



UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS (CCA)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE PÚBLICA
NOS TRÓPICOS - PPGSASPT

DUCILENE DO CARMO DA SILVA

EFEITO AGUDO DO INSETICIDA FIPRONIL EM PEIXE NEOTROPICAL,
Colossoma macropomum.

ARAGUAÍNA-TO

2024

DUCILENE DO CARMO DA SILVA

EFEITO AGUDO DO INSETICIDA FIPRONIL EM PEIXE NEOTROPICAL,
Colossoma macropomum.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins, como requisito para a obtenção do grau de mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Gustavo Paulino

ARAGUAÍNA-TO

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

D636e do Carmo da Silva, Ducilene.
EFEITO AGUDO DO INSETICIDA FIPRONIL EM PEIXE NEOTROPICAL,
Colossoma macropomum. / Ducilene do Carmo da Silva. – Araguaína, TO,
2024.
81 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado)
em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2024.
Orientador: Marcelo Gustavo Paulino

1. Neurotoxicidade. 2. Ecotoxicologia aquática. 3. Biomarcadores. 4.
Tambaqui. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DUCILENE DO CARMO DA SILVA

EFEITO AGUDO DO INSETICIDA FIPRONIL EM PEIXE NEOTROPICAL,
Colossoma macropomum.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins, como requisito para a obtenção do grau de mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública.

Data da aprovação: 18/03/2024

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
MARCELO GUSTAVO PAULINO
Data: 22/03/2024 13:25:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marcelo Gustavo Paulino - UFNT



Documento assinado digitalmente
FABIANO MENDES DE CORDOVA
Data: 26/03/2024 08:35:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova - UFNT



Documento assinado digitalmente
ANIELI CRISTINA MARASCHI
Data: 25/03/2024 20:20:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Anieli Cristina Maraschi - UFSCar

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, por ter me amparado e sustentado durante toda essa jornada, sem seu imenso cuidado e bondade certamente não teria chegado até aqui. Gratidão é a palavra que expressa meu sentimento à Ele.

À minha família, que mesmo de longe, sempre se fez presente, me apoiando em todos os momentos. À minha querida mãe Dora e meu pai Saul, obrigado por me ensinarem a nunca desistir de meus objetivos, mesmo que pareçam impossíveis.

À minha Maninha (Duciane) que sempre cuidou de mim como uma filha, saiba que você contribuiu imensamente para a realização deste sonho. Ao meu Cheirosinho (Davi), que me proporcionou sentir um amor inexplicável e recíproco, saiba que seu abraço me traz paz e vontade de ser uma pessoa melhor todos os dias. Palavras seriam poucas para externar o meu amor e gratidão a vocês.

Ao meu namorado Leonardo, que me fez por inúmeras vezes cessar o choro com suas palavras de conforto e confiança. Obrigada por todo o incentivo e apoio durante essa caminhada, por sempre me lembrar da minha capacidade de chegar até aqui. Saiba que sem você tudo teria sido mais difícil. Amo muito você!

Às minhas queridas amigas de laboratório: Malba, Silvana, Rosa Mara, Greyce, Elis, Gil e Liana, saibam que vocês deixaram tudo mais leve. Obrigada por cada risada compartilhada, esses momentos ficarão eternizados em minhas melhores lembranças do mestrado.

Às técnicas do laboratório, Gilzelle e Liana, obrigada por cada ensinamento, vocês são incríveis no que fazem. Gil, palavras seriam insuficientes para expressar o tamanho da gratidão que tenho a você, sem sua amizade e ajuda dificilmente eu teria chegado até aqui, obrigada de coração!!!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Gustavo Paulino por toda a confiança, paciência e dedicação para comigo, saiba que seu profissionalismo é um exemplo a ser seguido. Obrigado por me proporcionar tanta experiência e aprendizado, seus ensinamentos certamente foram enriquecedores para que eu pudesse chegar até aqui. Me inspiro e tenho imensa admiração pelo seu trabalho e pela forma que acrescenta na vida de seus orientados. Eu não poderia escolher um orientador melhor.

Ao professor Dr. Sandro (CCA) e a Profa. Marisa Narciso Fernandes – Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa – UFSCar, por ter cedido espaço e materiais para o desenvolvimento de boa parte dessa pesquisa. Ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade

Animal e Saúde Pública nos Trópicos pela oportunidade e CAPES pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Ao financiamento desta pesquisa: O desenvolvimento desta pesquisa contou com o auxílio financeiro da PROPESQ/UFNT, edital nº18/2023. À FAPT/CAPES – Programa de Desenvolvimento da Pós-graduação – Parcerias Estratégicas nos Estados.

À banca examinadora da qualificação, o Prof. Dr. Wagner dos Santos Mariano e Dra. Anieli Cristina Maraschi, suas considerações certamente foram fundamentais para melhoria deste trabalho!

À banca examinadora da dissertação, o Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova e Dra. Anieli Cristina Maraschi, suas contribuições sem dúvidas acrescentaram e serão de extrema relevância para melhoria e posterior publicação deste trabalho.

RESUMO

O uso do fipronil como inseticida agrícola tem crescido consideravelmente e sua aplicação indiscriminada tem intensificado a contaminação dos ecossistemas aquáticos, gerando alerta de preocupação à saúde dos peixes. Este estudo avaliou a toxicidade aguda do inseticida fipronil no peixe neotropical *Colossoma macropomum* via respostas integradas de múltiplos biomarcadores. Os animais foram divididos em três grupos: Controle (livre do contaminante); F40 (expostos à concentração de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$) e F160 (exposto à 160 $\mu\text{g L}^{-1}$), por 96 horas. Após exposição, amostras de sangue, fígado, músculo, cérebro e brânquias foram coletadas para análise de biomarcadores neurotóxicos, fisiológicos, citogenéticos, bioquímicos e morfológicos. A atividade da acetilcolinesterase aumentou no músculo dos animais expostos ao grupo F160 em relação ao controle e F40, indicando distúrbio na junção neuromuscular. Embora o não comprometimento morfofuncional (I_{org}) do tecido cerebral, houve um aumento no índice de lesão individual (I_{alt}) para edema intracelular em F160, quando comparado ao controle e ao F40, indicando ação neurotóxica do inseticida. Não houve alterações na morfologia branquial e densidade de ionócitos entre os grupos expostos, todavia, foi observado uma desregulação osmo-ionica plasmática, evidenciada pelo aumento do íon Na^+ no grupo F160 em relação ao controle, diminuição de K^+ de forma concentração dependente e aumento na osmolalidade total em F40 quando comparado ao controle. Não houve alteração para o íon Cl após exposição. Os parâmetros hematológicos, índices hematimétricos e leucócitos totais decresceram de forma concentração dependente, indicando possíveis quadros de anemia e infecção tecidual, além de poder levar à uma disfunção no transporte de gases. A frequência de eritrócitos micronucleados não sofreu alteração após a exposição, entretanto, o potencial citogenotóxico do contaminante foi expresso através das alterações nucleares eritrocitárias. Embora o fipronil não tenha prejudicado a funcionalidade do tecido hepático, foi observado alterações morfológicas do tipo alteração da arquitetura hepática nos grupos tratados em relação ao controle, e do tipo degeneração citoplasmática entre tratados. A glicose plasmática e o índice hepatossomático permaneceram inalterados após a exposição. A redução nos níveis de glicogênio hepático de forma concentração dependente indicam interferência do contaminante no metabolismo do peixe, sugerindo metabolização de glicogênio nas células para manter os níveis de glicemia normais. A normalidade do sistema de biotransformação GSH-GST e biomarcadores de danos hepáticos (alanina-transaminase e bilirrubinas) demonstraram que a integridade dos hepatócitos e função de biotransformação não foram afetadas pela ação do inseticida. A toxicidade do fipronil em *C. macropomum* ocorreu em diferentes concentrações, promovendo alterações morfofisiológicas, neurotóxicas e fisiológicas no organismo, com preservação da funcionalidade do órgão analisados.

Palavras chave: neurotoxicidade, ecotoxicologia aquática, biomarcadores, pesticida, tabaqui.

ABSTRACT

The use of fipronil as an agricultural insecticide has significantly increased, and its indiscriminate application has intensified the contamination of aquatic ecosystems, raising concerns about fish health. This study evaluated the acute toxicity of the insecticide fipronil in the neotropical fish *Colossoma macropomum* through integrated responses of multiple biomarkers. The animals were divided into three groups: Control (free from the contaminant); F40 (exposed to a concentration of 40 $\mu\text{g L}^{-1}$); and F160 (exposed to 160 $\mu\text{g L}^{-1}$), for 96 hours. After exposure, blood, liver, muscle, brain, and gill samples were collected for analysis of neurotoxic, physiological, cytogenetic, biochemical, and morphological biomarkers. The activity of acetylcholinesterase increased in the muscle of animals exposed to the F160 group compared to the control and F40, indicating a disturbance in the neuromuscular junction. Although there was no morphofunctional impairment (Iorg) of the brain tissue, there was an increase in the Individual Lesion Index (Ialt) for intracellular edema in F160, when compared to the control and F40, indicating neurotoxic action of the insecticide. There were no changes in gill morphology and ionocyte density among the exposed groups; however, plasma osmotic ion regulation was disrupted, evidenced by an increase in Na^+ ion in the F160 group compared to the control, a concentration-dependent decrease in K^+ , and an increase in total osmolality in F40 when compared to the control. There were no changes in chloride ion after exposure. Hematological parameters, hematometric indices, and total leukocytes decreased in a concentration-dependent manner, indicating possible anemia and tissue infection, potentially leading to gas transport dysfunction. The frequency of micronucleated erythrocytes did not change after exposure; however, the cytogenotoxic potential of the contaminant was expressed through nuclear erythrocyte alterations. Although fipronil did not impair the functionality of the hepatic tissue, morphological alterations such as changes in hepatic architecture were observed in treated groups compared to the control, as well as cytoplasmic degeneration among treated groups. Plasma glucose and hepatosomatic index remained unchanged after exposure. Concentration-dependent reduction in hepatic glycogen levels indicated interference of the contaminant in fish metabolism, suggesting glycogen metabolism in cells to maintain normal blood glucose levels. The normalcy of the GSH-GST biotransformation system and hepatic damage biomarkers (alanine transaminase and bilirubins) demonstrated that hepatocyte integrity and biotransformation function were not affected by the action of the insecticide. The toxicity of fipronil in *C. macropomum* occurred at different concentrations, causing morphophysiological, neurotoxic, and physiological changes in the organism, while preserving the functionality of the analyzed organs.

Keywords: neurotoxicity, aquatic ecotoxicology, biomarkers, pesticide, tambaqui.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- Figura 1-** Esquema das vias de contaminação de pesticidas aos sistemas aquáticos.....16
- Figura 2 -** Estrutura química do inseticida Fipronil.....17
- Figura 3 -** Representação do mecanismo de ação do inseticida fipronil no receptor GABA. O fipronil bloqueia a ativação do receptor e a ausência de inibição sináptica leva a hiperexcitação do sistema nervoso central.....18
- Figura 4 –** Exemplar de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Escala = 1 cm.....19

CAPÍTULO 2

- Figura 1 -** Atividade da acetilcolinesterase (AChE) de *Colossoma macropomum* expostos a diferentes concentrações do inseticida fipronil em exposição aguda por 96 h. (A) cérebro (B) e músculo. Os valores são expressos como médias (\pm E.P.M.). (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. (#) Indica diferença ($p < 0,05$) entre tratados.....42
- Figura 2 –** Representação histológica de lesões no tecido cerebral de peixes tambaqui expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil por 96 horas. (A) tecido cerebral normal. (B) Degeneração hidrópica e edema intracelular (seta preta). (C) Hiperemia (seta preta). (D) hemorragia (seta preta). Barra de escala = 20 μm43
- Figura 3 -** Índice de lesão do órgão (I_{org}) em cérebro de tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil por 96 horas.....44
- Figura 4 –** Representação histológica de lesões mais frequentes no tecido branquial de peixes tambaqui expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil por 96 horas. (A) Estrutura normal do tecido branquial; (B) estrela indica hiperplasia e fusão parcial lamelar; (C) seta preta indica descolamento de lamelas e edema; (D) cabeça de seta indica hipertrofia do epitélio lamelar. L = lamela; F = filamento; CP = células pilares. Barra de escala = 20 μm45
- Figura 5 -** Índice de lesão do órgão (I_{org}) em brânquias de tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil por 96 horas.....46
- Figura 6 –** Valores médios (média \pm erro) de ionócitos imunomarcados na lamela (A) e filamento (B) de *Colossoma macropomum* expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil por 96 horas.....47
- Figura 7 –** Imunohistoquímica contra Na^+/K^+ -ATPase de ionócitos em brânquias de *C. macropomum* expostos ao inseticida fipronil nas concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ por 96 horas. (A) grupo controle (B) grupo tratado. Barra de escala = 20 μm47

CAPÍTULO 3

- Figura 1** - Índice de lesão do órgão (I_{org}) em fígado do tambaqui (*Collossoma macropomum*) expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ do fipronil por 96 horas.....68
- Figura 2** – Valores médios (\pm E.P.M.) de glicose plasmática (A), glicogênio hepático (B) e índice hepatossomático (C) para o tambaqui após exposição aguda às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ do inseticida fipronil. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.....69
- Figura 3** - Concentração de glutathiona reduzida (GSH) (A) e glutathiona-s-transferase (B) no fígado de tambaqui expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ do fipronil por 96 horas.....70

LISTAS DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Índice de alteração individual (I_{alt}) em cérebro de peixes tambaqui expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ do inseticida fipronil por 96 horas. (*) indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. (#) Indica diferença ($p < 0,05$) entre tratados.....43

Tabela 2 – Índice de alteração individual (I_{alt}) em brânquias de peixes tambaqui expostos às duas diferentes concentrações do inseticida fipronil (40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$) por 96 horas.....45

Tabela 3 – Concentração de íons e osmolalidade plasmática em *Colossoma macropomum* expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ do inseticida fipronil por 96 horas. (*) indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. (#) Indica diferença ($p < 0,05$) entre tratados.....48

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Valores médios (\pm E.P.M.) dos parâmetros hematológicos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após exposição aguda de 96 horas à duas diferentes concentrações do inseticida fipronil. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao controle. (#) Indica diferença ($p < 0,05$) entre tratados.....66

Tabela 2 - Valores médios (\pm E.P.M) dos parâmetros micronucleares e ANEs em eritrócitos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após exposição aguda de 96 horas ao fipronil. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.67

Tabela 3. Valores (\pm E.P.M.) dos parâmetros plasmáticos de hepatotoxicidade de *Colossoma macropomum* em 96h após exposição ao inseticida fipronil. ALT – Alanina Aminotransferase; BD – Bilirrubina Direta; BT – Bilirrubina Total. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.....67

Tabela 4 - Índice de alteração individual (I_{alt}) no fígado de peixes tambaqui expostos a diferentes concentrações do inseticida fipronil por 96 horas. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao controle. (#) Indica diferença ($p < 0,05$) entre tratados.....68

LISTAS DE ABREVIACÕES

AChE = Acetilcolinesterase

ANEs= Anomalias nucleares eritrocitárias

BSA = Albumina de soro bovino

BT = Bilirrubina total

BD = Bilirrubina direta

ALT = Alanina aminotransferase

CCA = Centro de Ciências Agrárias

CEUA= Comitê de Ética de Uso de Animais

CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média

E.P.M. = Erro padrão da média

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

Fi = Fator de importância

Fipronil = (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-[(trifluorometil)sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitril)

GABA = ácido γ -aminobutírico

GSH = Glutathiona

GST = Glutathiona S-transferases

Hb = Hemoglobina

HCM = Hemoglobina corpuscular média

Hct = Hematócrito

I_{alt} = Índice de lesão individual do órgão

I_{org} = Índice de lesão no órgão

LG-PAS positivo = Leucócitos granulares PAS positivo

MN = Micronúcleo

RBC = “*Red blood cells*” – Eritrócito

Sc = Escore

UFNT = Universidade Federal do Norte do Tocantins

VCM = Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral

1. Introdução.....	15
1.1. Uso de inseticidas no Brasil e contaminação do ambiente aquático.....	15
1.2. Fipronil.....	16
1.3. Uso de peixes como bioindicadores.....	18
1.4. Tecidos indicadores de qualidade	20
1.5. Biomarcadores	21
1.5.1. Biomarcadores fisiológicos	22
1.5.2. Biomarcadores citogenéticos	22
1.5.3. Biomarcadores bioquímicos	23
1.5.4. biomarcadores morfológicos.....	24
2. Objetivos.....	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
Referências	26

CAPÍTULO 2 - Toxicidade aguda do inseticida fipronil induzindo efeitos neurotóxicos e osmorregulatórios no peixe amazônico, *Colossoma macropomum*

Resumo	35
1. Introdução.....	36
2. Materiais e métodos.....	38
2.1. Animais.....	38
2.2. Contaminante	38
2.3. Delineamento experimental	38
2.4. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE).....	39
2.5. Análises histopatológicas	39
2.6. Imunohistoquímica de ionócitos (contra Na ⁺ /K ⁺ -ATPase)	40
2.7. Determinação da osmolaridade total e concentrações iônicas plasmáticas	40
2.8. Proteína total	41
2.9. Análises estatísticas	41
3. Resultados.....	42
3.1. Análises de neurotoxicidade	42
3.2. Análises branquiais e osmorregulatórias	44

4. Discussão	49
5. Conclusão	52
Referências.....	53

CAPÍTULO 3 - Alterações hematológicas e hepáticas de *Colossoma macropomum* após exposição aguda ao inseticida fipronil

Resumo	58
1. Introdução.....	59
2. Materiais e métodos.....	61
2.1 Peixes	61
2.2 Contaminante	61
2.3 Delineamento experimental	61
2.4 Biomarcadores hematológicos	62
2.5 Teste de micronúcleo (MN) e anomalias nucleares eritrocitárias (ANEs)	62
2.6 Bilirrubina total e bilirrubina direta plasmática	62
2.7 Alanina-aminotransferase plasmática.....	63
2.6 Histopatologia do fígado.....	63
2.7 Glicose	64
2.8 Glicogênio.....	64
2.9 Índice Hepatosomático	64
2.10 Glutathione reduzida e Glutathione-S-Transferase do fígado (GSH e GST)	64
2.13 Análise Estatística.....	65
3. Resultados.....	66
3.1 Parâmetros hematológicos e citogenotóxicos	66
3.2 Variáveis plasmáticas de hepatotoxicidade	67
3.3 Análise histopatológica de fígado	67
3.4 Glicose, glicogênio e índice hepatossomático	68
3.5 Sistema de biotransformação (GSH-GST)	70
4. Discussão	71
5. Conclusão	75
Referências.....	76

CAPÍTULO 1 – Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO

1.1 Uso de pesticidas no Brasil e contaminação do ambiente aquático

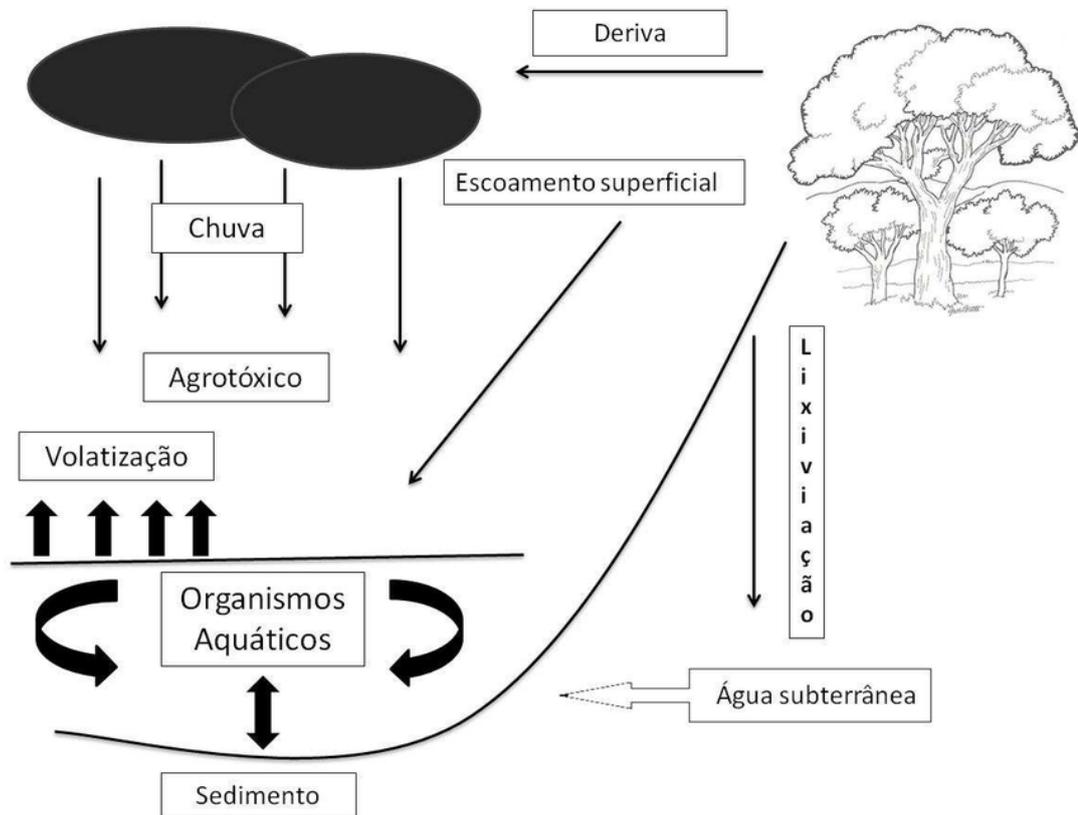
O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas mundial e ocupa a segunda posição no ranking de exportação, desempenhando papel fundamental na economia do país (Pignati *et al.*, 2017). O mercado brasileiro de pesticidas expandiu rapidamente na última década, em um ritmo de crescimento maior que o dobro do apresentado pelo mercado global, tornando-se o maior consumidor de pesticidas do mundo desde 2008 (Rigotto; Vasconcelos; Rocha, 2014).

Os pesticidas são definidos como substâncias químicas utilizadas para prevenir, destruir, repelir ou inibir a ocorrência ou efeito de organismos vivos capazes de prejudicar as lavouras agrícolas (Gomes; Oliveira, 2021). Dentre os tipos de pesticidas, estão os inseticidas, produtos desenvolvidos para atuarem contra insetos (Viegas Júnior, 2003). Sua utilização torna-se essencial e indispensável para impulsionar a produtividade agrícola, especialmente grandes áreas de monoculturas (De Moraes; Marinho-Prado, 2016).

O comportamento dos pesticidas no ambiente é muito complexo e sua dinâmica é influenciada por uma série de fatores, incluindo as propriedades físico-químicas tanto do meio quanto do composto, o princípio ativo do agente químico e o método de aplicação (Salvo; Santiago; Silva de Assis, 2018). Todavia, seu uso indiscriminado tem gerado preocupação quanto a contaminação de sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos (Montanha *et al.*, 2011).

A aplicação prolongada e indiscriminada de pesticidas afeta em maior proporção o meio aquático, considerando que são facilmente transportados de um ponto para outro na hidrosfera (Gripp *et al.*, 2017; Gupta *et al.*, 2014). Quando aplicados na agricultura, apenas 0,1% dos pesticidas atingem os organismos alvo, enquanto o restante será responsável pela contaminação dos ecossistemas adjacentes às áreas de cultivo (Pimentel e Levitam, 1986). Uma das principais rotas de inserção dessas substâncias químicas nos corpos hídricos é através do escoamento superficial, que é o fluxo de água na superfície do solo, ocorrendo principalmente nos períodos de intensa precipitação, resultando no transporte de moléculas tóxicas aderidas às partículas do solo (Sousa *et al.*, 2016). Também podem alcançar os ambientes aquáticos por deriva, drenagem, lixiviação e desmatamento de áreas florestais e mata ciliar (Oliveira *et al.*, 2015; Belchior *et al.*, 2014; Beggel *et al.* 2012) (Figura 1).

Figura 1 - Esquema das vias de contaminação de pesticidas aos sistemas aquáticos.



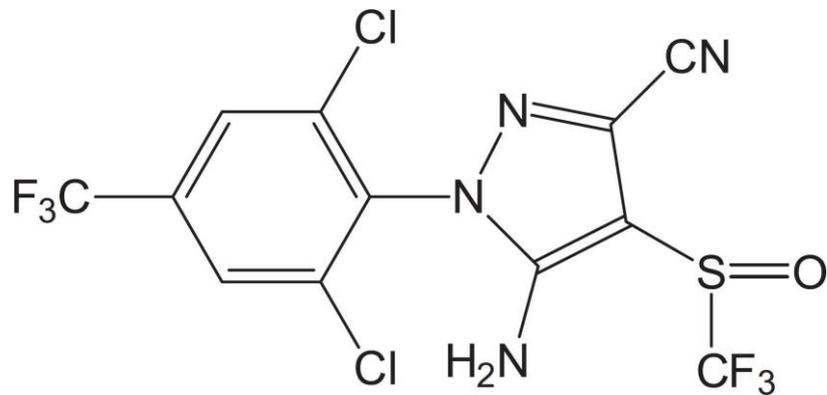
Fonte: Silva *et al.* (2013)

Os resíduos de pesticidas, dependendo de suas propriedades físico-químicas, podem se ligar a Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), bioacumular nos organismos e biomagnificar ao longo da cadeia trófica, gerando distúrbios na dinâmica das populações bases, disfunções hormonais, imunológicas, neurológicas e reprodutivas (Salvo; Santiago; Silva de Assis, 2018). Quando disponíveis na água, os peixes podem absorver pesticidas durante sua atividade alimentar e/ou através de processos respiratórios (Fernandes; Moron, 2020). No organismo, essas moléculas podem adentrar a corrente sanguínea e se distribuir por todo o corpo do animal, causando alterações nos processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos (Li *et al.*, 2018).

1.2 Fipronil

O fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)-fenil]-4-[(trifluorometil)-sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila) (Figura 2) é um potente inseticida do grupo fenilpirazol, amplamente utilizado na agricultura no tratamento de sementes, substituindo pesticidas piretroides, organofosforados e carbamatos, aos quais alguns insetos adquiriram resistência ao longo do tempo (Budd *et al.*, 2015).

Figura 2 – Estrutura química do inseticida Fipronil.



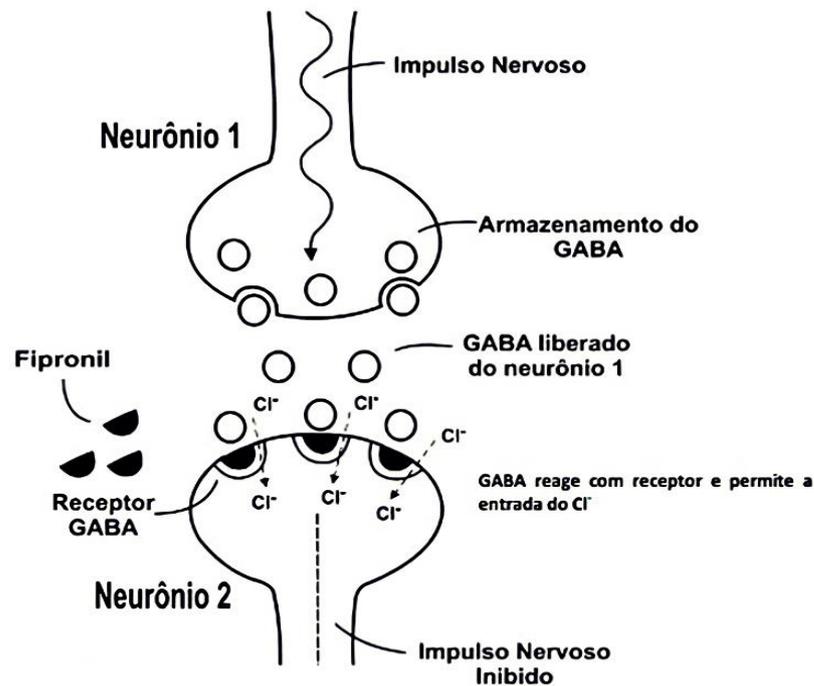
Fonte: Okumura *et al.* (2016).

O fipronil é registrado em mais de 70 países, sendo frequentemente utilizado em mais de 100 culturas, incluindo o milho, algodão, trigo, berinjela, manga, frutas cítricas e sorgo (Okumura *et al.*, 2016; Ghaffar *et al.*, 2018). O Regent® e Termidor® são produtos comerciais que contêm fipronil como ingrediente ativo (Okumura *et al.*, 2016). Quando aplicado nas culturas, as moléculas de fipronil são degradadas quimicamente (por fotólise e hidrólise) ou biodegradadas (por processos de oxidação e redução), gerando subprodutos (fipronil amida, fipronil sulfeto, fipronil desulfinil e fipronil sulfona), que segundo relatos de Peret *et al.* (2010) e Gunasekara *et al.* (2007) podem causar efeitos iguais ou mais tóxicos que o composto original.

O tempo de vida média do fipronil em meio aquático varia de 116 a 130 dias (Amaral, 2012). Após a aplicação via pulverização, adentra o ambiente aquático por escoamento agrícola, o que representa um sério risco para a saúde dos peixes, pois é considerado extremamente tóxico a esses animais (Wang *et al.*, 2016). No Brasil, o relatório que avalia a presença dos princípios ativos mais comercializados e utilizados, da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2018), aponta que o fipronil estava dentre os mais detectados, com valores que variaram de 2,4 a 465,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Concentrações estas que excedem o valor de ecotoxicidade crônica estabelecida para peixes, que segundo a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) é de até 2,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (USEPA, 2018).

Seu mecanismo de ação (Figura 3) baseia-se no bloqueio não competitivo dos receptores gama-aminobutírico (GABA), causando paralisia e morte do inseto por hiperexcitação neuronal (Qureshi *et al.*, 2016).

Figura 3 – Representação do mecanismo de ação do inseticida fipronil no receptor GABA. O fipronil bloqueia a ativação do receptor e a ausência de inibição sináptica leva a hiperexcitação do sistema nervoso central.



Fonte: Rosa (2021).

Considerando que os resíduos de fipronil podem se bioconcentrar nos peixes, há uma alerta de preocupação com a saúde pública, pois os seres humanos são um dos seus consumidores diretos (Gupta *et al.*, 2014; Bonmatin *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018). Deste modo, os peixes têm se tornado modelos experimentais importantes para as pesquisas ecotoxicológicas, especialmente quando se pretende avaliar os possíveis riscos do fipronil direcionados à biodiversidade aquática.

1.3 Uso de peixes como bioindicadores

Para auxiliar a avaliação da toxicidade de substâncias químicas em ambientes aquáticos, são utilizadas espécies bioindicadoras, as quais permite fazer correlação com um determinado fator antrópico com potencial impactante (Lins *et al.*, 2010; Huerta; Rodriguez-Mozaz; Barcelo, 2012). O termo “bioindicadores” pode ser definido como espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, abundância e condições são indicativos biológicos de uma determinada condição ambiental (Godefroid; Fonseca; Silva, 2015).

Os peixes possuem grande diversidade ecológica e são considerados eficientes bioindicadores da qualidade aquática, podendo refletir distúrbios ambientais em diversas escalas, devido às suas características de mobilidade, estilo de vida e posição no topo da cadeia

alimentar (Lupi *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2013; Ghaffar *et al.*, 2019). Sendo animais topo de cadeia, os peixes são capazes de indicar respostas de efeitos crônicos, cumulativos e persistentes ao longo da cadeia, emitindo respostas mesmo em baixos níveis de contaminação (Lins *et al.*, 2010).

Alterações na qualidade da água podem ser refletidas nos peixes por meio de diferentes respostas nos níveis de organização biológica, que variam de acordo com o grau de plasticidade fenotípica que cada grupo possui (Freitas; Siqueira-Souza, 2009). Logo, sua utilização em pesquisas ecotoxicológicas é apontada como indispensável na avaliação da integridade ecológica (Godefroid; Fonseca; Silva, 2015). Em pesquisas ecotoxicológicas, diversas espécies de peixes são utilizadas como bioindicadores, dentre elas o *Colossoma macropomum*.

O tambaqui, *C. macropomum* (Figura 4) é uma espécie amazônica pertencente à classe Osteichthyes, nativa e amplamente distribuída nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco (Buckup; Menezes; Ghazzi, 2007). Apresenta hábito alimentar onívoro, consumindo frutas e sementes, além de fitoplâncton e zooplâncton filtrados através de seus longos e numerosos rastros branquiais (Santos; Ferreira; Zuanon, 2006).

Figura 4 – Exemplar de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Escala = 1 cm.



Fonte: Autora, 2024.

O tambaqui é o segundo maior peixe de escama da bacia amazônica, podendo atingir tamanho superior a 1 metro e pesar até 30 kg em meio natural, e em piscicultura, atingir 1 kg no primeiro ano, e de 1,5 a 3 kg no segundo, sendo uma das espécies mais cultivadas nacionalmente (Brasil, 2010). Dentre as principais razões que justificam o cultivo crescente da espécie, destaca-se o seu rápido crescimento, alta produtividade, rusticidade e grande aceitação

pelo mercado consumidor, além de possuir um alto valor comercial e grande importância econômica no Brasil (Andrade Vieira *et al.*, 2019; Gomes *et al.*, 2010).

1.4 Tecidos biológicos como indicadores de qualidade

As brânquias são órgãos vitais e multifuncionais, particularmente sensíveis a qualidade da água, constituindo o primeiro tecido alvo de xenobióticos, devido sua localização anatômica, contato direto com a água e rápida absorção (Pandey *et al.*, 2008). As células do tecido branquial respondem rapidamente ao contato com substâncias químicas, por meio de ajustes morfológicos que permitem sua sobrevivência no meio, todavia, pode interferir na eficácia das trocas gasosas, osmorregulação, equilíbrio ácido-base e excreção de compostos nitrogenados (Strzyzewska; Szarek; Babinska, 2016). Alterações morfológicas no epitélio branquial são considerados indicadores de toxicidade, com grau de severidade a depender da concentração do poluente e tempo de exposição (Mazon *et al.*, 2002).

O fígado, órgão de intensa atividade metabólica, recebe por via sanguínea os contaminantes absorvidos do meio, e dependendo do nível de toxicidade do agente químico, tempo de exposição e concentração exibe alterações em sua morfologia (Braunbeck *et al.*, 1990). Participa do metabolismo energético e é o órgão mais associado à desintoxicação de substâncias endógenas e exógenas e processo de biotransformação, podendo refletir a exposição aos contaminantes de modo eficiente (Zeni, 2016; Guelfi, 2015). Os hepatócitos são considerados como uma das primeiras células alvo de toxicidade, e conseqüentemente, uma das primeiras a serem afetadas pela ação de contaminantes químicos, o que caracteriza o fígado como um indicador indispensável de contaminação ambiental (Zelikoff, 1998).

O cérebro é extremamente sensível a perturbações do metabolismo energético, pois qualquer alteração que interrompa sua integridade estrutural e funcional altera seu comportamento metabólico normal (Soengas; Aldegunde, 2002; De La Torre; Ferrari; Salibián, 2002). A complexidade das funções do sistema nervoso, os eventos neurotóxicos de natureza múltipla e a variabilidade e inacessibilidade dos sítios celulares e moleculares, tornam esse órgão um indicador para avaliar a ação neurotóxica de contaminantes químicos (Amorim, 2003). Sabendo que os efeitos neurotóxicos se manifestam a longo prazo ou após um período de latência, tem-se procurado validar alguns parâmetros que possam permitir a detecção precoce da ação neurotóxica, antes que seja evidenciado danos à saúde do animal (Manzo *et al.*, 1996).

O músculo branco é um tecido chave para o crescimento e sobrevivência dos peixes. Constitui a maior parte da massa corpórea do animal, fornece produção de energia para natação

intensiva de curta duração e está diretamente ligado à capacidade de fluuabilidade (Sclafani *et al.*, 1993; Catalan *et al.*, 2007). Além de serem utilizados para determinar eventos de bioacumulação em peixes que podem acometer a saúde pública (Voigt, 2015; Santos *et al.*, 2018), o tecido muscular também é empregado em análises de neurotoxicidade, considerando que o músculo contém principalmente acetilcolinesterase (AChE), enzima representativa da atividade neuronal e muscular (Badiou *et al.*, 2008). O funcionamento adequado desta enzima é fundamental na quebra da acetilcolina nas junções neuromusculares (Solé *et al.*, 2010). Deste modo, inibição ou ativação da AChE no músculo por meio de substâncias químicas são usados na avaliação dos efeitos deletérios da contaminação ambiental (Čolović *et al.*, 2013).

O sangue é considerado um bom indicador do estado de saúde do animal, evidenciando efeitos nocivos a contaminantes (Gouthier *et al.*, 2023). Mudanças na qualidade físico-químico da água, ocasiona diversas alterações hematológicas, cujas respostas variam de acordo com a concentração exposta (Rodrigues *et al.*, 2010). O emprego da análise citogenotóxica em células eritrocitárias de peixes, permite avaliar o efeito de contaminantes no meio hídrico, bem como o potencial genotóxico e/ou mutagênico de um contaminante após interação com o ambiente (Jesus; Carvalho, 2008).

Assim, para verificação de sinais de toxicidade, utilizam-se biomarcadores em diferentes tecidos, para obtenção de respostas fisiológicas, bioquímicas e morfológicas.

1.5 Biomarcadores

Os biomarcadores podem ser definidos como as respostas bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que expressam a exposição ou efeitos tóxicos causados por um agente estressor, podendo ser avaliadas através de amostras teciduais, fluido corporal ou organismos inteiros, para fornecer evidências de exposição e/ou efeitos causados por contaminação (Pereira *et al.*, 2011). Os biomarcadores permitem avaliar os efeitos de compostos tóxicos, investigar suas interações com o meio e prognosticar se seu mecanismo de ação exerce ou não efeitos deletérios em uma dada espécie (Huggett *et al.*, 1992).

Além de indicar o mecanismo de ação, os biomarcadores são essenciais para avaliar a saúde do peixe e integridade de seus órgãos (Portruneli *et al.*, 2021). Nesses animais, os inseticidas podem se manifestar em vários níveis de organização biológica, incluindo disfunções fisiológicas, alterações estruturais em órgãos e tecidos e modificações comportamentais, que podem prejudicar o crescimento e reprodução da espécie (Nogueira; Castro; Sá, 2008).

1.5.1 Biomarcadores fisiológicos

Os parâmetros hematológicos agem como refletor patológico de peixes expostos a substâncias tóxicas, podendo contribuir para a detecção de alterações na saúde e estado fisiológico do animal (Etim *et al.*, 2013). Dentre estes, estão o hematócrito (Hct), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem total e diferencial de leucócitos e trombócitos, frequentemente utilizados em pesquisas ecotoxicológicas, pois fornecem subsídios sobre o estado de saúde do animal (Clauss; Dove; Arnold, 2008).

Dentre as principais alterações induzidas por estresses em peixes estão a concentração de glicose plasmática e os níveis de glicogênio hepático, ambos envolvidos na demanda energética e sobrevivência do animal (Majumder; Kaviraj, 2018; Baudou *et al.*, 2019). A glicose é amplamente utilizada como biomarcador para evidenciar respostas secundárias ao estresse, fornecendo subsídios para o diagnóstico do estado fisiológico do animal quando exposto a contaminantes (Hurvitz *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2012), enquanto que, o glicogênio é fundamental para estocagem energética que se utiliza nos primeiros momentos de estresse do animal (Christiansen; Klungsoyr, 1987).

Proporções entre o peso do órgão e o peso corporal, como o Índice Hepatosomático (IHS) são amplamente utilizados como um indicativo do estado energético dos peixes (Querol *et al.*, 2002) ou alterações em suas condições normais, causadas por estresse (Roussel *et al.*, 2007). Estudos demonstram que o IHS é um potencial indicador de efeitos tóxicos, fornecendo informações sobre a capacidade de um indivíduo tolerar a contaminação química (Kopecka; Pempkowiak, 2008; Li *et al.*, 2009).

1.5.2 Biomarcadores citogenéticos

Os biomarcadores citogenéticos são ferramentas empregadas para detectar a presença de substâncias mutagênicas através de danos no material genético (Hemalatha *et al.*, 2020). Em peixes, os eritrócitos podem ser utilizados para avaliação de danos genotóxicos e mutagênicos. Os agentes genotóxicos são capazes de interagir com o DNA e cromossomos, induzindo alterações nas estruturas celulares que resultam em mutações gênicas irreversíveis, perpetuando-se nas gerações subsequentes, e aumentando o risco de doenças hereditárias e redução da diversidade de espécies (Shah *et al.*, 2020).

O teste de micronúcleo (MN) é um biomarcador frequentemente utilizado para investigar os potenciais efeitos de poluentes ambientais em peixes. Os MN são massas que possuem cromatina citoplasmática, originados tanto de fragmentos acêntricos resultantes da

quebra de cromossomos (efeito clastogênicos) quanto de cromossomos inteiros atrasados (efeito aneugênicos), que não se incorporam ao núcleo principal durante o processo de divisão celular (Udroiu, 2006).

Alterações no material genético das células eritrocitárias podem modificar o aspecto morfológico normal do núcleo, dando origem às Alterações Nucleares Eritrocitárias (ANEs). As ANEs são caracterizadas como uma análise complementar a de MN, sendo consideradas biomarcadores sensíveis que evidenciam potencial citogenotóxico na integridade celular (Hussain *et al.*, 2018).

1.5.3 Biomarcadores bioquímicos

Os biomarcadores bioquímicos são considerados ferramentas essenciais para avaliar as respostas de organismos a contaminantes ambientais, a partir do funcionamento de sistemas enzimáticos, envolvidos no metabolismo celular (Payne *et al.*, 1987). Dentre os biomarcadores bioquímicos, as enzimas constituem um grupo de substâncias proteicas, com função catalítica nas vias metabólicas, sendo suscetíveis a modificações em sua função na presença de um xenobióticos de origem agrícola (Jonsson; Aoyama, 2010), emitindo respostas que garantem a homeostase (Cruz, 2013). A análise de parâmetros bioquímicos, como a atividade da acetilcolinesterase (AChE), Glutathiona reduzida (GSH) e Glutathiona-S-Transferase permitem a detecção precoce da existência de contaminação por substâncias químicas, identificação de espécies em risco de intoxicação, magnitude da contaminação e determinação do grau de severidade dos efeitos tóxicos de pesticidas (Cruz, 2013).

A enzima Glutathiona-S-transferase (GST) desempenha papel fundamental na Fase II da biotransformação de moléculas químicas e é considerada um biomarcador de toxicidade, juntamente com a glutathiona reduzida (GSH), que atua como antioxidantes não enzimáticos. Conjuntamente, atuam na eliminação eficiente de metabolitos tóxicos do organismo (Rinaldi *et al.*, 2002). A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que se concentra nas sinapses colinérgicas e neuromusculares, sendo responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh) em colina e acetato, evitando disparos nervosos incessantes (Čolović *et al.*, 2013). A atividade da AChE em diferentes tecidos fornece um método para diagnosticar intoxicação por produtos químicos (Modesto; Martinez, 2010). Normalmente, a atividade da AChE é determinada no cérebro e tecido muscular, pois o sistema neuromuscular dos peixes é principalmente colinérgico e sua atividade normal é essencial para o comportamento e função muscular normal (Payne *et al.*, 1996). Em peixes, alterações na AChE resulta em hiperestimulação dos nervos

colinérgicos, e conseqüentemente, causa natação errática, tremores e convulsão, além de prejudicar a alimentação, fuga e comportamento reprodutivo (Miron *et al.*, 2005).

Deste modo, o uso de biomarcadores envolvendo a determinação de atividades enzimáticas estão se tornando cada vez mais frequentes, pois conferem vantagem como a alta eficiência e especificidade, baixo custo e rapidez de resposta, fornecendo informações de efeito metabólico causado pelo contaminante (Amorim, 2003).

1.5.4 Biomarcadores morfológicos

Biomarcadores morfológicos são usados para avaliar a integridade estrutural de um órgão, detectando mudanças na morfologia que indicam exposição a agentes estressores (Paulino *et al.*, 2012). Alterações na morfologia tecidual são marcadores sensíveis de toxicidade, considerando que emitem respostas mesmo em baixos níveis de toxicidade, respondendo através de lesões celulares, advindas de alterações bioquímicas e fisiológicas no órgão (Cantanhêde *et al.*, 2014).

A histopatologia é considerada uma ferramenta essencial em estudos ecotoxicológicos, possibilitando uma avaliação específica de células e órgãos-alvo e fornecendo subsídios sobre o mecanismo de ação de um contaminante sob o animal *in vivo* (Nogueira *et al.*, 2009). Ela traduz a lesão integrada em função da duração e da intensidade da exposição ao poluente e a capacidade adaptativa do tecido, fornecendo subsídios de intoxicação antes que sejam identificadas mudanças comportamentais ou na aparência externa do animal (Albinati *et al.*, 2009). Através da histopatologia é possível obter respostas biológicas de forma rápida e com custo relativamente baixo. Deste modo, a análise morfológica tecidual constitui-se um biomarcador eficiente para diagnosticar e identificar as conseqüências fisiológicas de exposição subletal a contaminantes tóxicos (Filho *et al.*, 2014), demonstrando ser fundamental para estabelecer relações causais entre a exposição a poluentes e resposta biológica dos peixes (Schwaiger *et al.*, 1997).

Em peixes, os ionócitos são os principais locais de troca iônica em brânquias, sendo, portanto, ricas em unidades da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA) na membrana basolateral (Hwang *et al.*, 2007). Logo, a imunomarcção destas proteínas pode ser um excelente biomarcador para se compreender os processos osmorregulatórios em brânquias de peixes (Shikano; Fujio, 1998).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade aguda do inseticida fipronil em peixe tambaqui (*Colossoma macropomum*) via respostas integradas de múltiplos biomarcadores.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos de neurotoxicidade do fipronil através da atividade enzimática da Acetilcolinesterase de cérebro e músculo branco de tambaqui após 96 h de exposição;
- Determinar os efeitos fisiológicos e citogenotóxicos da exposição aguda a diferentes concentrações do inseticida fipronil em *C. macropomum* via biomarcadores hematológicos;
- Analisar o comprometimento morfofisiológico do fígado, brânquias e cérebro, através de biomarcadores histopatológicos e fisiológicos;
- Avaliar a ativação do sistema enzimático de biotransformação (GSH/GST) no fígado de *C. macropomum*.

REFERÊNCIAS

- ALBINATI, A. C. L.; MOREIRA, E. L. T.; ALBINATI, R. C. B.; CARVALHO, J. V.; DE LIRA, A. D.; SANTOS, G. B.; VIDAL, L. V. O. Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 621-627, 2009.
- AMARAL, R. B. **Investigação do comportamento eletroquímico do inseticida fipronil e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2012.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev. Bras. Epidemiol.** v.6, n.2, 2003.
- ANDRADE VIEIRA, J. A. R.; DA SILVA, G. S.; MATOS, L. V.; OLIVEIRA, M. I. B.; VAL, V. M. F. A. Avaliação dos efeitos do Roundup® e da hipóxia sobre os parâmetros hematológicos e histologia branquial de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Scientia Amazonia**, v. 8, n. 2, 2019.
- BARBOSA, K. F. S.; OLIVEIRA, E. N.; MACHADO, R. N.; GOMES, A. L. S.; DUNCAN, W. P. DMSO (dimetil sulfóxido) inibe acetilcolinesterase dos tecidos nervoso e muscular de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Scientia Amazonia**, v. 7, n.3, B1-B6, 2018.
- BAUDOU, F.G.; OSSANA, N.A.; CASTAÑÉ, P.M.; MASTRÁNGELO, M.M.; GONZÁLEZ, N. A. A.; PALACIO, M. J.; FERRARI, L. Use of integrated biomarker indexes for assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. **Sci. of The Total Environ.**, v. 650, p.1779-1786, 2019.
- BEGGEL, S., WERNER, I., CONNON, R.E., GEIST, J.P., Impacts of the phenylpyrazole insecticide fipronil on larval fish: time-series gene transcription responses in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following short-term exposure. **Sci. Total Environ.** v.426, p.160-165, 2012.
- BELCHIOR, D. C.V.; SARAIVA, A. S.; LÓPES, A. M. C.; SCHEIDT, G. N. Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 34, n. 1, p. 135-151, 2017.
- BONMATIN, J. M.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LISS, M.; LONG, E.; MARZARO, M.; MITCHELL, E. A. D.; NOOME, D. A.; SIMON-DELISO, N.; TAPPARO, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental science and pollution research**, v. 22, p. 35-67, 2015.
- BRASIL B. **Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura– Brasil 2010**. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2010_na_c_boletim.pdf. Acesso em: 16 out. 2023.
- BRAUNBECK, J. B.; STORCH, V.; BRESCH, H. Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroamine. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.19, p.405-418, 1990.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. A. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**, v. 1. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007.

BUDD, R.; ENSMINGER, M.; WANG, D.; GOH, K. S. Monitoring fipronil and degradates in California surface waters, 2008–2013. **Journal of environmental quality**, v. 44, n. 4, p. 1233-1240, 2015.

CATALAN, I. A.; BERDALET, E.; OLIVAR, M.P.; ROLDAN, C. Response of muscle-based biochemical condition indices to short-term variations in food availability in post-fl exion reared sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) larvae. **J. Fish Biol.** v.70, p. 391–405, 2007.

CETESB. **Qualidade das águas do interior de São Paulo 2017**, São Paulo: CETESB, 2018.

CHRISTIANSEN, C.; KLUNGSOYR, L. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.88b, p.701-711, 1987.

CLAUSS, T.M.; DOVE, A.D.M.; ARNOLD, J.E. Hematologic disorders of fish. *Vet. Clin. Exot. Anim.*, v.11, p.445-703, 2008. CLAUSS, T.M.; DOVE, A.D.M.; ARNOLD, J.E. Hematologic disorders of fish. **Vet. Clin. Exot. Anim.**, v.11, p.445-703, 2008.

ČOLOVIĆ, M. B.; KRSTIĆ, D. Z.; LAZAREVIĆPAŠTIS, T. D.; BONDŽIĆ, A. M.; VASIĆ, V.M. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, v. 11, n. 3, p. 315-335, 2013.

COLOVIC, M.B.; KRSTIC, D. Z.; LAZAREVIC-PASTI.; TAMARA, D.; BONDZIC, A. M.; VASIC, V. M. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315-335, 2013.

CRUZ, A. C. S. **Biomarcadores de contaminação ambiental: atividade mitocondrial e lisossômica em peixes expostos a biodiesel e blenda**. Tese (Doutorado em biotecnologia). Universidade Federal da Bahia, 2019.

DE LA TORRE, F. R.; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 131, n. 3, p. 271-280, 2002.

DE MORAIS, L. A. S.; MARINHO-PRADO, J. S. Plantas com atividade inseticida. **Defensivos Agrícolas Naturais: Uso e Perspectivas. Brasília, DF: Embrapa. Cap**, v. 19, p. 542-593, 2016.

ETIM, N. N.; ENYENIHI, G. E.; WILLIAMS, M. E.; UDO, M. D.; OFFIONG, E. E. A. Haematological parameters: indicators of the physiological status of farm animals. **British Journal of Science**, v. 10, n. 1, p. 33-45, 2013.

FERNANDES, M.N., MORON, S.E. Breathing and respiratory adaptations. In: Baldisserotto, B, Urbinati, E.C., Cyrino, J.E.P. (Eds.), **Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish. Academic Press**, London, p. 217–250, 2020.

FILHO, F, M, S.; REZENDE, K. F. O.; EMERENCIANO, A. K.; MOREIRA, L. M.; VILA, V. B.; BORGES, R. M.; PRESSINOTTI, L. N. Avaliação de biomarcadores histológicos em

peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana. **Atas de Saúde Ambiental-ASA (ISSN 2357-7614)**, v. 2, n. 1, p. 09-22, 2014.

FREITAS, C. E. C.; SIQUEIRA-SOUZA, F. K. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. **Revista Agrogeoambiental**, 2009.

GHAFFAR, A.; HUSSAIN, R.; ABBAS, G.; KALIM, M.; KHAN, A.; FERRANDO, S.; GALLUS, L.; AHMED, Z. Fipronil (Phenylpyrazole) induces hemato-biochemical, histological and genetic damage at low doses in common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology**, v. 27, p. 1261-1271, 2018.

GHAFFAR, A.; HUSSAIN, R.; ABBAS, G.; KHAN, R.; AKRAM, K.; LATIF, H.; ALI, S.; BAIG, S.; DU, X.; KHAN, A. Assessment of genotoxic and pathologic potentials of fipronil insecticide in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). **Toxin Reviews**, v. 40, n. 4, p. 1289-1300, 2019.

GODEFROID, R. S.; FONSECA, L. S.; SILVA, R. C. Utilização dos peixes do rio bacacheri como indicadores da qualidade ambiental. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**. v. 8, n.4, 2015.

GOMES, L. C.; SIMÕES, L. N.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2.ed. Santa Maria: Ed. UFSM, p.175-204, 2010.

GOMES, R. D.; OLIVEIRA, J. V. G. Prospecção de perfis epidemiológicos de intoxicações exógenas por agrotóxicos dos Estados da Região Norte do Brasil nos anos de 2007 a 2020. **AMAZÔNIA: SCIENCE & HEALTH**, v. 9, n. 4, p. 2-16, 2021.

GOULART, B. V.; VIZIOLI, B. D. C.; ESPINDOLA, E. L. G.; MONTAGNER, C. C. Matrix effect challenges to quantify 2, 4-D and fipronil in aquatic systems. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, p. 1-12, 2020.

GOUTHIER, L.; JACQUIN, L.; GIRAUD, J.; JEAN, S.; HANSSON, S. Metal Contaminants in Fish: Blood as a Potential Non-lethal Monitoring Tool. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 111, n. 1, p. 12, 2023.

GRIPP, H. S.; FREITAS, J. S.; ALMEIDA, E. A.; BISINOTI, M. C.; MOREIRA, A. B. Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 136, p. 173-179, 2017.

GUELFY, M. **Mecanismos de toxicidade do fipronil em hepatócitos isolados de rato**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal), Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2015.

GUNASEKARA, A.S.; TRUONG, T.; GOH, S.K.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R.S. Environmental fate and toxicology of fipronil. **J Pestic Sci**, v.32, p.189– 199, 2007.

GUPTA, S. K.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; SAHARAN, N.; PRAKASH, C.; AKHTAR, M. S.; KUMAR, S. 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**, v. 84, p. 113-122, 2014.

HEMALATHA, D.; NATARAJ, B.; RANGASAMY, B.; MAHARAJAN, K.; RAMESH, M. Exploring the sublethal genotoxic effects of class II organophosphorus insecticide quinalphos on freshwater fish *Cyprinus carpio*. *J. of Ocean. and Limn.*, 2020.

HUERTA, B.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 404, n. 9, p. 2611-2624, 2012.

HUGGETT, R.J.; KIMERIE, R.A.; MEHRIE JR., P.M.; BERGMAN, H.L. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publishers: Boca Raton, 1992.

HURVITZ, A., BERCOVIER, H., RIJN, J.V. Effect of ammonia on the survival and the immune response of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vaccinated against streptococcus iniae. **Fish & Shellfish Immunology**, v.7, p.45-53, 1997.

HUSSAIN, B., SULTANA, T., SULTANA, S., MASOUD, M.S., AHMED, Z., MAHBOOB, S. Fish eco-genotoxicology: comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. **Saudi J. Biol. Sci.** v. 25, p. 393-398, 2018.

HWANG, P. P.; LEE, T. H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comp. Biochem. Phys.**, 148, 479, 2007.

IBAMA, 2022. **Relatório de comercialização ao de agrotóxicos. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília**. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrototoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrototoxicos>. Acesso em 04 de jan de 2024.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por Mercúrio (Hg). **Oecol. Bras.** v.12, n. 4, p. 680-693, 2008.

JONSSON, C. M.; AOYAMA, H. Alteração da atividade enzimática em organismos aquáticos por poluentes de origem agrícola: uma abordagem geral e sobre a suscetibilidade da fosfatase ácida. **Química Nova**, vol. 33, n. 4, p. 920- 928, 2010.

KAH, OLIVER.; ANGLADE, I.; LEPRÊTRE, E.; DUBOURG, P.; MONBRISON, D. The reproductive brain in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 11, p. 85-98, 1993.

KI, Y. W.; LEE, J. E.; PARK, J. H.; SHIN, I. C.; KOH, H. C. Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to fipronil. **Toxicol. Lett.** v.211, p.18-28, 2012.

KOPECKA J.; PEMPKOWIAK, J. Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper. **Ecotox. Environ. Safe.** v. 70, p.379–391, 2008.

LI, H., YOU, J., WANG, W.-X. Multi-compartmental toxicokinetic modeling of fipronil in tilapia: Accumulation, biotransformation, and elimination. **J. Hazard. Mat.** v.360, p.420–427, 2018.

- LI, Z.; ZLABEK, V.; VELISEK, J.; GRABIC, R.; MACHOVA, J.; RANDAK, T. Physiological condition status and muscle-based biomarkers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), after long-term exposure to carbamazepine. **Journal of Applied Toxicology: An International Journal**, v. 30, n. 3, p. 197-203, 2009.
- LINS, J.A P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V, S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.** v. 8, n. 4, p. 469-484, Curitiba, 2010.
- LUPI, C.; NHACARINI, N. I.; MAZON, A. F.; SÁ, O. R. Avaliação da poluição ambiental através das alterações morfológicas nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilapia) nos córregos Retiro, consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. **Revista Fafibe On Line**. n.3, Bebedouro-SP, 2007.
- MAJUMDER, R.; KAVIRAJ, A. Acute and sublethal effects of organophosphate insecticide chlorpyrifos on freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Drug and chemical toxicology**, v. 42, n. 5, p. 487-495, 2018.
- MANZO, L.; ARTIGAS, F.; MARTÍNEZ, E.; MUTTI, A.; BERGAMASCHI, E.; NICOTERA, P.; TONINI, M.; CANDURA, S. M.; RAY, D. E.; COSTA, L. G. Biochemical markers of neurotoxicity. A review of mechanistic studies and applications. **Human & Experimental Toxicology**, v.15, n. 1, p. 20-35, 1996.
- MARCHESAN, E.; SARTORI, G. M. S.; AVILA, L. A.; MACHADO, S. L. O.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; MACEDO, V. R. M.; MARCHEZAN, M. G. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1053-1059, 2010.
- MARGARIDO, T. C.; FELÍCIO, A. A.; DE CERQUEIRA ROSSA-FERES, D.; DE ALMEIDA, E. A. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Mar. Environ. Res.** v.91, p.61-67, 2013.
- MAZON, A. F.; MONTEIRO, E. A. S.; PINHEIRO, G. H. D.; FERNANDES, M. N. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to cooper in freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 63, p. 621-631, 2002.
- MIRON, S. D.; CRESTANI, M.; SHETTINGER, M. R.; MORSCH, V. M.; BALDISSEROTTO, B.; TIerno, M. A.; MORAES, G.; VIEIRA, V. L. P. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*)(Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 3, p. 398-403, 2005.
- MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 81, n. 6, p. 781-787, 2010.
- MONTANHA, F. P.; ASTRAUSKAS, J. P.; KIRNEW, M. D.; NAGASHIMA, J. C.; PIMPÃO, C. T. Degradação de ambientes aquáticos por exposição a compostos químicos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 17, p. 1-12, 2011.

NOGUEIRA, D. J.; CASTRO, S. C.; SÁ, O. R. Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas – MG. **Revista Brasileira de Zoociências**. v. 11, n. 3, p. 227-232, 2009.

OKUMURA, F.; AMARAL, R. B.; ORESTES, E.; SILVA, A. B. F.; MAZO, L. H. Electrochemical and quantum chemical investigations of the insecticide fipronil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 925-932, 2016.

OLIVEIRA, B. R.; PENETRA, A.; CARDOSO, V. V.; BENOLIEL, M. G.; BARRETO CRESPO, M. T.; SAMSON, R. A.; PEREIRA, V.J. Biodegradation of pesticides using fungi species found in the aquatic environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 11781-11791, 2015.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; ANSARI, R. A.; ALI, M.; KAUR, M.; HAYAT, F.; AHMADA, F.; RAISUDDIN, S. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Chemico Biological Interactions**. v. 174, p. 183–192, 2008.

PAULINO, M. G.; SOUZA, N. E. S.; FERNANDES, M. N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.80, p.6– 13, 2012.

PAYNE, J. F.; FANCEY, L.; RAHIMTULA, A.; PORTER, E. Review and perspective on the use of mixed function oxygenase enzymes in biological monitoring. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, vol. 86, p. 233-245, 1987.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L. L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, n. 2, p. 225-231, 1996.

PEREIRA, C. D. S.; MARTIN-DÍAZ, M. L.; ZANETTE, J.; CESAR, A. CHOUERI, R. B.; ABESSA, D. M. S.; CATHARINO, M. G. M.; VASCONCELOS, M. B. A.; BAINY, A. C. D.; SOUSA, E. C. P. M.; VALLS, T. A. D. Integrated biomarker responses as environmental status descriptors of a coastal zone (Sao Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 74, n. 5, p. 1257-1264, 2011.

PERET, A.M.; OLIVEIRA, L.F.; BIANCHINI, I.J.; SELEGHIM, M.H.; PERET, A.C.; MOZETO, A.A. Dynamics of fipronil in Oleo Lagoon in Jataí Ecological Station, São Paulo-Brazil. **Chemosphere**. v.78, p.1225–1229. 2010.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. S.; LARA, S. S.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. C.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3281-3293, 2017.

PIMENTEL, D.; LEVITAN, L. Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. **Bioscience**, v. 36, n. 2, p. 86-91, 1986.

PORTRUNELI, N.; BONANSEA, R. I.; VALDÉS, M. E.; SILVA, L. C. M.; VIANA, N. P.; GOULART, B. V.; SOUZA, I. C.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; MONTAGNER, C. C.; WUNDERLIN, D. A.; FERNANDES, M. N. 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**, v. 240, p. 105987, 2021.

QUEROL, M.V.M.; QUEROL, E.; GOMES, N.N.A. Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae), bacia do rio uruguai médio, Sul do Brasil. **Iheringia, Sér. Zool.**, v.92, p.79-84, 2002.

QURESHI, I. Z.; BIBI, A.; SHAHID, S.; GHAZANFAR, M. Exposure to sub-acute doses of fipronil and buprofezin in combination or alone induces biochemical, hematological, histopathological and genotoxic damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic toxicology**, v.179, p.103–114, 2016.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro, 2014.

RINALDI, R.; ELIASSON, E.; AWEDMARK, S.; MORGENSTERN, R. Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 10, p. 1053-1058, 2002.

RODRIGUES, A. P. C.; MACIEL, P.O.; PEREIRA DA SILVA, L. C. C.; ALBUQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M.; LINDE, A. R.; ALMOSNY, N. R. P.; ANDREATA, J. V.; BIDONE, E. D.; CASTILHOS, S. C. Biomarkers for Mercury Exposure in Tropical Estuarine Fish. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 5, n. 1, p. 9-18, 2010.

ROUSSEL H, JOACHIM S, LAMOTHE S, PALLUEL O, GAUTHIER L, BONZOM JM. A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms: individual and population responses of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). **Aquat. Toxicol.** v.82, p.272–280, 2007.

SALVO, L. M.; SANTIAGO, M. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. Biomarkers as a tool to evaluate environmental quality of aquatic ecosystems susceptible to pesticide contamination. **Periodico Tche Química**, v. 15, n. 30, p. 56-64, 2018.

SANTOS, C. C. M.; CUNHA, F. S.; D'ÁVILA, T. V. B.; LIMA, B. S.; CARVALHO, I. M. B. G.; ARAÚJO, A. A. S.; FILHO, J. G. S.; CARNEIRO, P. C. F.; SOUSA, R. C.; FUJIMOTO, R. Y.; MARIA, A. N. Avaliação da contaminação de pesticida no músculo de tambaquis (*Colossoma macropomum*) cultivados e de sedimento da região do Baixo São Francisco. **VIII Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação**, 2018.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. **Peixes comerciais de Manaus**. ed. 2, IBAMA/AM, ProVárzea, Manaus, 2006.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, Netherlands, 15 sept. 1997.

SCLAFANI, M.; TAGGART, C. T.; THOMPSON, K. R. Condition, buoyancy and the distribution of larval fish – implications for vertical migration and retention. **J. Plankton Res.** v.15, p.413–435, 1993.

SHAH, N.; KHAN, A.; HABIB, N. K.; KHISROON, M. Genotoxic Consequences in Common Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella* Valenciennes, 1844) Exposed to Selected Toxic Metals. **Bio. Trace Element Res.**, 2020.

SHIKANO, T.; FUJIO, Y. Immunolocalization of na⁺. k⁺-atpase in branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and freshwater acclimation. **J. Exp. Biol.**, v.201, p.3031-3040, 1998.

SILVA, R. D.; ROCHA, L. O.; FORTES, B. D. A.; VIEIRA, D.; FIORAVANTI, M. C. S. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pesq. Vet. Bras.** v. 32, p. 99-107, 2012.

SOENGAS, J. L.; ALDEGUNDE, M. Energy metabolism of fish brain. **Comparative biochemistry and physiology part B: biochemistry and molecular biology**, v. 131, n. 3, p. 271-296, 2002.

SOLÉ, M.; BAENA, M.; ARNAU, S.; CARRASSON, M.; MAYNOU, F.; CARTES, J. E. Muscular cholinesterase activities and lipid peroxidation levels as biomarkers in several Mediterranean marine fish species and their relationship with ecological variables. **Environment international**, v. 36, n. 2, p. 202-211, 2010.

SOUSA, A. S.; DUAVÍ, W. C.; CAVALCANTE, R. M.; MILHOME MAL, DO NASCIMENTO RF. Estimated levels of environmental contamination and health risk assessment for herbicides and insecticides in surface water of Ceará, Brazil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 96, p. 90–95, 2016.

SOUZA, I. C.; DUARTE, I. D.; PIMENTEL, N. Q.; ROCHA, L. D.; MOROZESK, M.; BONOMO, M. M.; AZEVEDO, V. C.; PEREIRA, C. D. S.; MONFERRÁN, M. V.; MILANEZ, C. R. D.; MATSUMOTO, S. T.; WUNDERLIN, D. A.; FERNANDES, M. N. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environmental Pollution**. v. 180, p. 136-144, 2013.

STRZYZEWSKA, E.; SZAREK, J.; BABINSKA, I. Morphologic evaluation of the gills as a tool in the diagnostics of pathological conditions in fish and pollution in the aquatic environment: a review. **Veterinarni Medicina**. v.61, n.3, p. 123-132, 2016.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v.79, n.2, p.201–204, 2006.

UNITED STATES. **Environmental Protection Agency (USEPA). Aquatic Life Benchmarks and Ecological Risk Assessments for Registered Pesticides**. Office of Pesticide Programs, 2018. Disponível em: <https://nepis.epa.gov/>. Acesso em: 12 de out de 2023.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390-400, 2003.

VOIGT, C. L. **Quantificação de metais em peixes (*Geophagus brasiliensis*, *Cyprinus carpio*), água e sedimento do reservatório de alagados em ponta grossa/pr e avaliação da bioconcentração e bioacumulação**. Tese (Doutorado em química), Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2015.

WANG, C.; QIAN, Y.; ZHANG, X.; CHEN, F.; ZHANG, Q.; LI, Z.; ZHAO, M. A metabolomic study of fipronil for the anxiety-like behavior in zebrafish larvae at environmentally relevant levels. **Environmental Pollution**, v. 211, p. 252-258, 2016.

ZELIKOFF, J.T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? **Toxicology, Limerick**, v. 129, n. 1, p. 63-71, 1998.

ZENI, T. O. **O uso da histopatologia por microscopia de luz em estudos com peixes dulcícolas em condições ambientais controladas**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, 2016.

ZHANG, B.; ZHANG, L.; HE, L.; YANG, X.; SHI, Y.; LIAO, S.; YANG, S.; CHENG, J.; REN, T. Interactions of fipronil within fish and insects: experimental and molecular modeling studies. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 23, p. 5756-5761, 2018.

CAPÍTULO 2 – Toxicidade aguda do inseticida fipronil induzindo efeitos neurotóxicos e osmorregulatórios no peixe amazônico, *Collossoma macropomum*

Resumo

O fipronil é um inseticida amplamente utilizado no cultivo agrícola para o controle de pragas, todavia, relatos de detecção deste pesticida em ecossistemas aquáticos têm gerado preocupações quanto aos efeitos tóxicos em organismos não-alvo. Este estudo avaliou as respostas neurotóxicas e osmorregulatórias induzidas pelo fipronil após exposição aguda de 96 horas. Peixes juvenis foram divididos (n=10) aleatoriamente em três grupos: Controle (livre do contaminante), F40 (exposto à concentração de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$) e F160 (exposto à 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil). Amostras de plasma, cérebro, músculo branco e brânquias foram coletadas para avaliação de toxicidade via biomarcadores enzimáticos, morfológicos, imuno-histoquímicos e osmo-iônico. Os resultados demonstraram aumento na atividade da Acetilcolinesterase (AChE) no músculo dos animais expostos ao grupo F160 em relação ao controle e F40, demonstrando interferência do inseticida na junção neuromuscular de *C. macropomum*. No cérebro, a atividade da AChE permaneceu inalterada entre os grupos. O índice de lesão individual do cérebro demonstrou aumento para edema intracelular, todavia, não houve comprometimento do órgão. Não houve alterações significativas no tecido branquial entre os grupos. Não houve indução de alteração no número de ionócitos no filamento e lamela branquial de tambaqui após exposição. As análises de íons plasmáticos demonstraram aumento da concentração de Na^+ no grupo F160 em relação ao controle, ao passo que, o íon K^+ diminuiu de modo concentração dependente. No plasma, não houve alteração no íon Cl após exposição. A osmolaridade total plasmática aumentou no grupo F40 em relação ao controle, indicando desregulação osmo-iônica. Os resultados demonstram que o fipronil é potencialmente neurotóxico, interferindo na atividade da AChE no músculo de *C. macropomum*. O inseticida interfere na função osmorregulatória das brânquias, induzindo alterações hidroeletrolíticas nos animais expostos.

Palavras-chave: Neurotoxicidade; cérebro; imuno-histoquímica; tambaqui; osmolaridade.

1. Introdução

A expansão agrícola tem sido acompanhada do uso intensivo de pesticidas para controlar pragas nas lavouras e minimizar perdas na produção (Viana *et al.*, 2021), todavia, a aplicação desses produtos tem resultado na contaminação dos ecossistemas aquáticos (Gottardi *et al.*, 2017). Mesmo que não sejam aplicados nas proximidades de corpos d'água superficiais, os inseticidas podem adentrar o ambiente aquático por aplicações de pulverização e escoamento agrícola (Gunasekara *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2010), representando um sério risco a organismos aquáticos não-alvo (Schäfer *et al.*, 2011).

O Fipronil é um inseticida amplamente utilizado em cultivos agrícolas e na prática veterinária para controlar pragas (Gunasekara *et al.*, 2007). No Brasil, concentrações consideravelmente altas de fipronil foram detectadas, tangendo concentrações reportadas de até 465 $\mu\text{g L}^{-1}$ em corpos hídricos próximos a lavouras no sudeste do Brasil (CETESB, 2018). Estes dados geram uma preocupação de saúde pública, principalmente em decorrência dos efeitos tóxicos em peixes (Beggel *et al.*, 2010; Chagnon *et al.*, 2015). O mecanismo de ação deste inseticida, consiste no bloqueio dos canais de cloreto controlados pelo ácido γ -aminobutírico (GABA) no sistema nervoso central, causando estimulação neuronal excessiva, convulsões, paralisia e morte do animal (Qureshi *et al.*, 2016; Saldaña-Serrano *et al.*, 2021). Embora o fipronil possua maior afinidade de ligação para subunidades do receptor GABA de invertebrados, a ligação aos receptores GABA de vertebrados é possível (Hainzl; Casida, 1996).

Quando disponíveis na água, o fipronil e seus principais metabólitos são potencialmente tóxicos para peixes (Margarido *et al.*, 2013; Gripp *et al.*, 2017; Pisa *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016), podendo ser absorvidos via alimentação, dérmica ou por processos respiratórios (Li; You; Wang, 2018). Estudos destacam que os efeitos adversos do fipronil em peixes incluem inibição do crescimento, desregulação endócrina, redução do comportamento de natação e alterações nos índices bioquímicos e fisiológicos (Li; You; Wang, 2018; Moreira *et al.*, 2021, Wang *et al.*, 2016).

Em peixes, a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e músculo é uma ferramenta primordial na análise de neurotoxicidade, pois é responsável por hidrolisar a acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas, evitando a propagação contínua de impulsos nervosos (Sturm; Silva; Hansen, 1999; Araújo; Santos, Gonsalves, 2016). A ação da AChE é sensível a atuação de pesticidas, e quando inibida, afeta o comportamento optomotor do animal, gerando problemas nas fibras musculares, ineficiência do desempenho exploratório, paralisia ou mesmo a morte (Pereira *et al.*, 2012; Bernal-Rey *et al.*, 2020; Mdgela *et al.*, 2010). Deste

modo, a análise da atividade da AChE é essencial para verificar o funcionamento do sistema neuromuscular e sensorial do organismo (Lionetto *et al.*, 2013).

As brânquias são o principal órgão respiratório e desempenham funções de osmorregulação, equilíbrio ácido-base e excreção de compostos nitrogenados (Paulino *et al.*, 2012). Por estar diretamente em contato com a água e possuir uma grande área de superfície, o tecido branquial é o primeiro a ter contato com os xenobióticos (Fernandes *et al.*, 2013) e a emitir respostas morfofisiológicas teciduais diante de interferentes ambientais. Alterações na estrutura branquial podem interferir na funcionalidade normal do órgão (Sakuragui; Sanches; Fernandes, 2003). Os ionócitos estão diretamente envolvidas na captação de Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} para manter a homeostase iônica (Perry *et al.*, 1992) e, a depender da espécie podem estar presente nas lamelas (Evans *et al.*, 2005). Nas brânquias, o fipronil pode estimular mecanismos de defesa bioquímicos e morfológicos para reduzir a absorção e minimizar os efeitos tóxicos, todavia, essas alterações resultam em lesões teciduais, que podem comprometer o órgão e sobrevivência do animal (Lupi *et al.*, 2007).

Considerando a crescente contaminação de corpos hídricos por pesticidas e os potenciais riscos que oferecem a organismos aquáticos, este estudo buscou avaliar os efeitos tóxicos do inseticida fipronil no peixe neotropical *Colossoma macropomum* após exposição subletal aguda. O tambaqui é uma espécie nativa de água doce, destacando-se pela alta importância econômica e ecológica em regiões tropicais, considerando que a espécie é cultivada em tanques e capturada com frequência em águas brasileiras. Além disso, a espécie é considerada bioindicadora pela facilidade de manuseio e manutenção em laboratório, sendo, portanto, amplamente utilizada para avaliar a qualidade de ambientes aquáticos (Fortes Carvalho-Neta *et al.*, 2015). Portanto, informações referentes a toxicidade do fipronil e o uso de biomarcadores neurotóxicos e osmorregulatórios em tambaqui, fornecem subsídios para verificar o estado fisiológico e a sensibilidade da espécie frente a contaminação química, e dessa forma, contribuir para o monitoramento de contaminação aquática.

2 Material e Métodos

2.1 Animais

Espécimes juvenis de *C. macropomum* (massa corporal = $201,6 \pm 18,2$ g e comprimento total = $22,2 \pm 0,7$ cm), fornecidos pelo setor de piscicultura do Instituto Federal do Tocantins – Campus Araguatins, foram transportados até o Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais, da Universidade Federal do Norte do Tocantins, no Centro de Ciências Agrárias (CCA) em Araguaína - TO. Os animais foram aclimatados por 30 dias em tanques de 3000 L, com fluxo contínuo de água. Os peixes foram mantidos em temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo natural (12:12 claro/escuro), parâmetros físico-químicos (OD $6,2 \pm 2,3$; pH $7,0 \pm 0,1$; amônia: $0,02 \pm 0,0$ ppm) controlados e alimentação diária com ração comercial contendo 40% de proteína.

2.2 Contaminante

A formulação comercial Regent® 800 WG foi utilizada como fonte do princípio ativo fipronil (800 g/kg). Os bioensaios foram baseados em uma concentração estipulada pela *United States Environmental Protection Agency* (EPA), como não prejudicial para peixes, e na média de valores de concentrações ambientais já encontradas no ambiente aquático (CETESB, 2018; Santillán Deiú *et al.*, 2021).

2.3 Delineamento Experimental

Os peixes foram divididos aleatoriamente em três grupos ($n = 10$) e acondicionados em caixas de 300L com aeração artificial contínua para uma aclimatação de 24 horas antes do bioensaio. Os animais foram expostos a um grupo controle (Livre do contaminante = GC) e dois tratados (F40 = $40 \mu\text{g L}^{-1}$ e F160 = $160 \mu\text{g L}^{-1}$), de modo agudo (96 h), em sistema estático, com os parâmetros físico-químicos controlados e privados de alimentação durante o teste.

Após exposição, os animais foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e uma amostra de sangue (1 mL) foi coletada com seringas heparinizadas para análises dos parâmetros plasmáticos. Após coletada a biometria, os animais foram eutanasiados por secção medular, para obtenção de amostras de brânquias, cérebro e músculo branco. Para a análise de biomarcadores bioquímicos neurotóxicos, amostragens de cérebro e músculo branco foram congeladas (-80°C) e fixadas em formol 10% tamponado para análises de biomarcadores morfológicos. As brânquias foram fixadas em solução de Bouin para análise histopatológica. O sangue remanescente foi centrifugado a 12000 g , 4°C por 5 minutos para separação do plasma

que foi posteriormente congelado (-80 °C) para análise de íons plasmáticos e osmolaridade total.

Esse experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Tocantins (Processo n° 23.101.001.315/22-35).

2.4 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi estabelecida segundo o método de quantificação do produto da reação da acetilcolina com o DTNB (5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoato), seguindo a metodologia de Ellman *et al.* (1961) com adaptações. Amostra de cérebro e músculo branco foram homogeneizados em tampão fosfato com pH 7,5 (0,1 M) e centrifugados a 10.000 g por 20 minutos a 4°C. Posteriormente, foi retirado o sobrenadante, diluindo-o na proporção 1:20 (v/v). Na cubeta, foi adicionado 50 µL de amostra diluída, 200 µL de DTNB e 50 µL de Iodeto de acetilcolina (9 mM). A leitura foi realizada em tempo total de 6 minutos, em intervalos de 0', 3' e 6' em espectrofotômetro em $\lambda = 415 \text{ nm}$.

2.5 Análises histopatológicas

Amostras do cérebro foram coletadas e fixadas em formol 10% tamponado (formol P.A, Fosfato de Sódio Bibásico e Fosfato Monobásico). As amostragens de brônquias foram coletadas e fixadas em solução de Bouin. Posteriormente, foram desidratadas em uma série de concentrações crescentes de etanol (de 70%-100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica. Secções histológicas foram confeccionadas em 5 µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina (HE) e finalizadas com Entellan®.

Para as análises de cérebro e brônquias, foram examinados 5 campos amostrais em 5 cortes histológicos, totalizando 25 campos de amostragem para cada animal. A observação foi realizada utilizando um microscópio de luz (LEICA MD500) juntamente com uma câmera de vídeo e um software de análise de imagem (LAS 2.0), em magnificação de 400x, de acordo com a metodologia proposta por Paulino *et al.* (2020). Foi atribuído um escore (Sc), dependente da distribuição da lesão no órgão, onde: (0) lesão inexistente; (1) ocorrência rara; (2) pouco frequente; (3) moderadamente presente, (4) severa ocorrência. Foi considerado ainda um Fator de Importância patológica (Fi), a qual indica a severidade da lesão e os efeitos na sobrevivência do animal: (1) lesão totalmente reversível e com pouca relevância patológica; (2) lesão reversível após a remoção do agente estressor e com moderada importância patológica; (3) lesões irreversíveis e com alta importância patológica.

O índice de lesão individual de lesão (I_{alt}) foi determinado a partir da multiplicação do Sc e Fi, enquanto o índice de comprometimento morfofuncional do órgão (I_{org}) foi baseado na somatória dos I_{alt} para cada animal ($I_{org} = \Sigma I_{alt}$).

2.6 Imuno-histoquímica de ionócitos (contra Na^+/K^+ -ATPase)

Amostras de brânquias foram fixadas em solução de Bouin, desidratadas em uma série crescente de etanol (70%-100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica. Secções histológicas (6 μ m) foram confeccionadas em micrótomo (Leica RM 2125RT). para rotina de imuno-histoquímica de ionócitos. As secções foram desparafinizadas em xilol 100% (2x) por 5 minutos e hidratadas em bateria decrescente de etanol (100-50%) por 3 minutos.

Os cortes histológicos foram lavados (2x) em tampão salino Tris base + triton 0,5 mM pH 7,4 (TBS-T) por 10 minutos com agitação contínua. As lâminas foram escorridas e as amostras foram pré-incubadas (em câmara úmida) com soro normal de cabra 20% - NGS (*Normal Goat Serum* – Gibco Invitrogen) por 1 hora, para bloquear sítios de ligação não específicos. A incubação com o primeiro anticorpo ($\alpha 5$) anti- Na^+/K^+ -ATPase (diluído 1:300) foi ‘overnight’ em câmara úmida a 20 °C. As secções foram lavadas 2 vezes por 15 minutos em TBS-T e incubados com o segundo anticorpo anti rato com peroxidase conjugada – GAMPO (*Goat anti-mouse Peroxidase* – Chemicon international, USA) diluído (1:100) por 1 hora. Após a incubação, foram lavadas 2 vezes com tampão salino Tris base (pH 7,4) por 15 minutos. O complexo foi visualizado utilizando a coloração com 3,3'-diaminobenzidina + Sulfato níquel amoniacal (DAB-Ni) e H₂O₂ por 5 minutos. A coloração foi interrompida em água destilada (2x) por 10 minutos.

As lâminas foram finalizadas usando Entellan e analisadas com o software Motic Image Plus 2.0 em microscópio de luz (Leica ICC50HD), com a contagem de ionócitos no filamento e lamelas em 10 campos aleatórios e expressas como n° ionócitos por mm² de epitélio.

2.7 Determinação da osmolalidade total e concentrações iônicas plasmática

Amostras de sangue foram centrifugadas a uma velocidade de 12000 g a 4°C, por 3 minutos, para separação do plasma. Para determinação da osmolalidade plasmática total foi utilizado 50 μ L do plasma. A análise foi realizada em um semi-microsmômetro (μ OSMETTE PRECISION SYSTEM) que tem como base o ponto de congelamento e expressa em mOsmol Kg de H₂O.

As concentrações dos íons Na^+ e K^+ foram determinadas em fotômetro de chama (DIGMED DM-61). A concentração de íons Cl^- (plasma diluído 1:20) foi determinada

utilizando um kit comercial Labtest® ref 115 (Cloretos Liquiform), seguindo as instruções do fabricante. As leituras de absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro de microplacas (Asys UVM 340) em $\lambda = 450$ nm. As concentrações de íons plasmáticos foram expressas em mEq L⁻¹.

2.8 Proteína total

O teor da proteína total (mg proteína⁻¹ mL⁻¹) do cérebro e músculo para as análises bioquímicas foi determinado de acordo com método de Bradford, utilizando coomassie brilliant blue G-250 (BRADFORD, 1976), adaptado para leitura em microplaca (Asys UVM 340) conforme descrito por Kruger (1994) e utilizando a albumina de soro bovino (1 mg mL⁻¹) como padrão. A absorvância das amostras foi medida a 595 nm.

2.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (D'agostino & Pearson) e as diferenças entre o grupo controle e os grupos tratados foram detectadas por análise de variância (ANOVA) One-way, seguido de pós-teste de Bonferroni ($n \geq 8$) ou seu correspondente não paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste Dunns. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando software GraphPad Prism 5.0, considerando significância de $p < 0,05$ entre os grupos.

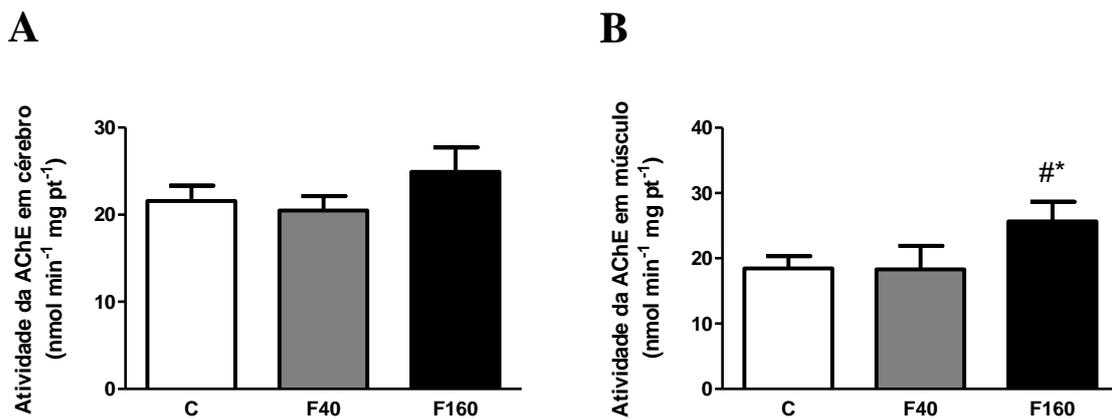
3. Resultados

Nenhum dos animais morreu durante a exposição aguda de 96 horas ao fipronil, indicando que as concentrações subletais são de relevância ambiental, considerando que podem ser encontradas no meio aquático.

3.1 Análises de neurotoxicidade

No músculo houve aumento de 39,1% na atividade da AChE no grupo F160 em relação ao controle, e aumento de 39,8% entre tratados. No cérebro, essa atividade permaneceu inalterada (Figura 1).

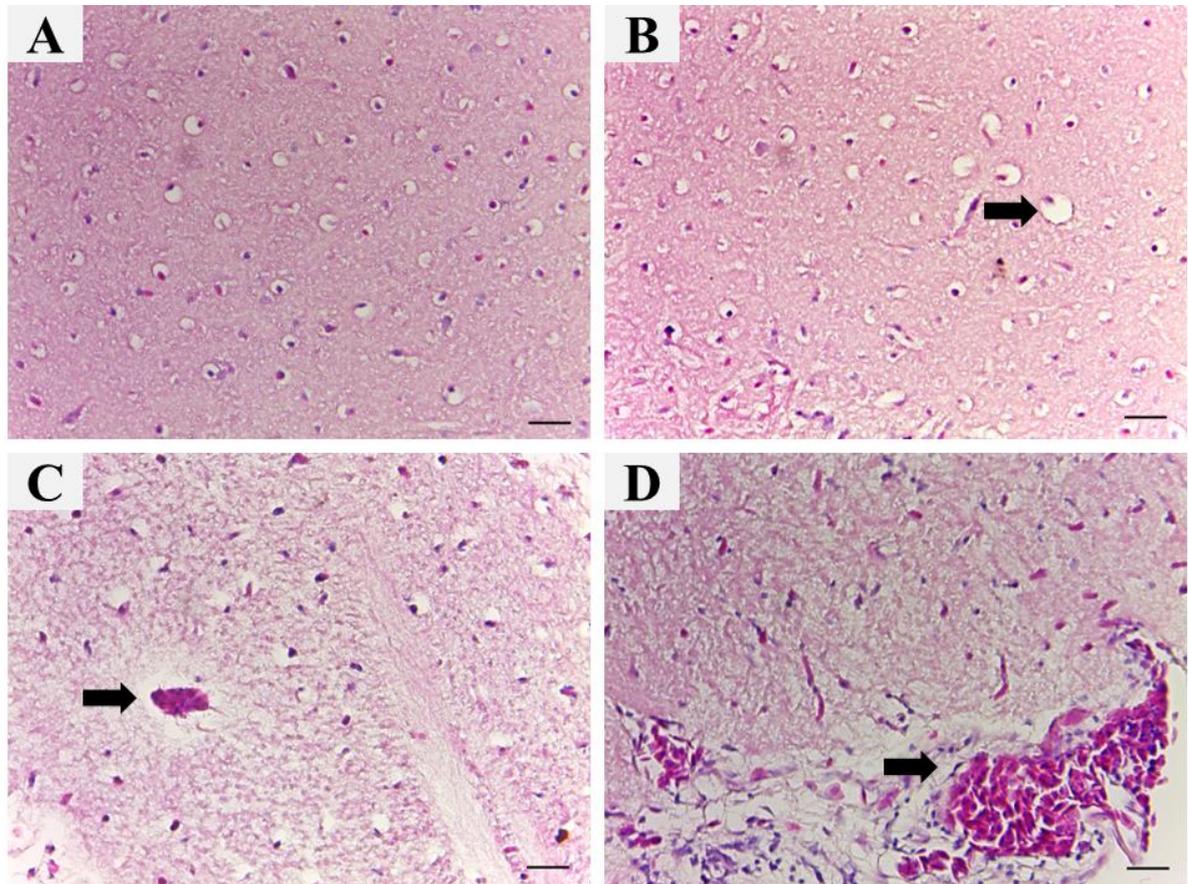
Figura 1 - Atividade da acetilcolinesterase (AChE) de *Colossoma macropomum* expostos a diferentes concentrações do inseticida fipronil em exposição aguda por 96 h. (A) cérebro (B) e músculo. Os valores são expressos como médias (\pm E.P.M.). (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. (#) Indica diferença ($p < 0,05$) entre tratados.



Fonte: autora (2024)

Na histologia do tecido cerebral foram encontradas lesões do tipo vacuolização, congestão, edema intracelular e tecidual, hemorragia, degeneração hidrópica e hiperemia. A Figura 2 demonstra algumas alterações observadas no tecido nervoso de *C. macropomum*, embora o I_{alt} tenha demonstrado aumento significativo apenas para edema intracelular no grupo exposto a $160 \mu\text{g L}^{-1}$ do fipronil (Tabela 1). Conforme apresentado na Figura 3, a exposição ao fipronil não causou comprometimento do órgão e, portanto, não interferiu na sobrevivência do animal.

Figura 2 – Representação histológica de lesões no tecido cerebral de peixes tambaqui expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil por 96 horas. (A) tecido cerebral normal. (B) Degeneração hidrópica e edema intracelular (seta preta). (C) Hiperemia (seta preta). (D) hemorragia (seta preta). Barra de escala = 20 μm .

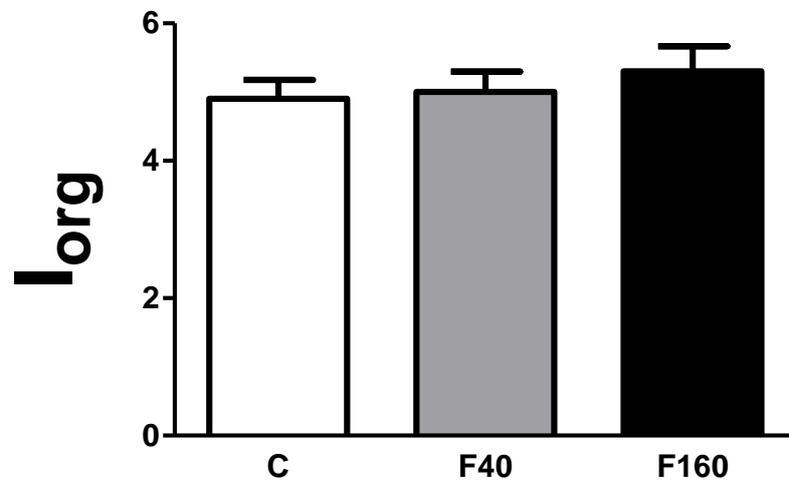


Fonte: autora (2024)

Tabela 1 – Índice de alteração individual (I_{alt}) em cérebro de peixes tambaqui expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ do inseticida fipronil por 96 horas. (*) indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. (#) Indica diferença ($p < 0,05$) entre tratados.

Alteração	Índice de Alteração Individual do Cérebro - I_{alt}		
	Concentração de Fipronil ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	Controle	F40	F160
Vacuolização	1,1 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1
Congestão	0,8 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1
Edema intracelular	0,3 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1 ^{*#}
Edema tecidual	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1
Hemorragia	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
Degeneração hidrópica	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1
Hiperemia	0,6 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1

Figura 3 - Índice de lesão do órgão (I_{org}) em cérebro de tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil por 96 horas.

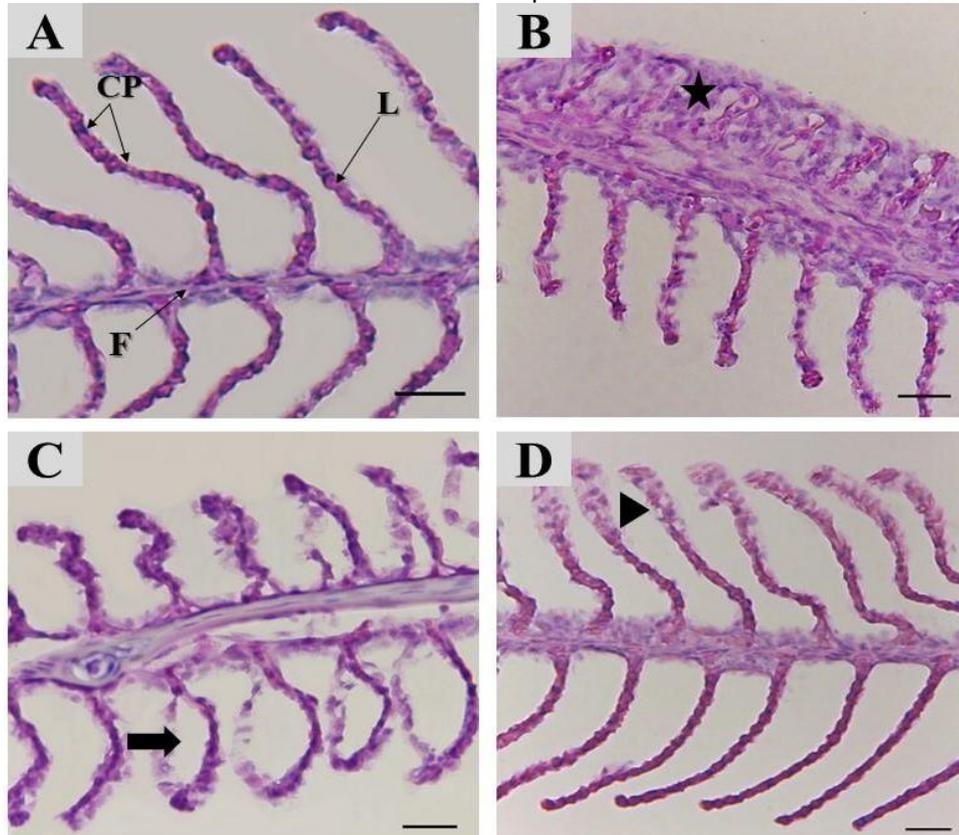


Fonte: autora (2024)

3.2 Análises morfológicas branquiais e osmo-iônicas

As características morfológicas normais do tecido branquial de *C. macropomum* estão ilustradas na Figura 4A, demonstrando epitélio lamelar pavimentoso sem alterações e com células pilares bem estruturadas. As principais lesões encontradas em brânquias de tambaqui nos grupos expostos estão representadas na Figura 4B-D. Em 96 horas de exposição, as alterações mais frequentes foram hipertrofia do epitélio lamelar, descolamento do epitélio, hiperplasia e fusão parcial de lamelas.

Figura 4 – Representação histológica de lesões mais frequentes no tecido branquial de peixes tambaqui expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil por 96 horas. (A) Estrutura normal do tecido branquial; (B) estrela indica hiperplasia e fusão parcial lamelar; (C) seta preta indica descolamento de lamelas e edema; (D) cabeça de seta indica hipertrofia do epitélio lamelar. L = lamela; F = filamento; CP = células pilares. Barra de escala = 20 μm .



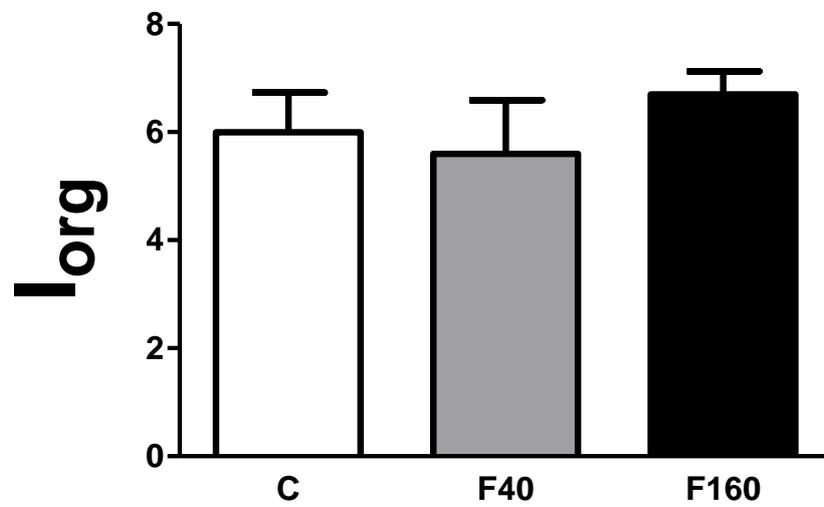
Fonte: autora (2024).

Não houve diferença no I_{alt} nas brânquias entre os grupos analisados (Tabela 2). O I_{org} demonstrou que não houve comprometimento morfofisiológico no tecido branquial dos animais tratados em relação ao controle (Figura 5).

Tabela 2 – Índice de alteração individual (I_{alt}) em brânquias de peixes tambaqui expostos às duas diferentes concentrações do inseticida fipronil (40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$) por 96 horas.

Alteração	Índice de Alteração Individual das Brânquias - I_{alt}		
	Concentração de Fipronil ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	Controle	F40	F160
Aneurisma	0,0 \pm 0,0	0,4 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1
Congestão, hiperemia e hemorragia	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
Hipertrofia do epitélio lamelar	1,8 \pm 0,2	1,9 \pm 0,1	2,4 \pm 0,2
Descolamento epitelial e edemas	0,7 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	1,0 \pm 0,3
Fusão parcial das lamelas	0,7 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1
Fusão total de lamelas	0,0 \pm 0,0	0,2 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0
Proliferação de células cloreto	0,0 \pm 0,0	0,2 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0
Hiperplasia do epitélio	2,6 \pm 0,6	2,0 \pm 0,4	2,2 \pm 0,3

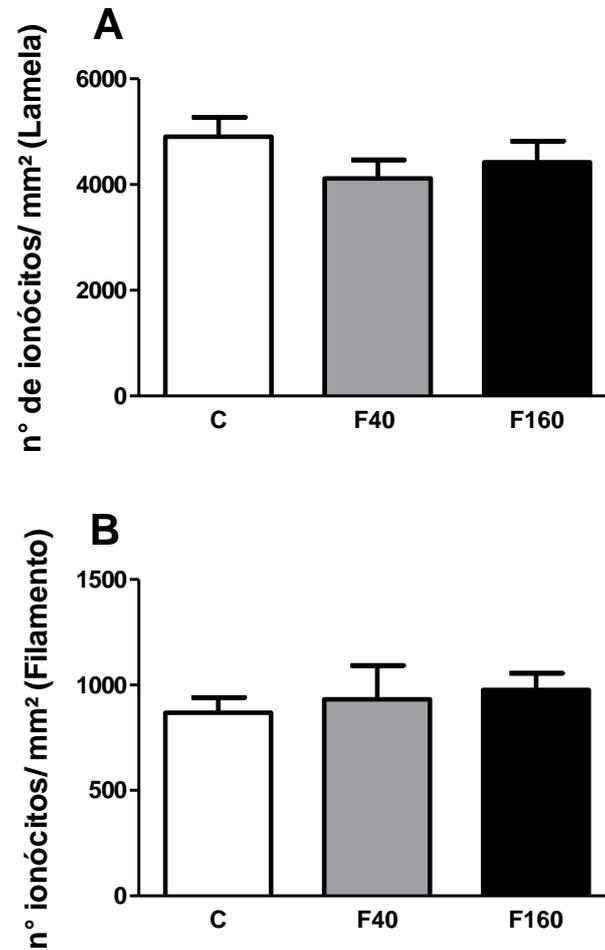
Figura 5 - Índice de lesão do órgão (I_{org}) em brânquias de tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil por 96 horas



Fonte: autora (2024).

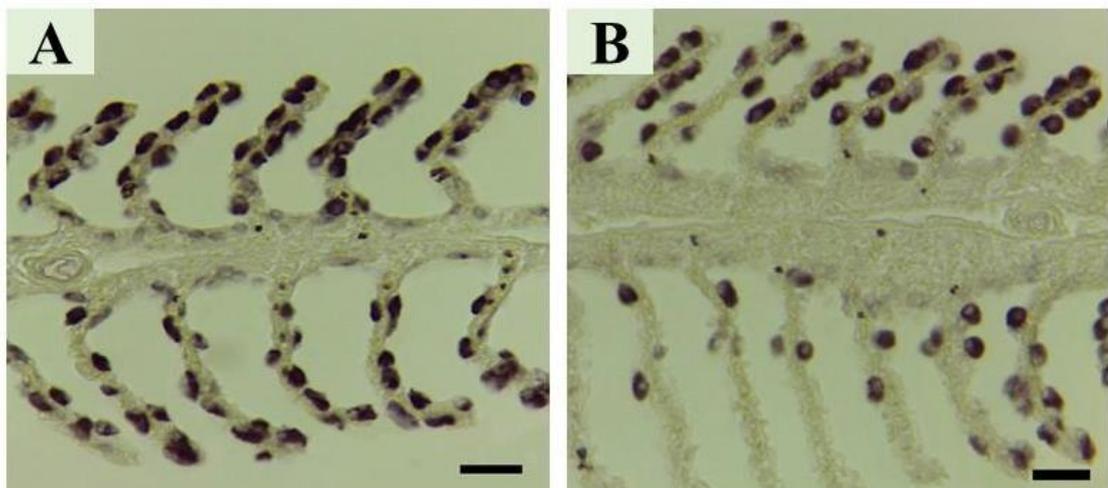
Nas brânquias, a imuno-histoquímica de ionócitos em *C. macropomum* não demonstrou alteração na densidade celular nos filamentos e lamelas entre os grupos (Figura 6). Na Figura 7A está ilustrado a distribuição de ionócitos no filamento e lamela branquial de animais controle. Filamentos branquiais imunomarcados de peixes tratados estão representados na Figura 7B.

Figura 6 – Valores médios (média \pm erro) de ionócitos imunomarcados na lamela (A) e filamento (B) de *Colossoma macropomum* expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil por 96 horas.



Fonte: autora (2024)

Figura 7 – Imunohistoquímica contra Na^+/K^+ -ATPase de ionócitos em brânquias de *C. macropomum* expostos ao inseticida fipronil nas concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ por 96 horas. (A) grupo controle (B) grupo tratado. Barra de escala = 20 μm .



Fonte: autora (2024).

Após exposição aguda ao fipronil, houve diferenças nas concentrações de Na⁺ e K⁺ plasmático, com aumento de Na⁺ no grupo F160 e diminuição K⁺ de forma dose dependente. A concentração de íons Cl⁻ permaneceu inalterada entre os grupos. Houve aumento na osmolaridade total do grupo F40 em relação ao controle (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentração de íons e osmolalidade plasmática em *Colossoma macropomum* expostos às concentrações de 40 e 160 µg L⁻¹ do inseticida fipronil por 96 horas. (*) indica diferença (p<0,05) em relação ao grupo controle. (#) Indica diferença (p<0,05) entre tratados.

Concentração de íons e Osmolalidade plasmática				
Grupos	Íons (mEq.L⁻¹)			Osmolalidade total (mOsmol. Kg H₂O)
	Na⁺	K⁺	Cl⁻	
Controle	183,0 ± 7,9	13,5 ± 0,5	118,7 ± 4,4	284,6 ± 5,7
F40	197,4 ± 9,1	13,1 ± 0,9	125,0 ± 3,1	303,0 ± 3,6*
F160	212,6 ± 6,9*	9,1 ± 0,8*#	127,4 ± 4,2	302,6 ± 6,2

4. Discussão

O fipronil, mesmo em concentrações ambientais altas, não foi letal para o *C. macropomum*. No entanto, demonstrou ser potencialmente neurotóxico e causar desregulação osmo-iônica após exposição subletal aguda de 96 h. Em relação aos biomarcadores neurotóxicos, a atividade da AChE muscular sugere maior efeito na junção neuromuscular. Segundo Miron *et al.* (2005) a ativação da AChE muscular pode representar um aumento na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), com consequente diminuição da ativação dos receptores nicotínicos e muscarínicos, o que possivelmente influencia no processo de neurotransmissão colinérgica. Um aumento na atividade da AChE no músculo foi relatado em robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) após administração de fipronil na dose de 10 mg/kg na ração (Sanahuja *et al.*, 2020) e a inalteração dessa enzima no tecido cerebral foi relatada no peixe *Pseudorasbora parva* após exposição aguda a diferentes concentrações do inseticida (Li *et al.*, 2020). Considerando que o sistema neuromuscular necessita de Na⁺ para sinalização (Luskova; Svoboda; Kolarova, 2002), sugere-se que a alteração na concentração plasmática desse íon possa ter contribuído na atividade da AChE muscular e lesões cerebrais. O K⁺ atua na regulação das funções musculares, e uma redução em sua concentração (hipocalemia) também apresenta efeito no sistema nervoso (Gabriel; Edori; Egobueze, 2019). O funcionamento adequado da atividade da AChE é crucial para diversas funções fisiológicas dos peixes, incluindo a localização da presa, fuga do predador e orientação em direção ao alimento (Dutra; Arends, 2003).

O curto tempo de exposição ao fipronil causou comprometimento imediato ao cérebro do tambaqui na concentração de 160 µg L⁻¹, o que foi evidenciado pelas alterações neste órgão. Segundo Unterberg *et al.* (2004) o edema intracelular afeta neurônios e astrócitos, sendo resultante da ausência do aporte de energia, que interfere com os mecanismos da bomba iônica na membrana celular, levando a desequilíbrios de substâncias ativas osmóticas, como de Na⁺ intracelular, causando influxo de água nas células. Deste modo, sugere-se que o aumento de edema intracelular no grupo F160, possa estar relacionado as desregulações iônicas plasmáticas e osmolaridade observadas neste estudo. Lakshmaiah (2017) relata que alterações histopatológicas no cérebro de peixes podem resultar de alterações funcionais e comportamentais, causando redução da funcionalidade do órgão. Por outro lado, Ardeshir *et al.* (2017) não observaram nenhuma lesão cerebral em peixe *Rutilus frisii* após exposição a duas vias de entrada do composto, intraperitoneal (doses de 450, 550, 650 e 750 mg/kg) e exposição na água (concentrações de 400, 500 e 600 µg L⁻¹).

Os epitélios filamentosos e lamelares das brânquias desempenham importantes papéis na ionorregulação e trocas gasosas dos peixes, além de formar uma barreira entre o meio interno e externo. Adicionado a isso, respondem prontamente a agentes potencialmente tóxicos na água (Evans *et al.*, 2005). Os distúrbios brânquias resultam de alterações bioquímicas e fisiológicas nos tecidos, podendo interferir e modificar o funcionamento adequado do órgão (Couch; Fournie, 1993). Relacionado ao tempo e a intensidade da exposição, a histopatologia de brânquias pode indicar a capacidade de regeneração do tecido quando expostos a um contaminante tóxico (Fernandes; Mazon, 2003). Neste estudo, o tecido branquial não foi afetado pelo fipronil, demonstrando não apresentar uma ação deletéria acentuada nas concentrações testadas, considerando que nenhuma alteração foi observada nos grupos expostos. Após exposição ao fipronil, fusão total de lamelas, hiperplasia epitelial, congestão vascular, ruptura das lamelas primárias, atrofia lamelar, degeneração lamelar e necrose foram relatadas em *Rhamdia quelen* nas concentrações de 0,3 e 0,4 mg L⁻¹ (Fredianelli *et al.*, 2019) e *Oreochromis niloticus* expostos a 0,014; 0,0042 e 0,002 mg L⁻¹ (El-Murr *et al.*, 2015).

Em peixes, os ionócitos estão geralmente distribuídas no filamento branquial, principalmente nas regiões interlamelares (Evans *et al.*, 2005). No *C. macropomum*, a distribuição de ionócitos nas lamelas é comumente presente, e de acordo com Costa e Fernandes (2002), essa alta densidade na espécie pode ser atribuída à baixa concentração de íons na água ambiental, uma característica das águas continentais brasileiras. Portanto, a presença de ionócitos na lamela de peixes brasileiros é comum, considerando que a maior parte das águas continentais do país são macias e pobres em íons (Fernandes; Perna-Martins, 2001). Sabendo que número de ionócitos está intimamente relacionado com as concentrações de íons na água, para manter a homeostase iônica (Fernandes; Perna-Martins, 2002), neste estudo, foi observado que o fipronil não induziu alterações na proliferação dessa célula, entretanto, houve ajustes hidro-eletrolítico nos animais expostos. Portanto, sugere-se que essa desregulação iônica e osmótica possa ser atribuída as unidades de Na⁺/K⁺/ATPase que estão dispostas ao tecido que caracterizam a atividade, assim como a abertura apical celular (área fracional).

Considerando que distúrbios no equilíbrio hídrico e na homeostase iônica são consequências de condições de estresse e/ou toxicidade em órgãos envolvidos nos processos osmorregulatórios (Wendelaar Bonga, 1997; Camargo; Martinez, 2006), as alterações nos íons e osmolaridade plasmática observada neste estudo, evidenciam que o contaminante induziu distúrbios iônico-osmótico no órgão branquial de tambaqui, embora não observado através da histopatologia e densidade de ionócitos. Para manter a homeostase dos fluidos corporais, os peixes dulcícolas compensam a perda iônica por difusão e o ganho osmótico de água,

absorvendo íons Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} pelas brânquias, produzindo grande volume de urina diluída (Hirose *et al.*, 2003). Portanto, neste estudo, o aumento na concentração de Na^+ e inalteração de Cl^- , sugerem desvios na homeostase hidroeletrólítica, causado pelo estresse da exposição ao inseticida.

5. Conclusão

A exposição aguda ao fipronil, demonstrou efeitos neurotóxicos e osmorregulatórias em *C. macropomum*. Os resultados evidenciam uma ação tóxica do inseticida na junção neuromuscular, sugerindo interferência na transmissão adequada do impulso nervoso para o músculo, o que pode comprometer o desempenho de funções importantes à sobrevivência do animal, como locomoção e capacidade exploratória. Embora o fipronil não tenha interferido no funcionamento normal do cérebro, sua toxicidade foi expressada através de lesões individuais, que embora reversível e baixa relevância patológica, podem ser progressivas ao longo do tempo e, conseqüentemente, comprometer o órgão e sobrevivência do animal. A histopatologia branquial apresentou baixa sensibilidade ao inseticida após exposição aguda de 96 horas, considerando que não houve comprometimento morfológico tecidual, provavelmente em decorrência da rápida transferência do contaminante das brânquias para a corrente sanguínea. Todavia, foi perceptível que houve interferência na função osmorregulatória desse órgão, evidenciadas pelo desequilíbrio hidro-eletrolítico plasmático nos peixes expostos ao contaminante.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.
- BEGGEL, S.; WERNER, I.; CONNON, R. E.; GEIST, J. P. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 16, p. 3169-3175, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.
- CAMARGO, M. M. P.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 1, p. 40-46, 2009.
- CAMPOS-BACA, L.; KOHLER, C. C. Aquaculture of *Colossoma macropomum* and related species in Latin America. In: American Fisheries Society Symposium. **American fisheries society**. p. 541, 2005.
- CETESB. **Qualidade das águas do interior de São Paulo 2017**, São Paulo: CETESB, 2018.
- CHAGNON, M., KREUTZWEISER, D., MITCHELL, E.A., MORRISSEY, C.A., NOOME, D.A., VAN DER SLUIJS, J.P. Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. **Environ. Sci. Pollut. Res.** v.22, n.1, p. 119–134, 2015.
- COSTA, O. T. F.; FERNANDES, M. N. Chloride cell changes induced by nitrite exposure in an Amazonian fish species. In: Aquatic Toxicology: Mechanism and Consequences. Eds. Kennedy, C.; Kolok, K.; MacKinlay, D. **International Congress of Fish Biology, Canada**. p. 51-61, 2002.
- COUCH, J. A.; FOURNIE, J. W. Advances in fisheries sciences. **Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms**. CRC Press, Boca Raton, 1993.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, J. R. V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** v.7, p.88–95, 1961.
- EL-MURR, A.; IMAM, T. S.; Y, H.; GHONIMI, W. A. M. Histopathological, immunological, hematological and biochemical effects of fipronil on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **J Vet Sci Technol**, v. 6, n. 5, p. 2-9, 2015.
- EVANS, D. H.; PIERMARINI, M.; CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. **Physiol. Rev.**, v.85, p.97-177, 2005.
- FERNANDES, M. N.; MAZON, A. F. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val., A.L., Kapoor, B.G. (Eds.), In Fish Adaptations. **Sci. Publi., Inc.**, v.422, p.203–231, 2003.

FERNANDES, M. N.; PAULINO, M. G.; SAKURAGUI, M. M.; RAMOS, C. A.; PEREIRA, C. D. S.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H. Organochlorines and metals induce changes in the mitochondria-rich cells of fish gills: an integrative field study involving chemical, biochemical and morphological analyses. **Aquatic toxicology**, v. 126, p. 180-190, 2013.

FERNANDES, M. N.; PERNA-MARTINS, S. A. Epithelial gill cells in the armored catfish, *Hypostomus cf. plecostomus* (Loricariidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, p. 69-78, 2001.

FERNANDES, M. N.; PERNA-MATINS, S. A. Chloride cell responses to long-term exposure to distilled and hard water in the gill of the armored catfish, *Hypostomus tietensis* (Loricariidae). **Acta Zoologica (Stockholm)**, v.83, p.321-328, 2002.

FORTES CARVALHO-NETA, R. N.; PINHEIRO-SOUSA, D. B.; DE MACÊDO SOBRINHO, I. C.; HORTON, E. Y.; ALMEIDA, Z. S.; TCHAICKA, L. et al. Genotoxic and hematological parameters in *Collossoma macropomum* (Pisces, Serrasalminidae) as biomarkers for environmental impact assessment in a protected area in northeastern Brazil. **Environmental Science Pollution Research**, v. 22, n. 20, p. 15994-16003, 2015.

FREDIANELLI, A. C.; PIERIN, V. H.; UHLIG, S. C.; GALEB, L. A. G.; ROCHA, D. C. C. Hematologic, biochemical, genetic, and histological biomarkers for the evaluation of the toxic effects of fipronil for *Rhamdia quelen*. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 43, n. 1, p. 54-59, 2019.

GABRIEL, U. U.; EDORI, O. S.; EGOBUEZE, E. C. Plasma enzymes and electrolytes in *Heterobranchus bidorsalis* treated with cypermethrin. **Biochem Anal Biochem**, v. 8, n. 380, p. 2161-1009.19, 2019.

GOTTARDI, M.; BIRCH, M. R.; DALHOFF, K.; CEDERGREEN, N. The effects of epoxiconazole and α -cypermethrin on *Daphnia magna* growth, reproduction, and offspring size. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 2155-2166, 2017.

GUNASEKARA, A.S.; TRUONG, T.; GOH, S.K.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R.S. Environmental fate and toxicology of fipronil. **J Pestic Sci**, v.32, p.189– 199, 2007.

HAINZL, D.; CASIDA, J. E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **PNAS**, v.93, p.12764–7, 1996.

HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; TAKEI, Y. Molecular biology of major components of chloride cells. **Comp. Biochem. Physiol.** v.136, p. 593-620, 2003.

JIANG, W.; LIN, K.; HAVER, D.; QIN, S.; AYRE, G.; SPURLOCK, F.; GAN, J. Wash-off potential of urban use insecticides on concrete surfaces. **Environ Toxicol Chem**, v.29, n.6, p. 1203–8, 2010.

KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantification. **Methods Mol Biol.** v.32, p.9–15, 1994.

LAKSHMAIAH, G. Brain histopathology of the fish *Cyprinus carpio* exposed to lethal concentrations of an organophosphate insecticide phorate. **Brain**, v. 2, n. 5, p. 668-672, 2017.

- LI, H.; YOU, J.; WANG, W.-X. Multi-compartmental toxicokinetic modeling of fipronil in tilapia: Accumulation, biotransformation, and elimination. **J. Hazard. Mat.** v.360, p.420–427, 2018.
- LI, H.; ZHANG, R.; SUN, F.; ZHANG, Y. Evaluation of toxicological responses and promising biomarkers of topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*) exposed to fipronil at environmentally relevant levels. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 24081-24089, 2020.
- LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; CALISI, A.; GIORDANO, M. E.; SCHETTINO, T. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- LUPI, C.; NHACARINI, N. I.; MAZON, A. F.; SÁ, O. R. Avaliação da poluição ambiental através das alterações morfológicas nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilapia) nos córregos Retiro, consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. **Revista Fafibe On Line**. n.3, Bebedouro-SP, 2007.
- LUSKOVA, V.; SVOBODA, M.; KOLAROVA, J. The effects of diazinon on blood plasma biochemistry in carp (*Cyprinus carpio* L). **Acta Vet Brno**, v.71, p.117-123, 2002.
- MDEGELA, R. H.; MOSHA, R. D.; SANDVIK, M.; SKAARE, J. U. Assessment of acetylcholinesterase activity in *Clarias gariepinus* as a biomarker of organophosphate and carbamate exposure. **Ecotoxicology**. v.19, n. 5, p.855–63, 2010.
- MIRON, S, D.; CRESTANI, M.; SHETTINGER, M. R.; MORSCH, V. M.; BALDISSEROTTO, B.; TIerno, M. A.; MORAES, G.; VIEIRA, V. L. P. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 3, p. 398-403, 2005.
- MOJIRI, A.; ANDASHT KAZEROON, R.; GHOLAMI, A. Cross-linked magnetic chitosan/activated biochar for removal of emerging micropollutants from water: Optimization by the artificial neural network. **Water**, v. 11, n. 3, p. 551, 2019.
- MOREIRA, R. A.; ARAÚJO, C. V. M.; PINTO, T. J. S.; SILVA, L. C. M.; GOULART, B. V.; VIANA, N. P.; MONTAGNER, C. C.; FERNANDES, M. N.; ESPINDOLA, E. L. G. Fipronil and 2, 4-D effects on tropical fish: Could avoidance response be explained by changes in swimming behavior and neurotransmission impairments?. **Chemosphere**, v. 263, p. 127972, 2021.
- PAULINO, M. G. **Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleosteo, Prochilodontidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos. UFSCar/UNESP, São Carlos, 2011.
- PAULINO, M. G.; SOUZA, N. E. S.; FERNANDES, M. N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.80, p.6– 13, 2012.
- PEREIRA, V. M.; BORTOLOTO, J. W.; KIST, L. W.; DE AZEVEDO, M. B.; FRITSCH, R.S.; OLIVEIRA, R. L.; PEREIRA, T. C. B.; BONAN, C. D.; VIANNA, M. R.; BOGO, M, R.

Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology*, v.33, p.469–47, 2012.

PERRY, S. F.; GOSS, G. G.; LAURENT, P. The interrelationships between gill chloride cell morphology and ionic uptake in four freshwater teleosts. **Canadian Journal of Zoology**, v. 70, n. 9, p. 1775-1786, 1992.

PISA, L.W.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; DOWNS, C. A.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; McFIELD, M.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; SETTELE, J.; SIMON-DELISO, N.; STARK, J. D.; VAN DER SLUIJS, J. P.; VAN DYCK, H.; WIEMERS, M. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental science and pollution research**, v. 22, p. 68-102, 2015.

QURESHI, I. Z.; BIBI, A.; SHAHID, S.; GHAZANFAR, M. Exposure to sub-acute doses of fipronil and buprofezin in combination or alone induces biochemical, hematological, histopathological and genotoxic damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic toxicology**, v.179, p.103–114, 2016.

SADAUSKAS-HENRIQUE, H. **Aspectos fisioecológicos de *Astyanax fasciatus* e *Pimelodus maculatus* (Teleósteos) do reservatório da UHE de Furnas, MG: avaliação morfofuncional das brânquias e variáveis hematológicas**. Dissertação (Mestrado), 2008.

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**, v. 173, p. 309-317, 2003.

SALDAÑA-SERRANO, M.; ESPINOZA-MORRIBERON, D.; DE-LA-TORRE, G. E.; ÁLVAREZ-BÉJAR, J. O.; LOPEZ, A. Toxicity of fipronil insecticide on the early life stages of *Colossoma macropomum* (gamitana). **International Aquatic Research**, v. 13, n. 4, p. 301, 2021.

SANAHUJA, I.; DALLARÉS, S.; IBARZ, A.; SOLÉ, M. Multi-organ characterisation of B-esterases in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Effects of the insecticide fipronil at two temperatures. **Aquatic Toxicology**, v. 228, p. 105617, 2020.

SANTILLÁN DEIÚ, A.; MIGLIORANZA, K. S. B.; ONDARZA, P. M.; TORRE, F. R. Exposure to environmental concentrations of fipronil induces biochemical changes on a neotropical freshwater fish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 43872-43884, 2021.

SCHÄFER, R. B.; VON DER OHE, P. C.; KÜHNE, R.; SCHÜÜRMAN, G.; LIESS, M. Occurrence and toxicity of 31 organic pollutants in large rivers of north Germany over a decade (1994 to 2004). **Environ Sci Technol**, v.45, p.6167–74, 2011.

STURM, A.; ASSIS, H. S.; HANSEN, P. D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Mari. Environ. Res.**, v. 47, p. 389–398, 1999.

SUVETHA, L.; RAMESH, M.; SARAVANAN, M. Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill Na⁺/K⁺-ATPase activity of a freshwater teleost fish *Cyprinus carpio*. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 29, n. 1, p. 44-49, 2010.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Draft Ecological Risk Assessment for the Registration Review of Fipronil**. Washington, 2020.

UNTERBERG, A. W.; STOVER, J.; KRESS, B.; KIENING, K. L. Edema and brain trauma. **Neuroscience**, v. 129, n. 4, p. 1019-1027, 2004.

VIANA, N. P.; SILVA, L. C. M.; PORTRUNELI, N.; SOARES, M. P.; CARDOSO, I. L.; BONANSEA, R. I.; GOULART, B. V.; MONTAGNER, C. C.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; WUNDERLIN, D. A.; FERNANDES, M. N. 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**, p. 1-14, 2022.

WANG, C.; QIAN, Y.; ZHANG, X.; CHEN, F.; ZHANG, Q.; LI, Z.; ZHAO, M. A metabolomic study of fipronil for the anxiety-like behavior in zebrafish larvae at environmentally relevant levels. **Environmental Pollution**, v. 211, p. 252-258, 2016.

CAPÍTULO 3 – Alterações hematológicas e hepáticas de *Colossoma macropomum* após exposição aguda ao inseticida fipronil.

Resumo

O uso intensificado do inseticida fipronil na agricultura tem causado contaminação dos ecossistemas aquáticos, gerando grandes preocupações quanto a sua toxicidade em organismos não-alvo, especialmente peixes. Este estudo avaliou a toxicidade de concentrações subletais do inseticida fipronil no peixe neotropical *C. macropomum* após exposição aguda de 96 h. Os animais foram divididos (n=10) em três grupos: Controle (livre do contaminante), F40 (concentração de 40 µg L⁻¹) e F160 (concentração de 160 µg L⁻¹) de fipronil. Amostras de sangue, plasma e fígado foram coletadas para as análises de toxicidade. Após a exposição, o número total de eritrócitos (*Red blood cells*-RBC), Hemoglobina (Hb), Hematócrito (Hct), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) diminuíram significativamente, sugerindo quadros anêmicos e disfunção no transporte de oxigênio. Houve redução de modo concentração dependente no número de leucócitos totais, com uma diminuição no percentual de neutrófilos circulantes do grupo F40 em relação ao controle. Entretanto, foi observado um aumento de Leucócitos granulares-PAS positivo (LG-PAS positivo) após exposição. Não houve indução de alterações na frequência de micronúcleos, porém foi observado uma diminuição concentração dependente de Alterações nucleares eritrocitárias (ANEs) com núcleo lobulado, o que expressa o potencial citogenotóxico do inseticida. Os parâmetros plasmáticos de hepatotoxicidade Bilirrubina direta (BD), Bilirrubina total (BT) e Alanina aminotransferase (ALT) indicaram que não houve dano na integridade celular e sistemas biliares. A toxicidade do fipronil induziu lesões no tecido hepático, como alteração da arquitetura hepática em ambos os grupos tratados em relação ao controle e degeneração citoplasmática entre F160 e F40, mas sem comprometimento do órgão. Ocorreu depleção nos níveis de glicogênio hepático conforme aumento da concentração, mantendo a glicose plasmática dentro da normalidade. O Índice hepatossomático (IHS) permaneceu inalterado após exposição ao contaminante. O fipronil não interferiu na capacidade de detoxificação do organismo, considerando a não alteração do complexo enzimático Glutathiona reduzida e Glutathiona-S-Transferase. Em conclusão, a toxicidade do fipronil causa distúrbios nos parâmetros eritrocitários e leucocitários, interferindo no sistema imunológico de *C. macropomum*. Concentrações subletais de fipronil induz alterações de efeitos metabólicos e morfofisiológicos no tecido hepático.

Palavras-chave: Hematologia; hepatotoxicidade; tambaqui; genotoxicidade; metabolismo.

1. Introdução

Os ecossistemas aquáticos são expostos diariamente a uma variedade de agentes químicos, advindos principalmente de atividades agrícolas (Neamat-Allah *et al.*, 2021; Mahmoud *et al.*, 2020). Os inseticidas são substâncias químicas amplamente utilizadas em lavouras com a finalidade de proteger e controlar pragas nas plantações, todavia, não são totalmente específicas (Zaluski *et al.*, 2015), podendo afetar organismos não-alvos, como os peixes (Costa *et al.*, 2008). No ambiente aquático, a toxicidade de pesticidas pode causar mudanças bioquímicas, morfológicas e comportamentais na biota, interferindo, portanto, no equilíbrio biológico, ciclo de vida e cadeia alimentar (Nakagome; Noldin; Resgalla Jr, 2007).

O fipronil é um inseticida frequentemente utilizado na agricultura e apresenta alta eficácia contra pragas, principalmente as resistentes aos organofosforados, carbamatos e piretróides (Hussain *et al.*, 2018; El-Murr *et al.*, 2019). Em insetos, o mecanismo de ação do fipronil consiste em bloquear os canais de cloreto controlados pelo ácido gama-aminobutírico, levando o animal a morte por hiperexcitação neuronal (Ardehshir *et al.*, 2017). Este contaminante apresenta um alto potencial de escoamento e lixiviação para águas superficiais e subterrâneas, tornando-se prejudicialmente tóxico para peixes de água doce, considerando que podem agir em locais não neuronais, gerando disfunções mitocondriais, danos ao DNA e formação de micronúcleos nesses animais (Pisa *et al.*, 2015; Badgujar *et al.*, 2015; Quereshi *et al.*, 2016). Estudos sugerem que o fipronil induz a produção de espécies reativas de oxigênio nas células dos peixes, o que pode causar aumento do estresse oxidativo e dano celular (Ki *et al.*, 2012; Margarido *et al.*, 2013).

Em peixes, o sangue caracteriza-se como um importante indicador de toxicidade, pois permite avaliar as condições de saúde do animal (Fathy *et al.*, 2019). Considerando que as células sanguíneas são uma das primeiras a terem contato e serem afetadas por moléculas tóxicas, os parâmetros hematológicos são importantes indicadores fisiológicos, mostrando-se essenciais na integração das respostas de peixes quando submetidos a um xenobiótico (Sadauskas-Henrique *et al.*, 2011). Além disso, através da avaliação leucocitária é possível verificar a resposta imune do animal diante de interferentes ambientais (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013). Sabendo que os inseticidas podem causar efeitos citogenotóxicos na biota aquática (Anogwih; Makanjuola; Chukwu, 2013; Vera-Candioti; Soloneski; Larramendy, 2015), a análise da frequência de micronúcleos (MN) e alterações nucleares eritrocitárias (ANEs) no sangue são considerados importantes biomarcadores da integridade cromossômica (Hussain *et al.*, 2018).

O fígado é o principal órgão relacionado aos processos de desintoxicação e biotransformação de substâncias tóxicas, e desempenha funções importantes no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios (Tavares *et al.*, 2018). Os hepatócitos são considerados o primeiro alvo de toxicidade, pois recebe por via sanguínea os poluentes absorvidos do ambiente, podendo de acordo com o tipo de substância química, tempo de contato e concentração sofrer alterações em sua funcionalidade normal (Braunbeck *et al.*, 1990). Portruneli *et al.* (2021) relataram que a toxicidade do fipronil causa alterações citológicas, morfológicas e histoquímica nos hepatócitos com processos autofágicos, esteatose e morte celular por necrose.

Diante do avanço da contaminação aquática por substâncias químicas e da grande ameaça que oferecem à organismos não-alvo, este estudo investigou o efeito agudo de concentrações subletais do inseticida fipronil nos parâmetros hematológicos e tecido hepático de *Colossoma macropomum*, utilizando a integração de biomarcadores sanguíneos, morfológicos e de biotransformação. O tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) é uma espécie de alta importância comercial em regiões tropicais, sendo responsável por uma parcela considerável do mercado nacional de pescado. Logo, sua ampla disponibilidade em empreendimentos de aquicultura e sua resistência aos desafios ambientais tornam esse organismo um bom indicador em estudos toxicológicos de contaminação aquática (Campos-baca; Kohler, 2005).

2 Material e métodos

2.1 Peixes

Juvenis de *C. macropomum* (massa corporal = $201,6 \pm 18,2$ g e comprimento total = $22,2 \pm 0,7$ cm) foram fornecidos pelo setor de piscicultura do Instituto Federal do Tocantins – Campus Araguatins, TO, Brasil. Os peixes foram transportados até o Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais, da Universidade Federal do Norte do Tocantins, Centro de Ciências Agrárias em Araguaína, onde foram aclimatados por 30 dias em tanques de 3000 L, com fluxo contínuo de água, fotoperíodo natural (12h luz:12 escuro), parâmetros físico-químicos controlados (temperatura: $26^\circ \pm 2^\circ\text{C}$; OD: $6,2 \pm 2,3$; pH $7,0 \pm 0,1$; amônia: $0,02 \pm 0,0$ ppm) e alimentação diária “*ad libitum*” com ração comercial (40% de proteína).

2.2 Contaminante

A formulação comercial Regent® 800 WG foi utilizada como fonte do princípio ativo fipronil (800 g/kg). Os bioensaios foram baseados em uma concentração estipulada pela *United States Environmental Protection Agency* (EPA), como não prejudicial para peixes, e em valores médios de concentrações ambientalmente relevantes do inseticida disponível no meio aquático (CETESB, 2018; Santillán Deíú *et al.*, 2021).

2.3 Delineamento experimental

Após a aclimação, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos ($n = 10$ em cada grupo) em caixas de 300 L com aeração artificial constante. Os peixes foram expostos a duas concentrações do inseticida fipronil ($F40 = 40 \mu\text{g L}^{-1}$ e $F160 = 160 \mu\text{g L}^{-1}$), de modo agudo (96 h), em sistema estático, com os parâmetros físico-químicos controlados e privados de alimentação durante o teste. Um grupo foi utilizado como controle, mantidos nas mesmas condições que os tratados, porém em água livre do contaminante.

Após a exposição, os animais foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e um 1 mL de sangue foi coletado via punção caudal com seringas heparinizadas para análises dos parâmetros hematológicos, plasmáticos e citogenotóxicos. Após biometria, os peixes foram eutanasiados via secção medular para coleta do fígado. Seguidamente, as amostras de fígado foram pesadas para análise do IHS, lavadas em solução salina (0,9% NaCl) e fixadas em solução de Bouin para análises morfológicas ou congeladas a -80°C para análises bioquímicas.

Esse experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Tocantins (Processo n° 23.101.001.315/22-35).

2.4 Biomarcadores hematológicos

As análises hematológicas foram determinadas seguindo a metodologia de Sadauskas-Henrique *et al.* (2011). O sangue foi utilizado para a determinação de hematócrito (Hct), número total de eritrócitos (RBC) e hemoglobina (Hb). Foram estabelecidos os índices hematimétricos: Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Os tubos capilares foram centrifugados a 12000 g durante 3 minutos na centrífuga de micro hematócrito e sua porcentagem determinada utilizando um cartão padrão específico para leitura. O RBC foi determinado em solução com 10 μ L de sangue diluído em 2 mL de formol citrato, e analisado posteriormente em câmara de Neubauer no microscópio óptico (aumento 400x). A quantificação da concentração de hemoglobina, foi estabelecida com a diluição de 10 μ L de sangue diluído em 2 mL de solução de Drabkin. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540nm.

As distensões sanguíneas foram confeccionadas logo no ato da retirada do sangue e secas em temperatura ambiente, sendo posteriormente fixadas em metanol e coradas com um Kit Panóptico Rápido (Laborclin®). Um total de 5.000 células sanguíneas foram analisadas em microscópio de luz (magnificação 1000x) para determinação do número total de leucócitos e trombócitos totais, assim como para contagem diferencial de leucócitos.

2.5 Teste de micronúcleo (MN) e anomalias nucleares eritrocitárias (ANEs)

Lâminas de extensões sanguíneas foram fixadas e coradas utilizando um kit panótico rápido (Laborclin®). A metodologia seguida foi a de Carrasco, Tilbury, Myers (1990), com adaptações de Cavalcante (2008). A avaliação da presença de micronúcleo foi estabelecida na contagem de 3.000 eritrócitos, em microscópio óptico, no aumento de 1000x. Para definir os micronúcleos, alguns critérios foram estabelecidos, como: ser morfológicamente semelhante ao núcleo principal; ter tamanho em até 1/3 do núcleo; não apresentar refringência e apresentar mesma coloração que o núcleo principal. As principais classificações estabelecidas para ANEs, quanto a sua morfologia foram: núcleo segmentado; reniforme; lobado; entalhado; binucleado e vacuolado.

2.6 Bilirrubina total e Bilirrubina direta plasmática

Amostras sanguíneas foram centrifugadas a uma velocidade de 12000 g a 4°C por 3 minutos, para obtenção do plasma. A quantificação da concentração de bilirrubina total (BT) e bilirrubina direta (BD) foi realizada utilizando um kit Labtest® ref.31, comparados com um

padrão de bilirrubina Labtest® ref. 32. A bilirrubina do plasma é dosada pela diazotização e formação de azobilirrubina vermelha. A BD é dosada em meio aquoso, ao passo que a BT (direta + indireta) é dosada por ação de um solubilizador de ação catalisadora. Para a leitura das absorvâncias das amostras, foi utilizado o espectrofotômetro de microplacas (Asys UVM 340) em $\lambda = 525 \text{ nm}$. Os resultados foram expressos em mg dL^{-1} .

2.7 Alanina-aminotransferase plasmática

Para obtenção do plasma, amostras sanguíneas foram centrifugadas a uma velocidade de 12000 g a 4°C durante 3 minutos. Para a determinação da atividade da alanina-aminotransferase (ALT) ($\text{U mg proteína}^{-1}$) no plasma foram realizadas por meio de um kit comercial Labtest® (ref. 1008 e 109, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. O princípio da técnica baseia-se na catálise da transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD, e a absorvância em 340 nm é diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra.

2.8 Histopatologia do fígado

Amostragens de fígado foram coletadas e fixadas em solução de Bouin, por 48 horas, e posteriormente desidratadas em séries crescentes em etanol (de 70-100%) para preparo das lâminas histológicas. Seguidamente, foram diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica. Cortes teciduais foram preparados em 5 μm de espessura, corados com hematoxilina e eosina e finalizados com Entellan®. Cinco campos amostrais foram aleatoriamente selecionados em 5 seções histológicas, totalizando 25 campos, utilizando microscopia de luz acoplada a uma câmera (aumento 400x) sob análise cega ao observador.

Para análises histopatológicas seguiu a metodologia de Paulino *et al.* (2020). A classificação individual da alteração histopatológica foi baseada em um escore (Sc) e um fator de importância (Fi) na qual mostra o índice de lesão no órgão (I_{alt}). O escore depende da distribuição da lesão no órgão, onde: (0) ausência de lesão; (1) raramente presente; (2) ocorrência leve; (3) moderadamente frequente, (4) grave ocorrência. O Fi indica a severidade da lesão e os efeitos na sobrevivência do animal: (1) lesão totalmente reversível e assim, com pouca relevância patológica; (2) lesão reversível após a remoção do agente estressor e assim, com moderada importância patológica; (3) lesões irreversíveis e com alta importância patológica. O índice de lesão e comprometimento do órgão (I_{org}) foi baseado na somatória do I_{alt} e expresso como média do grupo ($I_{\text{org}} = \Sigma I_{\text{alt}}$).

2.9 Glicose plasmática

Amostras sanguíneas foram centrifugadas a uma velocidade de 12000 g a 4°C durante 3 minutos, para obtenção do plasma. A glicose foi quantificada fotometricamente em extratos neutros ($\lambda = 505$ nm), utilizando um kit comercial Labtest® ref.133 (Glicose Liquiform), seguindo as instruções do fabricante.

2.10 Glicogênio

O glicogênio hepático foi determinado pela concentração de açúcares redutores totais segundo a metodologia de Bidinotto *et al.* (1997). Para esta análise, 50 mg de fígado foram preparados em KOH 6N, e então aquecidos em banho maria a uma temperatura de 100°C por 3 minutos. Em uma alíquota de 250 μ L, foi adicionado 3 mL de etanol P.A e 100 μ L de sulfato de potássio 10% (K_2SO_4). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em 3.000 rpm, por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado através da inversão do tubo e o precipitado foi diluído em 2,5 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de fenol e 2 mL de H_2SO_4 . A leitura foi realizada em espectrofotômetro em $\lambda = 480$ nm, contra um padrão de glicose (1mM) e expressas em μ mol de glicosil-glicose g tecido⁻¹.

2.11 Índice hepatossomático

Para a análise do índice hepatossomático (IHS) seguiu-se a metodologia descrita por Ratton *et al.* (2003), no qual o IHS = [massa do órgão (g) x 100] / massa corpórea (g).

2.12 Glutathiona reduzida e glutathiona-S-transferase do fígado

A atividade da GST (U mg proteína⁻¹) foi determinada de acordo com Habig e Jakobi (1981), usando o CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) como substrato. A absorbância foi monitorada a 340 nm, em um período de 3 minutos com intervalos de 30 segundos. A concentração de GSH (nmol GSH proteína⁻¹) foi definida de acordo com Wilhelm-Filho *et al.* (2005), utilizando o DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) como reagente. A formação do ânion tiolato foi medida a 415 nm. O conteúdo de GSH foi expresso em μ g GSH mg proteína⁻¹ com base em uma curva padrão de GSH.

2.13 Proteína total

O teor da proteína total (mg proteína⁻¹ mL⁻¹), do fígado para as análises de GST, GSH, ALT foi determinado pelo método de Bradford, utilizando coomassie brilliant blue G-250

(BRADFORD, 1976), adaptado para leitura em microplaca (Asys UVM 340) conforme descrito por Kruger (1994) e utilizando a albumina bovina (1 mg mL^{-1}) como padrão. A absorbância das amostras foi medida a 595 nm.

2.14 Análise estatística

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (D'agostino & Pearson) e as diferenças entre o grupo controle e os grupos tratados foram detectadas por análise de variância (ANOVA) One-way, seguido de pós-teste de Bonferroni ($n \geq 8$) e seu correspondente não paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste Dunns. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando software GraphPad Prism 5.0, considerando significância de $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

3. Resultados

Durante a exposição, não houve mortalidade de nenhum dos organismos submetidos às concentrações do fipronil.

3.1 Parâmetros hematológicos e citogenotóxicos

Os valores médios para os parâmetros eritrocitários e leucocitários estão descritos na Tabela 1. A exposição ao inseticida reduziu o percentual do HCT de modo concentração-dependente nos grupos expostos. Houve diminuição na concentração de Hb e contagem de RBC no grupo F160 em relação ao controle e entre tratados. Os índices hematimétricos demonstraram redução do HCM entre os grupos tratados e diminuição do CHCM em F160 em relação ao controle e F40. A análise de leucograma demonstrou diminuição concentração dependente dos leucócitos totais nos grupos expostos. Na contagem diferencial de leucócitos, houve uma diminuição de neutrófilos circulantes e um aumento para LG-PAS positivo no grupo F40 em comparação ao controle.

Tabela 1 - Valores médios (\pm E.P.M.) dos parâmetros hematológicos de tambaqui (*Collossoma macropomum*) após exposição aguda de 96 horas à duas diferentes concentrações do inseticida fipronil. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao controle. (#) Indica diferença ($p < 0,05$) entre tratados.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS			
	Controle	F40 $\mu\text{g L}^{-1}$	F160 $\mu\text{g L}^{-1}$
Parâmetros			
HCT (%)	30,2 \pm 1,0	24,2 \pm 1,9*	16,4 \pm 1,2*#
Hb (g dL)	6,6 \pm 0,2	5,5 \pm 0,4	2,5 \pm 0,2*#
RBC (10^4 células mm^3)	142,4 \pm 9,3	114,2 \pm 14,6	69,3 \pm 6,4*#
Índices hematimétricos			
VCM (μm^3)	218,6 \pm 10,9	224,6 \pm 14,9	231,8 \pm 8,4
HCM (pg célula $^{-1}$)	46,0 \pm 2,7	52,8 \pm 5,1	36,8 \pm 2,6#
CHCM (g dL $^{-1}$)	22,4 \pm 1,2	23,6 \pm 1,8	15,0 \pm 0,5*#
Variáveis leucocitárias			
Leucócitos totais	3,4 \pm 0,4	2,1 \pm 0,3*	1,7 \pm 0,1*
Trombócitos totais	4,0 \pm 0,3	4,5 \pm 0,6	3,3 \pm 0,2
Linfócitos (%)	47,9 \pm 4,7	56,4 \pm 4,1	53,9 \pm 4,0
Monócitos (%)	9,9 \pm 1,7	11,8 \pm 1,7	12,4 \pm 2,2
Eosinófilos (%)	0,2 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2
Neutrófilos (%)	40,1 \pm 3,8	25,8 \pm 2,8*	31,8 \pm 5,0
Basófilos (%)	0,0 \pm 0,0	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
LG – PAS (%)	1,7 \pm 0,3	3,0 \pm 0,7*	1,9 \pm 0,4

A análise da frequência de MN não apresentou alteração significativa entre os grupos. Todavia, em ANEs foi observado diminuição de 21,3% de células lobuladas no grupo F40 e 36,9% em F160 quando comparados ao controle. Para as demais ANEs, não houve alteração (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores médios (\pm E.P.M) dos parâmetros micronucleares e ANEs em eritrócitos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após exposição aguda de 96 horas ao fipronil. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

GENOTOXICIDADE			
Parâmetros	Controle	F40 $\mu\text{g L}^{-1}$	F160 $\mu\text{g L}^{-1}$
Micronúcleo	0,01 \pm 0,00	0,73 \pm 0,46	0,50 \pm 0,22
ANES			
Binucleada (%)	0,09 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02	0,10 \pm 0,05
Reniforme (%)	3,09 \pm 0,28	2,47 \pm 0,13	2,48 \pm 0,20
Segmentada (%)	0,08 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01
Indentada (%)	0,12 \pm 0,02	0,07 \pm 0,02	0,11 \pm 0,01
Lobulado (%)	3,74 \pm 0,27	2,92 \pm 0,19*	2,36 \pm 0,14*
Vacuolada (%)	0,01 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

ANES = Anomalias Nucleares Eritrocitárias.

3.2 Variáveis plasmáticas de hepatotoxicidade

Os biomarcadores plasmáticos estão representados na Tabela 3. Após exposição não houve alteração nas concentrações plasmática BD e BT, todavia, foi observado uma diminuição da atividade da ALT no grupo F160 em relação ao controle.

Tabela 3 - Valores (\pm E.P.M.) dos parâmetros plasmáticos de hepatotoxicidade de *Colossoma macropomum* em 96h após exposição ao inseticida fipronil. ALT – Alanina Aminotransferase; BD – Bilirrubina Direta; BT – Bilirrubina Total. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Grupos	Variáveis		
	ALT nmol min ⁻¹ mg proteína ⁻¹	BD mg dL ⁻¹	BT mg dL ⁻¹
Controle	0,7 \pm 0,2	0,4 \pm 0,0	1,3 \pm 0,2
F40 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,6 \pm 0,0	0,4 \pm 0,1	1,3 \pm 0,4
F160 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,5 \pm 0,0*	0,4 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2

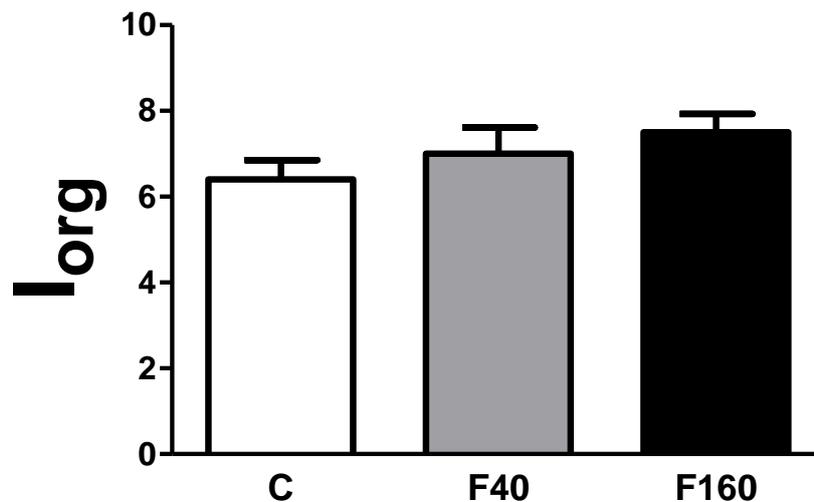
3.3 Análise histopatológica de fígado

Na análise histopatológica do fígado, o I_{alt} demonstrou significância para alteração da arquitetura hepática e degeneração citoplasmática (Tabela 4). O I_{org} demonstrou que não houve comprometimento do tecido hepático entre os grupos expostos (Figura 1).

Tabela 4 – Índice de alteração individual (I_{alt}) no fígado de peixes tambaqui expostos a diferentes concentrações do inseticida fipronil por 96 horas. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao controle. (#) Indica diferença ($p < 0,05$) entre tratados.

Índice de Alteração Individual do Fígado - I_{alt}			
Alteração	Concentração de Fipronil ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	Controle	F40	F160
Acúmulo de substâncias intracelulares	$0,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
Alterações nucleares	$0,2 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,2$
Alteração da arquitetura hepática	$1,6 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2^*$	$2,5 \pm 0,1^*$
Degeneração citoplasmática	$1,8 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,0\#$
Hemorragia intra-hepática	$0,1 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,0$
Hipertrofia dos hepatócitos	$1,0 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
Hiperemia dos sinusoides	$0,5 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$

Figura 1 - Índice de lesão do órgão (I_{org}) em fígado do tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ do fipronil por 96 horas.

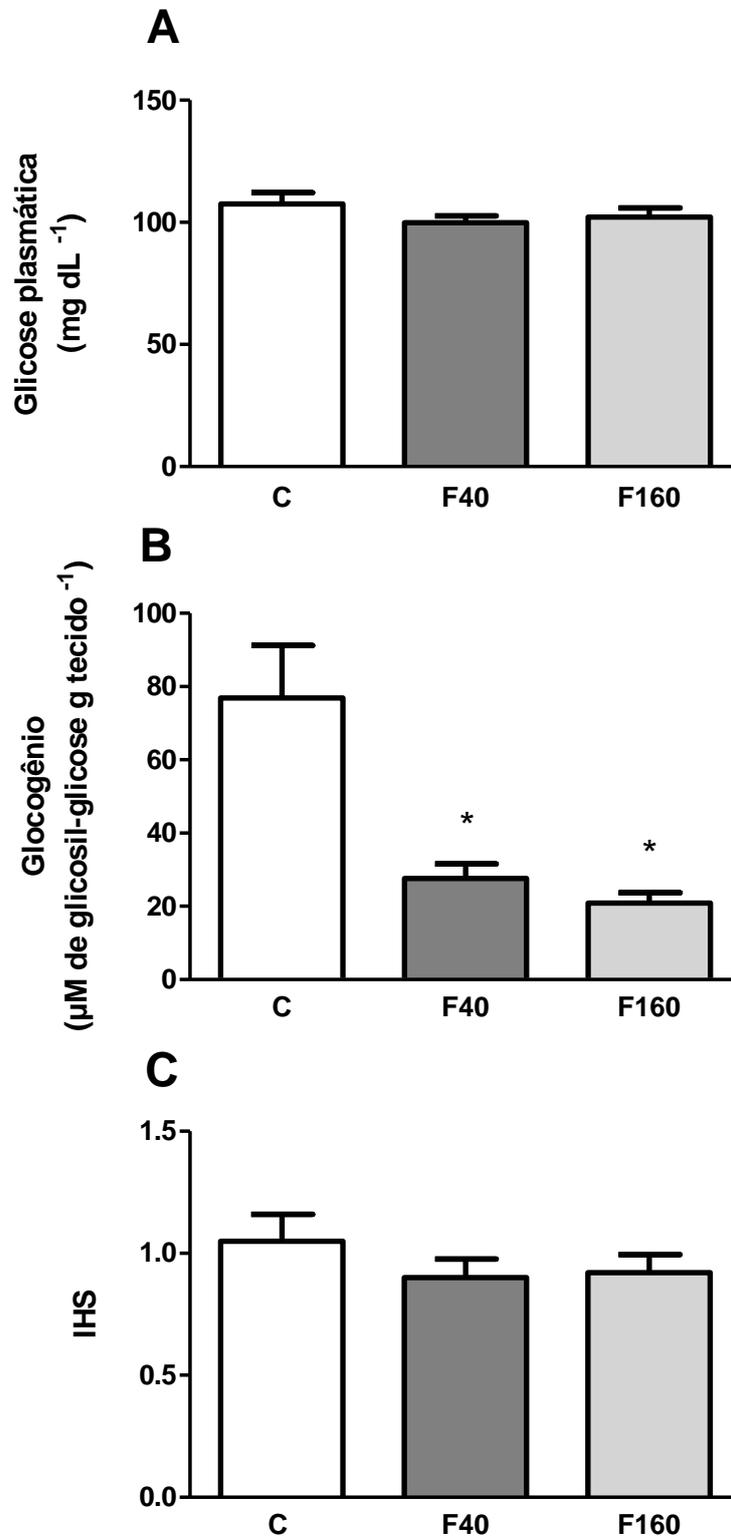


Fonte: autora (2024)

3.4 Glicose, Glicogênio e Índice Hepatosomático

Não houve alteração da glicose plasmática em ambas as concentrações expostas ao fipronil. Após a exposição, os níveis de glicogênio hepático diminuíram de modo concentração-dependente. O IHS não apresentou alteração entre os grupos (Figura 2).

Figura 2 – Valores médios (\pm E.P.M.) de glicose plasmática (A), glicogênio hepático (B) e índice hepatossomático (C) para o tabaqui após exposição aguda às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ do inseticida fipronil. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

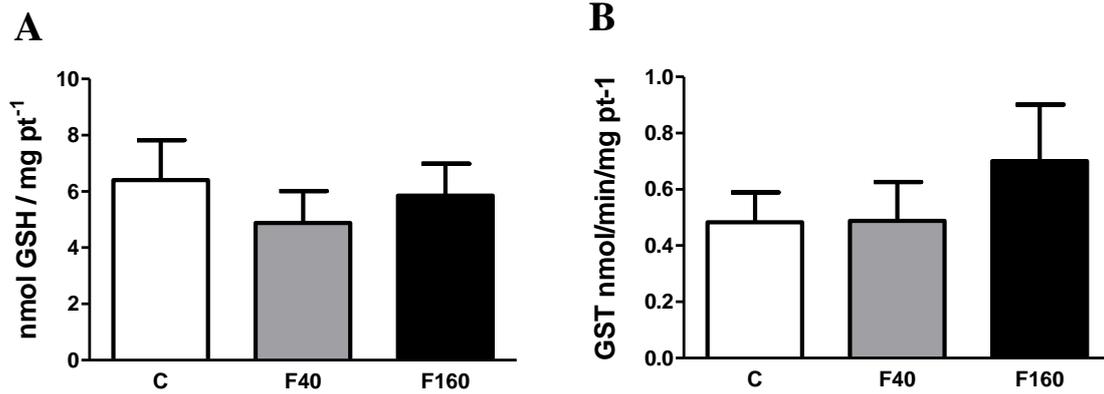


Fonte: autora (2024)

3.5 Sistema de biotransformação (GSH-GST)

A concentração de GSH e atividade da GST não apresentaram alterações após 96 horas de exposição a fipronil, conforme representado na Figura 3.

Figura 3 – Concentração de glutatona reduzida (GSH) (A) e glutatona-s-transferase (B) no fígado de tambaqui expostos às concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ do fipronil por 96 horas.



4. Discussão

O inseticida fipronil demonstrou ser potencialmente tóxico para *C. macropomum* em exposição subletal aguda, induzindo o organismo a realizar ajustes fisiológicos, metabólicos e morfológicos, entendidos como estratégias para manter sua sobrevivência diante das condições adversas impostas.

Neste estudo, a diminuição das variáveis eritrocitárias sugere quadros anêmicos e disfunção no transporte de oxigênio nas células. A diminuição de RBC, Hb e Hct são indicativos de anemia normocítica (Naoum; Naoum, 2008), ao passo que, a redução da HCM e CHCM tem correlação com a deficiência na concentração de hemoglobina na célula e evidenciam que o quadro anêmico também é hipocrômica (Naoum, 2011). Diminuição do RBC, Hb e Hct também foram relatados por Ghaffar et al. (2018) em *Cyprinus carpio* após exposição às concentrações de 0,06; 0,08 e 0,10 mg L⁻¹ de fipronil por 12 dias, demonstrando que o inseticida afeta diretamente os parâmetros eritrocitários de peixes. Uma redução na contagem de RBC, Hb e Hct em peixes, pode estar associado a ocorrência de hemólise, rápida oxidação da hemoglobina em metahemoglobina, destruição de eritrócitos ou estresse oxidativo nos tecidos formadores de sangue (Ghaffar et al., 2018; Gul et al., 2017; Velmurugan et al., 2016; Gupta et al., 2014).

Considerando que os leucócitos são responsáveis pela defesa do organismo, e que utilizam as vias sanguíneas para efetuar o monitoramento e emissão de respostas imunológicas contra infecções e/ou injúria tecidual (Saravanan et al., 2017), a redução no número de leucócitos totais observada neste estudo, sugerem uma diminuição da resposta imune do animal induzida pela ação do fipronil. Sabendo que os neutrófilos apresentam alta sensibilidade a modificações ambientais e emitem respostas contra lesões e inflamações (Havixbeck; Barreda, 2015), a diminuição dessas células após exposição, podem indicar um aumento da sua migração para tecidos lesionados. A leucopenia pode tornar os peixes susceptíveis a infecções e doenças parasitárias ou até causar a morte do animal (Wiik et al., 1989). Semelhante ao estudo, Fredianelli et al. (2019) também relataram diminuição de leucócitos totais em *Rhamdia quelen* após exposição às concentrações de 0,3 e 0,4 mg L⁻¹ de fipronil.

Nos achados deste estudo, nenhuma alteração foi observada na frequência de MN, demonstrando que nas concentrações expostas, o fipronil não causou efeitos clastogênicos. Todavia, não se pode descartar a possibilidade de que a não observância de MN possa estar associada a redução no RBC dos grupos tratados, o que possivelmente dificultou a visualização dessas células, ou atraso na síntese de DNA durante a eritropoiese. Achados semelhantes foram relatados por Fredianelli et al. (2019) após exposição de bagres prateados (*R. quelen*) às concentrações de 0,3 e 0,4 mg L⁻¹ de fipronil. Segundo estes autores, a aplicação do teste de

MN em sangue periférico é particularmente indicada para condições de exposição crônica, logo, uma exposição prolongada é necessária para acumular a substância tóxica no organismo a uma concentração capaz de causar alterações nesse parâmetro.

Sugere-se que a diminuição de ANEs com núcleos lobulados pode estar relacionada a diminuição no número de células eritrocitárias. As alterações no núcleo das células são decorrentes de uma tentativa de controle do ciclo celular e reparo do DNA em uma região do cromossomo afetada, de modo que a membrana nuclear cria imperfeições, dando origem a tais anomalias (Shimizu *et al.* (1998). Estudos sugerem que as alterações eritrocitárias sejam decorrentes do efeito citotóxico do fipronil, resultando em disparidades cromossômicas (Hussain *et al.*, 2012; Ghaffar *et al.*, 2015). Segundo Bolognese e Hayashi (2011) os peixes apresentam resposta citogenotóxicas de exposição a poluentes semelhante à dos mamíferos, o que viabiliza a comparação da avaliação de substâncias potencialmente prejudiciais para os seres humanos, embora menor quantidade de DNA por célula e do baixo índice mitótico na atividade celular dos peixes. Deste modo, havendo alterações em ANEs, sugere-se que a exposição a longo prazo ao fipronil possa levar a danos graves no material genético de *C. macropomum*.

A utilização de biomarcadores plasmáticos tem sido frequentemente empregada para documentar e quantificar tanto a exposição quanto os efeitos causados por poluentes (Winkaler *et al.*, 2001). A bilirrubina é um dos principais pigmentos biliares encontrados nos sistemas circulatórios dos peixes, sendo o produto do catabolismo da hemoglobina (Abouelghar; El-Bermawy; Salman, 2020). Sabendo que os padrões de BD, BT e ALT são indicadores bioquímicos de hepatotoxicidade (Dufour *et al.*, 2001; Ozer *et al.*, 2008), neste estudo, a normalidade desses parâmetros indicam que a toxicidade do fipronil não causou danos hepáticos e não comprometeu a integridade e funcionalidade das células e dos sistemas biliares em *C. macropomum*, integrando os achados histopatológicos do fígado, em que não houve comprometimento da função normal do órgão hepático. As transaminases plasmáticas emitem respostas a vários estressores químicos (Xião *et al.*, 2019). Neste estudo, a diminuição da ALT plasmática evidencia que não houve prejuízos na integridade celular dos peixes expostos ao fipronil. Segundo Ovie *et al.* (2010), poluentes tóxicos afetam a atividade enzimática de peixes, causando distorções nas organelas celulares, o que pode provocar aumento ou diminuição nas atividades enzimáticas desses animais.

O fígado é o primeiro órgão a receber metabólitos e nutrientes, bem como o primeiro a ser exposto a compostos tóxicos (Sreelatha *et al.*, 2009). Embora houvesse presença de alterações individuais no tecido hepático de *C. macropomum*, foi constatada ausência de comprometimento na funcionalidade normal do órgão. O aparecimento das lesões presente nesse estudo pode ser atribuído a ajustes morfofisiológicos no tecido hepático, como alternativa para minimizar os impactos da toxicidade do fipronil no órgão e evitar potenciais danos à sobrevivência do animal. De acordo com Fischer *et al.* (2000), mudanças na alteração da arquitetura hepática, causadas pela perda do formato dos hepatócitos e aumento do espaço intercelular podem refletir a desorganização das proteínas poliméricas, componentes do citoesqueleto celular. Apesar deste estudo não ter observado lesões hepáticas, Qureshi *et al.* (2016) relataram que a toxicidade do fipronil é capaz de induzir hemorragia hepática, hiperplasia e hipertrofia nuclear, congestão tecidual e ruptura do ducto biliar no fígado de *Cyprinus carpio*.

Nos teleósteos, o glicogênio hepático é uma reserva energética prontamente liberada nos primeiros sinais de estresse (Christiansen; Klungsoyr, 1987). O glicogênio hepático é fonte de glicose e auxilia na regulação dos níveis de glicose no sangue (Moon, 1998). Segundo Montanha e Pimpão (2012), em situações de estresse, o perfil glicídico pode sofrer alterações nos organismos expostos. Neste estudo, a diminuição no glicogênio hepático evidencia situações de estresse nos animais tratados com o fipronil, sugerindo metabolização de glicose nas células com consequente demanda energética do glicogênio para manter a glicemia normal do organismo. Considerando que a hipóxia é uma das causas resultantes de depleção do estoque de glicogênio (Cattaneo *et al.*, 2008), sugere-se que a diminuição dessa reserva energética neste estudo, possa estar relacionada a alterações no transporte de oxigênio, evidenciado pela redução da Hb e CHCM nos parâmetros eritrocitários.

O IHS está comumente associado ao estado nutricional e energético dos peixes (Querol *et al.*, 2002), apresentando estreita relação com os níveis de glicogênio nas células hepáticas (Cyrino *et al.*, 2000). Considerando que este estudo demonstrou diminuição no glicogênio hepático e inalteração do IHS, sugere-se que possa ter ocorrido um aumento na osmolalidade celular, resultando em um maior número de partículas em solução, o que não interferiu no peso do órgão. Valores de IHS inalterados indicam que não houve alterações hepáticas graves, resposta que se integra à alteração do I_{org} do fígado. Santillán-Deiú *et al.* (2021) também não observaram alterações no IHS de *P. lineatus* após exposição de 21 dias às concentrações de 0,5 e 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil. Portanto, a utilização de biomarcadores de biotransformação e danos

celulares é um dos métodos frequentemente empregados para avaliar os efeitos tóxicos de contaminantes ambientais em peixes (Bonomo *et al.*, 2021).

O sistema GST-GSH atua na fase II de desintoxicação, realizando a conjugação de metabólitos gerados durante a fase I de biotransformação, excretando da célula o produto resultante sem causar potenciais danos celulares (Van der Oos; Beyer; Vermeulen, 2003). Neste estudo, as concentrações de fipronil não alteraram os níveis de GSH, embora Ghazanfar *et al.* (2018) tenha relatado diminuição no conteúdo de GSH após exposição aguda de *C. carpio* a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil. Portanto, como a GSH pode eliminar espécies reativas de oxigênio (ERO) diretamente (Huang *et al.*, 2015), a não alteração desse parâmetro indica que o inseticida não induziu dano oxidativo severos nos animais expostos. Além disso, a GSH desempenha papel vital no sistema de defesa dos peixes, pois as enzimas GPx e GST dependem dela como substrato (Monteiro; Rantin; Kalinin, 2010). Semelhantes aos resultados desse estudo, Wu *et al.* (2014) relataram que a atividade da GST permaneceu inalterada após exposição de *D. rerio* às concentrações de 0,2; 0,4 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil.

5. Conclusão

Concentrações subletais de fipronil são relativamente tóxicas para *C. macropomum*, induzindo alterações de efeitos fisiológicos e citogenotóxicos em exposição aguda de 96 horas. As alterações nos biomarcadores hematológicos representaram uma resposta compensatória do animal para manter o sangue oxigenado, visando minimizar os riscos à saúde. A toxicidade do fipronil causa ajustes metabólicos e morfofisiológicos no fígado, o que pode estar relacionado a situações de estresse no animal, entretanto, o inseticida não induz comprometimento do órgão e não ativa o sistema de biotransformação de xenobióticos (GSH/GST) em *C. macropomum*. Embora as lesões evidenciadas no tecido hepático sejam reversíveis e de baixa relevância patológica, podem ser regressivas ao longo do tempo e, conseqüentemente, afetar a saúde e sobrevivência do animal.

Referências

- ABOUELGHAR, G. E.; EL-BERMAWY, Z. A.; SALMAN, H. M. S. Oxidative stress, hematological and biochemical alterations induced by sub-acute exposure to fipronil (COACH®) in albino mice and ameliorative effect of selenium plus vitamin E. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 7886-7900, 2020.
- ANOGWIH, J. A.; MAKANJUOLA, W. A.; CHUKWU, L. O. Spinosad induced Cytogenotoxic effects on the mosquito fish, *Poecilia reticulata*. **Journal of Clinical Toxicology**, 2013.
- ARDESHIR, R. A.; ZOLGHARNEIN, H.; MAVAHEDINIA, A.; SALAMAT, N.; ZABIHI, E. Comparison of waterborne and intraperitoneal exposure to fipronil in the Caspian white fish (*Rutilus frisii*) on acute toxicity and histopathology. **Toxicology reports**, v. 4, p. 348-357, 2017.
- BADGUJAR, P.C.; PAWAR, N. N.; CHANDRATRE, G. A.; TELANG, A. G.; SHARMA, A. K. Fipronil induced oxidative stress in kidney and brain of mice: protective effect of vitamin E and vitamin C. **Pesticide biochemistry and physiology**, v.118, p.10–18, 2015.
- BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of fish diseases**, v. 1, p. 3-26, 1991.
- BEDOR, C. N. G.; RAMOS, L. O.; PEREIRA, P. J.; RÊGO, M. A. V.; PAVÃO, A. C.; AUGUSTO, L. G. S. Vulnerability and risk situations related to the use of pesticides in irrigated fruit farming. *Rev Bras Epidemiol*, v.12, p.39-49, 2009.
- BEGGEL, S., WERNER, I., CONNON, R.E., GEIST, J.P., Impacts of the phenylpyrazole insecticide fipronil on larval fish: time-series gene transcription responses in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following short-term exposure. **Sci. Total Environ.** v.426, p.160-165, 2012.
- BIDINOTTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, RH de S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim técnico do CEPTA**, v. 10, n. 1, p. 53-60, 1997.
- BOLOGNESI, Claudia; HAYASHI, Makoto. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205-213, 2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAUNBECK, J. B.; STORCH, V.; BRESCH, H. Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroamine. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.19, p.405-418, 1990.
- CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish Aquat. Sci.** v.47, p.2123-2136, 1990.

CAVALCANTI, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOPIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research**. 655, 41–46, 2008.

CHRISTIANSEN, C.; KLUNGSOYR, L. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.88b, p.701-711, 1987.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química nova**, v. 31, p. 1820-1830, 2008.

CYRINO JEP, PÓRTZ L, MARTINO RCI. Retenção de proteína e energia em juvenis de “Black Bass” *Micropterus Salmoides*. **Sci Agric**, v.57, p.609-616, 2000.

DUFOUR, D. R.; LOTT, J. A.; NOLTE, F. S.; GRETCH, D. R.; KOFF, R.S.; SEEFF, L. B. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. **Clinical chemistry**, v. 46, n. 12, p. 2050-2068, 2000.

EL-MURR, A.; EL HAKIM, Y.A.; NEAMAT-ALLAH, A.N.F.; BAESHEN, M.; ALI, HÁ. Immune-protective, antioxidant and relative genes expression impacts of β -glucan against fipronil toxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Shellf Immunol**, v. 94, p.427–433, 2019.

FATHY, M., MOHAMED, I. A., FARGHAL, A. I. A., TEMERAK, S. A. H., SAYED, A. E.D. H., Hemotoxic effects of some herbicides on juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Environ. Sci. and Pollution Research**, v. 26, p. 30857- 30865, 2019.

FISCHER, W.J.; HITZFELD, B.C.; TENCALLA, F.; ERIKSSON, J.E.; MIKHAILOV, A.; DIETRICH, D.R. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) **Toxicol. Sci.**, v.54, p.365–373, 2000.

GHAFFAR, A.; HUSSAIN, R.; ABBAS, G.; KHAN, R.; AKRAM, K.; LATIF, H.; ALI, S.; BAIG, S.; DU, X.; KHAN, A. Assessment of genotoxic and pathologic potentials of fipronil insecticide in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). **Toxin Reviews**, v. 40, n. 4, p. 1289-1300, 2019.

GUL, S. T.; KHAN, A.; FAROOQ, M.; NIAZ, S.; AHMAD, M.; KHATOON, A.; HUSSAIN, R.; SALEEMI, M. K.; HASSAN, M. F. Effect of sub lethal doses of thiamethoxam (a pesticide) on hemato-biochemical values in cockerels. **Pak Vet J**, v.37, n.2, p.135–138, 2017.

HABIG, W.H., JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione Stransferases. **Methods Enzymol**. 77, 398–405, 1981.

HAVIXBECK, J. J.; BARREDA, D. R. Neutrophil development, migration, and function in teleost fish. **Biology**, v. 4, p. 715–734, 2015.

HORI, T. S. F.; AVILEZ, I. M.; INOUE, L. K.; MORAES, G. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (teleotei: characidae) juveniles. **Comp. Biochem. Physiol.** v.143, p.67 – 72, 2006.

HUANG, B.; FENG, M.; LI, D.; YANG, Y. Antagonistic joint toxicity assessment of two current-use phthalates with waterborne copper in liver of *Carassius auratus* using biochemical biomarkers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 116, p. 107-112, 2015.

HUANG, X., LI, Y., WANG, T., LIU, H., SHI, J., ZHANG, X. Evaluation of the oxidative stress status in zebrafish (*Danio rerio*) liver induced by three typical organic UV filters (BP-4, PABA and PBSA). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 2, p. 651, 2020.

HUSSAIN, B., SULTANA, T., SULTANA, S., MASOUD, M.S., AHMED, Z., MAHBOOB, S. Fish eco-genotoxicology: comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. **Saudi J. Biol. Sci.** v.25, p.393-398, 2018.

HUSSAIN, B., SULTANA, T., SULTANA, S., MASOUD, M.S., AHMED, Z., MAHBOOB, S. Fish eco-genotoxicology: comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. **Saudi J. Biol. Sci.** v.25, p.393-398, 2018.

HUSSAIN, R.; MAHMOOD, F.; KHAN, A.; JAVED, M. T.; REHAN, S.; MEHDI, T. Cellular and biochemical effects induced by atrazine on blood of male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Pestic Biochem Physiol*, v.103, n.1, p.38–42, 2012.

KI, Y. W.; LEE, J. E.; PARK, J. H.; SHIN, I. C.; KOH, H. C. Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to fipronil. **Toxicol. Lett.** v. 211, p.18-28, 2012.

KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantification. **Methods Mol Biol.** v.32, p.9–15, 1994.

MAHMOUD, E.; EL-SAYED, B.M.; MAHSOUB, Y.H.; EL-MURR, A.E.I.; NEAMAT-ALLAH, A.N. F. Effect of *Chlorella vulgaris* enriched diet on growth performance, hemato-immunological responses, antioxidant and transcriptomics profile disorders caused by deltamethrin toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish Shellf Immunol**, v. 102, p.422– 429, 2020.

MARGARIDO, T. C.; FELÍCIO, A. A.; DE CERQUEIRA ROSSA-FERES, D.; DE ALMEIDA, E. A., Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Mar. Environ. Res.** 91, 61e67, 2013.

MILITÃO, G. F. G.; ZIERI, R.; CAMILO, R. Y. Efeito da exposição subletal de Fipronil 800 WG da Nortox por 96 horas e da recuperação de sete dias no perfil glicídico de girinos de *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802). VII Salão de pesquisa e inovação, 2022.

MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes – revisão. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, n. 18, 2012.

MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. N. Inorganic Mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). **Ecotoxicology**, v.19, p.105-123, 2010.

MOON, Thomas W. Glucagon: from hepatic binding to metabolism in teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, n. 1, p. 27-34, 1998.

NAKAGOME, F. K.; NOLDIN, J. A.; RESGALLA JR, C. Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, 2007.

NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. **Hematologia laboratorial eritrócitos**. 2 ed. São José do Rio Preto, SP, 2008.

NAOUM, P.C. Diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas. **RBAC**, v.43, p.160-162, 2011.

NEAMAT-ALLAH, A. N. F; MAHSOUB, Y. H.; MAHMOUD, E. A. The potential benefits of dietary β -glucan against growth retardation, immunosuppression, oxidative stress and expression of related genes and susceptibility to *Aeromonas hydrophila* challenge in *Oreochromis niloticus* induced by herbicide pendimethalin. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 2, p. 518-528, 2021.

OVIE, K.; BEMIGHO, I. R.; GBEMI, O. M. Variations in alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities in African catfish: *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) at different sublethal concentrations of potassium permanganate. **Scientific Research and Essays**, v. 5, n. 12, p. 1501-1505, 2010.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194-205, 2008.

PAULINO, M. G.; ROSSI, P. A.; VENTURINI, F. P.; TAVARES, D.; SOUZA, N. E. S.; SAKURAGUI, M. M.; MORAES, G.; TEREZAN, A. P.; FERNANDES, J. B.; GIANI, A.; FERNANDES, M. N. Hepatotoxicity and metabolic effects of cellular extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi* containing microcystins RR and YR on neotropical fish (*Hoplias malabaricus*). **Chemosphere**, v. 175, p. 431-439, 2017.

PISA, L.W.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; DOWNS, C. A.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; McFIELD, M.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; SETTELE, J.; SIMON-DELISO, N.; STARK, J. D.; VAN DER SLUIJS, J. P.; VAN DYCK, H.; WIEMERS, M. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental science and pollution research**, v. 22, p. 68-102, 2015.

PORTRUNELI, N.; BONANSEA, R. I.; VALDÉS, M. E.; SILVA, L. C. M.; VIANA, N. P.; GOULART, B. V.; SOUZA, I. C.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; MONTAGNER, C. C.; WUNDERLIN, D. A.; FERNANDES, M. N. 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**, v. 240, p. 105987, 2021.

QUEROL, M.V.M.; QUEROL, E.; GOMES, N.N.A. Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae), bacia do rio uruguai médio, Sul do Brasil. **Iheringia, Sér. Zool.**, v.92, p.79-84, 2002.

QURESHI, I. Z.; BIBI, A.; SHAHID, S.; GHAZANFAR, M. Exposure to sub-acute doses of fipronil and buprofezin in combination or alone induces biochemical, hematological,

histopathological and genotoxic damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic toxicology**, v. 179, p. 103-114, 2016.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá: Eduem, 2013.

RATTON, F.T.; BAZZOLI, N.; SANTOS, B.G. Reproductive biology of *Apareiodon affinis* (Pisces: Parodontidae) in the Furnas reservoirs, Minas Gerais, **Braz. J. Appl. Ichthyol.**, v.19, p.387–390. 2003.

SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; SAKURAGUI, M. M.; PAULINO, M. G.; FERNANDES, M, N. Using condition factor and blood variable biomarkers in fish to assess water quality. **Environ Monit Assess**. São Carlos, 2011.

SANTILLÁN DEIÚ, A.; MIGLIORANZA, K. S. B.; ONDARZA, P. M.; TORRE, F. R. Exposure to environmental concentrations of fipronil induces biochemical changes on a neotropical freshwater fish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 43872-43884, 2021.

SARAVANAN, M.; KIM, J. Y.; HUR, K. J.; RAMESH, M.; HUR, J. R. Responses of the freshwater fish *Cyprinus carpio* to different concentrations of butachlor and oxadiazon. **Biocatal Agric Biotech**. v.11, p.275–281, 2017.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase, **J. Cell Biol**. v.140, p.1307–1320, 1998.

SREELATHA, S.; PADMA, P. R.; UMADEVI, M. Protective effects of *Coriandrum sativum* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n.4, p.702-708, 2009.

TAVARES, D.; PAULINO, M. G.; TEREZAN, A. P.; FERNANDES, J. B.; GIANI, A.; FERNANDES, M. N. Biochemical and morphological biomarkers of the liver damage in the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*, injected with crude extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi*. **Environ. Sci. Pollut. Res**. 25, 15349-15356, 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Draft Ecological Risk Assessment for the Registration Review of Fipronil**. Washington, 2020.

VAN DER OOS, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. **Environ. Toxicol. Pharmacol**. v.13, p.57–149, 2003.

VELMURUGAN, B.; CENGIZ, E. I.; SENTHILKUMAAR, P.; UYSAL, E.; SATAR, A. Hematological parameters of freshwater fish *Anabas testudineus* after sublethal exposure to Cypermethrin. **Environ Pollut Prot**, v.1, n. 1, p.32–39, 2016.

VERA-CANDIOTI, J.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Pirimicarb-based formulation-induced genotoxicity and cytotoxicity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae). **Toxicology and Industrial Health**, v. 31, n. 11, p. 1051-1060, 2015.

- WIIK, R.; ANDERSEN, K.; UGLENES, I.; EGIDIUS, E. Cortisol-induced increase in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar*, to *Vibrio salmonicida*, together with effects on the blood cell pattern. **Aquaculture**. 83, 201–215, 1989.
- WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; ZANIBONIFILHO, E.; PEDROSA, R. C. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*, v.244, p.349-357, 2005.
- WINKALER, E. U.; SILVA, A. G.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Maringá*. v.23, p.507-514, 2001.
- WU, H.; GAO, C.; GUO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; MA, E. Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 115, p. 9-14, 2014.
- XIAO, W.; ZOU, Z.; LI, D.; ZHU, J.; YUE, Y.; YANG, H. Effect of dietary phenylalanine level on growth performance, body composition, and biochemical parameters in plasma of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*. **Journal of the world Aquaculture Society**, v. 51, n. 2, p. 437-451, 2020.
- ZALUSKI, R., KADRI, S.M., ALONSO, D.P., MARTINS RIBOLLA, P.E., DE OLIVEIRA ORSI, R., Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. **Environ.Toxicol. Chem.** v.34, n.5, p. 1062–1069, 2015.