

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

LETICIA MARGARETE DE MOLINER

**EFEITO TÓXICO DOS INSETICIDAS FIPRONIL E CLORPIRIFÓS EM TILÁPIA DO
NILO (*Oreochromis niloticus*)**

LAGES

2023

LETICIA MARGARETE DE MOLINER

**EFEITO TÓXICO DOS INSETICIDAS FIPRONIL E CLORPIRIFÓS EM TILÁPIA DO
NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, área de concentração em Gestão, Monitoramento e Controle Ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Indianara Fernanda Barcarolli.

LAGES

2023

Moliner, Leticia Margarete de
Efeito tóxico dos inseticidas fipronil e clorpirifós em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Leticia Margarete de Moliner.
-- 2023.
112 p.

Orientadora: Indianara Fernanda Barcarolli
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Lages, 2023.

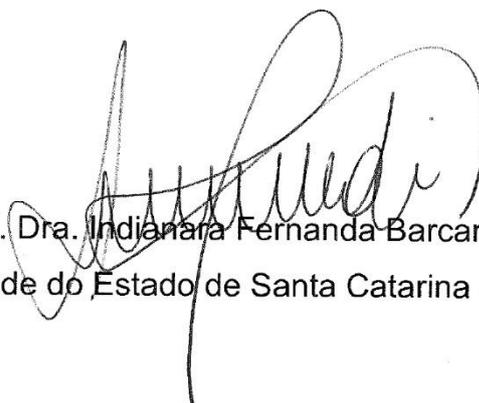
1. Agrotóxico. 2. Toxicologia ambiental. 3. Biomarcador. 4. Osmorregulação. 5. Estresse oxidativo. I. Barcarolli, Indianara Fernanda. II. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. III. Título.

LETICIA MARGARETE DE MOLINER

**EFEITO TÓXICO DOS INSETICIDAS FIPRONIL E CLORPIRIFÓS EM TILÁPIA DO
NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, área de concentração em Gestão, Monitoramento e Controle Ambiental.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dra. Indianara Fernanda Barcarolli
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membros:



Prof. Dra. Marta Marques de Souza
Universidade Federal do Rio Grande – FURG



Prof. Dra. Natalia Carolina Moraes Ehrhardt Brocardo
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Lages, 31 de janeiro de 2023.

Dedico este trabalho aos meus pais, Margarete e Helio, por proporcionar condições, ensinamentos e apoio para que eu possa seguir a minha trajetória. Ao meu irmão Elias, por estar presente em todos os momentos e celebrar as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela proteção proporcionada, por estar sempre presente em minha vida e por colocar pessoas tão especiais no meu caminho.

Aos meus pais, Margarete e Helio, por todo apoio, amor e incentivo proporcionados para que eu possa seguir em busca dos meus objetivos.

Ao Elias e à Janaína, por estarem presentes em todos os momentos, sempre me incentivando a buscar os meus sonhos. Vocês foram essenciais para que eu concluísse esse curso.

Ao Elias Francisco e à Diana, por me alegrarem de modo tão especial.

À minha orientadora, Prof. Dra. Indianara, por toda a orientação, paciência, dedicação e ensinamentos proporcionados neste estudo. Agradeço por ser essa pessoa incrível, que mesmo diante de tantos desafios, esteve sempre presente, me incentivando e proporcionando condições para que este estudo fosse concluído.

Ao grupo “Trio de seis”, composto pela Cristiane, Emili, Isadora e Nicole, por toda a ajuda e apoio ao longo do curso, por tantas risadas e experiências compartilhadas, tornando esse período mais leve, e, em especial, à Jéssica, minha parceira de orientadora, pelas conversas e pelo incentivo, principalmente, ao decorrer deste experimento.

À Alaide, Thalia, Raquel e, principalmente, ao Manoel, por toda a ajuda no laboratório, que foi fundamental para que este experimento fosse realizado.

À Dra. Márcia, Thayssa e Suélin, pela troca de experiências e pela compreensão, que foram essenciais para nessa trajetória.

A todos os familiares e amigos que se fizeram presente no decorrer desse curso, compreendendo minha ausência e me apoiando em tantos momentos, e, ao Henrique, pela amizade, conversas e por todo o incentivo.

Aos Professores do Cav-Udesc, por compartilhar seus conhecimentos com excelência e pela prestatividade ao longo deste estudo.

Ao Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina (UNIEDU), pelo financiamento e apoio desta pesquisa.

"Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas."

Marie Curie

RESUMO

O uso excessivo de agrotóxicos promove inúmeros impactos ao meio ambiente, dentre os quais, destaca-se os efeitos tóxicos sobre as espécies não-alvo. Nesse sentido, para avaliação dos riscos ambientais dos agrotóxicos, o emprego de técnicas da toxicologia ambiental se faz necessária, pois é imprescindível conhecer os efeitos tóxicos que determinados contaminantes podem ocasionar ao meio ambiente. Por meio da utilização de bioindicadores e biomarcadores, é possível obter informações sobre os efeitos tóxicos causados pela exposição aos agrotóxicos. Assim, considerando que os inseticidas fipronil e clorpirifós são conhecidos por causarem diversos danos ao meio ambiente, o presente estudo teve por objetivo analisar os efeitos tóxicos da exposição aguda aos inseticidas fipronil e clorpirifós por meio de análises bioquímicas em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), observando os efeitos individuais e combinados dessa exposição. Para tanto, analisou-se as atividades enzimáticas da acetilcolinesterase (AChE), catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST), anidrase carbônica (AC) e Na^+ , K^+ - ATPase, nos tecidos do cérebro, brânquias e fígado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após exposição pelo período de 96 horas, bem como, verificou-se se a combinação dos inseticidas fipronil e clorpirifós apresenta efeito sinérgico ou antagônico. Os resultados demonstraram que a exposição individual do clorpirifós inibiu a atividade enzimática da AChE no tecido cerebral e da CAT no tecido hepático, enquanto sob efeito da exposição ao fipronil, a atividade da CAT cerebral e branquial foi inibida, sendo que, em ambas as exposições individuais aos compostos, a atividade da AC foi inibida no tecido das brânquias. A exposição à mistura de clorpirifós e fipronil inibiu a atividade hepática da CAT e da atividade cerebral e branquial da GST. A atividade enzimática da Na^+ , K^+ ATPase não foi detectada em nenhum dos grupos expostos ao clorpirifós e ao fipronil, e na mistura dos agrotóxicos. Assim, constatou-se que a exposição aos inseticidas clorpirifós e fipronil, tanto individual quanto em associação, ocasionou estresse oxidativo em *Oreochromis niloticus*. Considerando a inibição da atividade enzimática da AC nas brânquias sob efeito da exposição individual ao clorpirifós e fipronil, demonstrou-se que esses inseticidas possuem capacidade de interferir no processo de osmorregulação. Diante disso, conclui-se que os inseticidas clorpirifós e fipronil apresentam potencial efeito tóxico em juvenis de tilápia do Nilo, sendo que a

exposição aguda aos referidos inseticidas ocasionou estresse oxidativo e interferiu no processo de osmorregulação de *Oreochromis niloticus*.

Palavras-chaves: Agrotóxico; Toxicologia ambiental; Biomarcador; Osmorregulação; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The excessive use of pesticides fosters numerous impacts on the environment, among which we highlight the toxic effects on non-target species. In this sense, in assessing the environmental risks of pesticides, environmental toxicology is of great importance, because it is essential to know the toxic effects that certain contaminants can cause to the environment, and, using bioindicators and biomarkers, it is possible to obtain important data on the toxic effects caused by exposure to pesticides. Thus, considering that fipronil and chlorpyrifos insecticides are known to cause several environmental damages, the present study aimed to analyze the possible toxic effects of acute exposure to fipronil and chlorpyrifos insecticides through biochemical analysis in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), observing the individual and combined effects of acute exposure to fipronil and chlorpyrifos insecticides. To this end, the enzymatic activities of acetylcholinesterase (AChE), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), carbonic anhydrase (CA) and Na⁺, K⁺ - ATPase were analyzed in the tissues of the brain, gills, and liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after exposure to the insecticides for 96 hours, and whether the combination of the insecticides fipronil and chlorpyrifos has a synergistic or antagonistic effect. The results showed that the individual exposure of chlorpyrifos inhibited the enzymatic activity of AChE in brain tissue and CAT in liver tissue of Nile tilapia, while under the effect of fipronil exposure, brain and gill CAT activity was inhibited, and under both individual exposures to the compounds, AC activity was inhibited in the gill tissue. Exposure to the mixture of chlorpyrifos and fipronil inhibited hepatic CAT activity and brain and gill GST activity in Nile tilapia. The enzyme activity of Na⁺, K⁺ - ATPase was not detected in any of the groups exposed to chlorpyrifos and fipronil as well as in the mixture of both pesticides. Thus, exposure to the insecticides chlorpyrifos and fipronil, both individually and together, was found to cause oxidative stress in *Oreochromis niloticus*. Considering the inhibition of CA enzymatic activity in Nile tilapia gills under the effect of individual exposure to chlorpyrifos and fipronil, it was demonstrated that these insecticides can interfere in the osmoregulation process of Nile tilapia. Therefore, it concludes that chlorpyrifos and fipronil insecticides have a potential toxic effect on Nile tilapia juveniles, and acute exposure to these insecticides caused oxidative stress and interfered with the osmoregulation process in *Oreochromis niloticus*.

Keywords: Pesticides; Environmental Toxicology; Biomarker; Osmoregulation; Oxidative Stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura molecular do clorpirifós.....	24
Figura 2 – Estrutura molecular do fipronil.....	25
Figura 3 – <i>Oreochromis niloticus</i>	27
Figura 4 – Atividade da AChE no cérebro de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h.....	38
Figura 5 – Atividade da CAT no cérebro de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h.....	41
Figura 6 – Atividade da CAT nas brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h.....	42
Figura 7 – Atividade da CAT no fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h.....	44
Figura 8 – Atividade da GST no cérebro de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h.....	46
Figura 9 – Atividade da GST nas brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h.....	47
Figura 10 – Atividade da GST no fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h.....	49
Figura 11 – Atividade da AChE no cérebro de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao fipronil no período de 96 h.....	57
Figura 12 – Atividade da CAT no cérebro de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao fipronil no período de 96 h.....	59
Figura 13 – Atividade da CAT nas brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao fipronil no período de 96 h.....	60
Figura 14 – Atividade da CAT no fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao fipronil no período de 96 h.....	61
Figura 15 – Atividade da GST no cérebro de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao fipronil no período de 96 h.....	63
Figura 16 – Atividade da GST nas brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao fipronil no período de 96 h.....	64
Figura 17 – Atividade da GST no fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao fipronil no período de 96 h.....	65

Figura 18 – Atividade da AChE no cérebro de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h	74
Figura 19 – Atividade da CAT no cérebro de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h	76
Figura 20 – Atividade da CAT nas brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h	77
Figura 21 – Atividade da CAT no fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h	79
Figura 22 – Atividade da GST no cérebro de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h	80
Figura 23 – Atividade da GST nas brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h	81
Figura 24 – Atividade da GST no fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h	83
Figura 25 – Atividade da AC nas brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h	94
Figura 26 – Atividade da AC nas brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição ao fipronil no período de 96 h	95
Figura 27 – Atividade da AC nas brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações de clorpirifós para cada grupo	35
Tabela 2 – Concentrações de fipronil para cada grupo	53
Tabela 3 – Concentrações de clorpirifós e fipronil para cada grupo.....	70
Tabela 4 – Concentrações de clorpirifós para cada grupo	89
Tabela 5 – Concentrações de fipronil para cada grupo	89
Tabela 6 – Concentrações de clorpirifós e fipronil para cada grupo.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Anidrase carbônica
AChE	Acetilcolinesterase
Anova	Análise de variante
ATP	Trifosfato de Adenosina
C1	Clorpirifós 1
C2	Clorpirifós 2
C3	Clorpirifós 3
C4	Clorpirifós 4
CAT	Catalase
Cav	Centro de Ciências Agroveterinárias
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CO ₂	Dióxido de carbono
CTR	Controle
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Efeito esperado
EO	Efeito observado
F1	Fipronil 1
F2	Fipronil 2
F3	Fipronil 3
F4	Fipronil 4
GSH	Glutationa reduzida
GST	Glutationa-S-transferase
K	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
LDH	Lactato Desidrogenase
MgCL ₂ -6H ₂ O	Cloreto de magnésio
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
PEP	Fosfoenolpiruvato

pH Potencial hidrogeniônico

PK Piruvato Quinase

Udesc Universidade do Estado de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	AGROTÓXICOS.....	23
1.1.1	Clorpirifós	24
1.1.2	Fipronil	25
1.1.2.1	<i>Proibição do fipronil</i>	26
1.2	TILÁPIA DO NILO	27
1.3	BIOMARCADORES.....	28
1.4	OBJETIVOS	31
1.4.1	Objetivo geral	31
1.4.2	Objetivos específicos	31
1.5	ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	31
2	EFEITO TÓXICO DO INSETICIDA CLORPIRIFÓS EM TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>)	33
2.1	INTRODUÇÃO	33
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	34
2.2.1	Teste de toxicidade	34
2.2.3	Atividade da acetilcolinesterase	35
2.2.2	Atividade da catalase	36
2.2.4	Atividade da glutationala-S-transferase	36
2.2.5	Análise de proteínas totais	37
2.2.6	Análise estatística	37
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
2.3.1	Atividade da acetilcolinesterase	37
2.3.1.1	<i>Cérebro</i>	37
2.3.2	Atividade da catalase	40
2.3.2.1	<i>Cérebro</i>	40
2.3.2.2	<i>Brânquias</i>	41
2.3.2.3	<i>Fígado</i>	43
2.3.3	Atividade da glutationala-S-transferase	45
2.3.3.1	<i>Cérebro</i>	45
2.3.3.2	<i>Brânquias</i>	47

2.3.3.3	<i>Fígado</i>	48
2.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
3	EFEITO TÓXICO DO INSETICIDA FIPRONIL EM TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>)	52
3.1	INTRODUÇÃO	52
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	53
3.2.1	Teste de toxicidade	53
3.2.3	Atividade da acetilcolinesterase	54
3.2.2	Atividade da catalase	54
3.2.4	Atividade da glutationala-S-transferase	54
3.2.5	Análise de proteínas totais	55
3.2.6	Análise estatística	55
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.3.1	Atividade da acetilcolinesterase	56
3.3.1.1	<i>Cérebro</i>	56
3.3.2	Atividade da catalase	58
3.3.2.1	<i>Cérebro</i>	58
3.3.2.2	<i>Brânquias</i>	59
3.3.2.3	<i>Fígado</i>	61
3.3.3	Atividade da glutationala-S-transferase	62
3.3.3.1	<i>Cérebro</i>	62
3.3.3.2	<i>Brânquias</i>	63
3.3.3.3	<i>Fígado</i>	64
3.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
4	POSSÍVEIS EFEITOS DA MISTURA DOS INSETICIDAS CLORPIRIFÓS E FIPRONIL EM TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>)	68
4.1	INTRODUÇÃO	68
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	69
4.2.1	Teste de toxicidade	70
4.2.2	Atividade da acetilcolinesterase	71
4.2.3	Atividade da catalase	71
4.2.4	Atividade da glutationala-S-transferase	71
4.2.5	Análise de proteínas totais	72
4.2.6	Análise do sinergismo e antagonismo	72

4.2.7	Análise estatística	73
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.3.1	Atividade da acetilcolinesterase	73
4.3.1.1	<i>Cérebro</i>	73
4.3.2	Atividade da catalase	75
4.3.2.1	<i>Cérebro</i>	75
4.3.2.2	<i>Brânquias</i>	76
4.3.2.3	<i>Fígado</i>	78
4.3.3	Atividade da glutatona-S-transferase	79
4.3.3.1	<i>Cérebro</i>	79
4.3.3.2	<i>Brânquias</i>	81
4.3.3.3	<i>Fígado</i>	82
4.3.3	Efeito da mistura de clorpirifós e fipronil	84
3.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
5	EFEITO DOS INSETICIDAS FIPRONIL E CLORPIRIFÓS NA ATIVIDADE DA ANIDRASE CARBÔNICA EM TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>)	87
5.1	INTRODUÇÃO	87
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	88
5.2.1	Teste de toxicidade	89
5.2.2	Atividade da anidrase carbônica	91
5.2.3	Atividade do Na⁺, K⁺ - ATPase	91
5.2.4	Análise do sinergismo e antagonismo	92
5.2.5	Análise de proteínas totais	92
5.2.6	Análise estatística	93
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
5.3.1	Atividade da anidrase carbônica	93
5.3.2	Atividade da Na⁺, K⁺ - ATPase	97
5.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
6	CONCLUSÃO	101

1 INTRODUÇÃO

Conhecidas como causadoras de alterações e impactos ambientais, as atividades agrícolas possuem como principais contaminantes em águas superficiais e subterrâneas, os resíduos de agrotóxicos e fertilizantes. As perdas da produção agrícola e o controle de organismos danosos às plantações podem ser controladas com a utilização de agrotóxicos. No entanto, a disponibilidade de poluentes no solo, ar e água ocasionada pela ação do homem em atividades agrícolas faz com que o meio ambiente sofra contínua degradação (IGNÁCIO, 2018).

Os agrotóxicos são utilizados extensivamente para proteger a produção agrícola contra os danos causados por inúmeras pragas, contudo, os efeitos adversos dos agrotóxicos aos organismos não-alvo são bastante significativos, tendo potencial para atingir os ecossistemas não visados, como os recursos hídricos, afetando inúmeros organismos (KADAM; KUMARI, 2020; PATIL, 2016).

Os ecossistemas aquáticos que percorrem as áreas agrícolas ou industriais possuem uma alta probabilidade de serem contaminados, por causa do escoamento e lixiviação de águas subterrâneas, e pela variedade de agrotóxicos, os quais se tornam uma ameaça aos organismos de água doce, principalmente aos animais sensíveis, como os peixes. Logo, a exposição a longo prazo frente a essas substâncias, pode causar várias anormalidades e redução do tempo de vida dos organismos (KUMARI, 2020).

Os agrotóxicos que são utilizados constantemente na agricultura mundial podem afetar negativamente os organismos não-alvo, entre eles, os peixes. Nesse sentido, acredita-se que as espécies aquáticas que são cultivadas ou habitam em regiões próximas as áreas agrícolas se tornam cada vez mais ameaçadas pelos efeitos da exposição aos contaminantes. Desse modo, a presença de agrotóxicos em rios possui capacidade de se tornar prejudicial para os organismos, principalmente para os peixes, sendo que relevantes alterações nas enzimas antioxidantes de peixes podem ser observadas na exposição da mistura de inseticidas (BOJARSKI; WITESKA, 2020; DOURADO, 2019; NAZ *et al.*, 2019).

Os peixes vêm sendo utilizados frequentemente para detectar e analisar os efeitos biológicos de contaminantes presentes nos recursos hídricos, apresentando respostas letais e subletais aos contaminantes, uma vez que, são uns dos organismos prejudicados pela contaminação de agrotóxicos nos recursos hídricos. Esses

organismos são considerados bons indicadores para utilizar em monitoramento ambiental de sistemas aquáticos, pois ocupam posições diferentes dentro da cadeia alimentar, podendo transferir energia e biomassa entre os níveis tróficos, tornando-se relevantes pela possibilidade de bioacumulação e biomagnificação de contaminantes, que pode apresentar riscos para saúde dos consumidores. Ademais, os contaminantes e poluentes no meio ambiente podem ocasionar o estresse oxidativo e alterar as respostas moleculares, fisiológicas, comportamentais ou históricas (SANTANA; CAVALCANTE, 2016; SILVA *et al.*, 2018).

Nesse sentido, em peixes, as informações sobre o destino e ação dos metabólitos de agrotóxicos colaboram para a compreensão da interferência da toxicidade dessas substâncias e os riscos à qualidade ambiental, acrescentando a saúde dos organismos aquáticos e do homem, pois os estudos ecotoxicológicos são uma das formas de se obter essas informações (SANTANA; CAVALCANTE, 2016).

Em meio às inúmeras espécies de peixes empregadas em estudos de toxicidade ambiental, a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), é constantemente utilizada em testes de toxicidade por ser uma espécie presente em vários níveis tróficos, além da alta capacidade de bioacumulação de substâncias tóxicas (AMIN *et al.*, 2022). Os resultados obtidos por meio de ferramentas de análises são de grande importância na avaliação dos riscos ambientais de inseticidas para os peixes. Ademais, um exemplo de ferramenta de sucesso é associação de biomarcadores moleculares com bioindicadores aquáticos, os quais fornecem respostas complementares na investigação de efeitos de agrotóxicos nos peixes (GUEDES *et al.*, 2020).

A resposta ao estresse oxidativo é considerada um mecanismo adaptativo que permite ao organismo, conviver com o estresse ocasionado mantendo seu estado normal ou homeostático. Tal mecanismo é determinado por parâmetros antioxidantes e indicadores de estresse oxidativo medidos em tecidos dos organismos analisados (UÇAR *et al.*, 2020).

Embora os agrotóxicos mesmo em concentrações baixas e ambientalmente realistas representem risco aos peixes, ainda são escassos os dados referentes aos parâmetros de marcadores de estresse oxidativo em peixes diante da exposição aos agrotóxicos (BOJARSKI; WITESKA, 2020).

Entre os inseticidas comumente encontrados nos corpos d'água, encontra-se o clorpirifós, que foi detectado em produtos agrícolas de praticamente todo o mundo

(ZAHARAN *et al.*, 2018), e o fipronil que é amplamente utilizado no controle de pragas no Brasil. Ainda que o fipronil tenha potencial de riscos para afetar a nível populacional, os seus efeitos indiretos são raramente levados em consideração em processos de avaliação de risco, além disso, há falta de pesquisa e dificuldade em identificar e atribuir a causalidade, pois os efeitos indiretos do fipronil podem ser tão importantes quanto os efeitos diretos em vertebrados (GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015).

Os estudos que têm como objetivo analisar os efeitos de contaminantes e poluentes, principalmente os agrotóxicos, no meio ambiente exercem grande importância, tendo em vista que a liberação indiscriminada de produtos tóxicos no meio ambiente é um dos grandes problemas da atualidade (GHISI *et al.*, 2011).

A utilização de organismos vivos como bioindicadores para a avaliação de toxicidade é de suma importância para realizar a avaliação da contaminação de ambientes aquáticos. Da mesma forma, a interpretação dos efeitos de impactos antropogênicos sobre o ambiente por meio da avaliação da toxicidade dos compostos tóxicos, é de grande relevância (IGNÁCIO, 2018).

Quando as substâncias químicas estão em altas concentrações, os resultados se tornam perceptíveis, como por exemplo, a mortalidade de peixes. No entanto, é possível que esses produtos também causem alterações histológicas e fisiológicas que não são externalizadas nos organismos não-alvo, como os peixes sobreviventes à intoxicação aguda (IGNÁCIO, 2018). Além disso, o primeiro alvo de toxicidade de um produto, como os pesticidas, é o fígado, visto que é um órgão muito sensível a contaminantes ambientais, embora os efeitos dos contaminantes possam se manifestar em vários órgãos e tecidos do peixe (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016).

Os impactos ocasionados pelos agrotóxicos podem ser direto – por meio de sua toxicidade, ou indireto – a redução da oferta alimentar, por exemplo. Os efeitos subletais exercidos pelos inseticidas, em concentrações abaixo de causar mortalidade, vão desde os efeitos citotóxicos e genotóxicos até interferir na função imune que irá reduzir o crescimento e a reprodução do indivíduo. Um dos principais meios para identificar a toxicidade dos agrotóxicos nos peixes é a aplicação de testes de toxicidade, sendo que os testes padrão para os pesticidas em vertebrados terrestres é realizado por meio de um teste agudo com duração inferior a 96 h. O teste ocorre por intermédio da exposição da substância aos organismos, onde os indivíduos recebem o produto em determinadas concentrações pelo período estimado, e após,

são realizadas as análises que buscam identificar a possível toxicidade do agrotóxico (GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015).

Conforme inúmeros estudos apontam, o uso inadequado e em excesso de agrotóxicos causa diversos impactos ao meio ambiente, principalmente aos recursos hídricos, além disso, são poucos os estudos que relatam o efeito tóxico da combinação de agrotóxicos em peixes. Nesse sentido, os compostos a serem analisados, fipronil e clorpirifós, ingredientes ativos comumente utilizados no Brasil, podem influenciar significativamente nas atividades das enzimas de estresse oxidativo (catalase, glutathione-S-transferase), nas enzimas de osmorregulação (Na^+ , K^+ - ATPase, anidrase carbônica) e na enzima neurocomportamental (acetilcolinesterase).

Considerando que são poucos os estudos realizados com o tema em questão, a presente pesquisa tem por objetivo analisar o efeito tóxico da exposição aguda aos inseticidas fipronil e clorpirifós em tilápia do Nilo, por meio da avaliação da atividade das enzimas em brânquias, cérebro e fígado de tilápia do Nilo, a fim de verificar os efeitos causados pela exposição aguda dos inseticidas clorpirifós e fipronil. Ainda, buscou-se identificar se a utilização em conjunto dos inseticidas fipronil e clorpirifós apresentam efeito sinérgico ou antagônico. Ao fim, será possível identificar os efeitos tóxicos ocasionados pelos produtos e se a ação em conjunto potencializou ou não, os efeitos nos biomarcadores. Os resultados encontrados serão de relevância para a análise da saúde dos peixes, monitoramento ambiental e para o meio científico, visto que há poucos estudos que abordam esse tema. Destaca-se que é desconhecido demais estudos que analisaram a toxicidade da mistura de clorpirifós e fipronil em peixes, tornando-se o presente experimento pioneiro no assunto, possibilitando a referência para estudos futuros.

1.1 AGROTÓXICOS

Conforme o inciso I do art. 2º da Lei Federal n. 7.802, de 11 de julho de 1989, são considerados agrotóxicos e afins:

I - agrotóxicos e afins:

a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;

b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

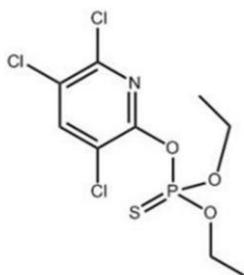
Entre as classes de agrotóxicos, encontra-se os inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, rodenticidas, entre outros, e em meio ao grupamento químico, destaca-se as principais categorias dos inseticidas: os organoclorados, organofosforados, carbamatos, neonicotinóides e piretróides (SANTANA; CAVALCANTE, 2016).

De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) (2021), o ingrediente ativo clorpirifós ocupou o 10º lugar entre os ingredientes ativos mais vendidos no ano de 2020, totalizando a venda de 8.864,88 toneladas, sendo dividido em: produção nacional (5491,40 t), importação (1439,14 t) e exportação (36,08 t). Já o fipronil, no mesmo ano, ocupou a 43ª posição dos ingredientes mais vendidos no Brasil, sendo que houve a produção nacional de 1555,63 t, importação de 503,78 t, exportação de 57,58 t, totalizando a venda de 2000,06 t do ingrediente ativo fipronil.

1.1.1 Clorpirifós

O clorpirifós (Figura 1) é um agrotóxico classificado como inseticida organofosforado, altamente tóxico e amplamente utilizado na agricultura, sendo comumente detectado em corpos hídricos e alimentos, conhecido como responsável por ocasionar danos ao sistema nervoso de animais (ANNA *et al.*, 2021; GÜL, 2005; MARQUES, 2019).

Figura 1 – Estrutura molecular do clorpirifós



Fonte: Fu (2022)

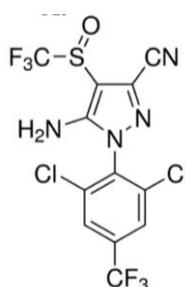
Os agrotóxicos organofosforados são bastantes utilizados, desempenhando um papel importante no processo de produção agrícola devido aos seus efeitos na prevenção da infecção por patógenos e no aumento da produtividade. Contudo, no início de sua produção, não foram considerados os efeitos tóxicos e a poluição ambiental que decorre da sua utilização. Assim, o uso excessivo de organofosforados ao longo dos anos desperta interesse para verificar seus perigos para o meio ambiente, principalmente água e solo, e a saúde animal (FU *et al.*, 2022).

Embora o clorpirifós seja um dos inseticidas mais tóxicos para o ecossistema aquático, apresentando efeitos nocivos sobre o estresse oxidativo em peixes, os mecanismos de toxicidade para os peixes ainda são poucos compreendidos (JIN *et al.*, 2015; YONAR, 2018).

1.1.2 Fipronil

O fipronil (Figura 2) é um inseticida fenilpirazol (MONTEIRO *et al.*, 2019), sendo um agrotóxico que elimina pragas e insetos que são resistentes a organofosforado, piretróides e carbamatos (MARGARIDO *et al.*, 2013), apresenta uma meia-vida longa e seus metabólitos podem persistir por muito mais tempo no ambiente do que o composto original (GONG *et al.*, 2021).

Figura 2 – Estrutura molecular do fipronil



Fonte: Trinh (2022)

O fipronil atua como bloqueador dos canais de cloreto junto aos receptores GABA (FERRO, 2014), intoxicando os animais por meio da ação inibidora no receptor pós-sináptico do ácido gama-aminobutírico, além disso, quando o fipronil ocasiona a inibição do GABA, ele vai interferir na entrada e saídas de moléculas, como a liberação da AChE (IGNÁCIO, 2018).

Esse inseticida está entre os agrotóxicos mais vendidos do mundo, sendo popular devido a sua alta toxicidade para vertebrados, longa persistência, flexibilidade e facilidade na aplicação e por sua origem sistêmica, a qual garante que se expande por toda a cultura alvo. Contudo, essas propriedades aumentam a chance de exposição aos organismos não-alvo e a contaminação ambiental (BONMATIN *et al.*, 2015).

O Brasil detém o título de maior produto de cana-de-açúcar, sendo esta cultura amplamente dependente da aplicação de agrotóxicos para sua manutenção. Entre os produtos químicos comumente aplicados na cultura de cana de açúcar-no-Brasil, o fipronil é um dos inseticidas que se destaca, motivo pelo qual, as consequências ambientais de sua aplicação merecem atenção (GRIPP *et al.*, 2017; MOREIRA *et al.*, 2021; VIANA *et al.*, 2022). Apesar da relevância, os estudos que analisam os mecanismos de acumulação e transformação relacionados ao tempo e tecidos específicos do fipronil em peixes são limitados (WANG *et al.*, 2022).

1.1.2.1 Proibição do fipronil

A Resolução de Diretoria n. 01, de agosto de 2021, da CIDASC – Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina, no seu art. 1º dispõe sobre a proibição do uso de agrotóxicos que contenham o princípio ativo fipronil na aplicação foliar, no estado de Santa Catarina:

Art. 1º - Proibir em todo território catarinense, para as modalidades de uso que envolvam aplicação foliar, a prescrição e a utilização dos produtos agrotóxicos que contenham em sua formulação o princípio ativo fipronil.

Parágrafo único - A restrição de uso previsto no caput deste artigo não se aplica para mudas florestais em ambientes de viveiro (SANTA CATARINA, 2021).

Embora tal restrição ocorreu no estado de Santa Catarina, ressalta-se que a Portaria de Consolidação GM/MS n. 5, de 28 de setembro de 2017, em seu art. 129 dispõe que: “o Anexo XX dispõe sobre o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade”, sendo que, no referido anexo, observa-se que o fipronil não consta na Tabela de Padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde (BRASIL, 2017).

Contudo, a Portaria GM/MS n. 888, de 4 de maio de 2021, alterou o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS n. 5/2017. Entre as alterações, verifica-se a

inclusão do fipronil na Tabela de Padrão de Potabilidade para Agrotóxicos e Metabólitos que representam risco à saúde, sendo o Valor Máximo Permitido (VMP) do parâmetro fipronil de 1,2 µg/L. Destaca-se que o parâmetro clorpirifós + clorpirifós-oxon apresenta o VMP de 30,0 µg/L (BRASIL, 2021).

Ante ao exposto, observa-se que o fipronil apresenta riscos ao meio ambiente, tendo sido proibida sua aplicação foliar no estado de Santa Catarina, demonstrando ser um agrotóxico que merece atenção quanto ao seu potencial toxicológico.

1.2 TILÁPIA DO NILO

Os animais aquáticos são organismos utilizados em monitoramento ambiental em todo o mundo, pois são considerados excelentes modelos genéricos para detectar alterações no meio ambiente. Entre as espécies de peixes, a espécie *Oreochromis niloticus* (Figura 3), popularmente conhecida como tilápia do Nilo, tem sido muito utilizada para avaliar os danos causados pelos agrotóxicos (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2015; GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015).

Figura 3 – *Oreochromis niloticus*



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A tilápia do Nilo é uma espécie com grande distribuição em ambientes tropicais, principalmente na América do Sul, Ásia e África (CHANDRASEKARA; PATHIRATNE, 2007). É uma espécie amplamente difundida, conhecida em todo o mundo, fornecendo assim, informações úteis para a avaliação de risco ecológico (ORUÇ,

2010), sendo considerada uma importante espécie indicadora de estudos de ecotoxicologia (GÜNAL *et al.*, 2020).

Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) (2014), a criação de tilápia é o tipo de aquicultura mais difundido no mundo, sendo registrada a sua produção em 135 países e territórios em todos os continentes. Em 2018, se tornou a terceira espécie mais produzidas na aquicultura mundial (FAO, 2020).

1.3 BIOMARCADORES

Os biomarcadores são indicadores da resposta da exposição a qualquer poluente, tóxico, produto químico ou qualquer outra substância. Podem ser avaliados em nível celular, molecular até ao nível do ecossistema ou comunidade. Os biomarcadores podem ser empregados com o objetivo de demonstrar os efeitos tóxicos da substância que o organismo foi exposto, como a toxicidade em sua neurologia, perfis histopatológicos, morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e hematológicos (ULLAH *et al.*, 2019).

Um das formas em que a toxicidade dos agrotóxicos age nos organismos, como os peixes, é por meio do estresse oxidativo. Durante o metabolismo dos agrotóxicos, são produzidas espécies reativas de oxigênio, as quais podem oxidar irreversivelmente as moléculas biológicas, originando o estresse oxidativo. Os antioxidantes agem inibindo o dano oxidativo para neutralizar os radicais livres doando elétrons, catalisando a quebra ou conversão de espécies oxidativas de oxigênio em componentes mais estáveis (DEYASHI; CHAKRABORTY, 2016).

Assim, o estresse oxidativo é utilizado como biomarcador sensível em avaliações ecotoxicológicas possibilitando compreender os efeitos adversos subjacentes. Para resistir ao dano oxidativo e proteger a célula de radicais livres, diferentes proteínas de estresse são produzidas, sendo o sistema de defesa oxidante composto por vários antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, e entre os principais antioxidantes enzimáticos, encontra-se a catalase e a glutathione-S-transferase. Durante o processo de desintoxicação pode ocorrer alterações nas espécies reativas de oxigênio nos componentes enzimáticos no organismo, indicando biomarcadores de estresse oxidativo na toxicologia dos agrotóxicos. Apesar do fato que as células estão equipadas com mecanismos de defesa antioxidante a fim de

desintoxicar os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio, ocorre dano celular quando há a produção de espécies reativas de oxigênio em excesso ou quando o sistema de defesa antioxidante não funciona perfeitamente (DEYASHI; CHAKRABORTY, 2016; ULLAH *et al.*, 2019).

Ademais, a biotransformação e bioacumulação são processos que modificam a toxicidade de produtos químicos que são facilmente metabolizáveis em organismos aquáticos. A avaliação da toxicidade e a previsão de substâncias tóxicas facilmente metabolizadas, pode certamente melhorar com a incorporação da biotransformação na modelagem de bioacumulação. Os mecanismos de biotransformação de xenobióticos podem causar alterações significativas no controle de várias funções corporais, fazendo com que os animais se tornem mais vulneráveis. (DOURADO, 2019; LI; YOU; WANG, 2018).

Uma enzima que desempenha papel fundamental na conjugação de xenobiótico e/ou seus metabólitos, é a glutathione-S-transferase que atua na fase II do processo de biotransformação, buscando transformar o xenobiótico, a fim de que os peixes possam excretá-lo. Vários produtos químicos, como agrotóxicos, induzem a atividade da glutathione-S-transferase como forma de proteção para os peixes expostos ao xenobiótico, tornando essa enzima um ótimo biomarcador para avaliar a presença de contaminantes no meio aquático (BATHIGE *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2016; NAZ *et al.*, 2019).

Não obstante, a atividade da catalase é uma resposta defensiva frente a produção de peróxido de hidrogênio durante a desintoxicação dos xenobióticos (HATAMI; BANAEI; HAGHI, 2019).

Além da GST e da CAT, a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) é umas das enzimas mais conhecidas e utilizada como biomarcador para estudos de poluição ambiental (GUPTA *et al.*, 2014; ORUC, 2012).

A acetilcolinesterase é produzida em neurônios colinérgicos e secretada na fenda sináptica, assim, está relacionada às membranas dos terminais axonais colinérgicos. A AChE é considerada como uma enzima de alta eficiência catalítica e alta taxa de hidrólise enzimática (IGNÁCIO, 2018). A inibição neuromuscular da acetilcolinesterase leva ao bloqueio da transmissão neural e ao aumento da acetilcolina nas terminações nervosas, que conseqüentemente, leva a diferentes inconsistências comportamentais. Essas alterações são geralmente associadas à

inibição da atividade da acetilcolinesterase nos músculos ou cérebro dos peixes e/ou no acréscimo no nível de acetilcolina (ULLAH *et al.*, 2019).

A exposição aguda a pesticidas organofosforados tem sua toxicidade primária associada à inibição da acetilcolinesterase nas sinapses colinérgicas e nas junções neuromusculares, pois os agrotóxicos organofosforados inibem a degradação enzimática do neurotransmissor acetilcolina, prolongando o estado ativado da célula pós-sináptica, assim, a AChE é considerada um bom biomarcador de exposição ao clorpirifós (ORUÇ, 2010; REINWALD *et al.*, 2022).

O processo biológico de osmorregulação é um mecanismo físico-químico que permite às células a perder ou ganhar fluídos, mantendo de forma ativa a quantidade de eletrólitos e fluídos no organismo com o ambiente, possibilitando que a pressão osmótica permaneça estável (PASCKE; LANZENDORF, 2017).

Nesse sentido, as enzimas Na⁺, K⁺ - ATPase e anidrase carbônica (AC) são enzimas relacionadas a absorção de íons, atuando na regulação osmo-iônica nas brânquias dos peixes, sendo de relevante importância na osmorregulação (HWANG; LEE, 2007; SAKURAGUI; SANCHES; FERNANDES, 2003).

A osmorregulação e ionorregulação em peixes é realizada principalmente pelos órgãos osmorreguladores, como as brânquias e rins, sendo que a Na⁺, K⁺ - ATPase atua no equilíbrio de íons e água (YANG *et al.*, 2016). A Na⁺, K⁺ - ATPase, em troca de dois K⁺ captados do meio extracelular por molécula de ATP hidrolasada, bombeia três íons Na⁺ para fora das células, fornecendo, também, força motriz para demais atividades osmorregulatórias, como o transporte de outros íons (KANAI *et al.*, 2013).

Por sua vez, a AC é uma metaloenzima amplamente difundida, que exerce um papel fundamental em vários processos fisiológicos, catalisando as reações reversíveis do dióxido de carbono e água: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$. Nas brânquias, a AC catalisa a hidratação reversível de CO₂ para fornecer HCO₃⁻ e H⁺, que atuam nos processos de transporte de íons e fundamentam a regulação sistêmica iônica e ácido-base. Diversos estudos demonstram a sensibilidade da anidrase carbônica *in vivo* e *in vitro* à exposição de inúmeros agrotóxicos em humanos e na vida selvagem, fornecendo informações sobre o alto potencial de interação de AC com inúmeras moléculas de agrotóxicos (GILMOUR, 2012; LIONETTO; CARICATO; GIORDANO, 2020).

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

O presente estudo tem por objetivo analisar os efeitos individuais e combinados da exposição aguda (96 h) aos inseticidas fipronil e clorpirifós por meio da análise de biomarcadores em brânquias, cérebro e fígado de peixes da espécie *Oreochromis niloticus*.

1.4.2 Objetivos específicos

a) Analisar atividades enzimáticas nos tecidos de tilápia do Nilo, a fim de identificar os possíveis efeitos tóxicos dos agrotóxicos clorpirifós e fipronil, determinando a atividade da:

a.1) acetilcolinesterase (AChE) no cérebro de *Oreochromis niloticus*, na exposição individual e combinada de fipronil e clorpirifós;

a.2) catalase (CAT) no cérebro, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus*, na exposição individual e combinada de fipronil e clorpirifós;

a.3) glutathione-S-transferase (GST) no cérebro, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus*, na exposição individual e combinada de fipronil e clorpirifós;

a.4) anidrase carbônica (AC) nas brânquias de *Oreochromis niloticus*, na exposição individual e combinada de fipronil e clorpirifós;

a.5) Na⁺, K⁺ - ATPase nas brânquias de *Oreochromis niloticus*, na exposição individual e combinada de fipronil e clorpirifós;

b) verificar o efeito sinérgico ou antagônico da combinação dos inseticidas clorpirifós e fipronil.

1.5 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

O presente trabalho é composto por quatro capítulos, além desta introdução e conclusão geral, que assim dispõem: três capítulos que analisam o estresse oxidativo sob efeito do clorpirifós, fipronil e da mistura de ambos em tilápia do Nilo, respectivamente, e após, no quinto capítulo, é analisado a toxicidade do fipronil,

clorpirifós e a combinação de ambos dos inseticidas, no processo de osmorregulação da tilápia do Nilo.

2 EFEITO TÓXICO DO INSETICIDA CLORPIRIFÓS EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

2.1 INTRODUÇÃO

O clorpirifós é um agrotóxico organofosforado utilizado no controle de pragas, sendo um inseticida comum em rios de água doce (ZAHNAN *et al.*, 2018), encontrado em produtos de pescas e sistemas agrícolas (ORUÇ, 2010; ORUC, 2012), apresentando alta toxicidade para os peixes de água doce (KUMARI, 2020). Além disso, a utilização abundante de inseticidas organofosforados, como o clorpirifós, vem gerando um aumento dos níveis residuais desses agrotóxicos nos ambientes aquáticos (EL-BOUHY; EL-HAKIM; MOHAMED, 2018).

Atualmente, os organofosforados tornaram-se uma parte indispensável na produção agrícola, contribuindo positivamente para o aumento do rendimento das culturas, até mesmo na vida residencial, onde os organofosforados tornaram-se uma arma eficaz para a desparasitação. Embora a utilização desses produtos proporciona benefícios reais, trazendo inúmeras vantagens, os agrotóxicos vêm sendo utilizados sem controle, ignorando as suas consequências, fazendo que os efeitos nocivos gradualmente se destaquem. Apesar de inúmeros países estarem investindo em políticas públicas voltadas à conscientização dos agrotóxicos, o uso de organofosforados inevitavelmente vem causando danos diretos ou indiretos aos seres humanos e ao meio ambiente (FU *et al.*, 2022).

Tendo em vista que os peixes têm um importante papel na cadeia alimentar, os estudos dos efeitos tóxicos dos agrotóxicos em peixes, como o clorpirifós, possui uma importância diagnóstica na avaliação dos efeitos adversos de agrotóxicos para a saúde humana. Já os efeitos subletais do clorpirifós em ambientes aquáticos podem causar alterações neurocomportamentais, morfológicas, oxidativas, bioquímicas, hematológicas, histológicas, alterações de desenvolvimento, entre outras. Além disso, os efeitos letais podem ocasionar a mortalidade em massa em organismos não-alvo em geral, e peixes em particular (KUMARI, 2020).

Nesse sentido, têm-se que os efeitos de longa duração são causados devido a exposição aguda a concentrações subletais de clorpirifós, gerando efeitos em diversos mecanismos de defesa dos peixes da espécie tilápia do Nilo (ZAHNAN *et al.*, 2018),

apresentando-se como um inseticida altamente tóxico para esta espécie (HOSSAIN *et al.*, 2022).

De acordo com Kumari (2020), é evidente que a presença de clorpirifós em ambientes aquáticos pode afetar a fauna aquática de várias maneiras, como alterações nas propriedades físico-químicas da água, entrada nas cadeias alimentares e danos fisiológicos aos tecidos vitais da fauna aquática, sendo que a alta toxicidade do clorpirifós apresenta efeito de ameaça à vida dos peixes em concentrações letais e subletais.

Diante das inúmeras possibilidades de efeito tóxico ocasionado pela exposição do inseticida clorpirifós no ambiente aquático, o presente estudo busca verificar o efeito tóxico agudo do inseticida clorpirifós em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), por meio das análises de atividade enzimáticas de acetilcolinesterase no tecido cerebral, da catalase e da glutathione-S-transferase nos tecidos do cérebro, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Centro de Ciências Agroveterinárias (Cav) da Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc), no Município de Lages, Santa Catarina, Brasil. Para o experimento, utilizou-se juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), adquiridos em piscicultura da região, com massa de $10,53 \pm 6,98$ g e comprimento de $7,94 \pm 2,32$ cm, os quais foram aclimatados pelo período de 36 (trinta e seis) dias, com aeração e temperatura constante. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, sendo que, após a alimentação *ad libitum* dos peixes, a água dos aquários era renovada.

2.2.1 Teste de toxicidade

Decorrido o período de aclimação, os peixes foram submetidos aos testes de toxicidade aguda (96 h), consistindo em cinco grupos distintos (Tabela 1). No teste de toxicidade foi aplicado o inseticida formulado comercialmente, composto por clorpirifós (48%) e xilol (50%).

Para a realização do teste de toxicidade, os peixes foram distribuídos aleatoriamente nos cinco aquários, contendo 20 L cada, com seis peixes por aquário.

Durante todo o teste, foi mantido o fotoperíodo de 12 h claro: 12 h escuro, com aeração constante, pH $8,61 \pm 0,07$, temperatura de $28,00 \pm 0,32$ °C, sendo que a água dos aquários não foi renovada e os peixes não foram alimentados durante todo o período do teste.

Tabela 1 – Concentrações de clorpirifós para cada grupo

Grupo	Sigla	Quantidade de clorpirifós (µg/L)
Controle	CTR	0,00
Clorpirifós 1	C1	0,5
Clorpirifós 2	C2	1
Clorpirifós 3	C3	3
Clorpirifós 4	C4	4

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Posterior ao período de 96 h do teste de toxicidade aguda, os peixes foram eutanasiados e coletados os tecidos: cérebro, brânquias e fígado. As amostras foram armazenadas em microtubo do tipo *Eppendorf* de 1,5 mL e mantidas sob refrigeração até o momento das análises enzimáticas. Todos os tecidos, com o auxílio do agitador mecânico, foram homogeneizados em solução de tampão fosfato de potássio (1,0 M e pH=7,0).

Inicialmente, realizou-se o teste de toxicidade aguda (96h) com as seguintes concentrações de clorpirifós: 0,015, 0,050, 0,075 e 0,1 mg/L. Contudo, os peixes não sobreviveram ao período do teste nas maiores concentrações do composto, havendo grande mortalidade nas primeiras horas do experimento. Tal concentração inicial foi baseada nos estudos realizados por Zahran *et al.* (2018) e Oruc (2012). Uma possibilidade para a mortalidade dos peixes no referido teste de toxicidade, seja devido a presença da substância xilol em conjunto com o clorpirifós.

No entanto, não foram encontrados testes de toxicidade com o xilol em peixes, motivo pelo qual, sugerimos a realização de estudos futuros com a utilização isolada de xilol no teste de toxicidade aguda em tilápia do Nilo, a fim de verificar seus efeitos na referida espécie.

2.2.3 Atividade da acetilcolinesterase

Para a determinação da atividade da acetilcolinesterase, utilizou-se o tecido do cérebro de tilápia do Nilo e foi empregado o método de Ellman *et al.* (1961), que consiste na determinação da taxa de produção de tiocolina.

Como substrato para o ensaio, utilizou-se 100 µL de iodeto de acetilcolina, que reage com 100 µL do reagente de cor 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), 100 µL do homogeneizado e 2 mL de tampão fosfato monopotássio (0,1 M e pH 7,0). Posterior a misturar os reagentes na cubeta, leu-se a absorbância a cada 30 segundos durante 2 minutos a 412 nm.

2.2.2 Atividade da catalase

A determinação da atividade da catalase foi realizada nos tecidos do cérebro, brânquias e fígado, e baseou-se na metodologia proposta por Beutler (1975). O ensaio consiste na utilização de 20 µL da amostra de tecidos já homogeneizados em tampão fosfato de potássio (1,0 M e pH=7,0), 20 µL de peróxido de hidrogênio e 2 mL de solução tampão (composto por Tris HCl 1M e EDTA 5 mM), que são adicionadas em cubeta de quartzo de 4 mL. Posterior, leu-se a cinética em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm.

2.2.4 Atividade da glutathiona-S-transferase

A determinação da atividade da glutathiona-S-transferase foi realizada nos tecidos do cérebro, brânquias e fígado, e baseou-se na metodologia proposta por Keen, Habig e Jakoby (1976), consistindo na complexação de glutathiona reduzida (GSH) com o substrato (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), que é catalisada pela GST presente na amostra.

Para tanto, preparou-se o tampão de reação, que consiste no tampão fosfato de potássio (0,1 M e pH 7,0), que é composto por fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico. Diluiu-se o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em álcool, e a GSH no tampão fosfato de potássio.

No ensaio, utilizou-se a cubeta de 4 mL e adicionou-se 2 mL do tampão de reação, 20 µL de CDNB, 20 µL de glutathiona reduzida (GSH) e 20 µL da amostra. Leu-se a amostra em espectrofotômetro, em 340 nm.

2.2.5 Análise de proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas nas amostras de cérebro, brânquias e fígado, com base no método de biureto, que consiste na utilização do reagente de biureto (composto por sulfato de cobre, citrato trissódico, carbonato de sódio e hidróxido de sódio) que reage com as proteínas da amostra, formando um complexo corado de cor azul, sendo proporcional a concentração proteica da amostra.

Nas cubetas de 4 mL, acrescentou-se 2 mL do reagente de biureto (marca Labtest) e 50 µL do homogeneizado das amostras. Ademais, preparou-se o padrão contendo 2 mL do reagente de biureto (40 mg/L) e 0,2 mL do reagente de cor. Leu-se o padrão e o teste em espectrofotômetro em 545 nm.

2.2.6 Análise estatística

Para a análise estatística, os resultados obtidos de cada atividade enzimática foram expressos em média e desvio padrão. Os resultados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk, a fim de verificar se sua distribuição é semelhante a uma distribuição normal. Consequente, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), objetivando identificar as possíveis diferenças entre os grupos, considerando valor- $p < 0,05$, e após, ao teste de comparação das médias encontradas, mediante a utilização do teste de Tukey, que analisou a diferença mínima significativa entre as médias, apontando quais diferem entre si, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Ademais, para os testes em que foi constatado a heterocedasticidade, realizou-se a transformação dos dados, conforme proposta por Box e Cox (1964). A análise estatística foi desenvolvida mediante a utilização dos *softwares* SAS e R Studio.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

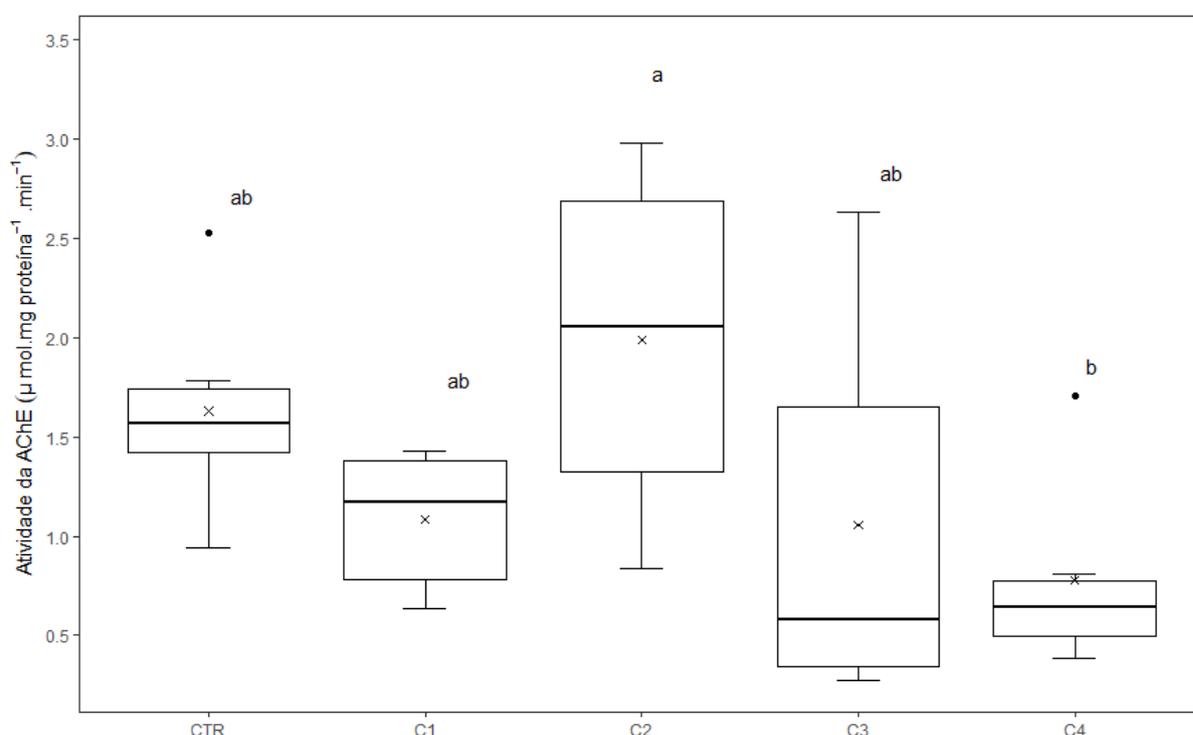
2.3.1 Atividade da acetilcolinesterase

2.3.1.1 Cérebro

A atividade da AChE no cérebro de *Oreochromis niloticus* sob o efeito do clorpirifós pelo período de 96 h é demonstrada na Figura 4. Os resultados do teste de

toxicidade quando submetidos à ANOVA demonstram que o inseticida clorpirifós afetou a atividade da AChE, tendo em vista que a diferença foi significativa ($p < 0,05$). Na concentração C4, se comparada com C2, ocorreu a inibição significativa da atividade da AChE, e, embora estatisticamente não houve diferença, observou-se que ocorreu o aumento da atividade da AChE em C2 e C3, e, em C4 ocorreu a redução da atividade da AChE, se comparada com o grupo controle. Conforme Fuller *et al.* (2021), o clorpirifós induz toxicidade por meio da inibição da acetilcolinesterase, a qual está relacionada a alterações no desenvolvimento de natação de peixes.

Figura 4 – Atividade da AChE no cérebro de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Situação similar ao presente estudo foi observada no experimento realizado por JIANG *et al.* (2022), em peixes zebras, no qual constataram que atividade da AChE no tecido do cérebro foi inibida em 56,9% na exposição ao clorpirifós, se comparada ao controle. Falfushynska *et al.* (2022) também constataram que atividade da AChE no cérebro de peixe zebra exposta ao clorpirifós foi inibida em todas as concentrações testadas do inseticida.

De acordo com Kavitha e Rao (2008), a inibição da AChE que ocasiona o acúmulo de acetilcolina nas junções sinápticas, pode estar correlacionada com o comportamento locomotor observadas nos peixes expostos ao clorpirifós.

Narra *et al.* (2017) observaram que, em *Clarias batrachus* expostas ao clorpirifós na concentração de 1,65 mg/L por um período de 15 dias, a atividade da AChE foi inibida no cérebro em 50% em comparação ao controle, sendo restaurada gradualmente até o dia 30.

A atividade cerebral da AChE em carpa comum, sob efeito da exposição ao clorpirifós, diminuiu significativamente (HATAMI; BANAEI; HAGHI, 2019). Em *Poecilia reticulata* expostas ao clorpirifós a atividade cerebral da AChE também foi inibida (SHARBIDRE; METKARI; PATODE, 2011). No estudo realizado por Jin *et al.* (2015), a atividade da AChE em larvas de peixes zebra foi menor se comparada com o controle.

Neste trabalho, observou-se que a concentração C2 e C3 tende a aumentar a atividade cerebral da AChE em tilápia do Nilo exposta ao clorpirifós. Esse aumento da atividade da AChE também foi constatado por Bonifacio *et al.* (2016) em *Cnesterodon decemmaculatus* expostas ao clorpirifós nas concentrações de 0.0084 µL/L e 0.00084 µL/L.

Já em *Daphnia magna* a atividade da AChE não foi afetada pela exposição de clorpirifós (FERRARIO *et al.*, 2018). Os peixes das espécies *Cnesterodon decemmaculatus* e *Cheirodon interruptus* quando expostos ao clorpirifós não apresentaram alterações significativas na atividade cerebral da AChE (BONIFACIO *et al.*, 2017).

Oruç (2010) determinou a concentração de 98,67 µg/L e 154,01 µg/L para a CL₅₀ de clorpirifós para juvenis de tilápia do Nilo. Logo, analisou concentrações subletais de clorpirifós-etílico (5, 10 e 15 ppb) por 15 e 30 dias, e em seguida, os peixes permaneceram em água limpa por 15 dias. Os dados demonstraram que o clorpirifós em concentrações baixas é capaz de causar inibição de 45,83 a 77,28% da atividade da AChE no tecido das gônadas, sendo que os peixes foram incapazes de superar o estresse a altas concentrações de clorpirifós, necessitando de 15 dias a mais para se recuperar, concluindo que o clorpirifós é capaz de induzir estresse oxidativo em *O. niloticus*.

No estudo realizado por Fuller *et al.* (2021), buscou-se verificar o potencial de transferência trófica de clorpirifós para *Hyalella azteca* (crustáceo) resistente a

organofosforado para o predador *Menidia beryllina*, em duas temperaturas (18 e 23 °C) por 7 dias. Os peixes alimentados com *H. azteca* dosados com clorpirifós variaram de 29,9 a 1250 ng/g de lipídios cerebral da AChE em peixes alimentados com *Hyaella azteca* na temperatura de 2 °C, demonstrando o potencial de transferência trófica, sendo que a maior bioacumulação ocorreu em peixes alimentados a 18 °C. Houve redução de 36,5% na atividade à 3 °C. Assim, o estudo demonstrou o potencial de transferência trófica de clorpirifós de presas resistentes a organofosforado para os peixes predadores, bem como o potencial de temperaturas elevadas para estimular os efeitos neurológicos do clorpirifós.

2.3.2 Atividade da catalase

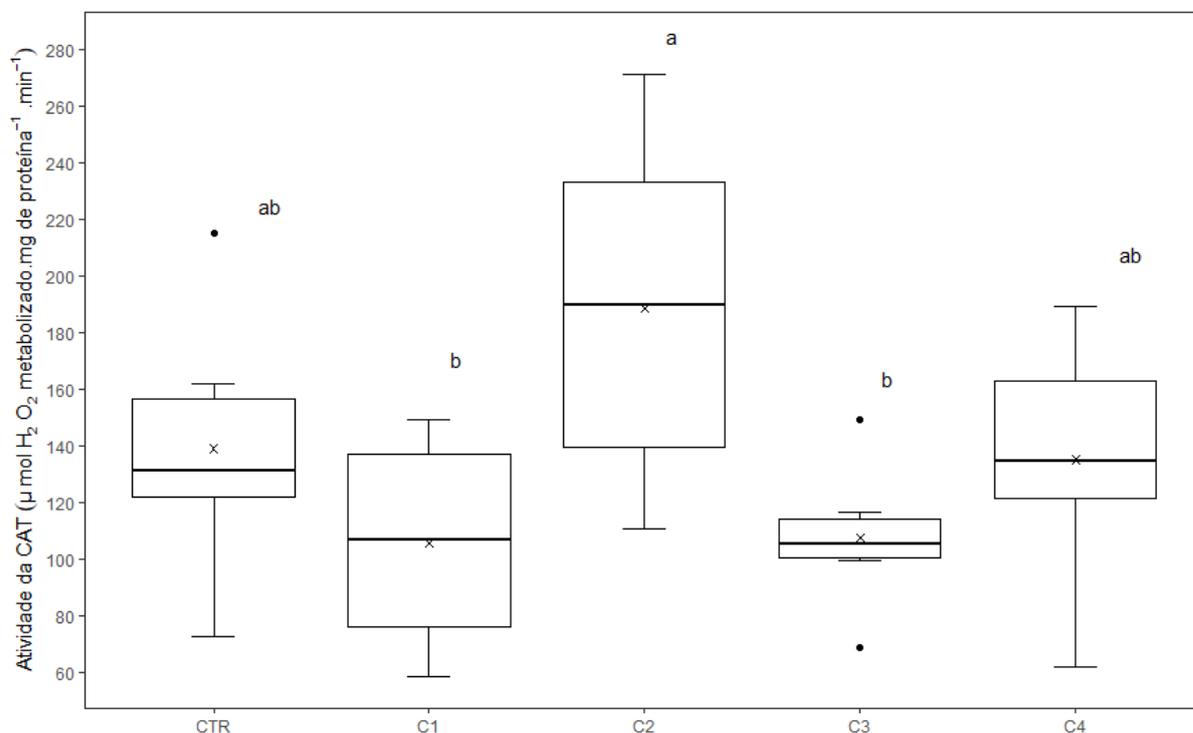
2.3.2.1 Cérebro

A atividade da CAT no cérebro de tilápia do Nilo apresentou diferença estatisticamente significativa quando os resultados foram submetidos ao teste da ANOVA ($p < 0,05$). No teste de toxicidade, observa-se que ocorreu inibição da atividade da CAT nos tratamentos C1 e C3 no cérebro de tilápia do Nilo na exposição ao clorpirifós, quando comparadas com C2, porém, quando comparados ao grupo controle, não há diferença estatisticamente significativa (Figura 5).

Situação similar ao presente estudo foi constatada por Xing *et al.* (2012), que analisaram a atividade da CAT no tecido cerebral de carpa capim após a exposição de 40 (quarenta) dias e observaram a inibição da atividade enzimática da catalase. Bonifacio *et al.* (2017) relataram a inibição da atividade cerebral da CAT em *Cheirodon interruptus* sob a exposição ao clorpirifós. A atividade cerebral da CAT em *Heteropneustes fossilis* também diminuiu significativamente sob a exposição ao clorpirifós (TRIPATHI; SHASMAL, 2010).

No entanto, há estudos que observaram a ativação da atividade da CAT no cérebro de peixes quando expostos ao clorpirifós. No cérebro de *Poecilia reticulata*, a atividade da CAT aumentou significativamente após a exposição de 96 h ao clorpirifós (SHARBIDRE; METKARI; PATODE, 2011). Jin *et al.* (2015) verificaram que a atividade da CAT aumentou significativamente quando as larvas do peixe. *Daphnia magna* quando expostas ao clorpirifós induziram o aumento da atividade da CAT (FERRARIO *et al.*, 2018).

Figura 5 – Atividade da CAT no cérebro de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h



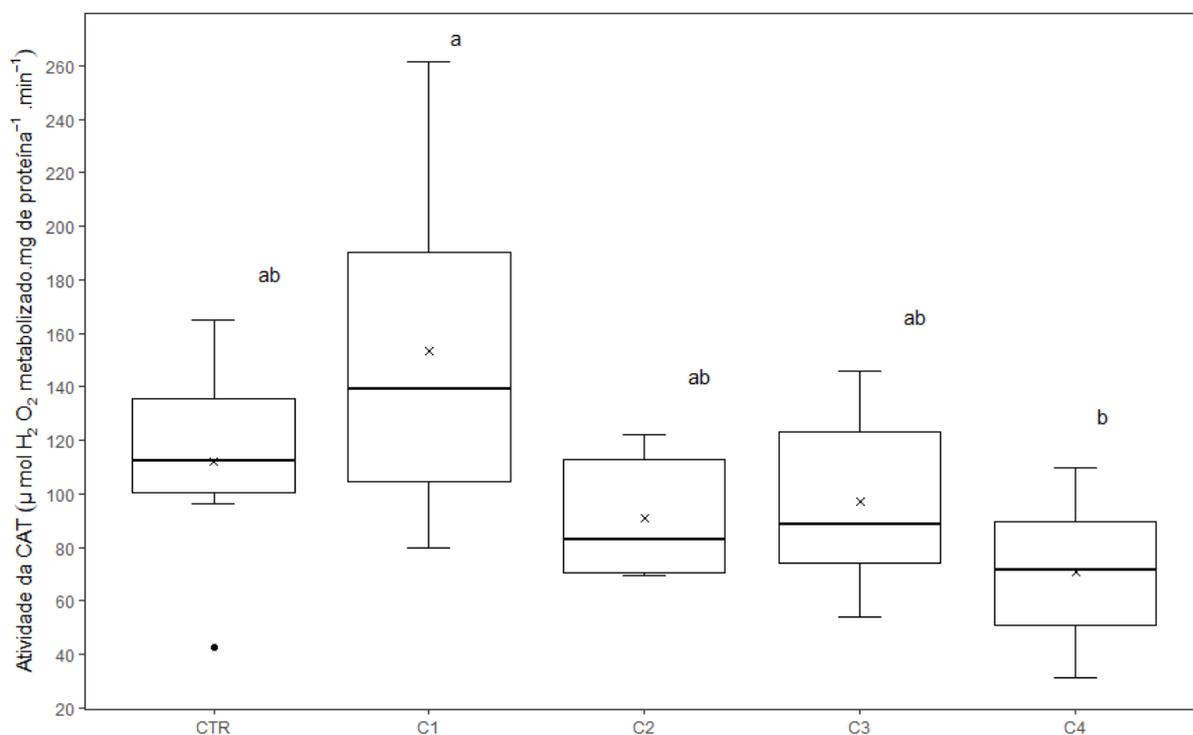
Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Jiang *et al.* (2022) analisam a atividade da CAT no tecido cerebral de peixe zebra após a exposição de clorpirifós e observam que a atividade não sofreu mudanças significativas. Em larvas de peixe-zebra, a exposição ao clorpirifós (200 $\mu\text{g/L}$) não trouxe mudança significativa entre tratamentos na atividade da CAT (ZHAO *et al.*, 2022). Já a atividade cerebral de CAT em *Cnesterodon decemmaculatus*, não foi detectada (BONIFACIO *et al.*, 2017).

2.3.2.2 Brânquias

No presente estudo, tilápias do Nilo quando exposta ao clorpirifós pelo período de 96 h, a atividade da CAT nas brânquias apresentou os resultados expostos na Figura 6, os quais foram submetidos à ANOVA e apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Na concentração C4, a atividade da CAT diminuiu significativamente, quando comparada com C1.

Figura 6 – Atividade da CAT nas brânquias de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Sob a exposição de clorpirifós, a atividade da CAT nas brânquias de *Cyprinus carpio carpio* diminuiu significativamente (YONAR *et al.*, 2012). A atividade da CAT nas brânquias em *Heteropneustes fossilis* foi inibida quando expostas ao clorpirifós (TRIPATHI; SHASMAL, 2010). Yonar (2018) também verificou a inibição significativa da CAT em brânquias de carpa comum sob a exposição do clorpirifós.

Já Sharbidre, Metkari e Patode (2011) observaram o aumento da atividade da CAT nas brânquias de *Poecilia reticulata* quando expostas ao clorpirifós.

No entanto, após a exposição ao clorpirifós, a atividade da catalase nas brânquias no peixe zebra não apresentou diferenças significativas (JIANG *et al.*, 2022). Os peixes da espécie *Cheirodon interruptus* quando expostos ao clorpirifós não apresentaram diferença estatisticamente significativa na atividade da CAT nas brânquias (JIANG *et al.*, 2022). A atividade da CAT nas brânquias de *Cnesterodon decemmaculatus* também não sofreu mudanças sob a exposição do clorpirifós (BONIFACIO *et al.*, 2017).

Zahran *et al.* (2018) analisaram as alterações imunotóxicas, hematológicas e patológicas na tilápia do Nilo, durante e após a exposição a clorpirifós (48%) em duas concentrações (15 e 75 µg/L) por 14 dias, seguidos de 2 semanas de recuperação, fornecendo informações importantes sobre os efeitos tóxicos do clorpirifós aos peixes. Entre os resultados, verificou-se que nas brânquias a atividade da CAT diminuiu significativamente na maior concentração de clorpirifós, e posterior a recuperação, o nível de CAT não apresentou mudanças significativas entre os grupos.

Em um cenário diferente, Chen *et al.* (2021) analisaram carpas comuns (*Cyprinus carpio L.*) expostas ao clorpirifós em concentrações de 1,16 µg/L, 11,6 µg/L e 116 µg/L, sendo que, no 30º dia, as brânquias foram coletadas para análise. Nas observações ultraestruturais e histopatológicas foi possível observar características de necrose e lesão inflamatória nos grupos tratados com clorpirifós. Tal experimento concluiu que a exposição ao clorpirifós promoveu lesão inflamatória e evocou necroptose em brânquias de carpa comum.

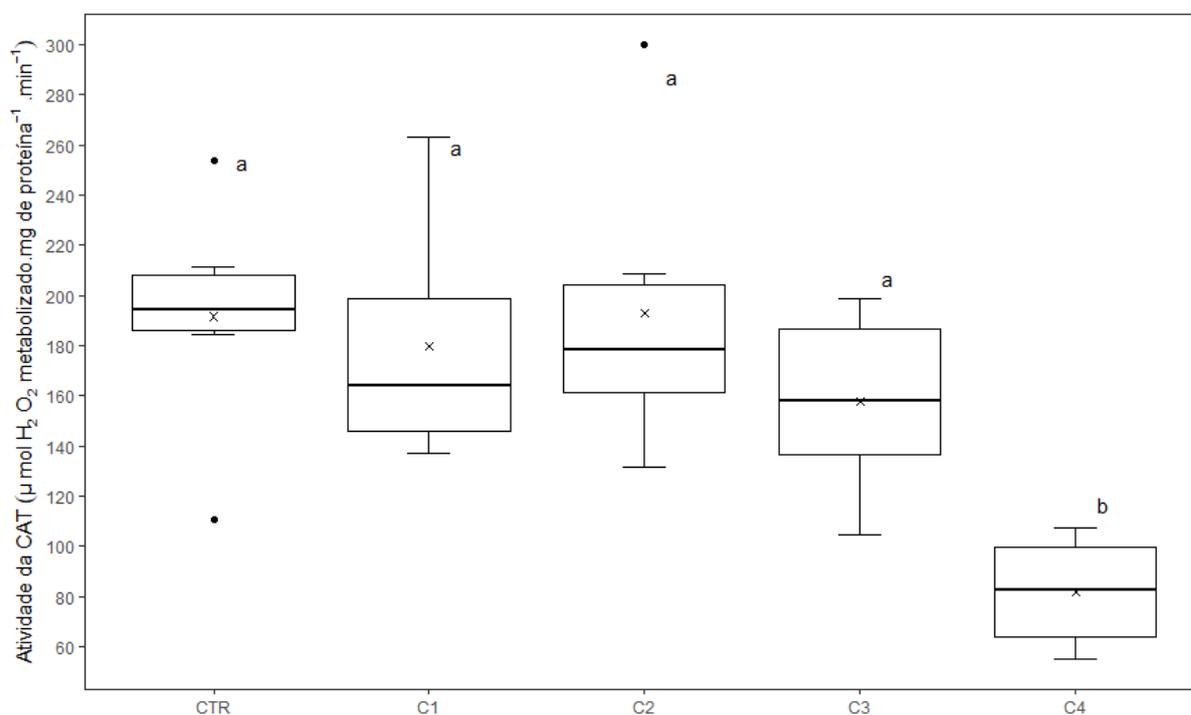
2.3.2.3 Fígado

Realizado o teste toxicidade aguda com o inseticida clorpirifós, a atividade da CAT no fígado de tilápia do Nilo apresentou os resultados dispostos na Figura 7. Observa-se que clorpirifós na concentração C4 apresentou inibição significativa da atividade da CAT, se comparada com as demais concentrações testadas. Ademais, os resultados quando submetidos a ANOVA apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, demonstrando que o clorpirifós interfere na atividade enzimática da catalase no fígado de tilápia do Nilo.

A inibição da atividade hepática da CAT também foi observada em peixes de diversas espécies sob a exposição do clorpirifós. Em *Heteropneustes fossilis*, ocorreu a inibição da atividade hepática da CAT quando os peixes foram expostos ao clorpirifós (TRIPATHI; SHASMAL, 2010).

A atividade da CAT no fígado de *Cyprinus carpio carpio* foi inibida significativamente sob a exposição de clorpirifós (YONAR *et al.*, 2012). *Cnesterodon decemmaculatus* quando expostas ao clorpirifós, apresentaram inibição da atividade da CAT no fígado (BONIFACIO *et al.*, 2017). A atividade hepática da CAT em carpa comum sob a exposição do clorpirifós, nas concentrações de 0,040 e 0,080 mg/L, também foi inibida significativamente (YONAR, 2018).

Figura 7 – Atividade da CAT no fígado de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Após a exposição a clorpirifós em 15 e 75 $\mu\text{g/L}$ por 14 dias, seguidos de 2 semanas de recuperação, Zahran *et al.* (2018) analisaram a atividade da CAT no fígado de tilápia do Nilo e constaram que a atividade da CAT aumentou em ambos os casos, sendo significativa na maior concentração de clorpirifós, se comparada com o controle. A atividade hepática da CAT em *Poecilia reticulata* também foi aumentada sob a exposição ao clorpirifós (SHARBIDRE; METKARI; PATODE, 2011).

Cnesterodon decemmaculatus quando exposta ao clorpirifós, foi verificado o aumento significativo da atividade da CAT no fígado se comparada ao controle (BONIFACIO *et al.*, 2016). A atividade da CAT no fígado de carpa capim aumentou significativamente quando exposta a clorpirifós (HATAMI; BANAEI; HAGHI, 2019). A atividade hepática da CAT em *Clarias batrachus* também foi significativamente ativada sob efeito da exposição de clorpirifós (NARRA *et al.*, 2017).

Além disso, em alguns estudos foi observado que o clorpirifós não afetou significativamente a atividade hepática da CAT. Nesse sentido, peixes zebra quando expostos ao clorpirifós não apresentaram diferenças significativas na atividade da

CAT no do fígado (JIANG *et al.*, 2022). A atividade da CAT no fígado de *Cheirodon interruptus* não apresentou alterações significativas após a exposição ao clorpirifós (BONIFACIO *et al.*, 2017).

Quanto à presença de clorpirifós nos recursos hídricos, no estudo realizado por Chierichetti *et al.* (2021), *Callorhinchus callorynchus* foram coletados nas águas costeiras da Argentina, nos quais foram verificados a acumulação de poluentes orgânicos persistentes e clorpirifós. Os resultados do experimento demonstraram que essa espécie pode concentrar os poluentes e o clorpirifós no músculo, gônadas e fígado, refletindo um histórico recente de contaminação nos seus tecidos.

2.3.3 Atividade da glutiona-S-transferase

2.3.3.1 Cérebro

Tilápia do Nilo após exposta ao clorpirifós por 96 h, para o cérebro, apresentou os resultados constantes na Figura 8. Os resultados dos testes de toxicidade aguda foram submetidos a ANOVA ($p < 0,05$) e não apresentaram diferenças significativas. Quando as médias foram submetidas ao teste de Tukey ($p < 0,05$), também não houve diferença estatisticamente significativa.

Embora a estatística não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os testes realizados, observa-se que ocorreu uma pequena inibição da atividade enzimática em C1 e C2, seguido por um leve aumento em C3 e C4.

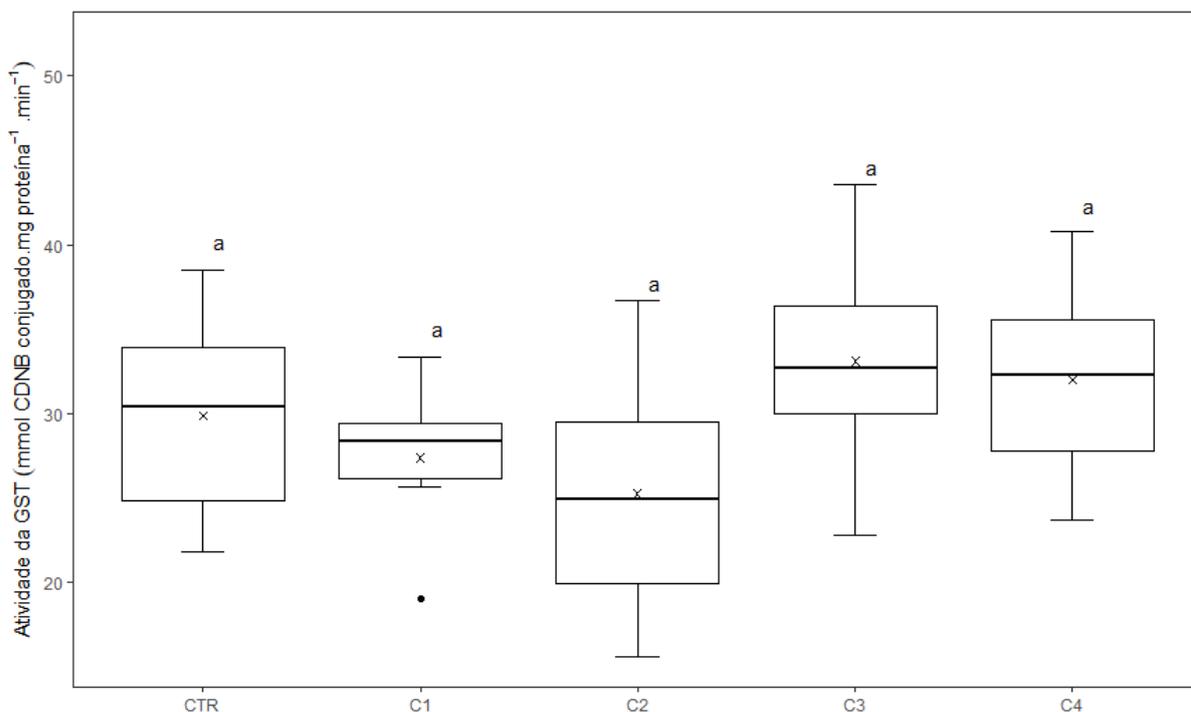
Similar ao observado no presente estudo, a atividade da GST cerebral de *Poecilia reticulata* quando exposta ao clorpirifós, foi inibida na menor concentração de clorpirifós, e aumentou gradualmente com o aumento da concentração de clorpirifós (SHARBIDRE; METKARI; PATODE, 2011).

Outrossim, no cérebro de *Cnesterodon decemmaculatus*, a atividade da GST não foi detectada (BONIFACIO *et al.*, 2017).

Jiang *et al.* (2022) verificaram que a exposição ao clorpirifós não ocasionou diferença estatisticamente significativa na atividade da GST no tecido cerebral de peixe zebra quando exposto ao clorpirifós. Após a exposição de clorpirifós, a atividade cerebral da GST em *Cnesterodon decemmaculatus* não sofreu diferença estatisticamente significativa (BONIFACIO *et al.*, 2016). A atividade da GST também

não apresentou mudanças no tecido cerebral de *Cheirodon interruptus* frente à exposição de clorpirifós (BONIFACIO *et al.*, 2017).

Figura 8 – Atividade da GST no cérebro de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

A pesquisa realizada por El-Bouhy, El-Hakim e Mohamed (2018), considerou a concentração subletal (1,32 e 2,64 $\mu\text{g/L}$) de clorpirifós (48% de pureza) na exposição de 96 h de alevinos de *O. niloticus* que levou o imunológico, bioquímico e DNA a interferir com o antioxidante de defesa. Entre os resultados, os autores observaram declínio antioxidantes, representado pela glutathione. Por fim, concluíram que exposição crônica de juvenis de tilápia do Nilo ao clorpirifós possui potencial para causar efeitos nocivos, sendo que, depois de 8 semanas houve 35 e 60% de mortalidade dos peixes.

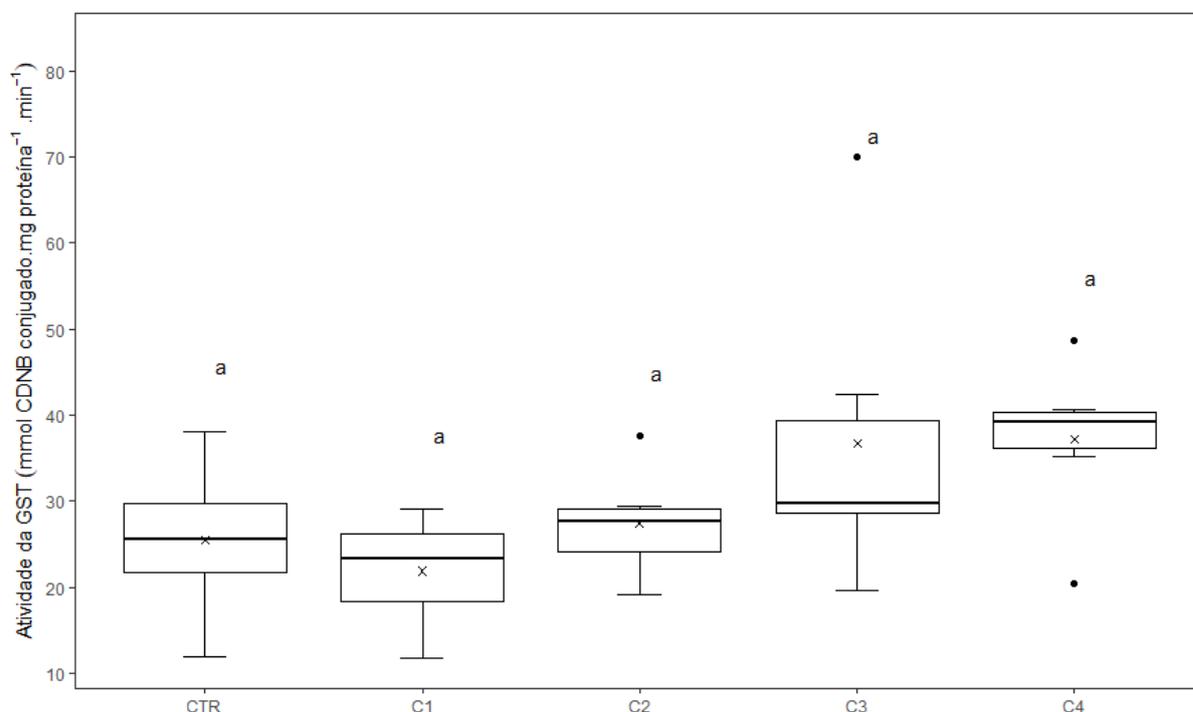
Oruç (2010) analisou a atividade da GST de juvenis de tilápia do Nilo em concentrações subletais de clorpirifós-etílico (5, 10 e 15 ppb) por 15 e 30 dias, a após a recuperação em água limpa por 15 dias. A atividade da GST nos tecidos gonodais não foi afetada pela exposição do clorpirifós nos primeiros 15 dias, mas diminuiu em

todas as concentrações após 30 dias exposição ao inseticida, e após o período de depuração, foi observada recuperação significativa da atividade enzimática.

2.3.3.2 Brânquias

Os resultados da atividade enzimática da GST no tecido das brânquias após a exposição aguda ao clorpirifós, foram expostos na Figura 9. Os resultados quando submetidos ao teste da ANOVA não apresentaram diferença estatisticamente significativa, demonstrando que o inseticida clorpirifós não provocou alterações significativas nas brânquias de tilápia do Nilo. Todavia, os resultados foram analisados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias do teste de toxicidade aguda, porém, em C2, C3 e C4 é possível observar um leve aumento da atividade da GST.

Figura 9 – Atividade da GST nas brânquias de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Não obstante, em brânquias de peixes zebra, a exposição ao clorpirifós não afetou significativamente a atividade da GST (JIANG *et al.*, 2022). Bonifacio *et al.*

(2016) também verificaram que a atividade da GST no tecido das brânquias de *Cnesterodon decemmaculatus* não sofreu alterações significativas na exposição ao clorpirifós, mas observaram uma tendência na ativação da atividade enzimática da GST. Sob o efeito de clorpirifós, a atividade da GST não apresentou mudanças significativas nas brânquias de *Cheirodon interruptus* (BONIFACIO *et al.*, 2017).

Outrossim, a atividade da GST foi alterada significativamente no tecido das brânquias de *Cnesterodon decemmaculatus* após a exposição ao clorpirifós (BONIFACIO *et al.*, 2017).

Zahran *et al.* (2018) observaram que nas brânquias de tilápias do Nilo, quando exposta ao inseticida clorpirifós (15 e 75 µg/L) por 14 dias, e posterior, 2 semanas de recuperação, ocorreu inibição significativa de GST em ambas as concentrações de clorpirifós, sendo a maior inibição na menor concentração. Após a recuperação, não houve diferenças significativas entre os grupos. Em larvas de peixe zebra, a atividade da GST diminuiu significativamente se comparada ao controle (JIN *et al.*, 2015).

Nas brânquias de *Poecilia reticulata*, a atividade da GST aumentou na dose com menor concentração de clorpirifós, e na maior concentração do inseticida, a atividade da GST foi inibida (SHARBIDRE; METKARI; PATODE, 2011).

A atividade da GST em brânquias de carpa comum aumentou significativamente após a exposição dos peixes ao clorpirifós (YONAR, 2018). Em *Daphnia magna* sob a exposição ao clorpirifós, a atividade da GST também foi ativada (FERRARIO *et al.*, 2018).

Já a pesquisa realizada por Ghayyur *et al.* (2019), apresentou resultados que revelam a exposição ao pesticida clorpirifós por 96 h em diferentes concentrações (0.25, 0.75 e 1.25 ppb) que causam diversas alterações, como o aumento significativo dos eritrócitos, glicemia e nível de cortisol, enquanto ocorre a diminuição dos leucócitos, proteína total, plaquetas e triglicerídeos no *Oreochromis mossambicus*, confirmando que a presença de clorpirifós no ecossistema aquático é tóxica para *O. mossambicus*.

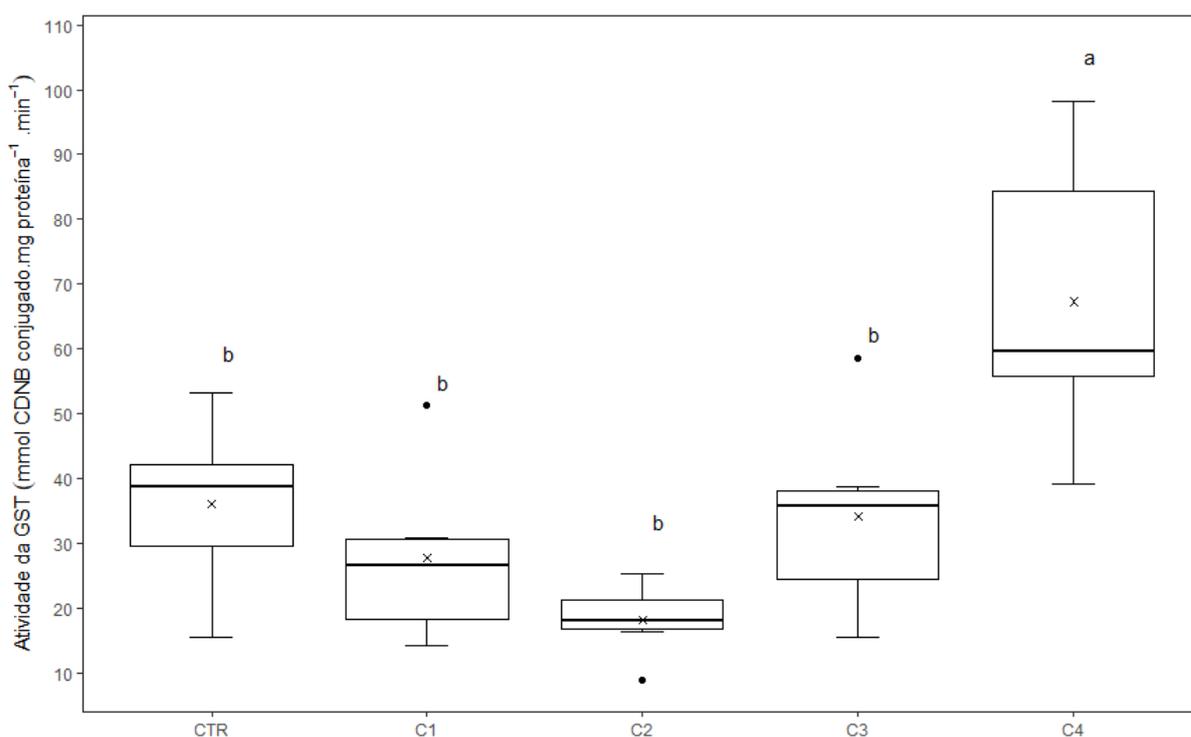
2.3.3.3 Fígado

Os resultados da atividade enzimática da GST no tecido do fígado após a exposição aguda ao clorpirifós foram apresentados na Figura 10. Os resultados dos testes foram submetidos à ANOVA e apresentaram diferenças estatisticamente

significativas. Ademais, quando analisados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), C4 apresentou diferenças significativas dos demais testes, sendo que, em C4, ocorreu o aumento estatisticamente significativo da atividade enzimática GST.

O aumento da atividade da GST também foi constatado em peixes de espécies diversas. Em carpa comum sob o efeito do clorpirifós, a atividade da GST no fígado foi ativada significativamente (YONAR, 2018). Em *Poecilia reticulata*, a atividade hepática da GST foi ativada gradualmente conforme aumentada a dose de clorpirifós (SHARBIDRE; METKARI; PATODE, 2011). Amiri *et al.* (2018) observaram aumento significativo do mRNA hepático de GST em truta arco-íris após a exposição ao clorpirifós (concentrações de 0,00 a 160 $\mu\text{g/L}$).

Figura 10 – Atividade da GST no fígado de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Zahram *et al.* (2018) observaram a atividade da GST em tilápia do Nilo após a exposição ao clorpirifós, nas concentrações de 15 e 75 $\mu\text{g/L}$ por duas semanas, seguidos de 2 semanas de recuperação, e constataram que a atividade da GST no fígado de peixe zebra foi inibida nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g/L}$ e 3 $\mu\text{g/L}$ de clorpirifós,

quando comparada ao grupo controle, e após a recuperação, não houve diferença estatisticamente significativa (FALFUSHYNSKA *et al.*, 2022).

Em larvas de peixe-zebra quando exposta ao clorpirifós (200 µg/L), Zhao *et al.* (2022) observaram que ocorreu o aumento da atividade GST, sendo que, o clorpirifós em conjunto com a catequina, ocasionaram a inibição da atividade GST, indicando que a catequina reduziu o estresse oxidativo de larvas de peixe-zebra expostas ao clorpirifós. No fígado de *Clarias batrachus*, a atividade da GST foi ativada após a exposição de clorpirifós pelo período de 15 dias (NARRA *et al.*, 2017).

Botté *et al.* (2012) analisaram a atividade da GST no fígado de juvenis de *Acanthochromis polyacanthus* após a exposição de 96 h ao clorpirifós em concentrações de 1, 10 ou 100 µg/L, e constataram que a atividade da GST não foi afetada significativamente pela presença de clorpirifós. Em *Cnesterodon decemmaculatus*, a atividade hepática da GST não apresentou alterações significativas sob o efeito do clorpirifós (BONIFACIO *et al.*, 2017).

Em peixes zebra, não foi verificado diferença estatisticamente significativa da atividade da GST no fígado após a exposição ao inseticida clorpirifós (JIANG *et al.*, 2022). *Cheirodon interruptus* sob o efeito de clorpirifós não apresentou alterações significativas da atividade de GST hepática (BONIFACIO *et al.*, 2017).

Bonifacio *et al.* (2016) analisaram a atividade de GST no fígado de *Cnesterodon decemmaculatus* após a exposição de clorpirifós e verificaram que a atividade enzimática não sofreu alterações significativas, porém, observaram uma tendência na inibição da GST.

Diante da diferença da atividade enzimática observada entre as espécies, de acordo com Botté *et al.* (2012), é possível que a resposta da atividade da GST diante da exposição ao clorpirifós seja dependente da espécie, pois, diferentes espécies podem utilizar mecanismos diferentes para reagir a exposição de clorpirifós. Além disso, a atividade da GST pode depender da duração da exposição do agrotóxico.

Ademais, El-Bouhy *et al.* (2016) realizam experimentos para analisar a resposta de tilápia do Nilo: coletaram água de duas pisciculturas, na qual analisaram o nível de clorpirifós por meio de cromatógrafo gasoso; determinação de toxicidade aguda (96 h); e resposta imune de tilápia do Nilo na exposição de clorpirifós. Assim, demonstraram que a CL₅₀ de clorpirifós foi de 0,07 mg/L (analisaram 0-0,18 mg/L de clorpirifós) e que a concentração de clorpirifós (0,008, 0,0035 e 0,0016 mg/L de clorpirifós que representa 1/8, 1/20 e 1/43 de CL₅₀) alterou os parâmetros

imunológicos (globulina total, imunoglobulina M, lisozima, óxido nítrico, atividade fagocítica e interleucina-1 β) de tilápia do Nilo. Por fim, concluíram que o inseticida clorpirifós tem efeito tóxico, bem como alterou os parâmetros imunológicos de *O. niloticus*.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, verifica-se que o clorpirifós afetou significativamente a atividade da AChE no cérebro de tilápia do Nilo, sendo observado a ativação enzimática nas menores concentrações, e a inibição enzimática na maior concentração de clorpirifós.

Referente a atividade da catalase, constatou-se que em todos os tecidos analisados o clorpirifós afetou significativamente a atividade enzimática. A atividade hepática da catalase foi inibida significativamente na maior concentração, sendo observado a inibição da catalase também no tecido das brânquias sob a exposição de maior concentração de clorpirifós.

Quanto à atividade enzimática da glutathione-S-transferase, observou-se que apenas no fígado houve alterações significativas, onde foi aumentada na maior concentração de clorpirifós.

Assim, infere-se que o inseticida clorpirifós provocou o estresse oxidativo em *Oreochromis niloticus*, inibindo significativamente as atividades enzimáticas da acetilcolinesterase e catalase.

Considerando que são encontrados poucos estudos na área, sugere-se que novos estudos sejam realizados com a espécie *Oreochromis niloticus*, analisando demais atividades enzimáticas de estresse oxidativo e sob a exposição prolongada ao inseticida clorpirifós, a fim de melhor avaliar os riscos ocasionados ao ambiente aquático sob a sua exposição.

3 EFEITO TÓXICO DO INSETICIDA FIPRONIL EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

3.1 INTRODUÇÃO

O fipronil é um inseticida fenilpirazol que inibe os receptores de ácido gama-aminobutírico em insetos, tornando-se um agrotóxico de amplo espectro e eficaz, amplamente utilizado na agricultura em todo o mundo, bem como, em medicamentos veterinários, no tratamento de animais e prevenção de infestações de ectoparasitas em animais de estimação e bovinos. No entanto, esse inseticida possui potenciais consequências ecotoxicológicas (ARDESHIR *et al.*, 2017; EADIEA *et al.*, 2020b; WANG *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2021).

A utilização do fipronil para a proteção de plantações e animais está ocasionando uma variedade de efeitos tóxicos em seres humanos e animais, principalmente após o aumento significativo de seu uso, trazendo uma preocupação crescente para a população. Assim, é indispensável que sejam estudados os efeitos tóxicos e o mecanismo do fipronil, a fim de proteger o meio ambiente de seus efeitos nocivos (WANG *et al.*, 2016). Considerando que o fipronil está sendo aplicado indiscriminado e conduzindo à poluição ambiental e representando risco à saúde pública, a detecção precoce do fipronil é fundamental para prevenir os efeitos deletérios em organismos não-alvo (TRINH *et al.*, 2022).

O fipronil é comumente adsorvido em sedimentos nos ambientes aquáticos (DEIÚ *et al.*, 2021b) e, devido ao amplo uso e seus efeitos tóxicos, o fipronil torna-se uma ameaça aos ambientes aquáticos e interfere no desenvolvimento de espécies não-alvo, representando uma ameaça aos organismos aquáticos (EADIEA *et al.*, 2020b). Desse modo, o fipronil pode ser detectado nos ambientes aquáticos próximos as regiões em que o agrotóxico foi aplicado (EADIE *et al.*, 2020a) e, em casos extremos, como em derramamento acidentais e uso ilegal de fipronil, que podem levar a altas concentrações no meio ambiente (WAGNER *et al.*, 2017).

Ainda, há evidências crescentes que o fipronil pode ocasionar diversos efeitos tóxicos em animais, como os efeitos hepatotóxicos, neurotóxicos, reprodutivos e citotóxicos em vertebrados. Os recentes estudos sugerem que o estresse oxidativo está relacionado com inúmeras toxicidades induzidas por fipronil. No entanto, existem

poucas revisões que abordam a toxicidade deste composto com relação ao estresse oxidativo (WANG *et al.*, 2016).

Ademais, atua como antagonista dos receptores de ácido gama aminobutírico, ocasionando uma superexcitação no sistema nervoso central, apresentando toxicidade relativamente alta para os peixes (EADIE *et al.*, 2020a).

Assim, o presente estudo apresenta como objetivo, a verificação do efeito tóxico do inseticida fipronil em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio das análises das atividades enzimática da acetilcolinesterase no cérebro, catalase e glutathione-S-transferase no cérebro, brânquias e fígado da referida espécie, sob efeito da exposição de 96 h ao inseticida fipronil.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Centro de Ciências Agroveterinárias (Cav) da Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc), localizado no Município de Lages, Santa Catarina, Brasil. Foram utilizados peixes juvenis do espécime *Oreochromis niloticus*, obtidos em piscicultura da região, com massa de $7,61 \pm 4,36$ g e comprimento de $7,57 \pm 1,30$ cm, sendo aclimatados pelo período de 36 dias.

3.2.1 Teste de toxicidade

Posterior ao período de aclimação, os peixes foram submetidos aos testes de toxicidade aguda (96 h), consistindo em cinco grupos distintos (Tabela 2). Para o teste, foi utilizado composto comercial contendo fipronil (2,5%).

Tabela 2 – Concentrações de fipronil para cada grupo

Grupo	Sigla	Quantidade (mg/L)
Controle	CTR	0,00
Fipronil 1	F1	0,12
Fipronil 2	F2	0,16
Fipronil 3	F3	0,32
Fipronil 4	F4	0,64

Fonte: Autora (2023).

Os peixes foram dispostos aleatoriamente nos aquários de vidro contendo 20 L, sendo cada grupo composto por seis indivíduos. Manteve-se o fotoperíodo de 12 h

claro: 12 h escuro, com aeração constante, pH $8,62 \pm 0,05$ e temperatura de $28,00 \pm 0,32$ °C. Durante o teste, os peixes não foram alimentados e a água dos aquários não foi renovada.

Após o período do teste de toxicidade aguda, os peixes foram eutanasiados, e os tecidos cérebro, brânquias e fígado coletados e armazenados em microtubo tipo *Eppendorf* de 1,5 mL, e após, mantidos sob refrigeração até a realização das análises enzimáticas. Ademais, os tecidos cérebro, brânquias e fígado foram homogeneizados em solução de tampão fosfato de potássio (1,0 M e pH=7,0), mediante auxílio de agitador mecânico.

3.2.3 Atividade da acetilcolinesterase

O método para a determinação da atividade da acetilcolinesterase fundamenta-se no trabalho de Ellman *et al.* (1961), consistindo na determinação da taxa de produção de tiocolina. A acetilcolinesterase foi determinada apenas para o tecido do cérebro.

Como substrato, foi utilizado 100 µL de iodeto de acetilcolina, que reage com 100 µL do reagente de cor DTNB, 100 µL do homogeneizado e 2 mL de tampão fosfato monopotássio (0,1 M e pH 7,0). Após misturar os reagentes na cubeta, a absorbância foi lida a cada 30 segundos durante 2 minutos a 412 nm.

3.2.2 Atividade da catalase

A determinação da atividade da catalase segue metodologia proposta por Beutler (1975), sendo analisada nos tecidos de brânquias, cérebro e fígado. Utilizou-se 20 µL das amostras de tecidos já homogeneizados em tampão fosfato de potássio (1,0 M e pH=7,0), 20 µL de peróxido de hidrogênio e 2 mL de solução tampão (Tris HCl 1M e EDTA 5 mM), em cubeta de quartzo de 4 mL e, após, verificou-se a cinética em espectrofotometria no comprimento de onda de 240 nm.

3.2.4 Atividade da glutathiona-S-transferase

A determinação da atividade da glutathiona-S-transferase é fundamentada pelo método desenvolvido por Keen, Habig e Jakoby (1976), consistindo na complexação

de glutationa reduzida com o substrato CNDB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) que é catalisada pela GST (presente na amostra).

Para o tampão de reação, tampão fosfato de potássio (0,1 M e pH 7,0), utilizou-se o fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico. O 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) foi misturado com álcool, e a glutationa reduzida (GSH) no tampão fosfato de potássio. Em uma cubeta de 4 mL, adicionou-se 2 mL do tampão de reação, 20 µL de CDNB, 20 µL de GSH e 20 µL da amostra, que foi lida em espectrofotômetro, em 340 nm. A atividade da GST foi determinada para todos os tecidos analisados.

3.2.5 Análise de proteínas totais

Na determinação de proteínas totais, utilizou-se o método de biureto, no qual o reagente de biureto (composto por sulfato de cobre, citrato trissódico, carbonato de sódio e hidróxido de sódio) reage com as proteínas da amostra e forma um complexo corado de cor azul, sendo proporcional a concentração proteica da amostra. Essa etapa foi realizada para todos os tecidos analisados.

Em cubetas de 4 mL, adicionou-se 2 mL do reagente de biureto (marca Labtest) e 50 µL do homogeneizado das amostras, bem como, preparou-se o padrão contendo 2 mL do reagente de biureto (40 mg/L) e 0,2 mL do reagente de cor. Leu-se o padrão e o teste em espectrofotômetro em 545 nm.

3.2.6 Análise estatística

Os resultados de cada atividade enzimática foram expressos na forma de média e desvio padrão. De partida, a fim de analisar se os resultados representavam uma distribuição normal, realizou-se o teste de Shapiro-Wilk. Considerando que, em alguns tratamentos, foi constatado a heterocedasticidade entre os grupos, procedeu-se com a transformação dos dados, conforme proposta por Box e Cox (1964). Após, todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5%, buscando identificar as possíveis diferenças entre cada grupo, seguido do teste de comparação das médias obtidas nos ensaios com a utilização do Teste de Tukey, o qual analisou a diferença mínima significativa entre as duas médias, apontando quais diferem entre si, considerando o nível de significância de 5%

($p < 0,05$). As análises estatísticas foram elaboradas com o auxílio dos softwares SAS e R.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Atividade da acetilcolinesterase

3.3.1.1 Cérebro

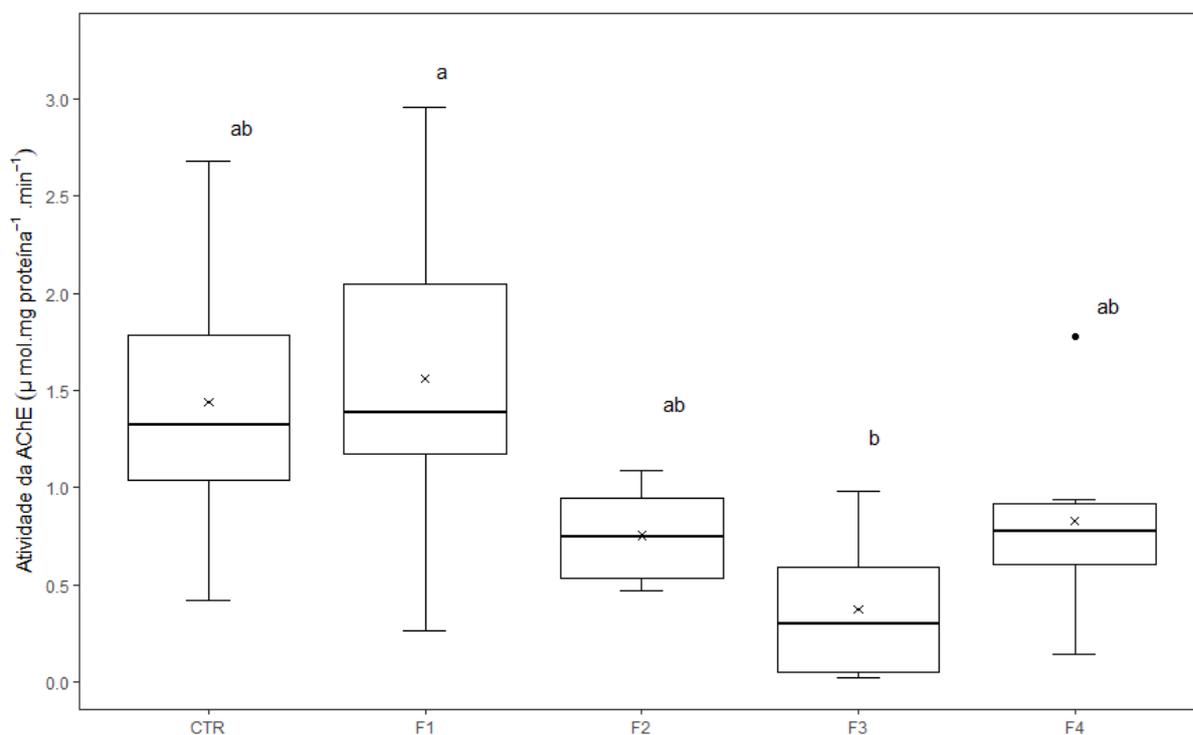
A atividade da AChE no cérebro de tilápia do Nilo sob a exposição aguda de fipronil está demonstrada na Figura 11. Os resultados quando submetidos a ANOVA, apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), sendo que, em F3 ocorreu a inibição significativa da atividade enzimática da AChE quando comparada com F1. Embora não haja diferença estaticamente entre todos os grupos contendo fipronil e o grupo controle, é possível observar a inibição da atividade da AChE paralelo ao aumento da concentração do fipronil.

Situação similar ao presente estudo ocorreu no experimento realizado por Moreira *et al.* (2021), que observaram que a atividade da AChE em peixe zebra diminuiu significativamente sob efeito das maiores concentrações de fipronil. Deíú *et al.* (2021b) também constataram que o fipronil promoveu estresse oxidativo em *Prochilodus lineatus*, evidenciado pela diminuição da atividade cerebral da AChE, bem como, ocorreu a diminuição significativa da capacidade antioxidante. Em tilápia do Nilo, a atividade cerebral da AChE foi inibida significativamente após a exposição de 96 h ao fipronil na concentração de 0,1 m/L (FREITAS, 2020).

No estudo realizado por Ignácio (2018), o fipronil causou altas taxas (aproximadamente 70%) de inibição da atividade da AChE no cérebro e, taxas mais baixas (20 a 35%) no músculo, de pacu e de tilápia. Os valores de concentrações foram de até 0,61 mg/L de fipronil para o pacu e de até 0,15 mg/L para a tilápia, sendo que causaram até 50% de mortalidade da amostra.

Em carpas expostas ao fipronil, a atividade da AChE no cérebro e músculo do espécime diminuiu significativamente (MENEZES *et al.*, 2016). Em *Prochilodus lineatus*, a atividade cerebral da AChE foi inibida significativamente após a exposição de fipronil na maior concentração (100 $\mu\text{g/L}$) (DEIÚ *et al.*, 2021a).

Figura 11 – Atividade da AChE no cérebro de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao fipronil no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Após 15 dias de exposição ao fipronil, a atividade da AChE diminuiu 47% em relação ao controle, no cérebro de alevinos de *Cyprinus carpio* (GUPTA *et al.*, 2014). A atividade da AChE no cérebro de truta arco-íris também foi inibida quando exposta ao fipronil, sendo que a inibição aumentou conforme crescia a concentração do fipronil (UÇAR *et al.*, 2021b).

Em uma perspectiva diferente, Huang *et al.* (2016) analisaram os efeitos tóxicos em *Gambusia affinis* em dois rios urbanos, no qual, dos 11 agrotóxicos detectados, fipronil, diclorvos e butacloro apresentaram nível de detecção de 40%. No cérebro do espécime, a atividade da AChE foi inibida significativamente, sendo correlacionada negativamente com as concentrações de fipronil no ambiente aquático.

Resultados diferentes ao experimento em questão, foi registrado em *Hyphessobrycon eques* que, sob efeito do fipronil, não foram observadas alterações significativas na atividade da AChE quando comparada ao grupo controle (Moreira *et al.*, 2021). A atividade cerebral da AChE em *Pseudorasbora parva* não sofreu diferença estatisticamente significativa após a exposição do fipronil (LI *et al.*, 2020). A

atividade da AChE no cérebro de jundiá também não sofreu alterações significativas sob efeito do fipronil, porém, no tecido do músculo foi observado a inibição enzimática da AChE (MENEZES *et al.*, 2016).

Já em juvenis de *Prochilodus Lineatus*, exposto a duas concentrações (5,5 e 82 µg/kg) de sedimentos enriquecidos com fipronil, a atividade da AChE não sofreu alterações significativas na menor concentração de fipronil, quando comparada ao controle, mas na maior concentração de fipronil, a atividade enzimática diminuiu significativamente (DEIÚ *et al.*, 2021b).

Outrossim, há registro de ativação da atividade enzimática, como ocorreu no estudo realizado por Sanahuja *et al.* (2020), no qual a atividade da AChE no cérebro de *Dicentrarchus labrax* aumentou após a exposição de 14 dias ao fipronil, bem como após o período de depuração (7 dias), já nas brânquias do organismo, não houve alterações significativas na atividade enzimática da AChE. No músculo de peixe zebra, a atividade da AChE também foi aumentada após a exposição ao fipronil (VIANA *et al.*, 2022).

Ante ao exposto, observa-se que, na maioria dos estudos citados, ocorreu a inibição da atividade cerebral da AChE nos peixes expostos ao inseticida fipronil, demonstrando que o fipronil afeta negativamente a atividade desse neurotransmissor.

3.3.2 Atividade da catalase

3.3.2.1 Cérebro

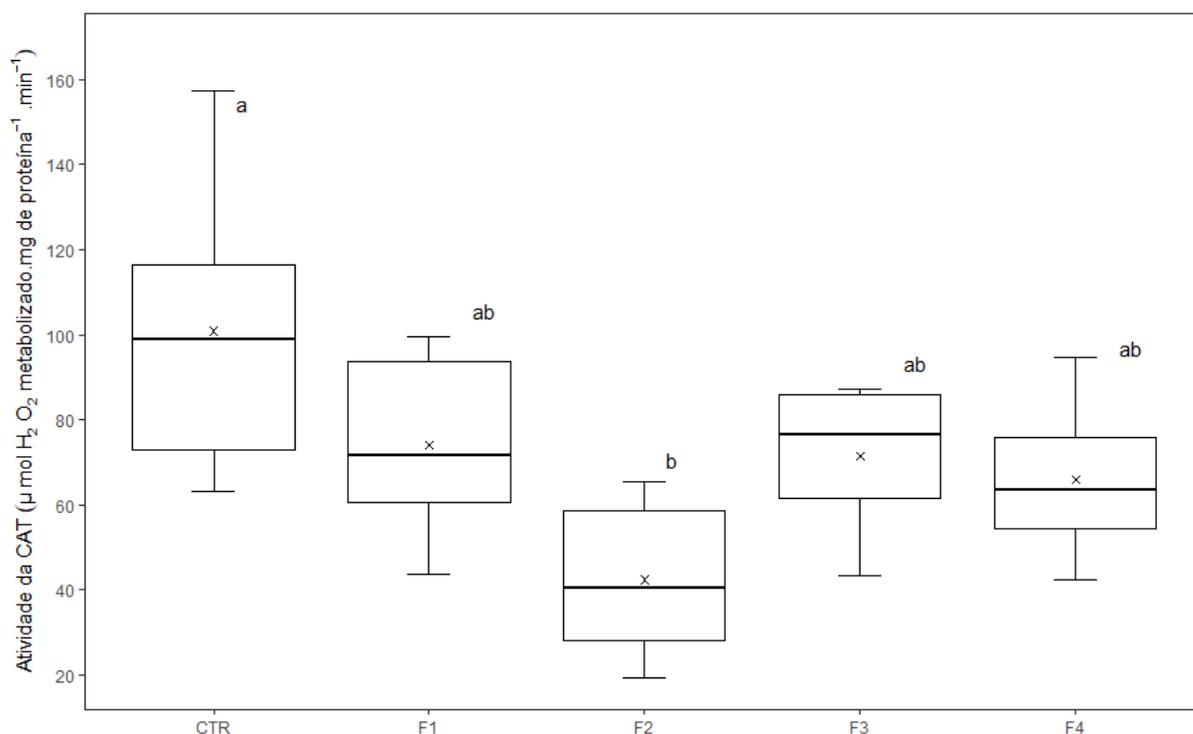
A atividade da catalase no cérebro de tilápia do Nilo após a exposição de 96 h ao inseticida fipronil está apresentada na Figura 12. Os resultados quando submetidos a ANOVA apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), demonstrando que o fipronil afetou a atividade enzimática da CAT, sendo que, em F2 ocorreu a inibição da atividade enzimática quando comparado com o grupo controle. Além disso, é possível observar uma leve inibição da atividade da CAT em todas as concentrações quando comparadas ao controle, embora não haja diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

Comportamento semelhante ao presente estudo foi constatado em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), que foram expostas ao fipronil em quatro concentrações (0,0; 0,05; 0,1 e 0,2 mg/L), onde ocorreu a inibição significativa da atividade cerebral

da CAT em todas as concentrações, se comparadas ao grupo controle, aumentando a inibição em paralelo ao crescimento da concentração de fipronil (UÇAR *et al.*, 2021b).

Já a atividade da CAT de corpo inteiro em peixe zebra permaneceu inalterada após a exposição ao fipronil pelo período de 96 h (VIANA *et al.*, 2022).

Figura 12 – Atividade da CAT no cérebro de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao fipronil no período de 96 h



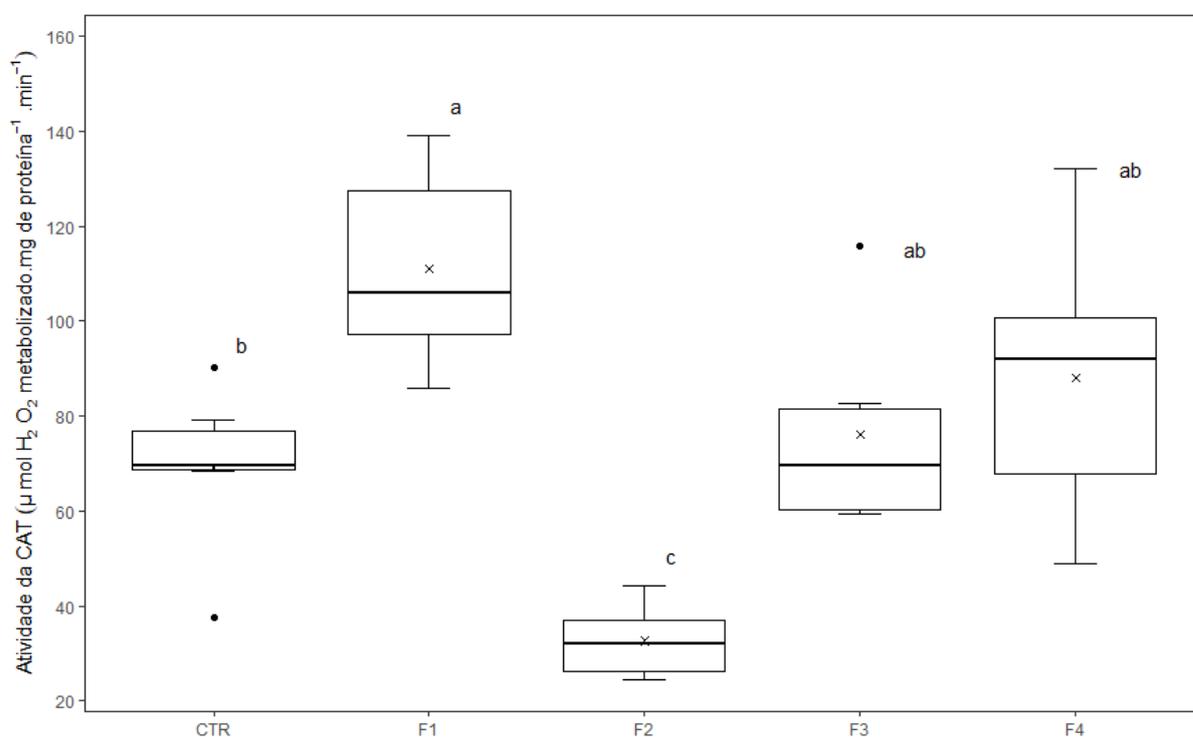
Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

3.3.2.2 Brânquias

Sob o efeito da exposição ao fipronil, a atividade da CAT nas brânquias de tilápia do Nilo é apresentada na Figura 13. Os resultados quando submetidos a ANOVA demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), sendo que, em F2 ocorreu a inibição enzimática da catalase, se comparada com os demais grupos de tratamento, e em F1, quando comparado ao grupo controle, ocorreu a ativação da atividade da CAT.

Resultado semelhante foi constatado por Uçar *et al.* (2020), que analisaram o efeito a exposição de 96 h ao fipronil (0,05; 0,1 e 0,2 mg/L) em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), e observaram a inibição da atividade da CAT nas brânquias, conforme aumentava a dose do inseticida. Nas brânquias de peixe zebra, a atividade da CAT também diminuiu significativamente sob a exposição de fipronil (VIANA *et al.*, 2022).

Figura 13 – Atividade da CAT nas brânquias de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao fipronil no período de 96 h



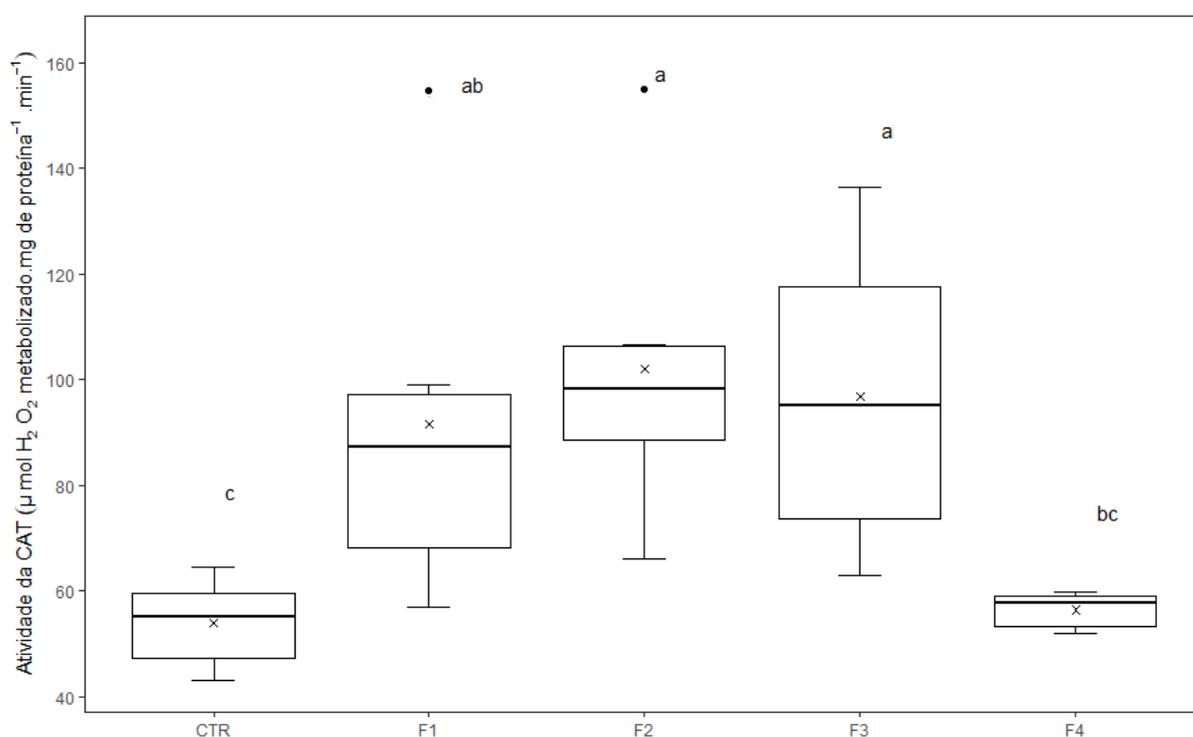
Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Já a atividade da catalase nas brânquias de *Cyprinus carpio* não sofreu alterações significativas quando exposta ao fipronil (GUPTA *et al.*, 2014), sendo que nas brânquias de *Prochilodus lineatus*, a atividade da CAT após a exposição ao fipronil também não apresentou mudanças significativas quando comparada ao grupo controle (PORTRUNELI *et al.*, 2021). A atividade da CAT em brânquias de tilápia do Nilo não foi alterada após a exposição ao fipronil por 96 h (FREITAS, 2020).

3.3.2.3 Fígado

A atividade hepática da catalase em tilápia do Nilo é exposta na Figura 14, sendo que os resultados quando submetidos a ANOVA apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Observa-se que em F1, F2 e F3 ocorreu a ativação significativa da atividade catalase, quando comparadas com o controle, e, em F4 foi constatado a inibição significativa da atividade enzimática da CAT, se comparada aos grupos F2 e F3.

Figura 14 – Atividade da CAT no fígado de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao fipronil no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Semelhante ao estudo em questão, a atividade hepática da CAT em truta arco-íris foi inibida conforme aumentava a concentração de fipronil (UÇAR *et al.*, 2020). Em carpas expostas ao fipronil, a atividade hepática da catalase foi inibida aos 7 dias em 41%, em 30 dias em 62% e, em 90 dias, ocorreu a inibição de 94%, se comparada ao controle (CLASEN *et al.*, 2012). Do mesmo modo, El-Murr *et al.* (2016) constataram

que a atividade da CAT no fígado de carpa comum diminuiu significativamente após a exposição ao fipronil.

Não obstante, tal situação foi detectada em peixes da espécie *Cyprinus carpio* (carpa comum) que foram expostos na presença de fipronil, em condições de campo de arroz, por 7, 30 e 90 dias. A concentração detectável de fipronil foi visível até 45 dias após a aplicação, sendo que a atividade da catalase no fígado foi inibida em 7, 30 e 90 dias. Com o referido estudo, Clasen *et al.* (2012) observaram que a resposta a exposição do fipronil desenvolveu estresse oxidativo nos peixes e alterações nos parâmetros bioquímicos em diferentes tecidos da carpa comum, porém, não foi detectado mudanças significativas no crescimento ou sobrevivência da carpa comum.

Já a atividade hepática da CAT em *Dicentrarchus labrax* não sofreu alterações significativas em duas temperaturas (13 e 18 °C), sob a exposição antes do fipronil, após 7 e 14 dias de exposição ao fipronil. Contudo, diminuiu significativamente após 7 dias de depuração (DALLARÉS *et al.*, 2020). Em tilápia do Nilo expostas ao fipronil por 96h, não foi identificado diferença estatisticamente significativa na atividade hepática da CAT (FREITAS, 2020).

Por outro lado, no estudo realizado por GUPTA *et al.* (2014), no fígado de *Cyprinus carpio*, a atividade da catalase aumentou após a exposição ao fipronil.

3.3.3 Atividade da glutiona-S-transferase

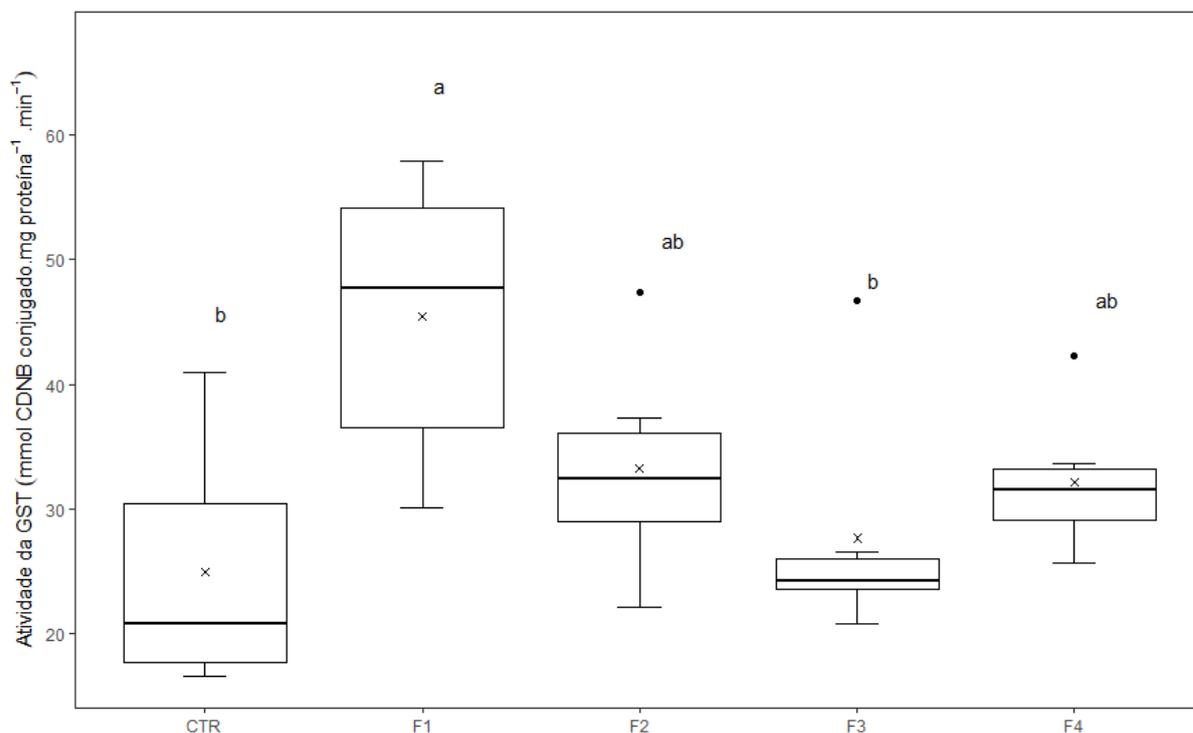
3.3.3.1 Cérebro

A atividade cerebral da GST em tilápia do Nilo sob a exposição do fipronil apresentou diferença estatisticamente significativa quando os resultados foram submetidos a ANOVA ($p < 0,05$), sendo que, em F1 houve o aumento significativo da atividade enzimática, quando comparada ao controle (Figura 15). Embora estatisticamente não haja diferença, observa-se uma tendência no declínio da atividade da GST, nas concentrações F2, F3 e F4.

O aumento da atividade enzimática da GST também foi observada em peixe zebra, no qual a atividade da GST de corpo inteiro foi ativada sob efeito do fipronil (VIANA *et al.*, 2022). Já no estudo realizado por Wu *et al.* (2014), foi analisado o efeito do fipronil em juvenis de peixe zebra, nas concentrações de 2, 4 e 20 µg/L de fipronil,

sendo que, no cérebro de peixe zebra a atividade da GST não sofreu alterações significativas sob efeito do fipronil.

Figura 15 – Atividade da GST no cérebro de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao fipronil no período de 96 h



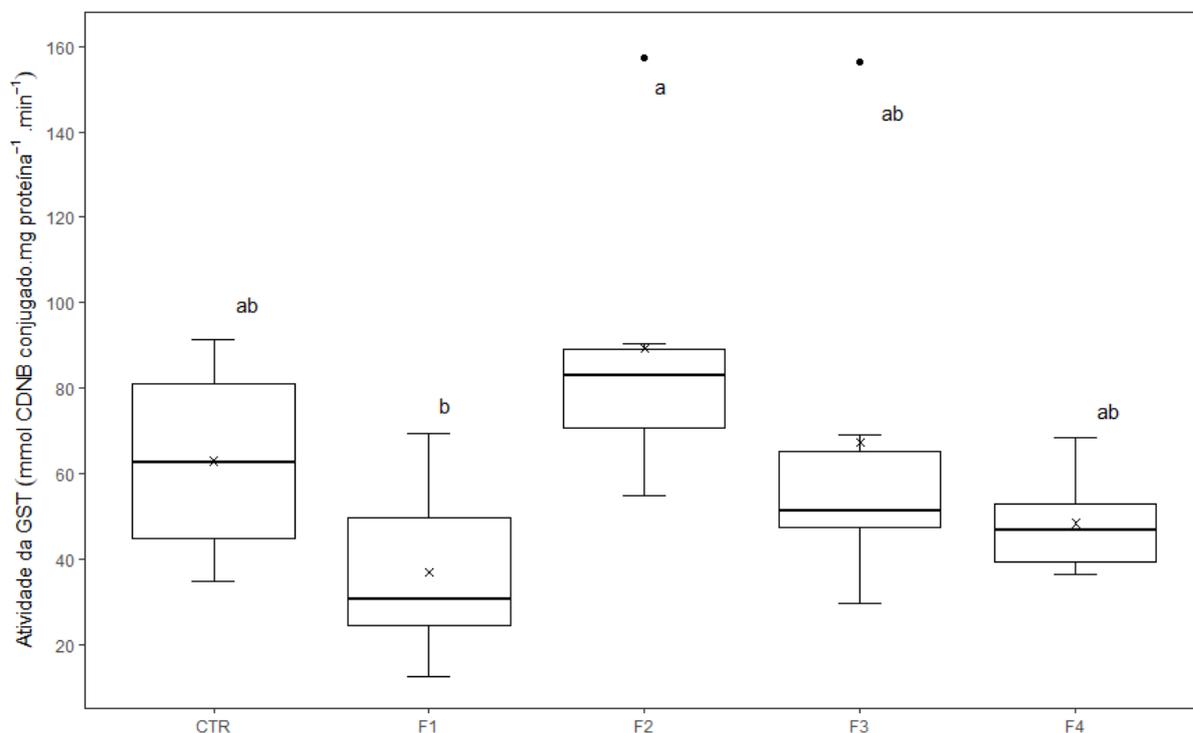
Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

3.3.3.2 Brânquias

Em brânquias de tilápia do Nilo sob efeito do fipronil, a atividade da GST apresentou os resultados expostos na Figura 16, os quais foram submetidos à ANOVA e apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Em F2, quando comparado com F1, verifica-se a ativação enzimática da catalase e após, em F3 e F4, um leve declínio da atividade se comparado ao grupo controle, embora não haja diferença estatisticamente entre eles.

Efeito semelhante foi observado nas brânquias de *Prochilodus lineatus*, onde a atividade da GST foi ativada sob efeito do fipronil quando comparada ao grupo controle (PORTRUNELI *et al.*, 2021). A atividade da GST também foi ativada nas brânquias de peixe zebra sob o efeito de fipronil (VIANA *et al.*, 2022).

Figura 16 – Atividade da GST nas brânquias de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao fipronil no período de 96 h



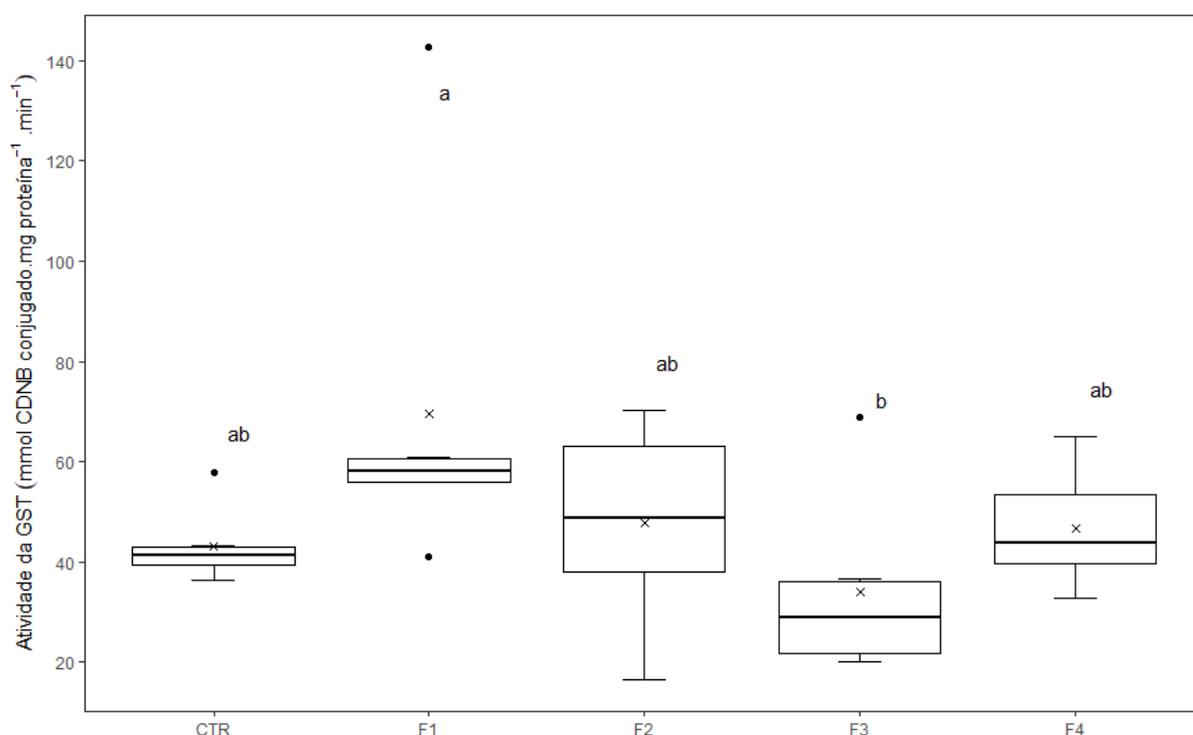
Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Já em outras espécies de peixes, observou-se, também, que não ocorreu alterações estatisticamente significativas na atividade enzimática da GST sob exposição ao fipronil, como foi constatado nas brânquias de carpa, onde a atividade da GST não sofreu alteração significativa sob a exposição ao fipronil (MENEZES *et al.*, 2016). Sob o efeito da exposição ao fipronil, a atividade da GST nas brânquias de peixe zebras também não sofreu alterações significativas (WU *et al.*, 2014). A atividade da GST em brânquias de jundiá não sofreu interferências significativas sob efeito do fipronil, porém, no músculo, houve a inibição enzimática da GST (MENEZES *et al.*, 2016). Nas brânquias de tilápia do Nilo, a atividade da GST não sofreu diferenças significativas após a exposição ao inseticida fipronil (FREITAS, 2020).

3.3.3.3 Fígado

A atividade da GST no fígado em tilápia do Nilo frente a exposição ao fipronil é apresentada na Figura 17. Os resultados quando submetidos a ANOVA não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), demonstrando que o fipronil não ocasionou mudanças na atividade hepática, de tal modo que, o teste de Tukey confirma que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o grupo controle.

Figura 17 – Atividade da GST no fígado de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao fipronil no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Do mesmo modo, em tilápias do Nilo, a atividade hepática da GST não sofreu modificações sob efeito da exposição ao fipronil (FREITAS, 2020). A atividade hepática da GST em peixes zebra não sofreu alterações significativas sob a exposição de fipronil (WU *et al.*, 2014). No fígado de *Cyprinus carpio*, a atividade da GST não apresentou diferenças significativas aos 7, 30 e 90 dias de exposição ao fipronil (CLASEN *et al.*, 2012). No fígado e intestino de *Pseudorasbora parva*, não foi detectado diferença significativa na atividade da GST sob efeito do fipronil (LI *et al.*, 2020).

Já a atividade hepática da GST em jundiás foi inibida após a exposição de fipronil (MENEZES *et al.*, 2016). No fígado de carpa comum, a atividade da GST também diminuiu significativamente após a exposição ao fipronil (EL-MURR *et al.*, 2016). Uçar *et al.* (2021a) analisaram a atividade da catalase no tecido sanguíneo de truta arco-íris e observaram a inibição da atividade da CAT sob a exposição do fipronil.

Ao contrário, a atividade da GST no fígado de carpa foi ativada sob a exposição de fipronil (MENEZES *et al.*, 2016). Em *Dicentrarchus labrax*, a atividade da GST no fígado aumentou significativamente após 14 dias de exposição ao fipronil e após 7 dias de depuração, não havendo diferença estatisticamente significativa após 7 dias sob efeito do fipronil (DALLARÉS *et al.*, 2020). Não obstante, a atividade hepática da GST em *Gambusia affinis* aumentou na maioria dos locais de amostragem em dois rios urbanos, no qual foi detectado a presença de fipronil, diclorvos e butacloro em 40% (HUANG *et al.*, 2016).

Assim, observa-se que, embora a exposição ao fipronil por 96 h em tilápia do Nilo não provocou alteração enzimática da GST hepática no presente estudo, diversos estudos apontam alterações significativas da GST em outras espécies de peixes.

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No experimento em tela, constatou-se que tilápias do Nilo expostas ao inseticida fipronil pelo período de 96 h sofreram estresse oxidativo, sendo observado a inibição da atividade cerebral da acetilcolinesterase, alterações estatisticamente significativas da atividade da catalase em todos os tecidos, ocorrendo a inibição nos tecidos do cérebro e brânquias, bem como, interferências na atividade da GST no cérebro e nas brânquias das tilápias do Nilo.

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, verifica-se que o inseticida fipronil possui potencial tóxico para o ambiente aquático, ressaltando-se que se trata de um produto que apresenta riscos aos organismos não-alvo do agrotóxico. Assim, o uso desse inseticida deve ser realizado com cautela, respeitando as distâncias estabelecidas para a aplicação do mesmo próximo aos corpos hídricos, uma vez que, demonstra-se que este inseticida apresentou efeito tóxico a espécie *Oreochromis niloticus*.

Ainda, considerando que foram encontrados poucos estudos relacionados aos efeitos tóxicos do inseticida fipronil, recomenda-se que novos experimentos sejam

realizados, buscando analisar os biomarcadores em diferentes espécies sob o mesmo cenário, a fim de identificar se o efeito dessa substância pode ser mais tóxico para determinadas espécies.

4 POSSÍVEIS EFEITOS DA MISTURA DOS INSETICIDAS CLORPIRIFÓS E FIPRONIL EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

4.1 INTRODUÇÃO

O aumento populacional, a crescente necessidade de alimentos e as restrições nas áreas cultivadas conduziu à utilização excessiva de agrotóxicos, sendo esses compostos utilizados para prevenir a destruição de culturas. Contudo, a utilização indiscriminada de agrotóxicos leva a toxicidade dessas substâncias para os seres humanos e animais, ameaçando a natureza e o ecossistema. Além disso, diversos agrotóxicos são utilizados em combinações, o que resulta na presença de vários resíduos de agrotóxicos e, possivelmente, toxicidade conjunta (ABDOLLAHDOKHT *et al.*, 2022; LOURTHURAJ; HATSHAN; HUSSEIN, 2022; ZHANG *et al.*, 2022).

Entre os agrotóxicos mais utilizados no Brasil, encontra-se o clorpirifós e o fipronil. O clorpirifós é um inseticida organofosforado, considerado tóxico, embora bastante utilizado nas atividades agrícolas (IHSAN; EDWIN; YANTI, 2019). Por sua vez, o fipronil, inseticida fenilpirazol, é conhecido por prejudicar a inibição regular dos impulsos nervosos, sendo que, pode resultar em paralisia e morte de insetos (MONTEIRO *et al.*, 2019). O fipronil pode ocasionar impactos diretos – por meio da toxicidade, ou indiretos – reduzindo sua suplementação alimentar entre os vertebrados, assim, uma grande variedade de efeitos subletais podem acontecer, tornando-se um risco para os peixes sensíveis (GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015).

Assim, com o aumento da aplicação de agrotóxicos convivemos com uma séria ameaça à saúde humana e à biodiversidade. Esses produtos químicos de uso agrícola podem afetar negativamente a saúde humana e o meio ambiente, e geralmente ocorrem misturas tóxicas e risco à saúde, prevalecendo a mistura de agrotóxicos na natureza, uma vez que, no cultivo de uma mesma cultura, são utilizados diversos agrotóxicos e os mesmos acabam se misturando, e assim, prevalecendo. Desse modo, quando se visa uma avaliação realista na análise de toxicidade, os efeitos dos agrotóxicos em conjunto devem ser levados em consideração, tornando a avaliação do risco ambiental mais realista (FALFUSHYNSKA *et al.*, 2022; KUNWAR *et al.*, 2021; SINHA *et al.*, 2022).

Os agrotóxicos no sistema aquáticos provêm de inúmeras fontes, ocasionado uma mistura de agrotóxicos no meio aquático, e assim, a presença combinada desses compostos em recursos hídricos pode ser prejudicial para a saúde dos organismos aquáticos, principalmente para os peixes (KUNWAR *et al.*, 2021; NAZ *et al.*, 2019; SINHA *et al.*, 2022).

Nesse sentido, considerando que os ambientes aquáticos, localizados próximos a locais da agricultura convencionais, estão expostos a diversos agrotóxicos, é necessário que seja identificado possíveis interações que modifiquem seus efeitos quando os agrotóxicos são misturados (MENA *et al.*, 2022). Logo, as análises dos parâmetros de estresse oxidativo em peixes podem ser relevantes para verificar os efeitos da exposição da misturas de inseticidas (BEVILAQUA *et al.*, 2020), uma vez que, a exposição combinada de agrotóxicos pode ocasionar importantes alterações nas enzimas antioxidantes de peixes, entre elas, as enzimas da CAT e GST, exercendo, assim, grande relevância para serem utilizadas como biomarcadores para identificar os efeitos tóxicos dos agrotóxicos em corpos hídricos (NAZ *et al.*, 2019).

O presente estudo tem como objetivo verificar os efeitos tóxicos da combinação dos inseticidas clorpirifós e fipronil em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), por meio da análise das atividades enzimáticas da acetilcolinesterase no tecido cerebral, catalase e glutathione-S-transferase nos tecidos cerebral, branquial e hepático de tilápia do Nilo expostas aos referidos agrotóxicos pelo período de 96 horas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi realizado no Centro de Ciências Agroveterinárias (Cav) da Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc), localizado no Município de Lages, Santa Catarina, Brasil.

A pesquisa foi realizada com juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), adquiridos em piscicultura da região, com massa de $10,88 \pm 6,54$ g e comprimento de $8,52 \pm 2,16$ cm. Os peixes foram aclimatados por 36 (trinta e seis) dias, com aeração e temperatura constante, sendo realizada a alimentação *ad libitum* e troca de água por duas vezes ao dia.

4.2.1 Teste de toxicidade

Após o período de aclimação, os peixes foram submetidos aos testes de toxicidade aguda (96 h), sendo distribuídos em cinco grupos distintos, conforme demonstrado na Tabela 3. Para o teste de toxicidade, utilizou-se duas formulações comerciais, uma contendo fipronil (2,5%) e outra, composta por clorpirifós (48%) e xilol (50%).

Tabela 3 – Concentrações de clorpirifós e fipronil para cada grupo

Grupo	Sigla	Quantidade (mg/L)		Quantidade (%)	
		Clorpirifós	Fipronil	Clorpirifós	Fipronil
Controle	CTR	0,00	0,00	-	-
Mistura 1	M1	0,015	0,12	11,11	88,89
Mistura 2	M2	0,03	0,16	15,79	84,21
Mistura 3	M3	0,05	0,32	13,51	86,49
Mistura 4	M4	0,06	0,64	8,57	91,43

Fonte: Autora (2023).

Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em cinco aquários, contendo 20 L cada, com 6 indivíduos por aquário. Durante as 96 h do teste de toxicidade aguda, manteve-se o fotoperíodo de 12h claro: 12h escuro, com aeração constante, pH $8,55 \pm 0,18$, temperatura de $28,00 \pm 0,32$ °C. Ademais, os peixes não foram alimentados e a água dos aquários não foi renovada durante o teste.

Após o teste de toxicidade aguda, os peixes foram eutanasiados e os tecidos: cérebro, brânquias e fígado foram coletados e armazenados em microtubo tipo *Eppendorf* com capacidade de 1,5 mL, e após, foram mantidos sob refrigeração, até a realização das análises. Com o auxílio do agitador mecânico, os tecidos foram homogeneizados em solução de tampão de fosfato de potássio (1,0 M e pH=7,0).

Insta ressaltar que, inicialmente, realizou-se o teste de toxicidade aguda somando as concentrações de clorpirifós e fipronil utilizada nos capítulos 2 e 3, ou seja, clorpirifós na quantidade de 0,015, 0,050, 0,075 e 0,1 mg/L; e fipronil na quantidade de 0,00, 0,12, 0,16, 0,32 e 0,64 mg/L.

Contudo, da mesma forma que ocorreu com o primeiro teste de toxicidade com o inseticida clorpirifós (capítulo 2), ocorreu alta taxa de mortalidade dos indivíduos nos aquários que continha o clorpirifós na quantidade de 0,075 e 0,1 mg/L, motivo pelo qual, repetiu-se o teste de toxicidade, acrescentando concentrações menores de

clorpirifós (0,03 e 0,06 mg/L), nos quais todos os indivíduos sobreviveram durante o período do teste.

4.2.2 Atividade da acetilcolinesterase

Empregou-se a metodologia proposta por Ellman *et al.* (1961) para determinar a atividade da acetilcolinesterase, que consiste na determinação da taxa de produção de tiocolina. O substrato do ensaio é composto por 100 µL de iodeto de acetilcolina, que reage com 100 µL do reagente de cor DTNB, 100 µL do homogeneizado e 2 mL de tampão fosfato monopotássio (0,1 M e pH 7,0). Misturou-se os reagentes na cubeta de 4 mL e leu-se a absorbância a cada 30 segundos durante 2 minutos, no comprimento de onda de 412 nm. A análise da atividade da acetilcolinesterase foi realizada apenas no tecido do cérebro de tilápia do Nilo.

4.2.3 Atividade da catalase

Para a determinação da atividade da catalase, foi utilizado a metodologia proposta por Beutler (1975), que consiste na utilização de 20 µL das amostras de tecidos já homogeneizados em tampão fosfato de potássio (1,0 M e pH=7,0), 20 µL de peróxido de hidrogênio e 2 mL de solução tampão (composto por Tris HCl 1M e EDTA 5 mM). Os reagentes foram adicionados em cubeta de quartzo de 4 mL e leu-se a cinética em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm. A atividade da catalase foi determinada para os tecidos cérebro, brânquias e fígado.

4.2.4 Atividade da glutathiona-S-transferase

A atividade da glutathiona-S-transferase foi determinada para todos os tecidos analisados com base na metodologia proposta por Keen, Habig e Jakoby (1976). O ensaio consiste na completação de glutathiona reduzida com o substrato (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), que é catalisada pela GST que está presente na amostra.

Assim, preparou-se o tampão de reação, que consiste no tampão fosfato de potássio (0,1 M e pH 7,0), composto por fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico. O 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) foi juntado ao álcool, e a glutathiona reduzida (GSH) no tampão fosfato de potássio. Utilizou uma cubeta de 4

mL, onde foi adicionado 2 mL do tampão de reação, 20 µL de CDNB, 20 µL de GSH e 20 µL da amostra, que foi lida em espectrofotômetro, em 340 nm.

4.2.5 Análise de proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas com o emprego do método de biureto, que consiste na utilização do reagente de biureto, que é composto por sulfato de cobre, citrato trissódico, carbonato de sódio e hidróxido de sódio. O reagente de biureto reage com as proteínas da amostra, formando um complexo corado de corado de cor azul, sendo proporcional a concentração proteica da amostra.

Determinou-se a proteínas totais dos tecidos cerebral, branquial e hepático, e, para tanto, em cubetas de 4 mL, adicionou-se 2 mL do reagente de biureto (marca Labtest) e 50 µL do homogeneizado das amostras. Para o padrão, utilizou-se o padrão contendo 2 mL do reagente de biureto (40 mg/L) e 0,2 mL do reagente de cor. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, em 545 nm.

4.2.6 Análise do sinergismo e antagonismo

A interação de sinergismo e antagonismo na mistura dos inseticidas clorpirifós e fipronil foi analisada após o cálculo do efeito esperado e do efeito observado, aplicando o modelo de ação independente proposto por Gottardi *et al.* (2017), que assim dispõe:

$$\text{Efeito esperado} = \frac{\text{Fipronil}}{\text{Controle}} \times \frac{\text{Clorpirifós}}{\text{Controle}} \quad (1)$$

Na equação acima (1), é considerando os efeitos da exposição ao clorpirifós e ao fipronil, de forma individual, em relação aos respectivos grupos controle, para encontrar o efeito esperado (EE). Na equação abaixo (2) é demonstrado o cálculo do efeito observado (EO), que é o efeito obtido da mistura de clorpirifós e fipronil, em relação ao grupo controle.

$$\text{Efeito observado} = \frac{\text{Mistura}}{\text{Controle}} \quad (2)$$

A determinação de sinergismo e antagonismo ocorreu pela relação de efeito esperado por efeito observado, onde $EO > EE$ indica sinergismo e $OE < EE$ indica antagonismo, de acordo com Portruneli *et al.* (2021).

4.2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos de cada atividade enzimática analisada foram expressos nas formas de média e desvio padrão, e foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk com o objetivo de verificar se os dados possuem uma distribuição similar a uma distribuição normal. Nos testes de toxicidade em que foi constatado a heterocedasticidade, realizou-se a transformação dos dados propostos por Box e Cox (1964). Consequente, os resultados foram submetidos à ANOVA (valor- $p < 0,05$), a fim de verificar as possíveis diferenças entre os testes de toxicidade e após, realizou-se o teste de comparação das médias obtidas, com o uso do teste de Tukey, que buscou analisar a diferença mínima significativa entre médias, apontando quais diferem entre si, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Nessa etapa da análise estatística, utilizou-se os *softwares* Excel, SAS e R.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Atividade da acetilcolinesterase

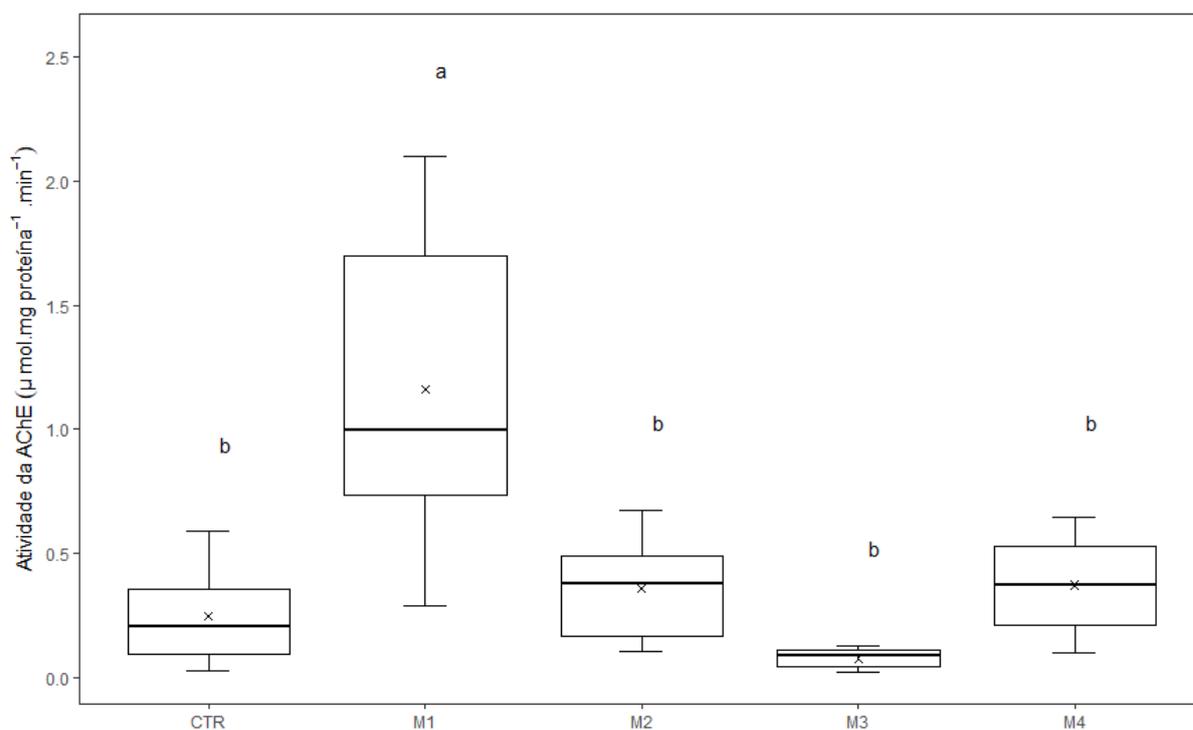
4.3.1.1 Cérebro

Os resultados da atividade cerebral da AChE em tilápia do Nilo após a exposição aguda aos inseticidas fipronil e clorpirifós (mistura) são expostos na Figura 18. Os referidos resultados foram submetidos à ANOVA e apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), sendo que, em M1 ocorreu a ativação da atividade cerebral da AChE, quando comparada aos demais grupos. Embora não haja diferença estatisticamente significativa, em M3 é possível observar uma leve inibição da atividade enzimática.

Registro da inibição da atividade da AChE sob a exposição combinada de agrotóxico foi constatada por Jiang *et al.* (2022) que, na mistura de clorpirifós e 1,1-

dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno (p,p'-DDE), observaram que a atividade da AChE no cérebro de peixe zebra foi inibida significativamente em 60,6%.

Figura 18 – Atividade da AChE no cérebro de *Oreochromis niloticus* após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

A atividade cerebral da AChE em peixes zebra também diminuiu significativamente sob efeito da exposição combinada de clorpirifós e glifosato em todas as concentrações testadas dos agrotóxicos (FALFUSHYNSKA *et al.*, 2022). Hatami, Banaee e Haghi (2019) observaram a inibição da atividade da AChE no cérebro de carpa capim sob a exposição combinada de clorpirifós e polietilenoglicol.

Bonifácio *et al.* (2016) analisaram o efeito tóxico do clorpirifós e do glifosato em *Cnesterodon decemmaculatus*, durante a exposição nas concentrações de 0,0084 $\mu\text{L/L}$ e 0,00084 $\mu\text{L/L}$ de clorpirifós, e 0.2 e 2 mg/L de glifosato, bem como as combinações dos dois agrotóxicos, durante seis semanas, e constataram que a mistura de clorpirifós e glifosato não afetou significativamente a atividade cerebral da AChE em *Cnesterodon decemmaculatus*.

Situação semelhante ao ocorrido no presente estudo, observado em M1, foi constatado por VIANA *et al.*, (2022), quando testou a mistura de fipronil e 2,4-D, em peixe zebra e verificou aumento da resposta da AChE no músculo.

Por outra perspectiva, Reinwald *et al.* (2022), utilizando embrião de peixe-zebra, caracterizaram as respostas transcriptômicas a uma variedade de concentrações subletais de seis inseticidas direcionados a nervos e músculos com diferentes modos de ação primários específicos (abamectina, carbaril, clorpirifós, fipronil, imidaclopride e metoxicloro). Utilizaram concentrações de fipronil de 0,5-464 µg/L e de clorpirifós de ≤10 µg/L, sendo a pureza das substâncias de ≥99 e ≥98%, respectivamente. Os autores analisaram os fatores biológicos afetados e identificaram candidatos a biomarcadores para um conjunto de inseticidas direcionados a nervos e músculos que atuam pelos modos de ação, sendo que o clorpirifós tem como modo de ação a inibição da AChE e o fipronil possui o modo de ação de antagonista do canal de cloreto fechado GABA.

4.3.2 Atividade da catalase

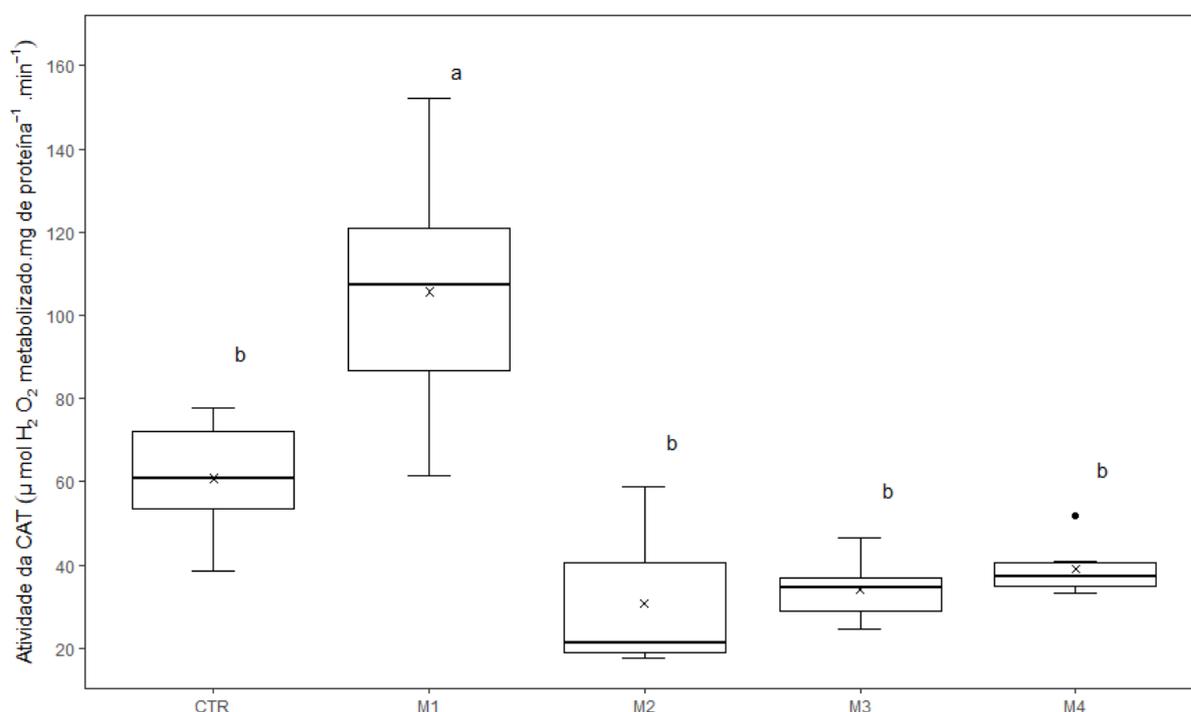
4.3.2.1 Cérebro

A atividade cerebral da CAT em tilápia do Nilo sob efeito da exposição à combinação de fipronil e clorpirifós é apresentada na Figura 19. Os resultados do experimento foram submetidos a ANOVA, onde foi constatado a diferença estatisticamente significativa, sendo que, em M1 ocorreu aumento significativo da atividade da CAT, se comparada aos demais grupos testados.

Situação similar ao presente experimento foi constatada após a exposição da mistura de clorpirifós e p,p'-DDE, onde a atividade da CAT no cérebro de peixe zebra aumentou significativamente (JIANG *et al.*, 2022).

Outrossim, sob efeito da combinação de clorpirifós e endosulfan, a atividade cerebral da CAT em *Labeo rohita* foi inibida significativamente após a exposição de 96 h aos agrotóxicos, além disso, a atividade da CAT nos músculos de *Labeo rohita* sob efeito da mistura dos dois agrotóxicos também diminuiu significativamente (NAZ *et al.*, 2019).

Figura 19 – Atividade da CAT no cérebro de *Oreochromis niloticus* após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

No cérebro de carpa comum, ocorreu a inibição da atividade da CAT após a exposição combinada de fipronil e buprofezina (GHAZANFAR; SHAHID; QURESHI, 2018). Após a exposição à mistura de clorpirifós e atrazina, Xing *et al.* (2012) verificaram que a atividade cerebral da CAT em carpa comum diminuiu significativamente diante da exposição aos agrotóxicos.

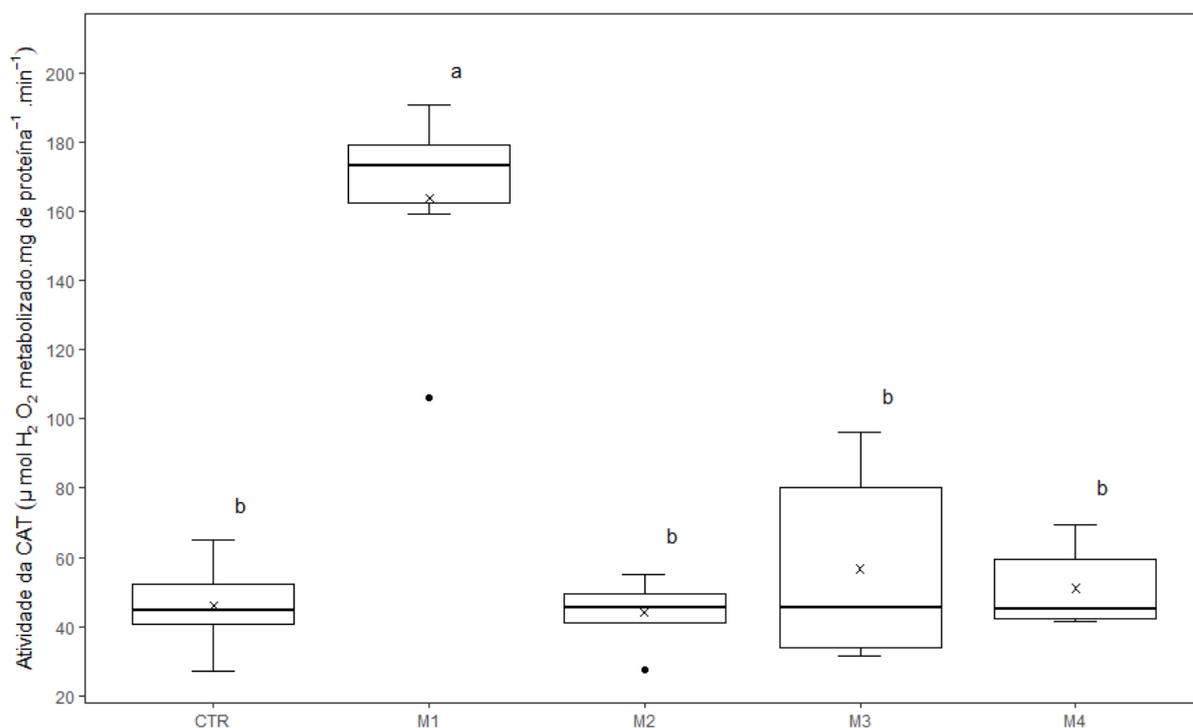
Bevilaqua *et al.* (2020) estudaram o efeito tóxico de fipronil em mistura com fungicidas (piraclostrobina e metil-tiofanato) em peixes zebra adultos, por sete dias, e verificaram que a misturas dos referidos agrotóxicos ocasionou a diminuição da atividade da CAT no cérebro dos peixes analisados.

4.3.2.2 Brânquias

Em brânquias de tilápias do Nilo, os resultados obtidos da exposição aguda da mistura (fipronil e clorpirifós) (Figura 20) foram submetidos à ANOVA e apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Similar à atividade cerebral da CAT,

a atividade da catalase por meio também foi aumentada significativamente na concentração M1. Nas demais concentrações, não foi constatado diferenças significativas.

Figura 20 – Atividade da CAT nas brânquias de *Oreochromis niloticus* após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

A ativação da atividade da catalase em brânquias de peixes também foi constatada por Viana *et al.* (2022), que observaram o aumento da atividade da CAT nas brânquias de peixe zebra após a exposição da mistura de fipronil e 2,4-D. Em brânquias de *Labeo rohita*, a atividade da CAT aumentou significativamente após a exposição combinada de clorpirifós e endosulfan (NAZ *et al.*, 2019). A atividade da CAT nas brânquias de peixe zebra aumentou significativamente após a exposição combinada de clorpirifós e p,p'-DDE (JIANG *et al.*, 2022).

Resposta enzimática contrária foi constatada em carpa comum, na qual a atividade da CAT nas brânquias da espécie foi inibida após a exposição em conjunto de fipronil e buprofezina (GHAZANFAR; SHAHID; QURESHI, 2018). No coração de

Labeo rohita, a atividade da CAT sofreu inibição sob efeito da combinação de clorpirifós e endosulfan pelo período de 96 h (NAZ *et al.*, 2019).

Já a exposição combinada de 2,4-D e fipronil não apresentou diferença estatisticamente significativa para a atividade da CAT nas brânquias de *Prochilodus lineatus*, embora houve uma leve inibição da atividade enzimática (PORTRUNELI *et al.*, 2021). Viana *et al.* (2022) avaliaram o efeito do fipronil em *Danio rerio* após a exposição de 96 h da mistura de fipronil (3.10 L/kg) e 2,4-D (1.27 L/kg). Sob efeito da mistura de fipronil e 2,4-D, a atividade da CAT de corpo inteiro de peixe zebra não sofreu diferença estatisticamente significativa.

Sob uma perspectiva diferente, Fuller *et al.* (2022) enriqueceram pastilhas com a mistura de clorpirifós, fipronil, p,p'-DDE, bifentrina e esfenvalerato, e verificam seu efeito em juvenis de *Oncorhynchus tshawytscha*, bem como a influência da temperatura. Assim, verificaram que a temperatura aumentou os efeitos dos agrotóxicos no desempenho da natação e de dois genes homeostáticos lipídios em juvenis de rei salmão.

4.3.2.3 Fígado

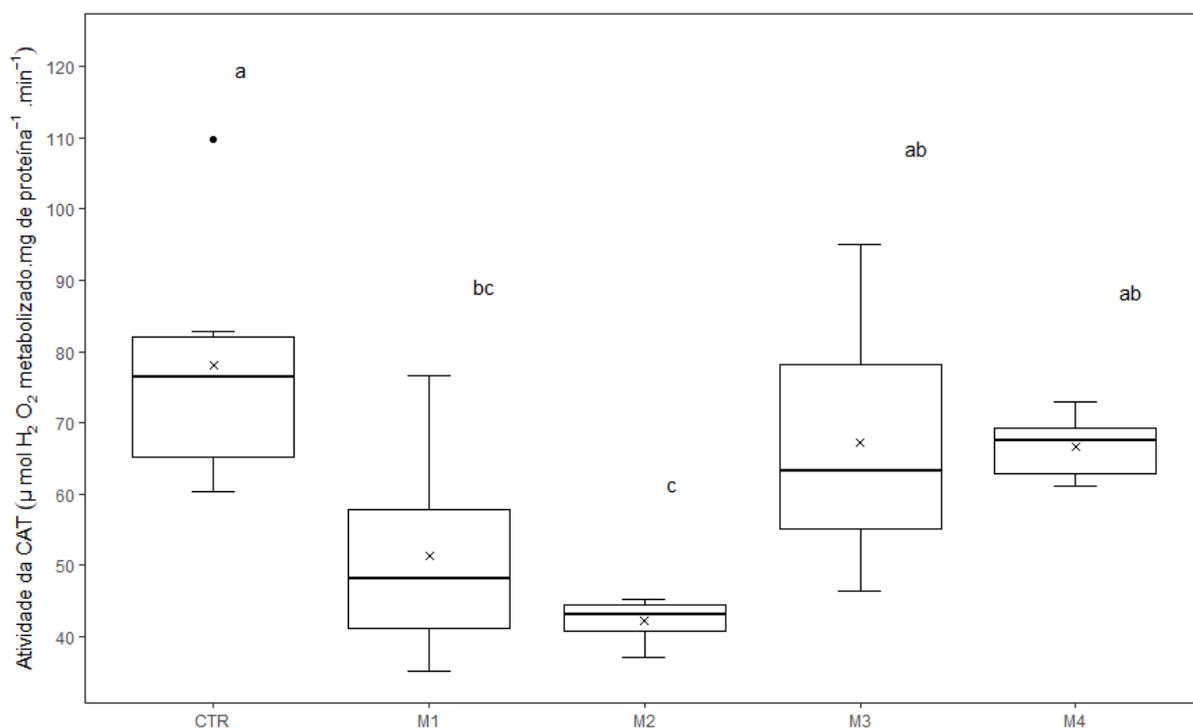
Sob efeito da exposição aguda à combinação dos inseticidas clorpirifós e fipronil, a atividade hepática da CAT em tilápia do Nilo é mostrada na Figura 21. Submetidos à ANOVA, os resultados demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O teste de Tukey apresentou diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os grupos M1 e M2, demonstrando, assim, a inibição da CAT no fígado dos peixes em M1 e M2 após a exposição de 96 h a mistura desses compostos.

Do mesmo modo, a atividade hepática da CAT em carpa comum foi inibida após a exposição combinada de fipronil e buprofezina (GHAZANFAR; SHAHID; QURESHI, 2018). A combinação de fipronil e chumbo também ocasionou a inibição significativa da CAT em carpa comum em estudo de El-Murr *et al.*, 2016.

De maneira oposta, a exposição combinada de clorpirifós e p,p'-DDE ativou significativamente a atividade da CAT no fígado de peixe zebra (JIANG *et al.*, 2022). De acordo com NAZ *et al.*, (2019) em estudo com a espécie *Labeo rohita*, a atividade hepática da CAT aumentou após de 96 h de exposição da combinação de clorpirifós e endosulfan, sendo que no rim também foi identificado a ativação da atividade

enzimática da CAT. Já para carpas capim quando expostas a combinação de polietilenoglicol e clorpirifós também apresentaram aumento significativo da atividade hepática da CAT para a espécie (HATAMI; BANAEI; HAGHI, 2019).

Figura 21 – Atividade da CAT no fígado de *Oreochromis niloticus* após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Já a atividade da CAT no fígado de *Cnesterodon decemmaculatus* não foi afetada significativamente após a exposição combinada de clorpirifós e glifosato (BONIFACIO *et al.*, 2016).

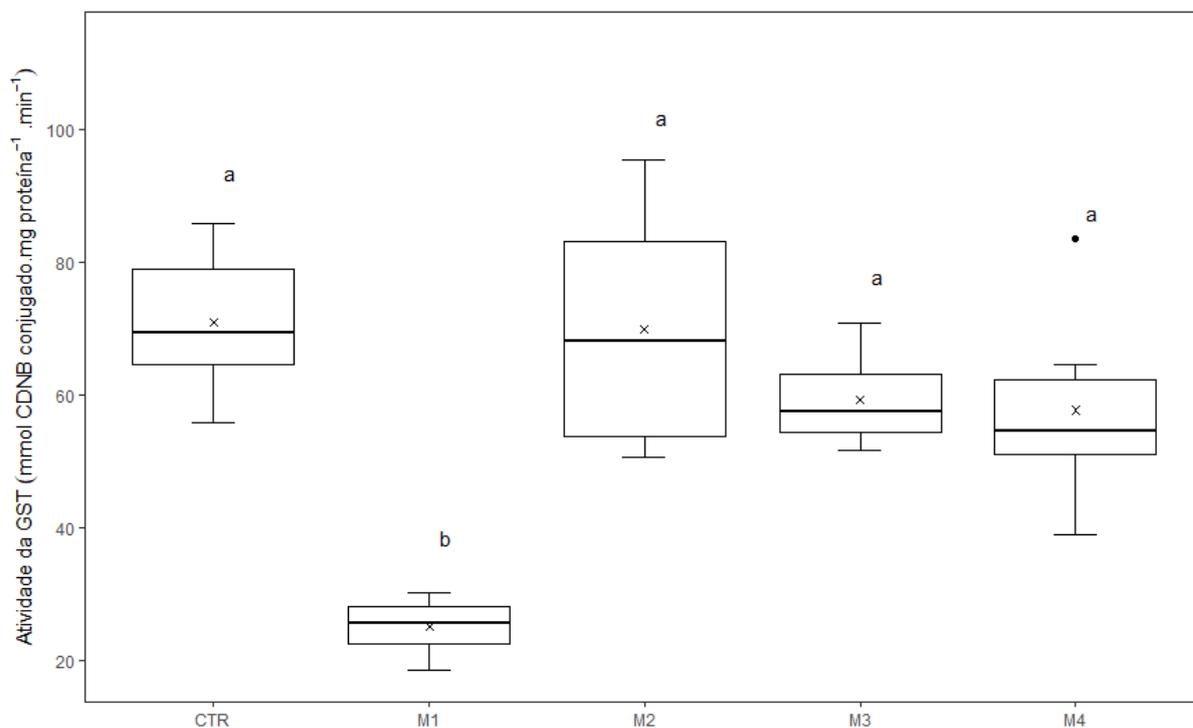
4.3.3 Atividade da glutiona-S-transferase

4.3.3.1 Cérebro

A atividade cerebral da GST em tilápia do Nilo sob efeito da exposição combinada de fipronil e clorpirifós é exposta na Figura 22. Os resultados encontrados foram submetidos à ANOVA e apresentaram diferença estatisticamente significativa

($p < 0,05$), sendo em M2, observado inibição da atividade da GST em tilápia do Nilo, quando comparada aos demais grupos do experimento.

Figura 22 – Atividade da GST no cérebro de *Oreochromis niloticus* após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Ao contrário do constatado no presente estudo, os demais experimentos relacionados com os inseticidas clorpirifós e fipronil relatam a ativação da atividade cerebral da GST nos peixes. Nesse sentido, têm-se os peixes da espécie *Labeo rohita* que, quando expostos a mistura de clorpirifós e endosulfan pelo período de 96 h, apresentaram o aumento significativo da atividade da GST no cérebro e no músculo cardíaco (NAZ *et al.*, 2019).

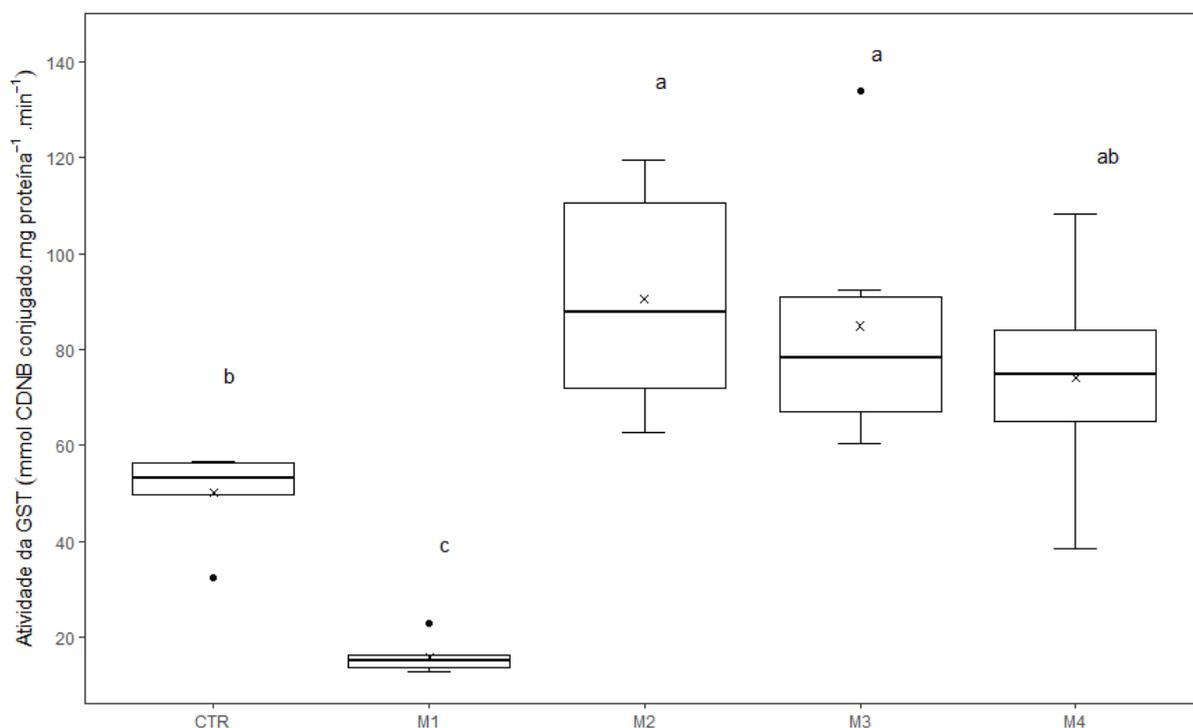
A atividade da GST no tecido cerebral de peixe zebra também foi ativada significativamente após a exposição combinada de clorpirifós e p,p'-DDE (JIANG *et al.*, 2022). Sob efeito da mistura de clorpirifós e glifosato, a atividade cerebral de GST em *Cnesterodon decemmaculatus* aumentou significativamente (BONIFACIO *et al.*, 2016).

Entretanto, posterior à mistura de fipronil e 2,4-D, a atividade da GST de corpo inteiro de peixe zebra foi aumentada (VIANA *et al.*, 2022).

4.3.3.2 Brânquias

A Figura 23 apresenta os resultados da atividade da GST nas brânquias de tilápia do Nilo sob efeito da mistura dos inseticidas clorpirifós e fipronil, sendo que esses resultados foram submetidos à ANOVA e apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Estatisticamente, em M1 ocorreu inibição da atividade enzimática da GST, se comparada aos demais grupos. Comportamento contrário foi observado em M2 e M3, onde a atividade da GST foi ativada significativamente quando relacionada com o grupo controle.

Figura 23 – Atividade da GST nas brânquias de *Oreochromis niloticus* após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Resposta semelhante aos grupos M2 e M3 foi observada sob a exposição combinada de clorpirifós e endosulfan, na qual a atividade da GST em brânquias e no

músculo de *Labeo rohita* aumentou significativamente dentro do período de 96 h (NAZ *et al.*, 2019). Peixes zebra exposto as misturas de 7,6 µg/L de clorpirifós com 100 µg/L de p,p'-DDE, e 76 µg/L de clorpirifós com 50 g/L de p,p'-DDE, demonstraram que a atividade da GST nas brânquias de peixe zebra também foi ativada significativamente após a exposição combinada dos compostos (JIANG *et al.*, 2022).

Foi observado por Bonifacio *et al.* (2016) que não houve diferença da atividade da GST em brânquias de peixes da espécie *Cnesterodon decemmaculatus* após a exposição a mistura de clorpirifós (0,00084 e 0,0084 µg/L) e glifosato (0,2 e 2mg/L), durante seis semanas.

Sob efeito da mistura de fipronil e 2,4-D, a atividade da GST nas brânquias de peixe zebra não sofreu alterações significativas se comparada ao grupo controle (VIANA *et al.*, 2022). Em brânquias de *Prochilodus lineatus*, a atividade da GST não apresentou diferença estatisticamente significativa após a exposição combinada de 2,4-D e fipronil, porém, foi possível identificar um leve aumento da atividade enzimática (PORTRUNELI *et al.*, 2021).

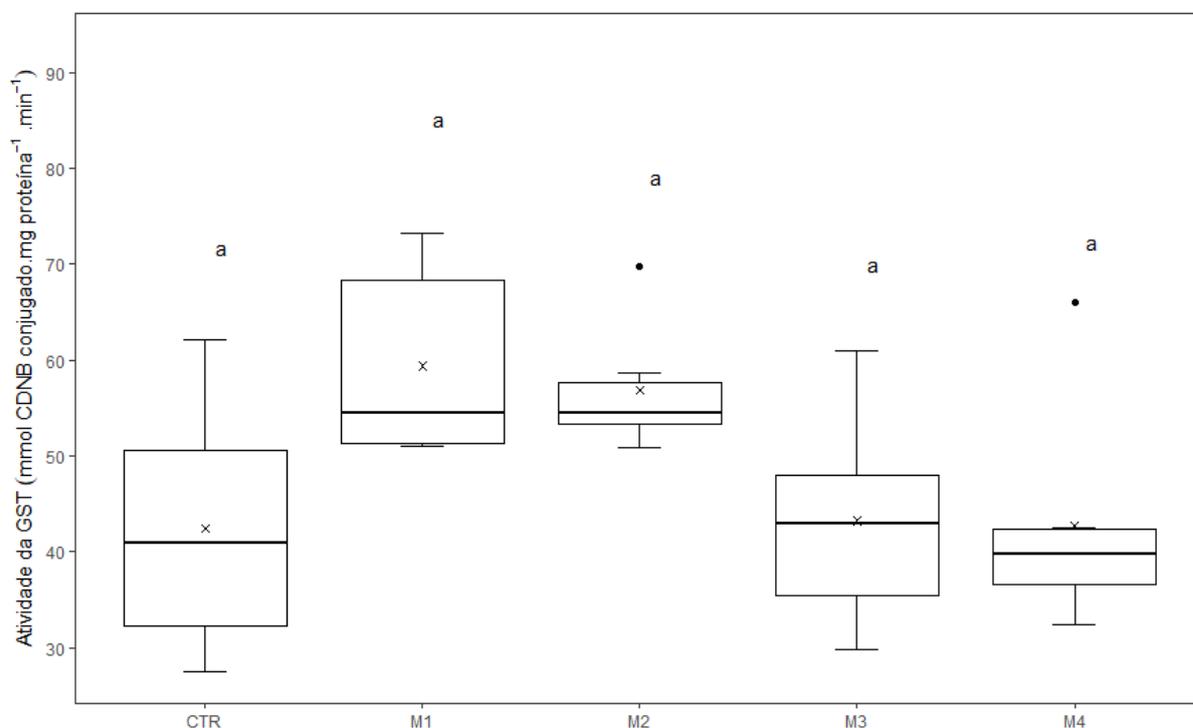
4.3.3.3 Fígado

A atividade hepática da GST em tilápia do Nilo sob a exposição da mistura de clorpirifós e fipronil é exibida na Figura 21, sendo que estes resultados foram submetidos à ANOVA, entretanto, não houve diferença estatisticamente entre eles, ainda assim, em M4 é possível observar uma tendência de inibição da atividade da GST.

Não obstante, a atividade hepática da GST em peixes zebra expostos a mistura de clorpirifós e glifosato diminuiu significativamente (concentrações de Roundup 500 µg/L com clorpirifós 0,1 µg/L, e Roundup 15 µg/L com clorpirifós 3 µg/L), sendo que a maior inibição ocorreu na menor concentração de clorpirifós com a maior concentração de glifosato (FALFUSHYNSKA *et al.*, 2022).

Bonifacio *et al.* (2016) também verificaram que a exposição combinada de clorpirifós e glifosato ocasionou a inibição da atividade de GST no fígado de *Cnesterodon decemmaculatus* em relação ao grupo controle. Ainda, a atividade enzimática da GST no fígado de carpa comum foi inibida significativamente após a exposição combinada de fipronil e chumbo (EL-MURR *et al.*, 2016).

Figura 24 – Atividade da GST no fígado de *Oreochromis niloticus* após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Outrossim, a atividade hepática da GST em *Labeo rohita* foi ativada significativamente sob efeito da mistura de clorpirifós e endosulfan, do mesmo modo, a atividade da CAT no rim aumentou significativamente após a exposição combinada dos referidos agrotóxicos (NAZ *et al.*, 2019). Jiang *et al.* (2022) observaram que a exposição combinada de clorpirifós e p,p'-DDE também ativou a atividade da GST no fígado de peixe zebra.

Em uma perspectiva diferente, Kunwar *et al.* (2022) analisaram a toxicidade individual e em mistura dos inseticidas clorpirifós e diclorvos por meio da exposição aguda de *Tor putitora* a mistura de clorpirifós (0,075 mg/L) e de diclorvos (1,29 mg/L). Os resultados obtidos no estudo demonstraram que a maioria dos biomarcadores analisados (glicemia, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, ureia, albumina sanguínea e triglicerídeos) foram afetados pela exposição aos agrotóxicos, porém se recuperam durante o período de depuração.

4.3.3 Efeito da mistura de clorpirifós e fipronil

A exposição pelo período de 96 h aos inseticidas fipronil e clorpirifós apresentou, na maioria dos experimentos (70%) de efeito sinérgico. Efeito antagônico foi observado na atividade hepática da CAT em todas as concentrações, na atividade da GST nas brânquias de tilápia do Nilo na menor concentração dos inseticidas (F1, C1 e M1) e na atividade hepática da GST na maior concentração dos agrotóxicos (F4, C4 e M4). Assim, o presente estudo demonstrou que a mistura dos inseticidas fipronil e clorpirifós afeta os organismos aquáticos e apresenta interação sinérgica, ou seja, os efeitos tóxicos são potencializados na combinação desses dois agrotóxicos.

A interação sinérgica pela mistura de fipronil foi constatada por Viana *et al.* (2022), que verificaram a interação sinérgica na atividade enzimática da CAT nas brânquias de peixe zebra após a exposição da mistura de fipronil e 2,4-D. De maneira oposta, a atividade da CAT e GST no corpo inteiro, a atividade de GST nas brânquias, e a atividade da AChE no músculo, apresentaram efeito antagônico sob a exposição da mistura de fipronil e 2,4-D.

A pesquisa realizada por Mena *et al.* (2022), teve por objetivo identificar o potencial de contaminantes para desencadear a resposta de evitação em peixes na exposição individual de clorpirifós, glifosato e clorotalonil, e exposição combinada de clorpirifós com glifosato e clorotalonil com glifosato. Constatou-se, no período total de 3 horas, interações sinérgicas nas misturas de clorpirifós e glifosato, na exposição de juvenis de *Danio rerio*, sendo que a mistura interferiu na resposta comportamental de evitação, uma vez que, os peixes foram distribuídos uniformemente ao longo do sistema de compartimentos, mostrando uma redução significativa no número de organismos no compartimento com concentrações mais elevadas.

Kunwar *et al.* (2021) realizam a exposição de carpa comum a concentrações subletais da mistura de clorpirifós (20%) e diclorvos (80%), sendo que, a LC_{50} em 96 h para a mistura foi de 0,145 mg/L de clorpirifós com 5.180 mg/L de diclorvos. Em todas as concentrações testadas houve o aumento de movimentos bucais e a captação de oxigênio de maneira dose-dependente, apresentando efeito sinérgico da mistura desses agrotóxicos, sendo que a toxicidade do clorpirifós foi maior do que a do diclorvos. Assim, os autores indicam que é necessário ter cautela na exposição de agrotóxicos, desenvolvendo padrões de qualidade da água, bem como de diretrizes, para os organismos aquáticos.

Outrossim, no estudo realizado por Zhang *et al.* (2022), verificou-se que a combinação de clorpirifós e carbendazim teve um efeito antagônico na velocidade média de natação e aceleração claro-escuro, além disso, constatou-se que o clorpirifós suprime a atividade motora. A exposição à mistura de fipronil e buprofezina também indicou antagonismo em carpa comum (GHAZANFAR; SHAHID; QURESHI, 2018).

Portruneli *et al.* (2021), buscaram analisar a bioconcentração e as alterações bioquímicas e morfológicas nas brânquias do peixe *Prochilodus lineatus* na mistura do inseticida fipronil e do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), nas concentrações de 447,0 µg/L de 2,4-D (67%) com 63,5 µg/L de fipronil (80%), e constataram que a mistura dos agrotóxicos apresentou efeito antagônico em *Prochilodus lineatus*.

Falfushynska *et al.* (2022) avaliaram os efeitos tóxicos individuais e em conjunto de Roundup (glifosato) e clorpirifós para o peixe zebra utilizando índices moleculares e bioquímicos no fígado, cérebro e sangue dos peixes. Os peixes foram expostos por 14 dias nas seguintes concentrações de mistura: Roundup 500 µg/L com clorpirifós 0,1 µg/L, e Roundup 15 µg/L com clorpirifós 3 µg/L. Por fim, os autores verificaram que o clorpirifós mostrou efeitos pró-oxidantes mais fortes do que o glifosato e concluíram que a análise de multibiomarcadores demonstrou que o clorpirifós é consideravelmente mais tóxico que o Roundup. Já na mistura dos referidos agrotóxicos, os efeitos foram causados principalmente pelo clorpirifós, com efeitos mínimos ou atenuantes da adição do Roundup, demonstrando efeito antagônico na mistura dos dois agrotóxicos, porém, não foi observado a redução da toxicidade com a adição do glifosato.

Conforme Portruneli *et al.* (2021), é importante considerar que o uso contínuo dos agrotóxicos pode resultar no aumento das concentrações na natureza, e assim, a exposição crônica a essas concentrações mais elevadas pode levar a bioconcentração a níveis superiores aos que os peixes possuem capacidade de superar pequenas concentrações de agrotóxicos, ocasionando inúmeros malefícios aos organismos aquáticos.

3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a análises das atividades enzimáticas da acetilcolinesterase, catalase e glutathione-S-transferase no tecido cerebral, branquial e hepático de tilápia do Nilo expostas a mistura de clorpirifós e fipronil pelo período de 96 h, verificou-se que a combinação desses dois agrotóxicos provocou alterações estatisticamente significativas nas atividades da AChE no cérebro, da CAT em todos os tecidos analisados, e na GST no cérebro e brânquias de tilápia Nilo, sendo observado a inibição das atividades da CAT no tecido hepático e da GST nos tecidos cerebral e branquial.

Assim, constatou-se que a combinação de fipronil e clorpirifós promoveu o estresse oxidativo em tilápias do Nilo, mediante a inibição das atividades enzimáticas da catalase e glutathione-S-transferase.

Ainda, na análise da interação de sinergismo e antagonismo na mistura do clorpirifós e fipronil, observou-se que a combinação desses inseticidas apresentou efeito sinérgico em 70% das análises realizadas, demonstrando que a mistura do fipronil e clorpirifós potencializa o efeito tóxico desses agrotóxicos em tilápia do Nilo.

Tendo em vista que o presente estudo é precursor no assunto em questão, sugere-se que novos experimentos sejam realizados com a combinação dos inseticidas clorpirifós e fipronil em espécies diversas, a fim de verificar se os efeitos tóxicos desses agrotóxicos também são potencializados em outras espécies de peixes.

5 EFEITO DOS INSETICIDAS FIPRONIL E CLORPIRIFÓS NA ATIVIDADE DA ANIDRASE CARBÔNICA EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

5.1 INTRODUÇÃO

Visando alimentar o excessivo crescimento da população mundial, as aplicações de agrotóxicos vêm aumentando constantemente, tornando-se evidente nos últimos anos. Embora os agrotóxicos sejam substâncias vastamente utilizadas nas atividades agrícolas, e atualmente, tornaram-se indispensáveis para garantir a alta produtividade por meio do controle de pragas no cultivo de plantações (GUPTA *et al.*, 2014), o crescimento das áreas de cultivo agrícola em conjunto com o uso intensivo de agrotóxicos vem contribuindo para a contaminação e poluição dos recursos hídricos (BONIFACIO *et al.*, 2017).

Não obstante, as misturas de agrotóxicos vêm sendo empregadas simultaneamente no controle de pragas e doenças, facilitando o manejo agrícola, tornando-se uma prática comum na agricultura atual (BEVILAQUA *et al.*, 2020). No entanto, esse uso generalizado de agrotóxicos, como em misturas, pode ocasionar diversos impactos negativos ao meio ambiente, entre eles, a contaminação e/ou poluição do solo e da água, apresentando potencial para induzir danos no ecossistema, produzindo efeitos tóxicos em organismos não-alvo (BEVILAQUA *et al.*, 2020). Diante da contaminação dos recursos hídricos por agrotóxicos, os peixes, importantes componentes dos ambientes aquáticos, são expostos constantemente a esses produtos de diferentes maneiras (UÇAR *et al.*, 2020).

Ainda que, os organismos aquáticos estejam expostos a diversas misturas de agrotóxicos no ambiente natural, as avaliações de riscos comumente utilizadas consideram a avaliação apenas de compostos individuais (FULLER *et al.*, 2022). Logo, quando se busca uma análise mais realista dos efeitos tóxicos dos agrotóxicos, é importante realizar a avaliação com uma combinação de produtos de uso agrícola, em vez de utilizar apenas uma substância. A avaliação sobre os efeitos tóxicos da relação de dois ou mais agrotóxicos poderá demonstrar a situação verdadeira dos riscos da exposição de agrotóxicos aos organismos não-alvo, tornando a análise mais realista (JIANG *et al.*, 2022; KUNWAR *et al.*, 2022 SINHA *et al.*, 2022). Nesse sentido, os testes de toxicidade em organismos aquáticos diante da exposição a agrotóxicos

são considerados um método importante para avaliar os potenciais efeitos nos tecidos dos peixes (UÇAR *et al.*, 2021a).

Entre os agrotóxicos comumente utilizados nas práticas agrícolas, encontram-se os inseticidas clorpirifós e fipronil. O clorpirifós é um inseticida organofosforado amplamente aplicado nas culturas agrícolas, permeando grande parte dos cursos hídricos e afetando os organismos aquáticos (HOSSAIN *et al.*, 2022). O fipronil é um inseticida fenilpirazol de amplo uso, comumente empregado na agricultura, apresenta alta toxicidade para os peixes e é adsorvido a sedimentos em ambientes aquáticos (DEIÚ *et al.*, 2021a; DEIÚ *et al.*, 2021b; LI *et al.*, 2020). Ainda que exista inúmeros estudos dos efeitos colaterais ocasionados em espécies não-alvo pelo uso do fipronil, este inseticida continua sendo amplamente empregado no controle de pragas nas atividades agrícolas (DALLARÉS *et al.*, 2020).

Ademais, os inseticidas apresentam potencial impactos aos organismos não-alvo, interrompendo o funcionamento saudável do meio ambiente, principalmente dos organismos dos ambientes aquáticos, tendo em vista que este ambiente é o receptor final do ecossistema aquático (UÇAR *et al.*, 2021b).

Por isso, considerando que os agrotóxicos apresentam toxicidade para os ambientes aquáticos e a escassez de estudos relacionando os efeitos tóxicos dos produtos químicos nos processos de osmorregulação em peixes, o presente estudo tem por objetivo verificar os possíveis efeitos tóxicos dos inseticidas fipronil e clorpirifós mediante a análise da anidrase carbônica (AC) e da Na⁺, K⁺ - ATPase nas brânquias de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sob a exposição de 96 h aos referidos inseticidas, de forma individual e em mistura.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo em questão foi desenvolvido no Centro de Ciências Agroveterinárias (Cav) da Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc), situado no Município de Lages, Santa Catarina, Brasil. No estudo foram utilizados juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), adquiridos em piscicultura da região, com massa de 10,88 ± 6,54 g e comprimento de 8,52 ± 2,16 cm, os quais foram aclimatados por 36 (trinta e seis) dias, com aeração e temperatura constante, com alimentação e troca de água por duas vezes ao dia, durante todo o período de aclimação.

5.2.1 Teste de toxicidade

Decorrido o período de aclimação, realizou-se o teste de toxicidade aguda com duração de 96 h, organizado em três experimentos: um experimento apenas com o clorpirifós (Tabela 4), o outro com fipronil (Tabela 5), e por fim, com a combinação de clorpirifós e fipronil (Tabela 6). Cada experimento é composto por cinco grupos, que foram expostos a diferentes concentrações de clorpirifós e fipronil, conforme exposto nas Tabelas 4, 5 e 6. Para o teste de toxicidade, utilizou-se dois produtos comerciais, um composto por fipronil (2,5%) e outro, formado por clorpirifós (48%) e xilol (50%).

Tabela 4 – Concentrações de clorpirifós para cada grupo

Grupo	Sigla	Quantidade de clorpirifós (mg/L)
Controle	CTR	0,00
Clorpirifós 1	C1	0,0005
Clorpirifós 2	C2	0,001
Clorpirifós 3	C3	0,003
Clorpirifós 4	C4	0,004

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os 90 (noventa) peixes foram distribuídos aleatoriamente em 15 (quinze) aquários, contendo 20 L cada. Durante todo o período do teste de toxicidade aguda (96 h), manteve-se o fotoperíodo de 12 h claro: 12 h escuro, com aeração constante, pH $8,55 \pm 0,18$, temperatura de $28,00 \pm 0,32$ °C, os peixes não foram alimentados e não houve a troca de água dos aquários.

Tabela 5 – Concentrações de fipronil para cada grupo

Grupo	Sigla	Quantidade (mg/L)
Controle	CTR	0,00
Fipronil 1	F1	0,12
Fipronil 2	F2	0,16
Fipronil 3	F3	0,32
Fipronil 4	F4	0,64

Fonte: Autora (2023).

Decorrido o período do teste de toxicidade, os peixes foram eutanasiados e foram coletados os tecidos do cérebro, brânquias e fígado, sendo armazenados individualmente em microtubo tipo *Eppendorf* com capacidade de 1,5 mL, e

posteriormente, foram mantidos sob refrigeração, baixa temperatura, até que fosse realizada as análises enzimáticas. Ainda, com o auxílio do agitador mecânico, todos os tecidos foram homogeneizados em solução de tampão de fosfato de potássio (1,0 M e pH=7,0).

Tabela 6 – Concentrações de clorpirifós e fipronil para cada grupo

Grupo	Sigla	Quantidade (mg/L)		Quantidade (%)	
		Clorpirifós	Fipronil	Clorpirifós	Fipronil
Controle	CTR	0,00	0,00	-	-
Mistura 1	M1	0,015	0,12	11,11	88,89
Mistura 2	M2	0,03	0,16	15,79	84,21
Mistura 3	M3	0,05	0,32	13,51	86,49
Mistura 4	M4	0,06	0,64	8,57	91,43

Fonte: Autora (2023).

Conforme já mencionado no capítulo anterior, realizou-se, também, o teste de toxicidade aguda com a mistura das seguintes concentrações de clorpirifós e fipronil: clorpirifós na quantidade de 0,015, 0,050, 0,075 e 0,1 mg/L; e fipronil na quantidade de 0,12, 0,16, 0,32 e 0,64 mg/L.

No entanto, nos grupos que continham clorpirifós na quantidade de 0,075 e 0,1 mg/L ocorreu alta taxa de mortalidade dos indivíduos. Diante disso, a concentração de clorpirifós foi reduzida para 0,03 e 0,06 mg/L, mantendo as demais concentrações sem alteração, possibilitando que todos os indivíduos sobrevivessem durante o período do teste.

Não obstante, na exposição individual ao clorpirifós nas concentrações iniciais de 0,015, 0,050, 0,075 e 0,1 mg/L, houve grande taxa de mortalidade nas duas maiores concentrações do inseticida, assim, realizou-se o teste com as concentrações expostas na Tabela 4.

Acredita-se que a alta toxicidade do inseticida industrial de clorpirifós seja dado devido a presença de xilol em sua composição, tendo em vista que, em demais estudos foram utilizadas concentrações maiores de clorpirifós, no entanto, quando se trata de toxicidade do xilol em peixes, os estudos são escassos. Assim, sugerimos que novos estudos sejam realizados com o composto xilol em peixes, para confirmar tal hipótese de alta toxicidade em espécie não-alvo.

5.2.2 Atividade da anidrase carbônica

Na determinação da atividade da enzima anidrase carbônica, empregou-se o método proposto por Henry (1991), que consiste em uma solução de água com CO₂ que é catalisado pela anidrase carbônica, com transferência de íons H⁺ entre o sítio ativo da enzima e o ambiente, resultando em uma alteração no pH à medida que a reação avança ao equilíbrio.

Para tanto, preparou-se uma solução de reação composta por manitol, sacarose, tris e fosfato, com pH 7,40. Quanto ao substrato, borbulhou-se CO₂ em água ultrapura. Na reação, utilizou-se 7,5 mL da solução de reação, 1 mL do substrato e 0,05 ml de tecido branquial homogeneizado.

Anotado o pH inicial (T₀) da solução de reação com a amostra, adicionou-se a água saturada com CO₂ e o pH foi registrado a cada 5 segundos, durante 30 segundos. Para calcular a atividade enzimática, empregou-se regressão linear entre a taxa de reação catalisada e a taxa não catalisada, relacionando com as proteínas totais da respectiva amostra.

5.2.3 Atividade do Na⁺, K⁺ - ATPase

Para a determinação da atividade do Na⁺, K⁺ - ATPase, foi utilizado a metodologia proposta por McCormick (1993), onde a hidrólise sensível à ouabaína do Trifosfato de Adenosina (ATP) é enzimaticamente ligada à oxidação da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH).

Para tanto, foram realizadas as seguintes soluções:

- Solução A: composta por Lactato Desidrogenase (LDH), Piruvato Quinase (PK), Fosfoenolpiruvato (PEP), ATP, NASH e imidazol, em pH 7,5;
- Solução B: consiste na adição de ouabaína na Solução A;
- Solução salina (1): constituída por cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio (MgCL₂-6H₂O), cloreto de potássio (KCl) e imidazol, em pH 7,5;
- Solução salina (2): elaborada com NaCl, MgCL₂-6H₂O e imidazol, em pH 7,5;
- Solução de trabalho A: formada pela solução A com a solução salina (1);
- Solução de trabalho B: composta pela solução B com a solução salina (2).

Consequente, foram preparados dois meios de reação:

- A: consiste na solução A, solução salina (1) e amostra;

- B: composta pela solução B, solução salina (2) e amostra;

Após, os meios de reação foram medidos em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 340 nm. A atividade da Na⁺, K⁺ - ATPase é dada por μmoles ADP/mg proteína/h.

5.2.4 Análise do sinergismo e antagonismo

A fim de verificar se a mistura de clorpirifós e fipronil apresentou interação de sinergismo ou antagonismo, aplicou-se a metodologia proposta por Gottardi *et al.* (2017), na qual é realizado o cálculo do efeito esperado (equação 1) e do efeito observado (equação 2). Assim, inicialmente, é considerado os resultados das análises após a exposição individual de fipronil e clorpirifós, relacionados com o respectivo grupo controle; e após, a razão entre o resultado encontrado após a exposição a mistura de inseticidas com o grupo controle, definindo o efeito observado.

$$\text{Efeito esperado (EE)} = \frac{\text{Fipronil}}{\text{Controle}} \times \frac{\text{Clorpirifós}}{\text{Controle}} \quad (1)$$

Consequente, para determinar se ocorreu a interação de sinergismo ou antagonismo, verificou-se que: se $EO > EE$ indica que ocorreu sinergismo e se $EO < EE$ indica a interação antagônica, de acordo com Portruneli *et al.* (2021).

$$\text{Efeito observado (EO)} = \frac{\text{Mistura}}{\text{Controle}} \quad (2)$$

5.2.5 Análise de proteínas totais

Para a determinação de proteínas totais, empregou-se o método de biureto, no qual é utilizado o reagente de biureto, composto por sulfato de cobre, citrato trissódico, carbonato de sódio e hidróxido de sódio. Na reação, o biureto reage com as proteínas presentes no meio, formando um complexo corado de corado de cor azul, conforme quantidade de proteína do meio.

Para tanto, em cubetas de 4 mL, adicionou-se 2 mL do reagente de biureto (marca Labtest) e 50 µL do homogeneizado das amostras, para o padrão, adicionou-se 2 mL do reagente de biureto (40 mg/L) com o 0,2 mL do reagente de cor.

Assim, os meios de reações foram lidos em espectrofotômetro com comprimento de onda em 545 nm, acertando o zero com o branco. Determinou-se as proteínas totais para os tecidos cerebral, branquial e hepático.

5.2.6 Análise estatística

Inicialmente, os resultados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk, a fim de verificar se sua distribuição é semelhante a uma distribuição normal, sendo que, nos testes em que foi verificado a heterocedasticidade, realizou-se a transformação dos dados, conforme proposta por Box e Cox (1964). Após, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), buscando verificar as possíveis diferenças entre os testes de toxicidade, considerando o valor- $p < 0,05$. Consequente, para o teste de comparação das médias obtidas das análises, os resultados foram submetidos ao teste de Tukey, a fim de analisar a diferença mínima significativa entre médias, apontando quais diferem entre si, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Nessa etapa da análise estatística, utilizou-se os *softwares* SAS e R.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Atividade da anidrase carbônica

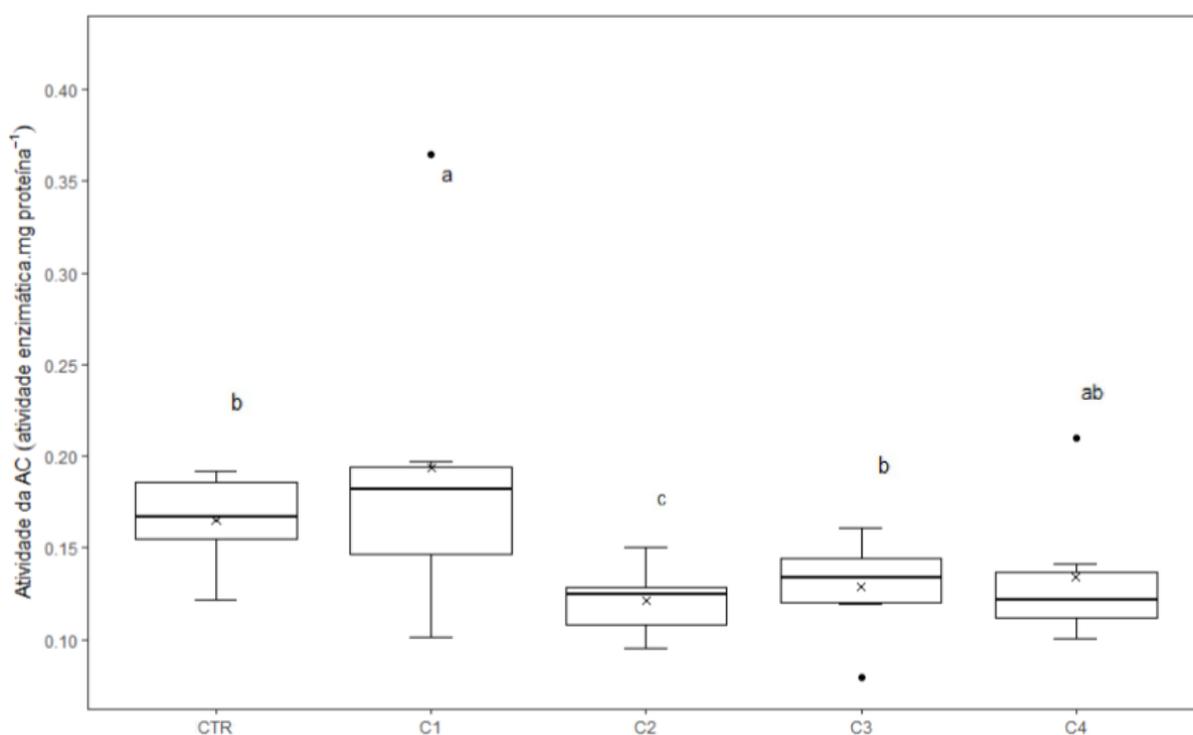
Após a exposição pelo período de 96 h ao clorpirifós, a atividade da AC nas brânquias de tilápia do Nilo é apresentada na Figura 25. Os resultados foram submetidos à ANOVA e demonstraram diferença estatisticamente significativa. Quando comparado ao grupo controle, C1 foi ativado significativamente, e após, em C2, houve a inibição da atividade enzimática da AC.

Situação similar foi observado em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), que foram expostas ao clorpirifós, em concentração de 2,25, 4,5 e 6,75 µg/L, por 24, 48, 72 e 96 h. A atividade da AC nas brânquias foi inibida significativamente em todas as concentrações em 48, 72 e 96 h após a exposição ao inseticida. Além disso, a

atividade hepática também foi inibida em todas as concentrações de clorpirifós (TOPAL *et al.*, 2014).

Ademais, resultados semelhantes ao clorpirifós foram encontrados na exposição aguda ao fipronil, conforme apresentado na Figura 26. Os resultados do teste de toxicidade foram submetidos à ANOVA e demonstraram que o fipronil afetou significativamente a atividade AC no tecido branquial da tilápia do Nilo. Verifica-se que, em F1 a atividade da AC foi ativada e em F2, ocorreu a inibição da atividade enzimática, se comparado ao grupo controle.

Figura 25 – Atividade da AC nas brânquias de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao clorpirifós no período de 96 h

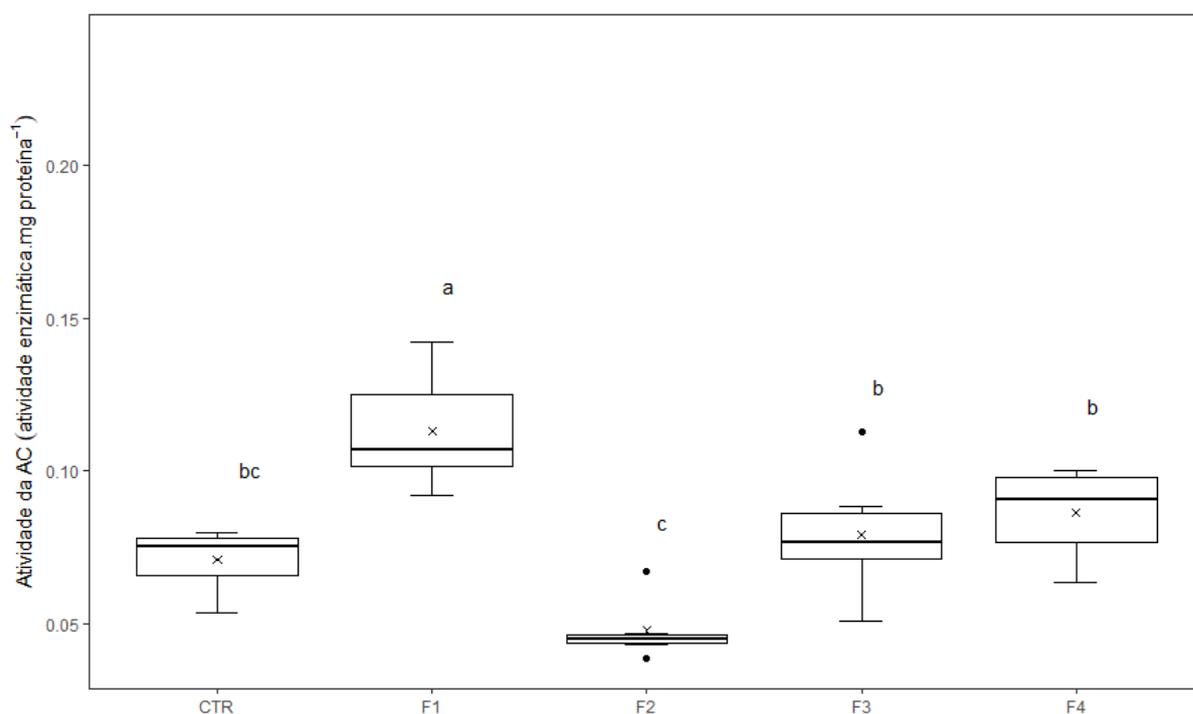


Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Outrossim, sob efeito da exposição combinada de clorpirifós e fipronil, a atividade da AC nas brânquias de tilápia do Nilo apresentou os resultados expostos na Figura 27, os quais foram submetidos à ANOVA e demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Assim, verifica-se que apenas M1 possui diferença estatisticamente significativa dos demais grupos, sendo que nessa concentração ocorreu o aumento da atividade branquial da AC.

Quanto a interação entre a mistura de fipronil e clorpirifós, constatou-se que ocorreu sinergismos em todos os testes de toxicidade aguda, apontando que a mistura desses inseticidas potencializa o efeito sobre a atividade branquial da AC, tornando-se mais tóxico para a tilápia do Nilo do que o fipronil e o clorpirifós de forma isolada.

Figura 26 – Atividade da AC nas brânquias de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao fipronil no período de 96 h



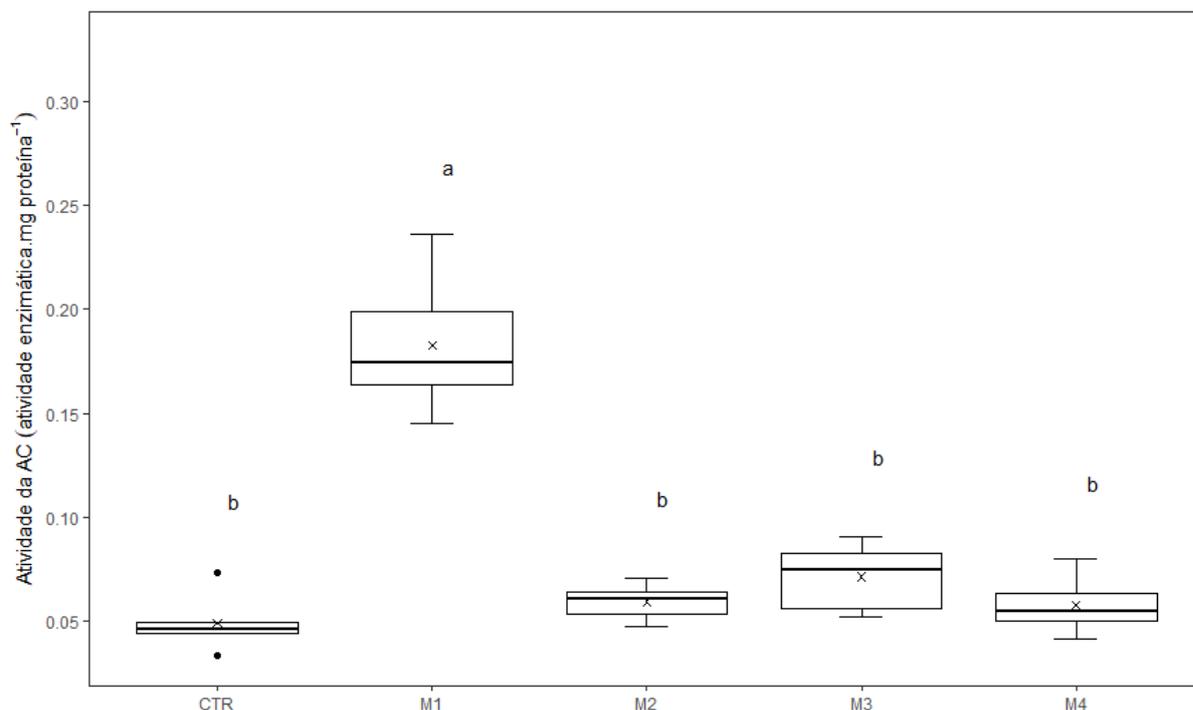
Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Diversos estudos apontam a sensibilidade *in vivo* e *in vitro* da AC quando submetidos a exposição de agrotóxicos, contudo, sobre os experimentos *in vivo* que demonstraram a sensibilidade da anidrase carbônica sob efeito da exposição ao clorpirifós, foi identificado apenas o estudo realizado por Topal *et al.* (2014) (LIONETTO; CARICATO; GIORDANO, 2020).

Embora os estudos realizados com exposição *in vivo* são relevantes para avaliar a toxicidade de determinado agrotóxico, bem como, para verificar a sensibilidade entre os diversos tipos de agrotóxicos em determinados organismos, tornando a avaliação mais realista (LIONETTO; CARICATO; GIORDANO, 2020), verifica-se que há uma escassez de experimentos *in vivo* que observaram o efeito

tóxico dos inseticidas fipronil e clorpirifós em peixes, tornando-se necessários novos estudos com a análise da AC, tendo em vista que essa enzima se mostrou um biomarcador sensível no presente estudo.

Figura 27 – Atividade da AC nas brânquias de *Oreochromis niloticus* após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h



Fonte: Elaborada pela autora (2023). Nota: letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente ($p > 0,05$).

Ademais, a anidrase carbônica é um biomarcador que pode ser usado para analisar os efeitos dos agrotóxicos em vários níveis tróficos e em diferentes ambientes, demonstrando ser um biomarcador eficaz em monitoramento e avaliação ambiental (LIONETTO *et al.*, 2012). Tendo em vista que a AC possui o íon Zn^{2+} em seu sítio ativo, os agrotóxicos inibem a atividade enzimática da AC em concentrações muito baixas devido aos átomos eletronegativos em suas estruturas químicas (CEYHUN *et al.*, 2010).

Nesse sentido, demais estudos apontam a inibição da atividade da AC em peixes após a exposição a determinados agrotóxicos. Em truta arco-íris exposta ao inseticida deltametrina, a atividade da AC nas brânquias foi inibida significativamente após o período de 24 e 48 h (CEYHUN *et al.*, 2010). Larvas de peixe zebra foram

expostas ao glifosato por 96 h, os resultados indicaram que a atividade da AC também foi inibida significativamente de maneira dependente da dose em todos os grupos, se comparado ao grupo controle (SULUKAN *et al.*, 2017).

Rhamdia quelen foram expostas ao herbicida atrazina por 96 h de exposição a concentrações de 2, 10 e 100 µg/L. Os resultados demonstraram que ocorreu a inibição da atividade branquial da AC na maior concentração do herbicida, enquanto no rim, a atividade da AC diminuiu apenas após a exposição a menor concentração de atrazina (MELA *et al.*, 2013).

5.3.2 Atividade da Na⁺, K⁺ - ATPase

No presente estudo, a atividade da Na⁺, K⁺ - ATPase nas brânquias de tilápia do Nilo não foi detectada em nenhum dos grupos expostos ao clorpirifós e ao fipronil, bem como a mistura de ambos os inseticidas. Considerando que esta enzima foi a última a ser analisada no experimento, sendo que as amostras branquiais ficaram em freezer convencional por um longo período, e tendo em vista o atraso na entrega dos reagentes utilizados, sugere-se que tais fatores contribuíram para a ausência da atividade enzimática da Na⁺, K⁺ - ATPase.

Embora que, no experimento em questão, não foi possível obter os resultados da atividade da Na⁺, K⁺ - ATPase em brânquias de tilápia do Nilo sob efeito da exposição aos inseticidas clorpirifós e fipronil, há estudos apontando que esta enzima é afetada pelos agrotóxicos, demonstrando, portanto, ser um bom biomarcador na exposição aos produtos químicos de uso agrícola.

Wang *et al.* (2013) analisaram o efeito da exposição ao clorpirifós e da atrazina em carpas por 40 dias, tanto individual quanto em mistura. Em geral, os resultados da atividade da Na⁺, K⁺ - ATPase no baço e rim cefálico de carpas mostrou ser dependente da dose, havendo a redução da atividade enzimática sob a exposição crescente aos agrotóxicos. Após o período de 20 dias de depuração, na menor concentração de clorpirifós e da mistura de clorpirifós e atrazina, a atividade da Na⁺, K⁺ - ATPase foi significativamente alterada no baço, já para o rim cefálico, a atividade da enzima foi ativada significativamente para todos os grupos, exceto os grupos de menores concentrações.

Peixes da espécie *Thalassoma pavo* L., uma espécie comum no mar mediterrâneo, foram expostos ao clorpirifós em concentrações de 4 e 8 µg/L por 48 e

96 h. Os resultados demonstraram que a proteína da Na⁺, K⁺ - ATPase nas brânquias dos peixes foi significativamente ativada após a exposição de 48 e 96 h em ambas as concentrações testadas. Contudo, os autores concluíram que é incerto afirmar que a atividade da enzima pode ser afetada pela exposição ao clorpirifós, tendo em vista que a sua atividade aumentou após a exposição ao inseticida (MACIRELLA; CURCIO; BRUNELLI, 2020a).

Estudos relatando a inibição enzimática da Na⁺, K⁺ - ATPase em tecidos de peixes também foram publicados, como no experimento realizado por Maricella *et al.*, (2020b) que, sob efeito da exposição de clorpirifós pelo período de 96 h (concentração de 4 e 8 µg/L), o número de células positivas de Na⁺, K⁺ - ATPase nas brânquias de *Carassius auratus* diminuiu significativamente, contudo, após 7 dias de recuperação o número de células positivas aumentou.

A atividade dessa enzima nas brânquias de *Clarias batrachus* foi inibida sob a exposição de clorpirifós pelo período de 15 dias, havendo a recuperação no 30º dia de depuração (NARRA *et al.*, 2017). No rim de *Dicentrarchus labrax*, sua atividade não variou significativamente após a exposição de fipronil (7 e 14 dias) e após o período de depuração (7 dias) (DALLARÉS *et al.*, 2020).

Ressalta-se, ainda, a escassez de estudos que analisaram a atividade da Na⁺, K⁺ - ATPase em peixes, principalmente para os inseticidas clorpirifós e fipronil, demonstrando, portanto, a necessidade de novos estudos que avaliem a ação tóxica do clorpirifós e fipronil sobre essa enzima, a fim de analisar os seus efeitos sobre os processos de osmorregulação em vertebrados.

Acerca da exposição aos demais agrotóxicos, observa-se a atividade enzimática da Na⁺, K⁺ - ATPase também se mostrou sensível, afirmando que os agrotóxicos exercem influência na atividade dessa enzima. Não obstante, *Clarias batrachus* foram expostas aos agrotóxicos endosulfan, carbofuran, metil paration e cipermetrina, de forma individual e mistura de ambos, por 1, 7, 15, 30 e 60 dias. Os resultados demonstraram que a atividade da Na⁺, K⁺ - ATPase nas brânquias do espécime diminuiu ao longo do período em todos os grupos exposto aos referidos agrotóxicos, sendo que a maiores inibições foram observadas nos grupos expostos ao carbofuran, carbofuran, metil paration, cipermetrina e a mistura dos quatro agrotóxicos após os 30 dias de exposição (NARRA *et al.*, 2016).

Posteriormente a exposição ao propiconazol por 7, 20 e 30 dias, a atividade da Na⁺, K⁺ - ATPase nas brânquias de trutas arco-íris não sofreu alterações em todos os

grupos depois de 20 dias de exposição, exceto no exposto a maior concentração do agrotóxico. Porém, após 30 dias sob efeito do fungicida, a atividade do Na⁺, K⁺ - ATPase foi inibida nas maiores concentrações de propiconazol (LI et al., 2011).

O fipronil é vastamente detectado em recursos hídricos, além de ser uma substância persistente no solo. No entanto, diversos aspectos ambientais, como variações no oxigênio dissolvido, pH e temperatura podem modificar a ação e efeitos desse composto. Além disso, essas variações ambientais fazem com que os efeitos de poluentes ambientais modifiquem as adaptações dos animais, aumentando os riscos de mortalidade direta e adversidades do ecossistema (DOURADO, 2019). Não obstante, o risco da contaminação ocasionada pelo uso do clorpirifós é reconhecida, bem como foi identificada em ambientes aquáticos e áreas costeiras de todo o mundo (MACIRELLA; CURCIO; BRUNELLI, 2020a).

Nesse sentido, é importante destacar que algumas concentrações ambientais encontradas de fipronil podem ser suficientemente altas para causar danos aos peixes. Ainda que não necessariamente cause a mortalidade entre adultos, a intoxicação por fipronil, pode ocasionar a redução de crescimento, desenvolvimento e reprodução de vertebrados individuais (GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015).

Assim, de acordo com Amin *et al.* (2022), para diminuir os possíveis efeitos negativos dos agrotóxicos em organismos não-alvo, principalmente em peixes, os agrotóxicos devem ser monitorados constantemente no meio ambiente, tendo em vista que, os agrotóxicos apresentam inúmeros efeitos tóxicos na saúde dos organismos aquáticos.

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a análise dos resultados da atividade enzimática da anidrase carbônica nas brânquias de tilápia Nilo expostas aos inseticidas fipronil e clorpirifós pelo período de 96 h, constatou-se que esse biomarcador de osmorregulação é sensível a exposição dos referidos agrotóxicos, demonstrando que a exposição individual ao clorpirifós e fipronil ocasionou a inibição da anidrase carbônica, desregulando, portanto, a atividade enzimática da anidrase carbônica no processo de osmorregulação em brânquias de *Oreochromis niloticus*.

Embora não foi possível analisar a atividade branquial da Na⁺, K⁺ - ATPase em tilápias do Nilo sob efeito da exposição ao clorpirifós e ao fipronil, devido à ausência

de sua atividade enzimática, diversos estudos *in vivo* apontam que a atividade dessa enzima em peixes pode variar entre espécies.

Por fim, para estudos futuros, sugere-se a análise branquial da atividade da AC *in vivo* em exposições prolongadas aos inseticidas fipronil e clorpirifós, tendo em vista que esta enzima apresentou sensibilidade na exposição aguda aos referidos agrotóxicos. Ainda, considerando que não foi detectado a atividade do Na⁺, K⁺ - ATPase em tilápias do Nilo, sugere-se que seja realizado a verificação da atividade dessa enzima em outras espécies de peixes, a fim de identificar se o fipronil e o clorpirifós afetam sua atividade enzimática, interferindo negativamente no processo de osmorregulação.

6 CONCLUSÃO

O excessivo uso de agrotóxicos nas atividades agrícolas vem proporcionando vários riscos ao meio ambiente e aos seres humanos. O ambiente aquático é um dos inúmeros locais atingidos pela utilização indiscriminada de agrotóxico, e nele, espécies não-alvo podem sofrer com os efeitos tóxicos desses produtos químicos de uso agrícola.

Nesse sentido, o presente estudo, por meio da exposição de juvenis de tilápias do Nilo aos inseticidas clorpirifós e fipronil, demonstrou os efeitos tóxicos dos referidos agrotóxicos mediante alterações estatisticamente significativas nas atividades enzimática da acetilcolinesterase, catalase, glutathione-S-transferase e anidrase carbônica nos tecidos do cérebro, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus*.

Os resultados encontrados no presente experimento demonstraram que a exposição individual do clorpirifós inibiu a atividade enzimática da AChE no tecido cerebral e da CAT no tecido hepático de tilápia do Nilo. Sob efeito da exposição ao fipronil, a atividade da CAT cerebral e branquial foi inibida. Além disso, a exposição à mistura de clorpirifós e fipronil foi capaz de inibir a atividade hepática da CAT e da atividade cerebral e branquial da GST de tilápias do Nilo. Assim, constatou-se que a exposição aos inseticidas clorpirifós e fipronil, tanto individual quanto em conjunto, ocasionou estresse oxidativo em *Oreochromis niloticus*.

Ademais, foi observado a inibição da atividade da anidrase carbônica nas brânquias de tilápia do Nilo sob efeito da exposição individual ao clorpirifós e fipronil, demonstrando assim, que esses inseticidas possuem capacidade de interferir no processo de osmorregulação de juvenis de tilápia do Nilo.

Quanto a interação da mistura de clorpirifós e fipronil, verificou-se a ação sinérgica em mais de 70% das atividades enzimáticas analisadas, apontando, assim, que a mistura dos inseticidas foi capaz de potencializar os efeitos tóxicos individuais do fipronil e do clorpirifós.

Diante disso, conclui-se que os inseticidas clorpirifós e fipronil apresentam potencial efeito tóxico em juvenis de tilápia do Nilo, sendo que a exposição aguda aos referidos inseticidas ocasionou estresse oxidativo e interferiu no processo de osmorregulação de *Oreochromis niloticus*. Assim, recomenda-se que a utilização desses inseticidas seja realizada com cautela, a fim de evitar possíveis efeitos tóxicos aos organismos não-alvo de ambientes aquáticos.

Por fim, considerando que os biomarcadores utilizados foram sensíveis a presença de clorpirifós e fipronil, bem como a escassez de estudo na área em questão, sugere-se que os estudos futuros sejam realizados com as misturas de diferentes agrotóxicos, mediante a análise de biomarcadores de estresse oxidativo e osmorregulação em peixes, a fim de obter análises realistas dos efeitos tóxicos gerados pela exposição combinada de agrotóxicos em ambientes aquáticos.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHDOKHT, Danial. *et al.* Conventional agrochemicals towards nano-biopesticides: an overview on recent advances. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 9, n. 13, 2022.
- AMIN, Muhammad. *et al.* Application of Alkaline Phosphatase to Assess the Health of *Oreochromis niloticus* Exposed to Organophosphates and Synthetic Pyrethroid Pesticides *In Vivo*. **Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste**, vol. 26, n. 4, 2022.
- AMIRI, Bagher Mojazi. *et al.* The effect of chlorpyrifos on salinity acclimation of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, vol. 195, p. 97-102, 2018.
- ANNA, Julieta S. De. *et al.* The insecticide chlorpyrifos modifies the expression of genes involved in the PXR and AhR pathways in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 178, 2021.
- Bathige, S.D.N.K. *et al.* A mu class glutathione S-transferase from Manila clam *Ruditapes philippinarum* (RpGST μ): Cloning, mRNA expression, and conjugation assays. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, vol. 162, p. 85-95, 2014.
- BEVILAQUA, Fernanda. *et al.* A mixture of fipronil and fungicides induces alterations on behavioral and oxidative stress parameters in zebrafish. **Ecotoxicology**, vol. 290 p. 140-147, 2020.
- BEUTLER, E. **Red cell metabolism: A manual of biochemical methods**. 2. Ed. New York: Grune & Stratton, 1975. 160 p.
- BOJARSKI, Bartosz; WITESKA, Małgorzata. Blood biomarkers of herbicide, insecticide, and fungicide toxicity to fish - a review. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 27, p. 19236–19250, 2020.
- BONIFACIO, Alejo Fabian. *et al.* Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. **Ecological Indicators**, vol. 68, p. 88-97, 2016.
- BONIFACIO, Alejo Fabian. *et al.* Environmental relevant concentrations of a chlorpyrifos commercial formulation affect two neotropical fish species, *Cheirodon interruptus* and *Cnesterodon decemmaculatus*. **Chemosphere**, vol. 188, p. 486-493, 2017.
- BONMATIN, J. M. *et al.* Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environ Sci Pollut Res**, vol. 22, p. 35-67, 2015.

BOTTÉ, E.S. *et al.* Effects of chlorpyrifos on cholinesterase activity and stress markers in the tropical reef fish *Acanthochromis polyacanthus*. **Marine Pollution Bulletin**, vol. 65, p. 384-393, 2012.

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An Analysis of Transformations. **Journal of Royal Statistical Society, Series B**, vol. 26, n. 2, p. 211-252, 1964.

BRASIL. Lei n. 7.802, de 11 de julho de 1989. **Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências**. Brasília, DF: Presidência da República, 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/CCIVIL_03/LEIS/L7802.htm#:~:text=Disp%C3%B5e%20sobre%20a%20pesquisa%2C%20a,inspe%C3%A7%C3%A3o%20e%20a%20fiscaliza%C3%A7%C3%A3o%20de.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017**. Disponível em: http://portalsinan.saude.gov.br/images/documentos/Legislacoes/Portaria_Consolidacao_5_28_SETEMBRO_2017.pdf.

BRASIL. Ministério da Saúde/Gabinete do Ministro. Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**: edição:85, seção:1, p. 127, 07 maio 2021.

CEYHUN, Saltuk Buğrahan. *et al.* In vitro and in vivo effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 97, n. 3, 2010.

CHANDRASEKARA, L.W.H.U.; PATHIRATNE, A. Body size-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by chlorpyrifos and carbosulfan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 67, p. 109–119, 2007.

CHEN, Jianqing. *et al.* Chlorpyrifos caused necroptosis via MAPK/NF- κ B/TNF- α pathway in common carp (*Cyprinus carpio* L.) gills. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, vol. 249, 2021.

CHIERICHETTI, Melisa A. *et al.* Persistent organic pollutants and chlorpyrifos in the cockfish *Callorhynchus callorhynchus* (Holocephali: *Callorhynchidae*) from Argentine coastal waters: Influence of sex and maturity. **Science of the Total Environment**. Vol. 706, 2021.

CHRISTOFOLETTI, Cintya, A. *et al.* Genotoxic Potential of the Insecticide Imidacloprid in a Non-Target Organism (*Oreochromis niloticus*-Pisces). **Journal of Environmental Protection**, vol. 6, p. 1360-1367, 2015.

DALLARÉS, Sara. *et al.* Multibiomarker approach to fipronil exposure in the fish *Dicentrarchus labrax* under two temperature regimes. **Aquatic Toxicology**, vol. 219, 2020.

DEIÚ, Antonela Santillán. *et al.* Exposure to environmental concentrations of fipronil induces biochemical changes on a neotropical freshwater fish. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 28, p. 43872–43884, 2021a.

DEIÚ, Antonela Santillan. *et al.* Multibiomarker responses and bioaccumulation of fipronil in *Prochilodus lineatus* exposed to spiked sediments: Oxidative stress and antioxidant defenses. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 177, 2021b.

DEYASHI, Mintu; CHAKRABORTY, Suman Bhusan. Pesticide induced oxidative stress and the role of antioxidant defense system in animal body. **Harvest**, vol. 2, 2016.

DOURADO, Priscila Leocádia Rosa. **Interferência do inseticida fipronil nas respostas ao estresse oxidativo de Tilápias do Nilo mediadas pelo ácido γ -aminobutírico (GABA), durante períodos de hipóxia**. 2019. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 2019.

EL-BOUHY, Zeinab M. *et al.* Effect of Insecticide "Chlorpyrifos" on Immune Response of *Oreochromis niloticus*. **Zagazig Veterinary Journal**, vol. 44, n. 3, p. 196-204, 2016.

EL-BOUHY, Zeinab M., EL-HAKIM, Yasser Abd; MOHAMED, Engy M. M. Chronic Effect of Chlorpyrifos on Biochemical, Immunological Changes and DNA Damage in Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Zagazig Veterinary Journal**, vol. 46, n. 1, p. 51-59, 2018.

ELLMAN, George L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EL-MURR, Abdelhakeem. *et al.* The β -1,3-glucan alleviated the hepatotoxicity induced by combination of fipronil and lead in common carp (*Cyprinus carpio*). **Comp Clin Pathol**, vol. 25, p. 689–697, 2016.

FALFUSHYNSKA, Halina. *et al.* Toxic effects and mechanisms of common pesticides (Roundup and chlorpyrifos) and their mixtures in a zebrafish model (*Danio rerio*). **Science of the Total Environment**, vol. 833, 2022.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges**. 2014. Disponível em: <https://www.fao.org/3/i3720e/i3720e.pdf>

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Sustainability in action. 2020**. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

FERRARIO, Claudia. *et al.* Linking sub-individual and supra-individual effects in *Daphnia magna* exposed to sub-lethal concentration of chlorpyrifos. **Environmental Pollution**, vol. 235, p. 411-418, 2018.

FERRO, Lucas de Abreu. **Avaliação da função cardíaca in vitro do cascudo *Hypostomus regani* (IHERING, 1905) e dos efeitos da exposição a concentrações subletais do pesticida Fipronil (REGENT 800WG®)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

FU, Huiyang. *et al.* Advances in organophosphorus pesticides pollution: Current status and challenges in ecotoxicological, sustainable agriculture, and degradation strategies. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 424, 2022.

FULLER, Neil. *et al.* Dietary exposure to environmentally relevant pesticide mixtures impairs swimming performance and lipid homeostatic gene expression in Juvenile Chinook salmon at elevated water temperatures. **Environmental Pollution**, vol. 314, 2022.

FULLER, Neil. *et al.* Enhanced trophic transfer of chlorpyrifos from resistant *Hyalella azteca* to inland silversides (*Menidia beryllina*) and effects on acetylcholinesterase activity and swimming performance at varying temperatures. **Environmental Pollution**, vol. 291, 2021.

GHAYYUR, Shehzad. *et al.* Effect of Chlorpyrifos on Hematological and Seral Biochemical Components of Fish *Oreochromis mossambicus*. **Pakistan J. Zool.**, vol. 51, n. 3, p. 1047-1052, 2019.

GHAZANFAR, Madiha; SHAHID, Sana; QURESHI, Irfan Zia. Vitamin C attenuates biochemical and genotoxic damage in common carp (*Cyprinus carpio*) upon joint exposure to combined toxic doses of fipronil and buprofezin insecticides. **Aquatic toxicology**, vol. 196, p. 42-52, 2018.

GHISI, Nédia de Castilhos. *et al.* Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environ Monit Assess**, vol. 180, p. 589–599, 2011.

GIBBONS, David; MORRISSEY, Christy; MINEAU, Pierre. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. **Environ Sci Pollut Res**, vol. 22, p. 103-118, 2015.

Gilmour, Kathleen M. New insights into the many functions of carbonic anhydrase in fish gills. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, vol. 184, p. 223–230, 2012.

GONG, Wenwen. *et al.* Application of biochar: An approach to attenuate the pollution of the chiral pesticide fipronil and its metabolites in leachate from activated sludge. **Process Safety and Environmental Protection**, vol. 149, p. 936-945, 2021.

GOTTARDI, Michele. et al. The effects of epoxiconazole and a-cypermethrin on *Daphnia magna* growth, reproduction, and offspring size. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 36, n. 8, p. 2155–2166, 2017.

GRIPP, Hortênsia S. et al. Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: *Leiuperidae*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 136, p. 173-179, 2017.

GUEDES, Thays de Andrade Guedes. et al. Cytoprotective and anti-apoptotic action of HSP70 stress protein in *Oreochromis niloticus* exposed to residual dilutions of insecticides with fipronil and ethiprole. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, vol. 55, n. 8, p. 687–693, 2020.

GÜL, Ali. Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-methyl on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae. **Chemosphere**, vol. 59, p. 163–166, 2005.

GÜNAL, Aysel. et al. Sub-lethal effects of Imidacloprid on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Water Air Soil Pollut**, vol. 231, n. 4, 2020.

GUPTA S. K. et al. Haemato-biochemical Responses in *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) Fry Exposed to Sub-lethal Concentration of a Phenylpyrazole Insecticide, Fipronil. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, vol. 84, n. 1, p. 113–122, 2014.

HATAMI, Mahdiye. BANAEI, Mahdi. HAGHI, Behzad Nematdoost. Sub-lethal toxicity of chlorpyrifos alone and in combination with polyethylene glycol to common carp (*Cyprinus carpio*). **Chemosphere**, vol. 2019, p. 981-988, 2019.

Henry, R.P. Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro: the electrometric delta pH and pH stat methods. DODGSON, Susanna J. et al. **The carbonic anhydrases: cellular physiology and molecular genetics**. New York: Springer Science+Business Media New York, 1991. p. 119-125.

HOSSAIN, Mohammad Amzad. et al. Toxic effects of chlorpyrifos on the growth, hematology, and different organs histopathology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, vol. 29, 2022.

HUANG, Guo-Yong. et al. Multi-biomarker responses as indication of contaminant effects in *Gambusia affinis* from impacted rivers by municipal effluents. **Science of the Total Environment**, vol. 563-564, p. 273-281, 2016.

HWANG, Pung-Pung; LEE, Tsung-Han. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, vol. 148, p. 479–497, 2007.

IGNÁCIO, Naiara Fernanda. **Recuperação de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) sobreviventes à intoxicação com fipronil**. 2018. Tese (Doutorado em Biociências) – Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2018.

IHSAN, Taufiq; EDWIN, Tivany; YANTI, Rahma Desri. The Effect of Sublethal Exposure of Chlorpyrifos to Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Case Study of Twin Lakes of West Sumatra, Indonesia. **Nature Environment and Pollution Technology**, vol. 18, p. 1399-1403, 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**, 2021. Disponível em < <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>.

JIANG, Jiangong. *et al.* The toxic effects of combined exposure of chlorpyrifos and p,p'-DDE to zebrafish (*Danio rerio*) and tissue bioaccumulation. **Aquatic Toxicology**, vol. 248, 2022.

JIN, Yuanxiang. *et al.* The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: A survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. **Fish & Shellfish Immunology**, vol. 43, p. 405-414, 2015.

KADAM, Padmini; PATIL, Rajaram. Effect of chlorpyrifos on some biochemical constituents in liver and kidney of fresh water fish, Channa gachua (*F. Hamilton*). **International Journal of Science and Research**, vol. 5, n. 4, p. 1975-1979, 2016.

KANAI, Ryuta. *et al.* Crystal structure of a Na⁺-bound Na⁺,K⁺-ATPase preceding the E1P state. **Nature**, vol. 502, pag. 201–206, 2013.

KAVITHA, P.; RAO J. V. Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, vol. 26, p. 192-198, 2008.

KEEN, J. H; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione s-transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.

KUMARI, Swarnima. Impacts of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in fish. **International Journal of Fauna and Biological Studies**, vol. 7, n. 4, p. 45-54, 2020.

KUNWAR, Prabesh Singh. *et al.* Joint toxicity assessment reveals synergistic effect of chlorpyrifos and dichlorvos to common carp (*Cyprinus carpio*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, vol. 246, 2021.

KUNWAR, Prabesh Singh. *et al.* Modulations of blood biochemical parameters of golden mahseer, *Tor putitora* following exposures to single and mixed organophosphate. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, vol. 251, 2022.

LI, Huixian. *et al.* Evaluation of toxicological responses and promising biomarkers of topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*) exposed to fipronil at environmentally

relevant levels. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 27, p. 24081–24089, 2020.

LI, Huizhen; YOU, Jing; WANG, Wen-Xiong. Multi-compartmental toxicokinetic modeling of fipronil in tilapia: Accumulation, biotransformation and elimination. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 360, p. 420–427, 2018.

LI, Zhi-Hua. *et al.* Biochemical responses in gills of rainbow trout exposed to propiconazole. **Central European Journal of Biology**, vol. 6, p. 84-90, 2011.

LIONETTO, Maria Giulia. *et al.* Carbonic Anhydrase as Pollution Biomarker: An Ancient Enzyme with a New Use. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, vol. 9, p. 3965-3977, 2012.

LIONETTO, Maria Giulia; CARICATO, Roberto; GIORDANO, Maria Elena. Carbonic anhydrase sensitivity to pesticides: perspectives for biomarker development. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 21, 2020.

LOURTHURAJ, A. Amala; HATSHAN, Mohammad Rafe; HUSSEIN, Dina S. Biocatalytic degradation of organophosphate pesticide from the wastewater and hydrolytic enzyme properties of consortium isolated from the pesticide contaminated water. **Environmental Research**, vol. 205, 2022.

MACIRELLA, Rachele. *et al.* Exposure and post-exposure effects of chlorpyrifos on *Carassius auratus* gills: An ultrastructural and morphofunctional investigation. **Chemosphere**, vol. 251, 2020b.

MACIRELLA, Rachele; CURCIO, Vittoria; BRUNELLI, Elvira. Morpho-Functional Alterations in the Gills of a Seawater Teleost, the Ornate Wrasse (*Thalassoma pavo* L.), after Short-Term Exposure to Chlorpyrifos. **Toxics**, vol. 8, n. 97, 2020a.

MARGARIDO, T. C. S. *et al.* Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Marine Environmental Research**, vol. 91, p. 61-67, 2013.

MARQUES, Márjori Brenda. **Bioindicadores de ambientes aquáticos contaminados pelo inseticida clorpirifós**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira. 2019.

McCORMICK, Stephen D. Methods for non-lethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺-ATPase activity. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, vol. 50, p. 656-658, 1993.

MELA, M. *et al.* Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 93, 2013.

MENA, Freylan. *et al.* Can a mixture of agrochemicals (glyphosate, chlorpyrifos and chlorothalonil) mask the perception of an individual chemical? A hidden trap underlying ecological risk. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 230, 2022.

MONTEIRO, Hugo R. *et al.* Assessment of fipronil toxicity to the freshwater midge *Chironomus riparius*: Molecular, biochemical, and organismal responses. **Aquatic Toxicology**, vol. 216, 2019.

MOREIRA, Raquel Aparecida. *et al.* Fipronil and 2,4-D effects on tropical fish: Could avoidance response be explained by changes in swimming behavior and neurotransmission impairments? **Chemosphere**, vol. 263, 2021.

NARRA, Madhusudan Reddy. *et al.* Insecticides induced stress response and recuperation in fish: Biomarkers in blood and tissues related to oxidative damage. **Chemosphere**, vol. 168, p. 350-357, 2017.

NARRA, Madhusudan Reddy. Single and cartel effect of pesticides on biochemical and hematological status of *Clarias batrachus*: A long-term monitoring. **Chemosphere**, vol. 144, p. 966-974, 2016.

NAZ, Huma. *et al.* Toxic Effect of Insecticides Mixtures on Antioxidant Enzymes in Different Organs of Fish, *Labeo rohita*. **Pakistan Journal of Zoology**, vol. 51, n. 4, p. 1355-1361, 2019.

ORUÇ, Elif Özcan. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 96, p. 160–166, 2010.

ORUC, Elif. Oxidative Stress Responses and Recovery Patterns in the Liver of *Oreochromis niloticus* Exposed to Chlorpyrifos-Ethyl. **Bull Environ Contam Toxicol**, vol. 88, p. 676-684, 2012.

PASCHE, Mayara Suzana. LANZENDORF, Felipe Nunes. Diferença entre peixes de água salgada e peixes de água doce. **Revista Maiêutica**, vol. 5, n. 01, p. 57-68, 2017.

PORTRUNELI, Natália. *et al.* Whole-body bioconcentration and biochemical and morphological responses of gills of the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or fipronil individually or in a mixture. **Aquatic Toxicology**, vol. 240, 2021.

REINWALD, Hannes. *et al.* Toxicogenomic profiling after sublethal exposure to nerve- and muscle-targeting insecticides reveals cardiac and neuronal developmental effects in zebrafish embryos. **Chemosphere**, vol. 291, 2022.

RODRÍGUEZ, Yadira Ansoar. *et al.* Liver alterations in *Oreochromis niloticus* (Pisces) induced by insecticide imidacloprid: Histopathology and heat shock protein in situ localization. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, vol. 51, n. 12, p. 881–887, 2016.

SAKURAGUI M. M.; SANCHES, J. R.; FERNANDES, M. N. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish

Hoplias malabaricus. **Journal of Comparative Physiology B**, vol.173, pag. 309–317, 2003.

SANTA CATARINA (Estado). CIDASC – Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina. Resolução de Diretoria n. 01, de agosto de 2021. Dispõe sobre a proibição do uso na modalidade foliar, dos produtos agrotóxicos que contenham o princípio ativo Fipronil em sua formulação, no estado de Santa Catarina. **Diário Oficial do Estado de Santa Catarina**, edição n. 21.591, p. 50, 24 ago. 2021.

SANTANA, Lígia Maria Borges Marques; CAVALCANTE, Rivelino Martins. Transformações metabólicas de agrotóxicos em peixes: uma revisão. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, vol. 8, n. 4, p. 257-268, 2016.

SHARBIDRE, Archana A. METKARI, Vimal. PATODE, Priyanka. Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 101, p. 132-141, 2011.

SILVA, Edison Bezerra. *et al.* Mucociliary transport, differential white blood cells, and cyto-genotoxicity in peripheral erythrocytes in fish from a polluted urban pond. **Environ Sci Pollut Res**, vol. 25, p. 2683–2690, 2018.

SINHA, Amit Kumar. *et al.* Modulations of blood biochemical parameters of golden mahseer, *Tor putitora* following exposures to single and mixed organophosphate. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, vol. 251, 2022.

SULUKAN, Ekrem. *et al.* An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Daino rerio*). **Chemosphere**, vol. 180, p. 77-85, 2017.

TOPAL, Ahmet. *et al.* *In vivo* changes in carbonic anhydrase activity and histopathology of gill and liver tissues after acute exposure to chlorpyrifos in rainbow trout. **Arh Hig Rada Toksikol**, vol. 65, p. 377-385, 2014.

TRINH, Kien Hong. *et at.* Development of novel fluorescence-based and label-free noncanonical G4-quadruplex-like DNA biosensor for facile, specific, and ultrasensitive detection of fipronil. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 427, 2022.

TRIPATHI, G.; SHASMAL, J. Reparation of chlorpyrifos-induced impairment by thyroxine and vitamin C in fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 73, p. 1397-1401, 2010.

UÇAR, Arzu. *et al.* Assesment of hematotoxic, oxidative and genotoxic damage potentials of fipronil in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. **Toxicology mechanisms and methods**, vol. 31, n. 1, p. 73-80, 2021a.

UÇAR, Arzu. *et al.* Determination of Fipronil toxicity by different biomarkers in gill and liver tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, vol. 56, p. 543–549, 2020.

UÇAR, Arzu. *et al.* Neurotoxic responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to fipronil: multi-biomarker approach to illuminate the mechanism in brain. **Drug and Chemical Toxicology**, vol. 45, n. 5, p. 2140-2145, 2021b.

ULLAH, Sana. *et al.* Biomarkers of pyrethroid toxicity in fish. **Environmental Chemistry Letters**, vol. 17, p. 945–973, 2019.

VIANA, Natália Prudêncio. *et al.* Bioconcentration and toxicological impacts of fipronil and 2,4-D commercial formulations (single and in mixture) in the tropical fish, *Danio rerio*. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 29, p. 11685-11698, 2022.

WANG, Jing-Xin. *et al.* Tissue-specific accumulation, transformation, and depuration of fipronil in adult crucian carp (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 232, 2022.

WANG, Xu. *et al.* Accumulation, histopathological effects and response of biochemical markers in the spleens and head kidneys of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 62, p. 148-153, 2013.

XING, Houjuan. *et al.* Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. **Chemosphere**, vol. 88, p. 377-383, 2012.

YANG, Wen-Kai. *et al.* Different Modulatory Mechanisms of Renal FX₁ for Na⁺ - K⁺ -ATPase between Two Closely Related Medakas upon Salinity Challenge. **International Journal of Biological Sciences**, vol. 12, n. 6, p. 730-745, 2016.

YONAR, M. Enis. Chlorpyrifos-induced biochemical changes in *Cyprinus carpio*: Ameliorative effect of curcumin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 151, p. 49-54, 2018.

YONAR, M. Enis. *et al.* Protective role of propolis in chlorpyrifos-induced changes in the haematological parameters and the oxidative/antioxidative status of *Cyprinus carpio carpio*. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 50, p. 2703-2708, 2012.

ZAHRAN, Eman. *et al.* Acute exposure to chlorpyrifos induces reversible changes in health parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquatic toxicology**, vol. 197, p. 47-59, 2018.

ZHANG, Wanjun. *et al.* Antagonistic effects and mechanisms of carbendazim and chlorpyrifos on the neurobehavior of larval zebrafish. **Chemosphere**, vol. 293, 2022.

ZHAO, Yun. *et al.* Catechin from green tea had the potential to decrease the chlorpyrifos induced oxidative stress in larval zebrafish (*Danio rerio*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 182, 2022.