

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**THIAGO RAMOS FREITAS**

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ROUNDUP® E AO FIPRONIL EM  
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)**

**LAGES**

**2020**

**THIAGO RAMOS FREITAS**

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ROUNDUP® E AO FIPRONIL EM  
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: profa. Dra. Indianara Fernanda Barcarolli

LAGES  
2020

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Freitas, Thiago Ramos  
Efeitos da exposição ao Roundup® e ao Fipronil em  
biomarcadores bioquímicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus,  
1758) / Thiago Ramos Freitas. -- 2020.  
47 p.

Orientador: Indianara Fernanda Barcarolli  
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Lages, 2020.

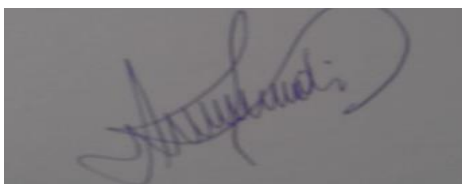
1. Ecotoxicologia. 2. *Oreochromis niloticus*. 3. Biomarcadores.  
4. Roundup®. 5. Fipronil. I. Barcarolli, Indianara Fernanda. II.  
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Ambientais. III. Título.

**THIAGO RAMOS FREITAS**

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ROUNDUP® E AO FIPRONIL EM  
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais.

**BANCA EXAMINADORA**



(Profa. Dra. Indianara Fernanda Barcarolli)  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membros:



(Profa. Dra. Mari Lucia Campos)  
Universidade do Estado de Santa Catarina



(Profa. Dra. Ariane Andreola)  
Centro Universitário Unifacvest

Lages, 22 de julho de 2020.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ricardo e Rosiane, e à minha avó, Jalma, por terem me educado e me ensinado seus valores e princípios; por me amarem incondicionalmente, e por não medirem esforços para que eu realizasse todos os meus sonhos.

Ao Matheus, por todo o apoio e incentivo, seja na confecção deste trabalho, como também na presença cotidiana.

À minha orientadora, profa. Indianara Barcarolli, pela orientação, paciência e auxílio ao longo desta importante etapa da minha vida.

Às professoras Mari Lúcia Campos e Ariane Andreola, por aceitarem fazer parte da banca, e pelos ensinamentos adquiridos ao longo da graduação que me levaram a cursar um mestrado.

Aos professores Everton e Josiane, pelas sugestões apontadas na banca de defesa de qualificação da presente pesquisa.

À Paula, pelo apoio e incentivo.

À Patrícia, ao Paulo e à Karina, meus colegas de laboratório, por me auxiliarem na condução dos experimentos.

À Universidade do Estado de Santa Catarina e à CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa.

Ao Jackson, da secretaria de pós-graduação, pela celeridade e elevado grau de competência com que sempre me atendeu.

Aos peixes.

Este trabalho é dedicado a todos os animais que perderam a vida em prol do avanço científico.

“[...] É indispensável trabalhar, pois um mundo de criaturas passivas seria também triste e sem beleza. Precisamos, entretanto, dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, e ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu.”

Erico Verissimo em Olhai Os Lírios do Campo

## RESUMO

Visando garantir maior produtividade, os defensivos agrícolas são amplamente utilizados nas lavouras brasileiras, destacando-se, neste sentido, o Roundup® (formulação comercial do herbicida glifosato), e o fipronil (inseticida de amplo espectro e de toxicidade seletiva). Todavia, devido aos mecanismos naturais de transporte entre os diferentes compartimentos ambientais sua presença é registrada também nos corpos hídricos. Desta forma, tencionando elucidar a relação dose-efeito em nível bioquímico-celular os testes de toxicidade, avaliados em organismos-teste, tais como peixes, surgem como ferramenta eficaz na adoção de políticas de prevenção desenvolvidas no controle de riscos ambientais e na melhoria das condições do meio ambiente. Baseado nestas premissas, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos do Roundup® e do fipronil em biomarcadores bioquímicos tais como as enzimas catalase (CAT), glutationa s-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE) em diferentes tecidos de *Oreochromis niloticus*. Para tal, os animais foram submetidos a um período de aclimação de 30 dias, para posterior exposição às doses de Roundup® (controle; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>) e de fipronil (controle; 0,01; 0,03; 0,05; 0,1 mg L<sup>-1</sup>). Os ensaios foram executados em triplicata e após 96 horas do início do teste os animais foram eutanasiados e os tecidos do cérebro, brânquias e fígado foram coletados e armazenados para posterior leitura de acordo com protocolos específicos em espectrofotômetro de emissão ultravioleta. Os dados da cinética enzimática foram submetidos aos testes de Levene e de Shapiro-wilk, a fim de verificar a homogeneidade das variâncias. Quando atendido este pressuposto optou-se pelo emprego de análises de variâncias (*Two-way* ANOVA) comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Do contrário, quando observada heterocedasticidade, foram empregados os testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ), com valor-p corrigido pelo método de Bonferroni. Os resultados obtidos mostraram que as doses de 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>, para o Roundup®, foram capazes de provocar efeito na cinética das enzimas CAT e GST no fígado dos organismos. Todavia, em análise para as mesmas enzimas nas brânquias, bem como para a AChE no cérebro, não foram constatadas alterações. O fipronil, por sua vez, nas doses testadas, não apresentou efeito sobre a CAT e a GST para as avaliações no fígado e nas brânquias, contudo, fora capaz de reduzir significativamente a atividade da AChE no cérebro dos indivíduos expostos à dose de 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Desta forma, os resultados do presente estudo sugerem que, ainda que em baixas concentrações, a exposição dos animais a ambos os compostos fora capaz de alterar mecanismos enzimáticos essenciais à sua sobrevivência no meio. Por fim, verificadas as diferentes respostas enzimáticas ante a presença do Roundup® e do fipronil, em função do tecido avaliado e do tempo de exposição, denota-se a necessidade da execução de ensaios que busquem avaliar outras enzimas envolvidas na regulação metabólica de *O. niloticus*, bem como da avaliação histológica dos tecidos do fígado, das brânquias e do cérebro, a fim de melhor compreender os efeitos adversos aqui observados.

**Palavras-chave:** Ecotoxicologia. *Oreochromis niloticus*. Biomarcadores. Roundup®. Fipronil.



## ABSTRACT

To ensure greater productivity, agricultural pesticides are widely used on Brazilian crops, with Roundup® (a commercial formulation of glyphosate herbicide) and fipronil (a selective toxicity insecticide) standing out. However, due to the natural mechanisms of transport between the different environmental compartments its presence is also registered in water bodies. Thus, aiming to elucidate the dose-effect relationship at the biochemical-cellular level, the toxicity tests, evaluated in test-organisms such as fish, appear as an effective tool in the adoption of prevention policies developed to control environmental risks and improve environmental conditions. Based on these premises, this study aimed to evaluate the effects of Roundup® and fipronil on biochemical biomarkers, such as the enzymes catalase (CAT), glutathione s-transferase (GST), and acetylcholinesterase (AChE), in different tissues of *Oreochromis niloticus*. For this, the animals underwent a 30-day acclimatization period for subsequent exposure to Roundup® (control; 0.1; 0.5; 1.0 and 2.0 mg L<sup>-1</sup>) and fipronil (control; 0.01; 0.03; 0.05; 0.1 mg L<sup>-1</sup>) doses. The tests were performed in triplicate and after 96 hours the animals were euthanized and the brain, gills, and liver tissues were collected and stored for later reading according to specific protocols in an ultraviolet emission spectrophotometer. The data of enzyme kinetics were submitted to Levene and Shapiro-Wilk tests to verify the homogeneity of variances. And, when this assumption was met, the use of variance analysis (*Two-way* ANOVA) compared by Tukey's test ( $p < 0.05$ ) was chosen. Otherwise, when heteroscedasticity was observed, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ( $p < 0.05$ ) were used, with p-value corrected by the Bonferroni method. The results obtained showed that the doses of 1.0 and 2.0 mg L<sup>-1</sup>, for Roundup®, were able to cause effects on the kinetics of the CAT and GST enzymes in the liver of the organisms. However, in analysis for the same enzymes in the gills, as well as for the AChE in the brain, no changes were found. Fipronil, on the other hand, had no effect on the CAT and GST in the evaluations of the liver and gills at the doses tested; however, it had been able to significantly reduce the activity of AChE in the brain of individuals exposed to the 0.1 mg L<sup>-1</sup> dose. The results of the present study suggest that, even at low concentrations, the exposure of animals to both compounds was capable of altering enzymatic mechanisms essentials to their survival. Finally, due to the different enzymatic responses to Roundup® and fipronil verified, depending on the tissue evaluated and the time of exposure, it is necessary to perform tests to evaluate other enzymes involved in the metabolic regulation of *O. niloticus*, as well as histological evaluation of liver, gills and brain tissues, to better understand the adverse effects observed here.

**Key-words:** Ecotoxicology. *Oreochromis niloticus*. Biomarkers. Roundup®. Fipronil.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Inter-relações representadas pelo tetraedro.....	13
Figura 2 - Estrutura molecular do glifosato.....	14
Figura 3 - Estrutura molecular do fipronil.....	16
Figura 4 - O teleósteo tilápia-do-Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ). .....	18
Figura 5 - Bioensaio agudo de toxicidade. ....	21
Figura 6 - Atividade da catalase no fígado dos organismos expostos ao Roundup®. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.....	26
Figura 7 - Atividade da glutathione s-transferase no fígado dos organismos expostos ao Roundup®. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.....	27
Figura 8 - Atividade da catalase nas brânquias dos organismos expostos ao Roundup®. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. ....	29
Figura 9 - Atividade da glutathione s-transferase nas brânquias dos organismos expostos ao Roundup®. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.....	29
Figura 10 - Atividade da acetilcolinesterase no cérebro dos organismos expostos ao Roundup®. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.....	31
Figura 11 - Atividade da catalase no fígado dos organismos expostos ao fipronil. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. ....	33
Figura 12 - Atividade da glutathione s-transferase no fígado dos organismos expostos ao fipronil. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.....	33
Figura 13 - Atividade da catalase nas brânquias dos organismos expostos ao fipronil. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. ....	35
Figura 14 - Atividade da glutathione s-transferase nas brânquias dos organismos expostos ao fipronil. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. ....	35
Figura 15 - Atividade da acetilcolinesterase no cérebro dos organismos expostos ao fipronil. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. ....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de qualidade de água. ....	20
Tabela 2 - Doses avaliadas para cada analito. ....	21

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AC</b>	Anidrase carbônica
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterase
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CAV</b>	Centro de Ciências Agroveterinárias
<b>CDNB</b>	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
<b>CEUA</b>	Comissão de ética no uso de animais
<b>CL<sub>50;96h</sub></b>	Concentração letal
<b>CTR</b>	Tratamento controle
<b>DTNB</b>	5-tio-2-nitrobenzoato
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GluCl</b>	Glutamato-cloro
<b>GPx</b>	Glutathione peroxidase
<b>GSH</b>	Glutathione reduzida
<b>GST</b>	Glutathione s-transferase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>LABTOX</b>	Laboratório de Toxicologia Ambiental
<b>OD</b>	Oxigênio dissolvido
<b>OH·</b>	Radical hidroxila
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>T1</b>	Tratamento 1 (0,1 mg L <sup>-1</sup> para Roundup®; 0,01 mg L <sup>-1</sup> para fipronil)
<b>T2</b>	Tratamento 2 (0,5 mg L <sup>-1</sup> para Roundup®; 0,03 mg L <sup>-1</sup> para fipronil)
<b>T3</b>	Tratamento 3 (1,0 mg L <sup>-1</sup> para Roundup®; 0,05 mg L <sup>-1</sup> para fipronil)
<b>T4</b>	Tratamento 4 (2,0 mg L <sup>-1</sup> para Roundup®; 0,1 mg L <sup>-1</sup> para fipronil)
<b>TGO</b>	Transaminase glutâmico-oxalacética
<b>TGP</b>	Transaminase glutâmico-pirúvica
<b>Udesc</b>	Universidade do Estado de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 OBJETIVO GERAL .....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
3.1 ACLIMATAÇÃO DOS PEIXES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS .....	20
3.2 BIOENSAIOS .....	21
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	22
3.3.1 Catalase .....	22
3.3.2 Glutathione s-transferase .....	22
3.3.3 Acetilcolinesterase .....	23
3.3.4 Proteínas totais .....	23
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	24
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
4.1 INFLUÊNCIA DO ROUNDUP® NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	25
4.1.1 Fígado .....	25
4.1.2 Brânquias .....	28
4.1.3 Cérebro .....	30
4.2 INFLUÊNCIA DO FIPRONIL NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	31
4.2.1 Fígado .....	31
4.2.2 Brânquias .....	34
4.2.3 Cérebro .....	36
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	38
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	39

## 1 INTRODUÇÃO

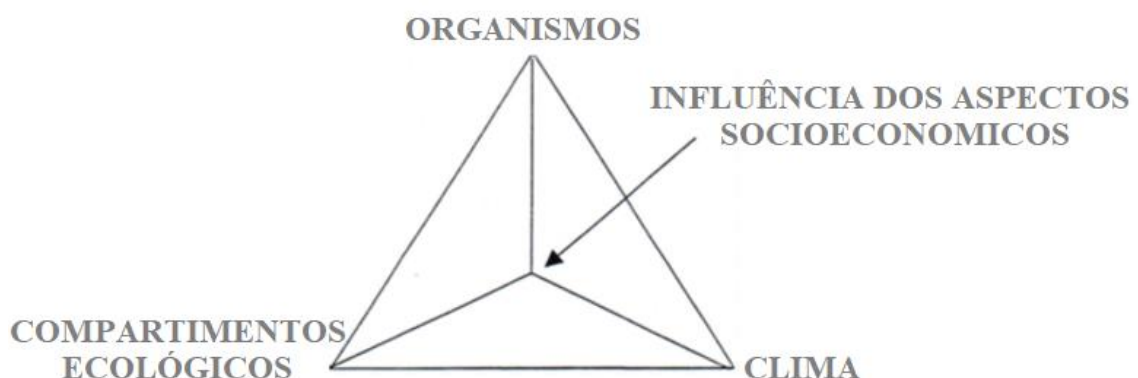
À medida que a humanidade, para suprir suas necessidades e desejos crescentes, desenvolve-se, constata-se um aumento expressivo das pressões sobre os biomas e ecossistemas, o que, quando associado ao crescimento populacional desordenado e à carência de políticas e práticas de conservação dos recursos naturais, resulta na deterioração das características primigênicas do meio.

Essa deterioração, conforme posto por Resende *et al.* (2007), intensifica o processo de poluição, isto pois os diferentes compartimentos terrestres figuram como receptáculos finais de detritos e de resíduos não tratados, oriundos das atividades antrópicas.

Braga *et al.* (2002), definem poluição como sendo qualquer modificação nas características físicas, químicas e/ou biológicas da atmosfera, litosfera ou hidrosfera, provocadas pelas atividades e intervenções humanas, capazes de resultar em dano à sobrevivência ou às atividades dos seres humanos e demais espécies.

Desta forma, entendendo que a poluição é uma condição do entorno dos seres vivos que lhes possa ser danosa, infere-se que o meio formado pelo ambiente natural e pelo desenvolvimento humano existe como um ente dinâmico, que gera um conjunto de efeitos interligados (Figura 1), e que sem controle pode levar ao caos (DESÍRIO, 2007; RESENDE *et al.*, 2007; TUCCI, 2008).

Figura 1 - Inter-relações representadas pelo tetraedro.



Fonte: Adaptado de Resende *et al.*, 2007.

Considerando, deste modo, esta relação dinâmica, pode-se afirmar que a qualidade dos ecossistemas aquáticos tem sido alterada em diferentes escalas nas últimas décadas devido à complexidade dos usos múltiplos da água pelo ser humano, associada à ineficaz gestão dos

recursos hídricos, e pelo lançamento de efluentes não tratados nos rios, lagos e oceanos (PEREIRA, 2004).

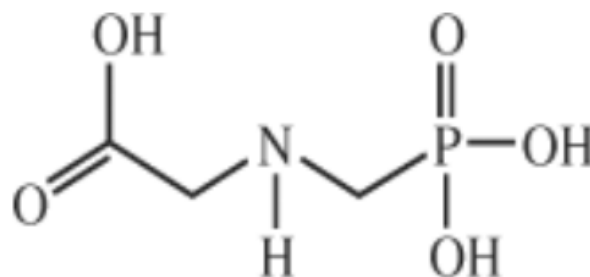
Num sentido relativo à depleção das propriedades qualitativas dos recursos hídricos, destaca-se também, o manejo inadequado dos sistemas agrícolas, isto pois a aplicação indiscriminada de defensivos e de fertilizantes, que quando transportados aos corpos hídricos - seja pela erosão do solo, por difusão (quando suspensos na forma de aerossóis), ou, ainda, quando percolam até níveis freáticos - gera interferências de diferentes magnitudes não somente às relações tróficas, mas também à interação organismo-meio (DERÍSIO, 2007; BAIRD & CANN, 2011).

Diversos são os defensivos que, visando o incremento da produção agrícola, são utilizados no controle de pragas, sendo que duas destas moléculas ganham destaque nas lavouras brasileiras: o glifosato, um herbicida fosfonato, estruturalmente similar aos compostos organofosforados (BAIRD & CANN, 2011); e o fipronil, um inseticida de amplo espectro e de toxicidade seletiva, pertencente ao grupo dos fenilpirazóis (BARETTO *et al.*, 2020).

O glifosato (N - (fosfometil)glicina), que apresenta fórmula molecular  $C_3H_8NO_5P$  (Figura 2), é um herbicida não-seletivo, pertencente ao grupo químico das glicinas, amplamente empregado no controle de uma extensa variedade de ervas devido à sua capacidade em agir como inibidor de enzimas essenciais à síntese de aminoácidos, como a fenilalanina, o triptofano e a tirosina. (RODRIGUES, 2008; ARMILIATO *et al.*, 2014).

É considerado um herbicida de baixa toxicidade, todavia, algumas formulações comerciais, sendo a mais comumente utilizada no Brasil, o Roundup®, apresentam em sua composição surfactantes, como as etilaminas, significativamente mais tóxicas que o próprio glifosato, cuja finalidade é a de potencializar a ação do produto, permitindo uma distribuição homogênea e completa do herbicida sobre a superfície foliar (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2001; LANGIANO & MARTINEZ, 2008; ALMEIDA; RODRIGUES; IMPERADOR, 2019).

Figura 2 - Estrutura molecular do glifosato.



A presença do Roundup® nos ecossistemas aquáticos, conforme posto anteriormente, é consequência dos processos de transporte entre compartimentos ambientais, destacando-se, neste sentido, o transporte através do escoamento superficial e da lixiviação do solo (QUEIROZ *et al.*, 2011). Sua elevada solubilidade em água, e sua meia vida de aproximadamente duas semanas, tornam-no biodisponível para uma extensa parcela da cadeia trófica (ARMILIATO *et al.*, 2014), o que resulta, por vezes, em danos à biota; isto pois, conforme posto por Lopes, Sandrini & Souza (2018), o Roundup® age como desregulador endócrino em algumas espécies de peixes, interferindo na síntese de hormônios essenciais ao bom funcionamento orgânico.

O fipronil (5 - amino - 1 - [2,6 - dicloro -  $\alpha$  -  $\alpha$  -  $\alpha$  - trifluor - p - totil) 4 - trifluorometilsulfinil - pirazol - 3 - carbonitrila), de fórmula molecular  $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$  (Figura 3), é um inseticida extremamente ativo pertencente ao grupo químico fenilpirazol, que age como um bloqueador não competitivo dos canais de cloro dos neurônios no sistema nervoso central (SNC) controlados pelo ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (ZHAO *et al.*, 2004).

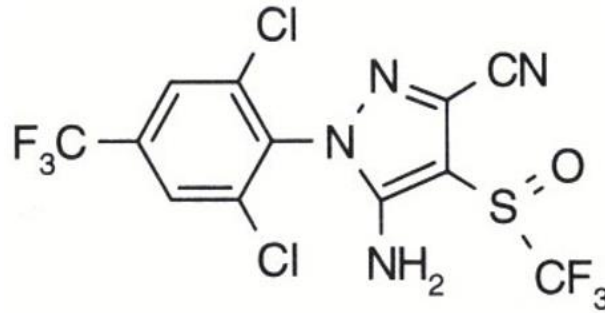
Tem o seu emprego associado ao controle de pragas em plantações de soja, cana-de-açúcar, algodão, arroz, batata, cevada, feijão, milho, trigo e também em pastagens (MEDEIROS *et al.*, 2015). Na medicina veterinária, é utilizado no controle de infestações por ectoparasitas em cães, gatos e bovinos (COELHO *et al.*, 2015).

É considerado um defensivo de ação seletiva, isto pois apesar de causar interferência na atividade do GABA, neurotransmissor presente em vertebrados e invertebrados, o fipronil apresenta também capacidade de inibição potencial dos canais de glutamato-cloro (GluCl), que estão presentes em invertebrados, mas não em mamíferos; o que resulta em efeitos proeminentes em artrópodes (ZHAO *et al.*, 2004).

Seus efeitos são relatados como alterações de níveis séricos de compostos orgânicos e inorgânicos, tais como colesterol, cálcio, proteínas totais e hormônios tireoidianos, e sua ação no SNC leva à hiperexcitação neuronal e à distonia muscular, o que culmina, por vezes, na morte dos organismos expostos (CHAGURI *et al.*, 2015; MEDEIROS *et al.*, 2015; BARRETTO *et al.*, 2020).



Figura 3 - Estrutura molecular do fipronil.



Fonte: Martins, 2009.

Todavia, apesar da sua seletividade para invertebrados, e devido a sua ampla utilização na agricultura e na medicina veterinária, o fipronil, representa potencial risco a organismos não-alvo (MARTINS, 2009), isto porque é capaz de alterar uma série de mecanismos metabólicos associados à síntese de carboidratos e de aminoácidos, através da inibição das funções mitocondriais em mamíferos e peixes (MANRIQUE & MACHADO NETO, 2008; RAMSDORF, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2015).

Assim, tendo em vista a possibilidade de se prevenir ou minimizar a incidência de mortes ou doenças decorrentes da interação das substâncias químicas com o organismo humano, a adoção de políticas de prevenção, desenvolvidas no controle de riscos ambientais e na melhoria das condições do meio ambiente ocorre atrelada ao estudo científico dos efeitos adversos causados aos organismos vivos pelas substâncias químicas liberadas no ambiente, denominado ecotoxicologia (AZEVEDO & CHASIN, 2003); que tem entre seus objetivos avaliar a relação dose-efeito em nível bioquímico-celular, através de ensaios de toxicidade sobre espécies-chave, bem como promover a coleta e análise concomitante de dados químicos, a fim de determinar a correlação entre exposição e efeito (AMORIM, 2003; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Neste sentido, o emprego de biomarcadores – definidos por Oost, Beyer e Vermeulen (2003), como sendo quaisquer medições capazes de refletir mudanças em uma resposta biológica, seja esta fisiológica, celular ou comportamental, relacionadas com a exposição a um agente químico, físico ou biológico – ocorre como ferramenta imprescindível no processo de avaliação toxicológica.

Acresce-se, conforme posto por Amorim (2003), que é desejável que o biomarcador apresente como característica essencial conhecida e apropriada sensibilidade e especificidade com a substância química avaliada; estando também contido em um meio biológico acessível, para que assim a avaliação seja, de fato, efetiva.

Segundo Silva *et al.* (2014) destacam-se entre os biomarcadores bioquímicos mais utilizados em estudos ambientais aqueles relacionados à biotransformação de compostos químicos, como as enzimas catalase (CAT) e glutathione s-transferase (GST). Outrossim, Han *et al.* (2019), apontam que o emprego da enzima acetilcolinesterase (AChE) constitui uma ferramenta promissora em estudos de avaliação da influência de poluentes no SNC.

A catalase, também denominada hidropoxidase, é uma enzima da classe das oxirredutases, presente principalmente nos peroxissomas celulares, que desempenha função primacial no processo de proteção da célula contra a oxidação devido à formação de produtos de reações secundárias do oxigênio (KIM *et al.*, 2019), sendo a principal via de degradação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) na grande maioria dos organismos. Tem a sua importância associada à manutenção das funções orgânicas pois, caso não seja degradado, por meio das reações de Fenton e de Haber-Weiss, mediante a participação dos íons ferro e cobre, o  $H_2O_2$  é convertido no radical OH, que é capaz de gerar danos irreversíveis, devido à sua alta reatividade, às membranas celulares (BARBOSA *et al.*, 2010)

A glutathione s-transferase é uma enzima encontrada intracelularmente em altas concentrações em todos os organismos aeróbicos (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008), que integra um mecanismo de resposta adaptativa aos danos causados por compostos químicos, possuindo papel central no processo de conversão e eliminação de xenobióticos, e na defesa celular contra o estresse oxidativo: pelo sequestro e transporte de compostos hidrofóbicos endógenos como hormônios, esteroides, bilirrubinas, ácidos da bile e produtos do estresse oxidativo (HAYES & PULFORD, 1995; FREITAS; VAZ JUNIOR; MASUDA, 2008).

A acetilcolinesterase (AChE), por sua vez, é uma enzima encontrada em todos os animais com células nervosas e tecidos musculares, sendo responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em acetato e colina (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016). É amplamente distribuída por todo o cérebro, particularmente nas regiões do córtex cerebral e hipocampo, estando os neurônios colinérgicos intimamente relacionados com importantes funções, tais como o controle motor, o aprendizado e a memória (MOTA *et al.*, 2012). A inativação e/ou inibição da AChE ocorre no interior do sítio ativo e provoca a perda do controle muscular, convulsões e, nos mamíferos, morte pelo colapso do SNC (PETRONILHO; PINTO; VILLAR, 2011).

É claro, portanto, que a deficiência do mecanismo de ação destas enzimas, ocasionada pela presença de agentes tóxicos, bem como a intensificação da atividade metabólica, quando avaliadas em espécies-alvo, como em peixes e crustáceos, resulta em efeitos mensuráveis

factíveis em expressar a qualidade dos ecossistemas e a relação dose-efeito dos poluentes sobre a saúde humana (LUNARDELI *et al.*, 2018; CARMO *et al.*, 2019).

Nesta senda, por ser o peixe de água doce mais cultivado no Brasil, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) figura como um bioindicador amplamente empregado na avaliação da poluição ambiental, isto porque além de ocupar diferentes níveis tróficos tanto como predador como também em transformador da matéria orgânica, é capaz de refletir as mudanças do meio em alterações metabólicas e comportamentais facilmente mensuráveis (CARRETERO, 2012; STECKERT *et al.*, 2019).

Introduzida na região nordeste do Brasil na década de 1970, a tilápia-do-Nilo é uma espécie originária da bacia hidrográfica do rio Nilo, no leste da África, que se encontra distribuída preferencialmente em regiões de climas tropical e subtropical. Caracteriza-se por ser um peixe do grupo dos Teleósteos, ordem Peciforme, pertencente à família Cichlidae; pelo seu hábito onívoro, alimentando-se preferencialmente de fitoplâncton, detritos de origem vegetal e pequenos invertebrados; pela coloração acinzentada; pelo corpo comprimido lateralmente, com presença de escamas do tipo cicloides; e pelo focinho curto com boca anterior dotada de pequenos dentes (Figura 4). É pouco exigente em relação ao oxigênio dissolvido (OD) e apresenta ótimo desenvolvimento em ambientes com temperaturas que variam entre 22 °C e 29 °C e pH na faixa de 6 a 9 (AYROZA *et al.*, 2011; CARRETERO, 2012. SILVA *et al.*, 2015; EMBRAPA, 2019).

Figura 4 - O teleósteo tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Desta forma, considerando a importância de se determinar a presença e a ação tóxica dos poluentes no ambiente, o presente estudo tem por objetivo verificar os efeitos do Roundup® e do fipronil em biomarcadores bioquímicos em *Oreochromis niloticus*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do Roundup® e do fipronil em biomarcadores bioquímicos de *Oreochromis niloticus*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I – Determinar a atividade da catalase e da glutathione s-transferase nas brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus* expostos ao Roundup®;

II – Determinar a atividade da acetilcolinesterase no cérebro de *Oreochromis niloticus* expostos ao Roundup®;

III – Determinar a atividade da catalase e da glutathione s-transferase nas brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus* expostos ao fipronil;

IV – Determinar a atividade da acetilcolinesterase no cérebro de *Oreochromis niloticus* expostos ao fipronil.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) presente nas instalações do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc), em Lages, Santa Catarina, Brasil. A presente pesquisa fora aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/Udesc), sob o nº 2870060919.

#### 3.1 ACLIMATAÇÃO DOS PEIXES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

Os exemplares de *Oreochromis niloticus* utilizados na pesquisa foram obtidos de empresa local especializada, sendo todos de sexo masculino, com idade aproximada de 3 meses. Os peixes foram mantidos no LABTOX em aquários de vidro com aeração mecânica constante, sob densidade de 2 indivíduos para cada litro de água, com temperatura ambiente média de  $25\text{ °C} \pm 0,5$ , e com fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro, por um período de 30 dias. Os animais foram alimentados uma vez ao dia, com ração de manutenção, adquirida em casa agropecuária. Os aquários foram limpos diariamente por sifonagem, com renovação de aproximadamente 70 % do volume total dos tanques.

A água utilizada nesta etapa, bem como na execução dos bioensaios, atende aos parâmetros de qualidade descritos no anexo XX da Portaria de Consolidação nº 05/2017 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017), todavia, aferiu-se diariamente o pH e o OD na água (Tabela 1). Adicionou-se, por fim, sempre após a limpeza dos aquários, agente complexante e inativador de cloro livre, da marca Labcon.

Tabela 1 - Parâmetros de qualidade de água.

Parâmetro	Valor Médio
pH	$7,1 \pm 0,3$
Temperatura	$25\text{ °C} \pm 1,0$
OD	$5,9\text{ mg L}^{-1} \pm 0,4$

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

### 3.2 BIOENSAIOS

Os bioensaios, feitos em triplicata, consistiram da avaliação de quatro doses mais grupo controle para cada um dos analitos (Tabela 2).

Tabela 2 - Doses avaliadas para cada analito.

Analito		Dose			
Roundup®	Controle	0,1 mg L <sup>-1</sup>	0,5 mg L <sup>-1</sup>	1 mg L <sup>-1</sup>	2 mg L <sup>-1</sup>
Fipronil	Controle	0,01 mg L <sup>-1</sup>	0,03 mg L <sup>-1</sup>	0,05 mg L <sup>-1</sup>	0,1 mg L <sup>-1</sup>

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Os animais, após o período de aclimação, foram distribuídos aleatoriamente em aquários de vidro contendo 12 L de água desclorada, mantidos sob aeração constante (Figura 5). A temperatura média da água manteve-se em 25 °C ± 1,0, e o OD em 6,1 mg L<sup>-1</sup> ± 0,3. Ao todo, cada tratamento recebeu 8 peixes, totalizando 24 indivíduos para cada dose avaliada. Nesta etapa os animais não foram alimentados, e não houve renovação da água.

Figura 5 - Bioensaio agudo de toxicidade.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Os peixes foram eutanasiados 96 horas após o início dos ensaios de acordo com o método Ike Jimi, que consiste em uma incisão cervical, interrompendo, assim, a conexão entre o encéfalo e a medula espinhal; e seus cérebros, fígados e brânquias foram coletados e armazenados em microtubos de 1,5 mL, mantidos sob refrigeração constante em baixas temperaturas, para posterior análise.

### 3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os tecidos, após a coleta, foram homogeneizados em solução tampão fosfato monopotássico (0,1 M) em pH 7, com auxílio de agitador mecânico. Após a homogeneização, os tecidos foram mantidos sob refrigeração, sendo descongelados posteriormente no momento em que se avaliou a absorbância dos homogeneizados para as enzimas catalase, glutathione s-transferase e acetilcolinesterase.

As leituras, para cada enzima, seguiram protocolos específicos, abaixo descritos, e foram efetuadas em espectrofotômetro de emissão ultravioleta (modelo T70+, PG Instruments Ltd.). Acrescenta-se que, durante esta etapa, os microtubos contendo os tecidos foram mantidos sobre placas de gelo, a fim de preservar a atividade enzimática.

#### 3.3.1 Catalase

O método, adaptado do protocolo descrito por Beutler (1975), determina a atividade da CAT a partir do consumo de  $H_2O_2$ . Foram utilizados, em cada avaliação individual, 2 mL de solução tampão de fosfato monopotássico (0,1 M) em pH 7, que serviu como meio reacional; 20  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio; e 20  $\mu$ L do homogeneizado.

Efetuaram-se as leituras, por espectrofotometria, em cubetas de quartzo de 4 mL, a cada minuto, para um comprimento de onda de 240 nm, para os tecidos das brânquias e fígado. Ao todo foram efetuadas cinco leituras para cada homogeneizado. A atividade da CAT foi expressa em unidades de  $H_2O_2$  metabolizado por miligrama de proteína ( $\mu$ mol de  $H_2O_2$ /mg proteína/min).

#### 3.3.2 Glutathione s-transferase

Assim como para a CAT, determinou-se a atividade da GST nos tecidos das brânquias e fígado dos peixes. O método, adaptado do protocolo proposto por Keen, Habig e Jakoby

(1976), consiste do preparo de solução tampão contendo 100 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), que age como reagente de cor na reação de formação de tioesteres quando em contato com o tiol glutatona reduzida (GSH).

Nesta etapa, adicionou-se, respectivamente, em cubetas de acrílico de 4 mL, 1940 µL de solução tampão de fosfato monopotássico (0,1 M) de pH 7; 20 µL de GSH; 20 µL do homogeneizado; e 200 µL de CDNB, para posterior leitura por espectrofotometria, para um comprimento de onda de 340 nm. Foram efetuadas leituras a cada minuto, totalizando cinco leituras para cada homogeneizado. A atividade da GST foi expressa em unidades de CDNB conjugado por miligrama de proteína (nmol de CDNB/mg proteína/min).

### 3.3.3 Acetilcolinesterase

A leitura da atividade da AChE, adaptada do trabalho de Ellman *et al.* (1961), consiste na determinação da taxa de hidrólise de iodeto de acetilcolina pela AChE, cujo produto reacional, a tiocolina, reage com o ânion 5-tio-2-nitrobenzoato (DTNB), resultando num conjugado de coloração amarelada, que é quantificado espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 412 nm.

O procedimento consistiu na adição de 2 mL de tampão fosfato monopotássico (0,1 M) de pH 7; de 100 µL do reagente de cor DTNB; de 100 µL do substrato enzimático iodeto de acetilcolina; e de 100 µL do homogeneizado. As leituras da AChE foram efetuadas em cubetas de acrílico de 4 mL uma única vez para cada homogeneizado de tecido cerebral dos peixes. A atividade da enzima foi expressa em unidades de ACh por miligrama de proteína (µmol de ACh hidrolisada/mg de proteína/min).

### 3.3.4 Proteínas totais

Empregou-se, nesta etapa, para quantificar os teores de proteínas em cada homogeneizado, o método de biureto, que se baseia na reação do reativo de biureto, que é um composto de uma mistura de sulfato de cobre e de um tampão de hidróxido de sódio que, devido a sua característica alcalina, reage com as proteínas séricas formando complexos quadrados planares com as ligações peptídicas, resultando na mudança da coloração do meio reacional, o que, por consequência, é capaz de expressar, por intermédio de análises espectrofotométricas, o teor de proteínas totais da amostra (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).



O procedimento metodológico consistiu na adição, em cubetas de acrílico de 4 mL, de 2 mL do reagente de proteínas totais, da marca Labtest (diluído 1:1 em água miliQ), e de 50 µL do homogeneizado; bem como do preparo de um branco experimental contendo 2 mL do reagente de proteínas totais e 50 µL de água miliQ; e de um padrão contendo 2 mL do reagente de proteínas totais e 50 µL do reagente de cor, de mesma marca.

Obteve-se o teor de proteínas totais, para todos os tecidos avaliados, para um comprimento de onda de 545 nm.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de atividade enzimática foram submetidos aos testes de homogeneidade de Levene e de Shapiro-Wilk para verificação de pressupostos essenciais à escolha dos testes de comparação entre médias. Posteriormente, aplicou-se o teste de análise de variâncias (*Two-way ANOVA*), e o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), a fim de verificar possíveis diferenças entre as réplicas e entre os tratamentos. Quando verificada heterocedasticidade entre as variâncias, optou-se pelo emprego dos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ), com valor-p corrigido pelo método de Bonferroni. Todas as análises estatísticas, bem como a confecção dos gráficos, foram feitas com auxílio dos softwares Excel®, Paleontological Statistics e Sisvar.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 INFLUÊNCIA DO ROUNDUP® NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As doses testadas para o herbicida Roundup®, denominadas, CTR, T1, T2, T3, e T4, consistiram, respectivamente, das concentrações de 0 (grupo controle), 0,1; 0,5; 1,0; e 2,0 mg L<sup>-1</sup>. Optou-se por estas concentrações pois, apesar da concentração letal (CL<sub>50;96h</sub>) do Roundup® para *Oreochromis niloticus*, conforme observado por Jiraungkoorskul *et al.* (2002), ser de 16,8 mg L<sup>-1</sup>, objetivou-se avaliar os efeitos em concentrações que não extrapolassem 15 % deste valor; isto porque, considerando a dinâmica ambiental e seus processos correlatos, os compostos são naturalmente diluídos e adsorvidos ao sedimento, encontrando-se, por vezes, no ambiente, em baixas concentrações disponíveis.

Por não haver diferença entre as réplicas (ANOVA,  $p < 0,05$ ), os dados foram agrupados como consistindo uma única repetição, a fim de promover o ganho de graus de liberdade na avaliação estatística.

#### 4.1.1 Fígado

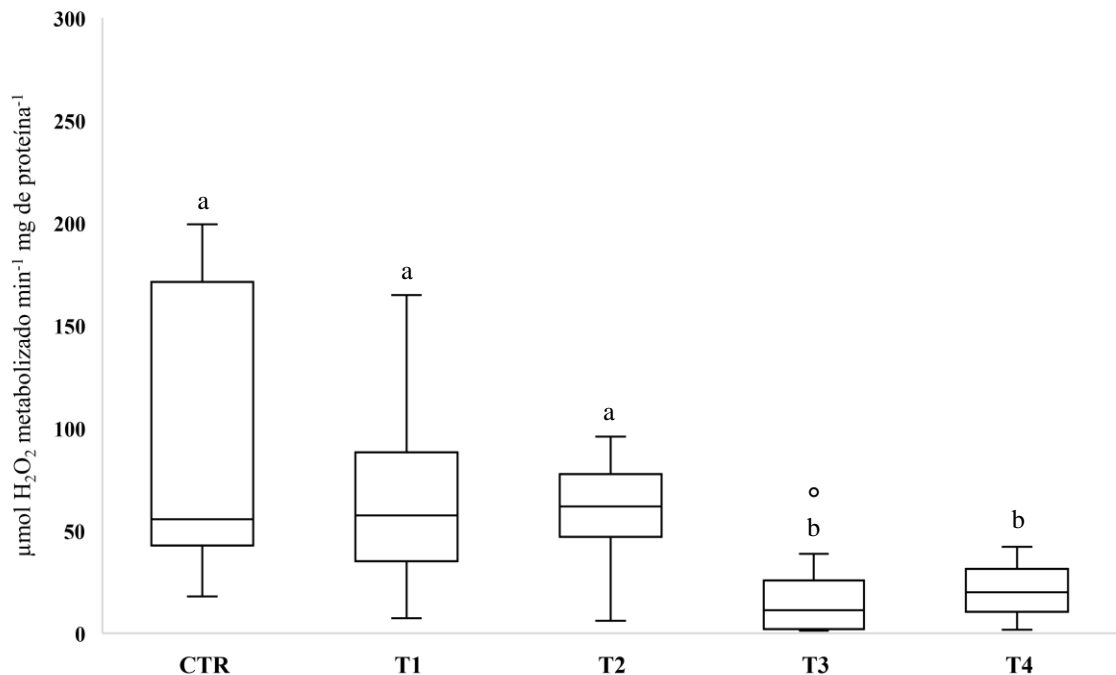
Considerado o principal órgão de biotransformação de xenobióticos, o fígado, em estudos de avaliação da exposição ambiental a poluentes, mostra-se uma excelente ferramenta de análise (AZEVEDO & CHASIN, 2003), isto pois contracenando como órgão-alvo, sendo seus mecanismos metabólicos de extrema relevância à ecotoxicologia, devido a sua alta sensibilidade (CAMARGO & MARTINEZ, 2007).

Os resultados da cinética enzimática da CAT e da GST, para as avaliações no fígado dos organismos, submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), indicaram diferenças pontuais entre os tratamentos.

Para a CAT, observou-se diminuição significativa na atividade da enzima para as doses testadas em T3 e T4, as quais diferenciaram-se do grupo CTR e dos tratamentos T1 e T2 (Figura 6). Desta forma, como o parâmetro avaliado para determinação da cinética da enzima é a degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, compreende-se que a presença do Roundup®, nas doses T3 e T4, age como inibidor da atividade da CAT, indicando possível estresse oxidativo devido à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Todavia, avaliações da atividade de outras enzimas, como a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona peroxidase (GPx), bem como avaliações

histológicas, são necessárias para melhor compreensão da dimensão dos danos observados às estruturas celulares.

Figura 6 - Atividade da catalase no fígado dos organismos expostos ao Roundup®. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

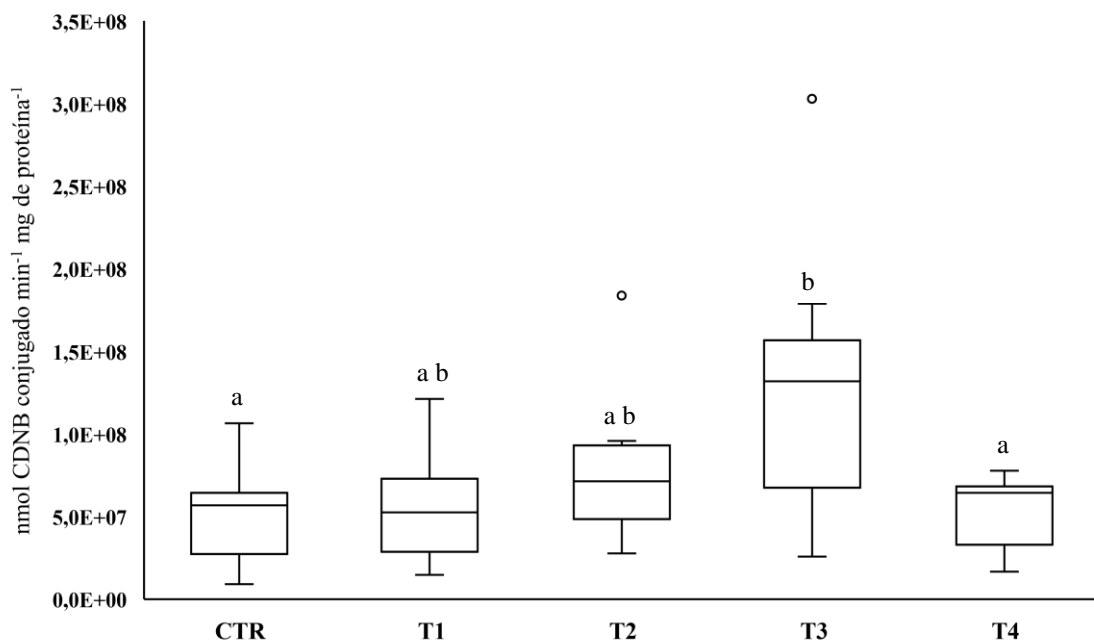
Constatou-se também variações quanto a atividade da GST: aumento significativo da atividade da enzima no tratamento T3, quando comparada com o grupo CTR; e diminuição significativa da cinética no tratamento T4, equiparando-a aos níveis observados no CTR, T1 e T2 (Figura 7).

Como para o caso da GST, o parâmetro de avaliação da atividade enzimática é a formação de um conjugado do poluente com o tiol GSH, pode-se inferir que para a dose T3, o aumento observado é consequência da manutenção homeostática, onde a enzima, devido ao incremento na concentração do xenobionte, apresenta, como mecanismo compensatório, a sua atividade aumentada. Outrossim, a redução constatada em T4 indica uma possível inibição da sua atividade.

No que tange a cinética enzimática, avaliando a influência do Roundup® em parâmetros bioquímicos em *Prochilodus lineatus*, peixe tropical de água doce, Langiano & Martinez (2008) observaram incremento na atividade da CAT no fígado dos indivíduos expostos a doses de 10 mg L<sup>-1</sup>, em ensaio de 96 horas. Todavia, Modesto & Martinez (2010), em avaliação com a mesma espécie, verificaram decréscimo significativo na atividade da CAT, e inibição da GST,

para doses de  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ , após 6 horas de exposição. Estes resultados indicam a ocorrência de diferentes respostas enzimáticas em função do tempo de exposição ao herbicida. Em estudo da influência do Roundup® sobre as estruturas celulares de jovens tilápias-do-Nilo, Jiraungkoorskul *et al.* (2002) verificaram alterações hepáticas severas, com danos irreversíveis às estruturas membranosas, picnose e consequente lise celular. Albinati *et al.* (2009), por sua vez, constataram alterações histológicas no fígado de *Leporinus macrocephalus* em decorrência da exposição ao herbicida, observando hemorragias, congestão hepática e necrose tecidual. Sánchez *et al.* (2017), em estudo com o teleósteo *Jenynsia multidentata*, verificaram aumento expressivo da atividade da GST para uma dose de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , bem como aumento da concentração de EROs e redução da capacidade celular antioxidante dos organismos.

Figura 7 - Atividade da glutatona s-transferase no fígado dos organismos expostos ao Roundup®. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Em suma, os resultados aqui apresentados revelam - para as doses avaliadas no fígado - que o Roundup® promove alterações bioquímicas importantes. Todavia, observa-se que seus efeitos sobre o metabolismo animal variam entre espécies, e de acordo com o tempo de exposição, havendo, portanto, a necessidade da avaliação de outras enzimas hepáticas em *O. niloticus*, para que se possa compreender, de forma holística, os possíveis danos associados à exposição da espécie ao herbicida.

#### 4.1.2 Brânquias

A exposição de peixes a agentes químicos perniciosos presentes no ambiente, é registrada também pelas alterações bioquímicas e morfológicas observadas nas brânquias, que são órgãos essenciais para o desempenho de importantes processos fisiológicos como a respiração, a osmorregulação, o equilíbrio ácido-básico e a excreção de compostos nitrogenados (PERRY, 2007).

Os resultados de atividade enzimática da GST, como não atenderam aos pressupostos necessários à avaliação estatística paramétrica, foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ) com valor-p corrigido pelo método de Bonferroni. Os dados de atividade da CAT, por sua vez, foram avaliados por intermédio da ANOVA e do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

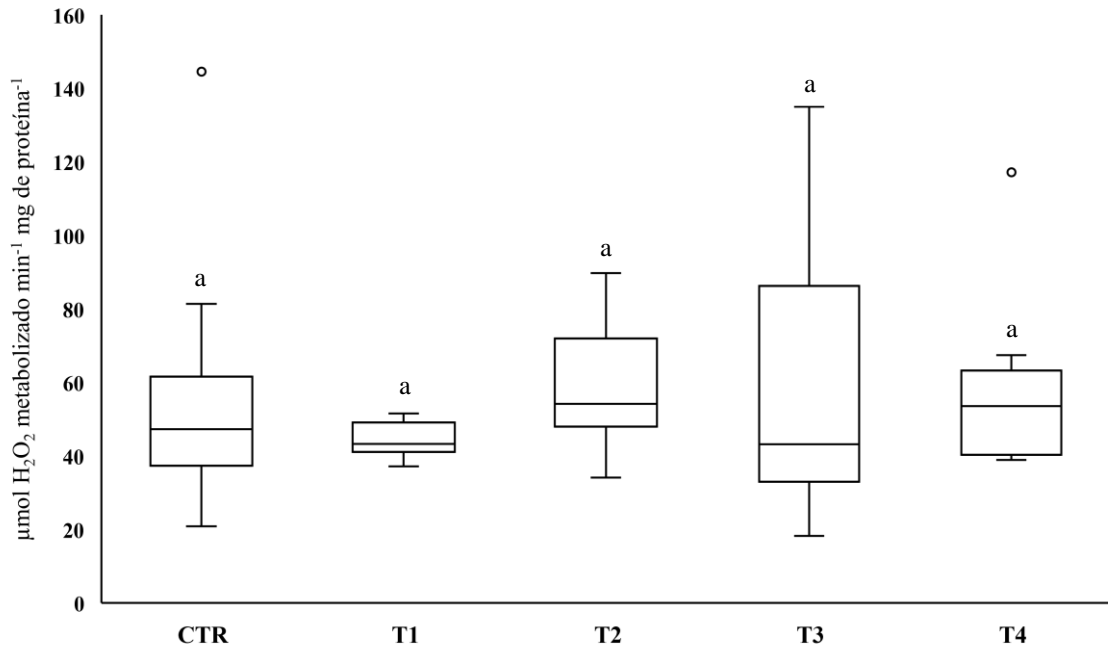
Não foram constatadas diferenças significativas entre os tratamentos para CAT (Figura 8), e para GST (Figura 9). Neste sentido, como são escassos os trabalhos sobre achados da CAT e da GST em brânquias de *Oreochromis niloticus* expostas ao Roundup®, os presentes resultados figuram como referência a futuras avaliações desenvolvidas para fins ecotoxicológicos.

Entretanto, diversos são os trabalhos que têm descrito danos histológicos às brânquias de peixes expostos ao Roundup®. Jiraungkoorskul *et al.* (2003), em teste crônico com três meses de duração, observaram a formação de edema, com necrose tecidual das estruturas epiteliais de branquiais de *O. niloticus* expostos a 5,0 e 15 mg L<sup>-1</sup> de Roundup®. Shiogiri *et al.* (2012) avaliando alterações morfofuncionais em *Piaractus mesopotamicus*, em teste crônico com a formulação comercial Roundup® Ready, constataram hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, dilatação capilar e descolamento do epitélio branquial para concentrações de 75 µg L<sup>-1</sup>. Sousa *et al.* (2016), em ensaio toxicológico com *Lophiosilurus alexandri*, verificaram alterações branquiais severas, tais como: aneurisma, hiperplasia e fusão lamelar nos animais mantidos na presença do Roundup®. Em consonância, Jiraungkoorskul *et al.* (2002), constataram, em ensaios progressivos de 24, 48, 72 e 96 horas, que os efeitos deletérios do herbicida são mais intensos conforme o passar do tempo de exposição.

É claro, portanto, que a presença do Roundup® é capaz de impactar a morfologia branquial dos peixes. Todavia, torna-se necessária a execução de ensaios que busquem avaliar a influência do herbicida sobre outros parâmetros bioquímicos, como para as enzimas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, e anidrase carbônica (AC), importantes aos processos de regulação osmótica e de

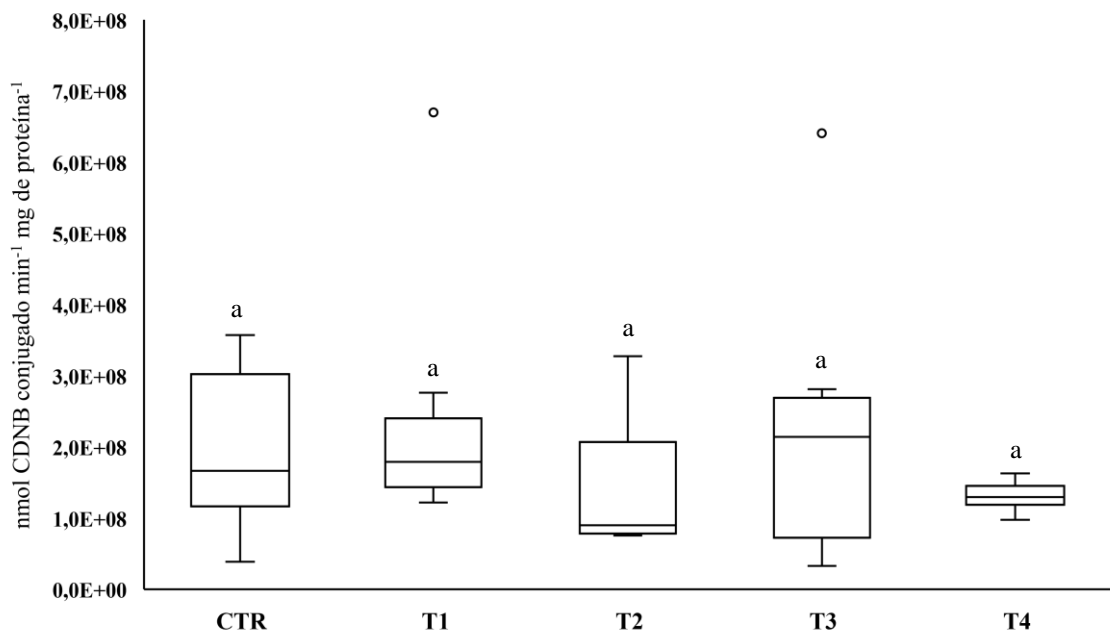
equilíbrio ácido-base, para que possa-se, com clareza, compreender os mecanismos de ação do Roundup® sobre o metabolismo de *O. niloticus*.

Figura 8 - Atividade da catalase nas brânquias dos organismos expostos ao Roundup®. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 9 - Atividade da glutatona s-transferase nas brânquias dos organismos expostos ao Roundup®. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

#### 4.1.3 Cérebro

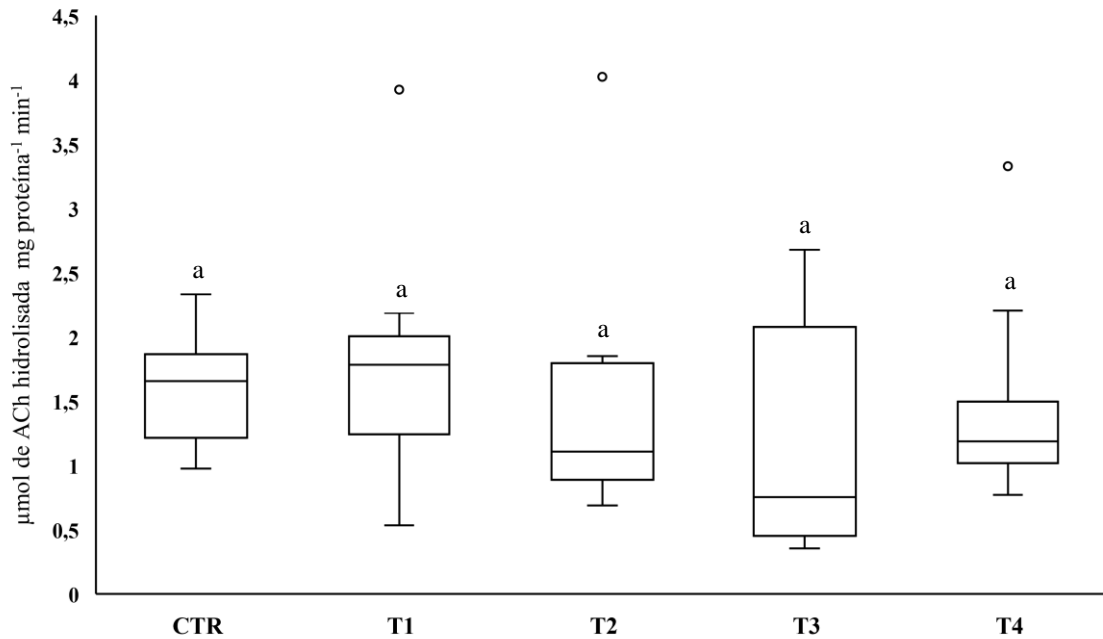
Os resultados da atividade enzimática da AChE, para todos os tratamentos, submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si e com o grupo CTR (Figura 10).

Entretanto, apesar da molécula de glifosato não ser classificada como inibidora da atividade da AChE (SANDRINI *et al.*, 2013), diversos são os estudos que relatam a inibição da atividade da enzima em diferentes espécies quando expostas ao herbicida. Modesto & Martinez (2010), por exemplo, avaliando os efeitos do Roundup® em *Prochilodus lineatus*, verificaram que, para a dose de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , em ensaios de 96 horas, houve diminuição na atividade da AChE no cérebro dos organismos. Em ensaio com *Jenynsia multidentata*, Sánchez *et al.* (2017) observaram inibição da atividade da enzima nos animais expostos à dose de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Gluszczak *et al.* (2006), por sua vez, em ensaios de exposição do teleósteo *Leporinus obtusidens* ao Roundup®, constataram expressiva diminuição na atividade da AChE para a dose de  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ , e inibição enzimática para a dose de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Tais alterações, conforme posto por Gholami-Seyedkolaei *et al.* (2013), resultam em danos severos aos animais, pois a redução da hidrólise de acetilcolina leva à distonia muscular, impactando, desta forma, a locomoção e a reprodução dos peixes.

No que tange os resultados da presente pesquisa, possivelmente devido às baixas doses aos quais os animais foram expostos, bem como em função do tempo de exposição, não foram constatadas alterações na cinética da AChE. Todavia, isto não comprova que o Roundup® não tem ação deletéria sobre o tecido cerebral de *O. niloticus*, isto porque outros mecanismos metabólicos, como os associados ao GABA podem estar sendo impactados.

Neste sentido, a necessidade de novas avaliações que busquem quantificar outros parâmetros bioquímicos é necessária para que se possa inferir com clareza os efeitos do Roundup® no SNC da espécie.

Figura 10 - Atividade da acetilcolinesterase no cérebro dos organismos expostos ao Roundup®. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

## 4.2 INFLUÊNCIA DO FIPRONIL NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Assim como para o Roundup®, as doses testadas para o fipronil foram denominadas CTR, T1, T2, T3 e T4, e consistiram, respectivamente, das concentrações de 0 (grupo controle), 0,01; 0,03; 0,05; e 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Optou-se por estas concentrações pois a CL<sub>50;96h</sub> do fipronil para *Oreochromis niloticus* é estimada em 0,25 mg L<sup>-1</sup> (USEPA, 1996) e objetivou-se avaliar doses que não extrapolassem 40 % deste valor. Os dados, por não terem sido constatadas diferenças entre as réplicas, foram agrupados como consistindo em um único ensaio.

Foram observados, para o tratamento T4, padrões de comportamento anormais: como natação errática e perda da capacidade de arfagem. Em consonância, Ignácio (2018) constatou, em estudo sobre o efeito do fipronil em *Oreochromis niloticus*, para as doses de 0,11, 0,15 e 0,20 mg L<sup>-1</sup>, mudança de coloração dos peixes, letargia, espasmos musculares e natação errática. Cella *et al.* (2012), avaliando efeitos do fipronil em *Piaractus mesopotamicus* e *Danio rerio*, constataram comportamento semelhante aos aqui relatados.

### 4.2.1 Fígado

Os dados da atividade enzimática da CAT (Figura 11) e da GST (Figura 12), para avaliação no fígado, por apresentarem homogeneidade de variâncias, foram submetidos à

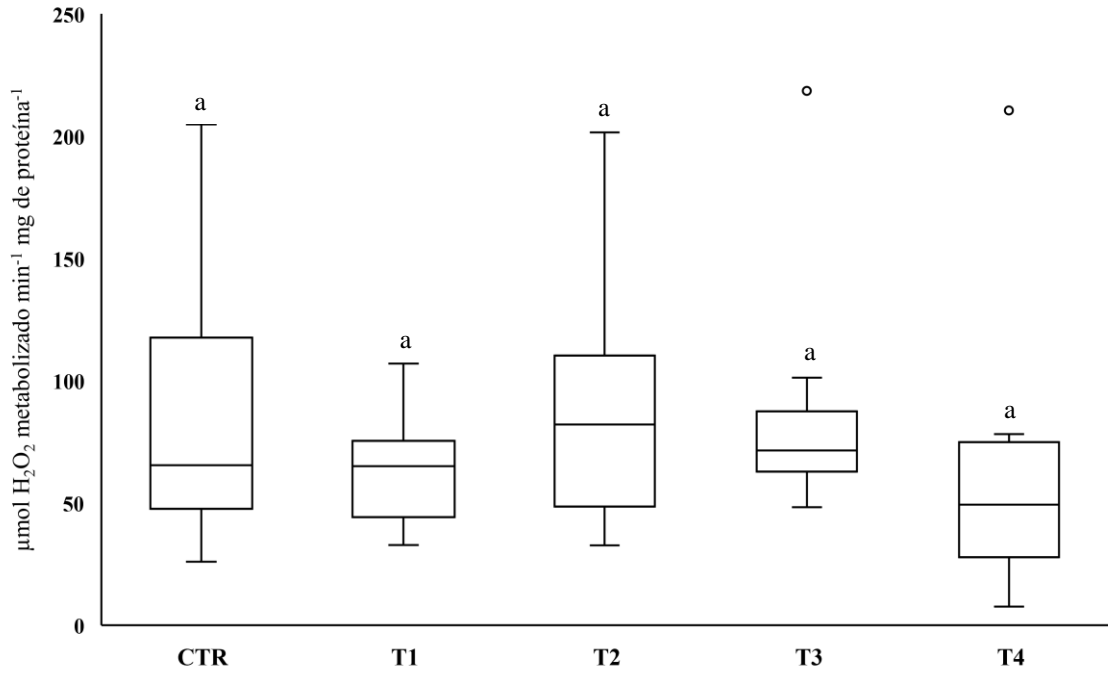


ANOVA e ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), não sendo observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Entretanto, verifica-se em outros estudos de exposição de peixes ao fipronil, como o de Clasen *et al.* (2012), que buscaram avaliar respostas bioquímicas no fígado de *Cyprinus carpio* mantidas em covos em plantação de arroz, aumento expressivo da atividade da SOD, e inibição da CAT. El-Murr *et al.* (2015), por sua vez, avaliando efeitos bioquímicos do fipronil em *O. niloticus*, constataram incremento na atividade das enzimas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), com danos associados às membranas dos hepatócitos; outrossim, os autores, em avaliação histopatológica, verificaram congestão venosa, hemorragia e necrose tecidual. Ramsdorf (2011), em contraste à presente avaliação, observou aumento na atividade da GST para dose de  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ , em *Astyanax sp.*, todavia, em avaliações para mesma dose em *Danio rerio*, não constatou alterações na atividade da GST para os organismos expostos ao fipronil.

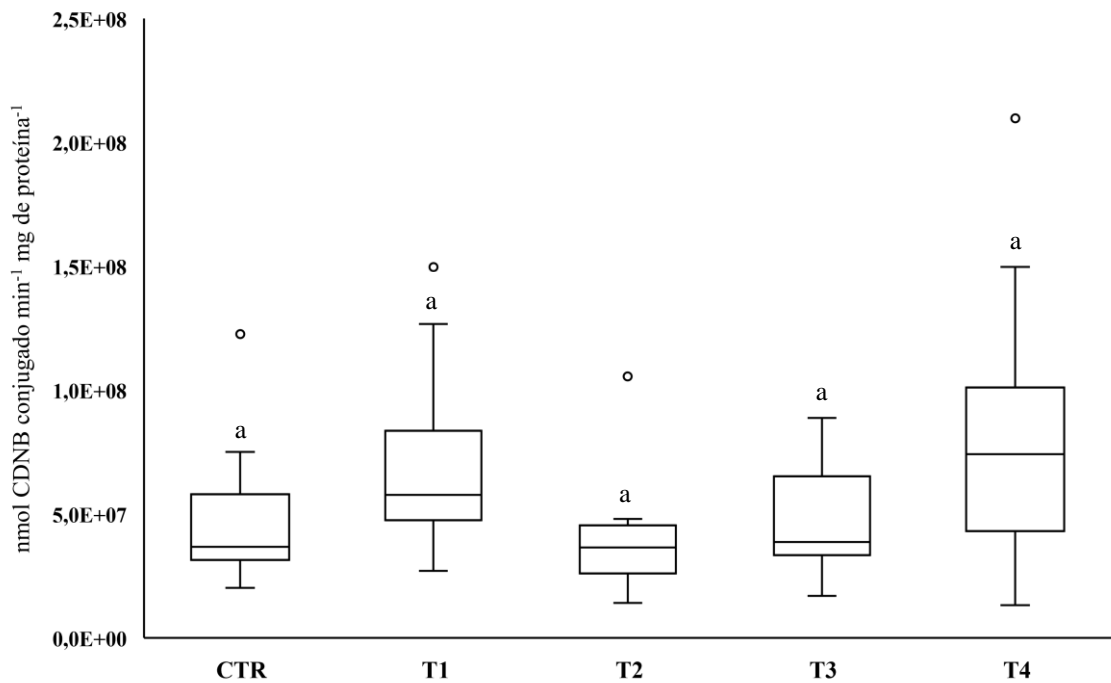
Os resultados aqui apresentados indicam que o fipronil não fora capaz de alterar a atividade da CAT e da GST no fígado de *O. niloticus*, entretanto, nada mais pode ser concluído, isto porque a presença do inseticida pode estar afetando mecanismos bioquímicos hepáticos não avaliados na presente pesquisa. Deste modo, considerando os expostos supracitados, e as diferentes respostas bioquímicas ante à exposição ao fipronil, salienta-se a necessidade da execução de ensaios com *O. niloticus*, quando expostos ao pesticida, que busquem avaliar não somente a atividade da CAT e da GST, como também de outras enzimas, tais como a SOD e a GPx, associadas à biotransformação de xenobióticos nas células hepáticas.

Figura 11 - Atividade da catalase no fígado dos organismos expostos ao fipronil. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 12 - Atividade da glutatona s-transferase no fígado dos organismos expostos ao fipronil. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

#### 4.2.2 Brânquias

Os resultados da atividade da CAT (Figura 13) e da GST (Figura 14), para as análises nas brânquias, quando submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), não apresentaram diferença significativa quando comparados.

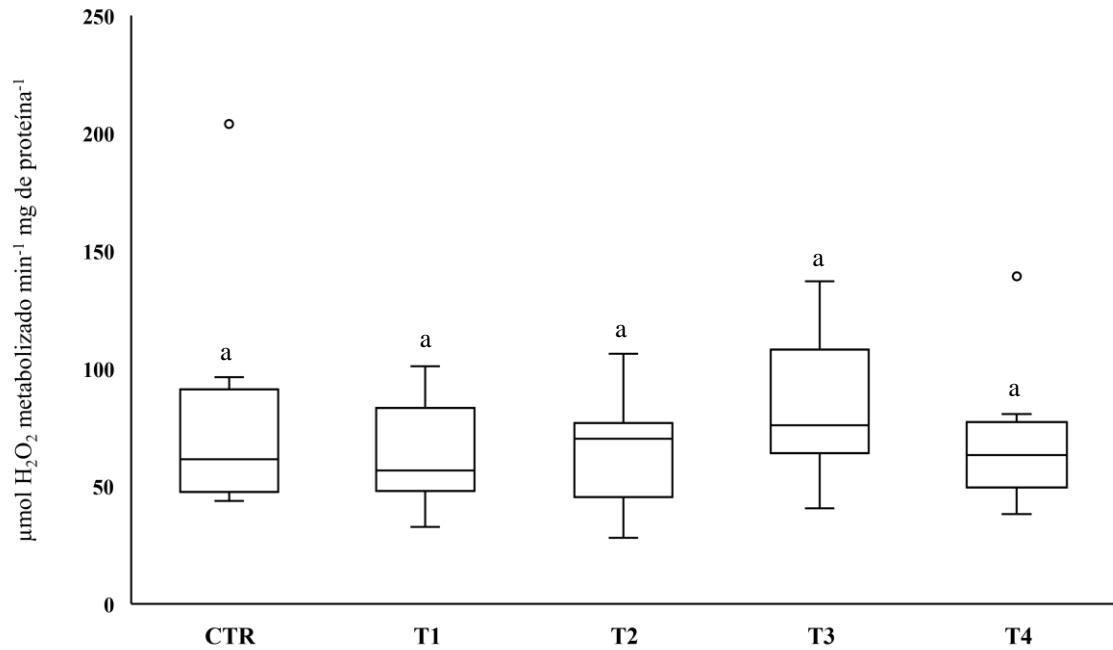
Em concordância, Trídico *et al.* (2010), avaliando o efeito do inseticida diazinon, na dose de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , em ensaio toxicológico de sete dias com *O. niloticus*, não constataram redução na atividade da GST branquial. Wu *et al.* (2014), avaliando doses subletais em *Danio rerio*, também não verificaram alterações na cinética da GST quando os tratamentos de doses  $2,0$ ;  $4,0$ ; e  $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  foram comparados ao grupo controle.

Tais achados sugerem que a GST não é um biomarcador sensível à avaliação dos efeitos do fipronil nas brânquias de peixes, todavia, a avaliação dos xenobiontes em relação à cinética da GST, em tecidos branquiais de diferentes espécies, é justificada devido ao relevante papel desempenhado pela enzima no processo de biotransformação (FUJIOKA & CASIDA, 2007).

Avaliando os efeitos do fipronil em *Rutilus kutum*, em ensaio de duas semanas de duração, Ardeshir *et al.* (2018) verificaram redução significativa na atividade da CAT nas brânquias dos organismos expostos a doses de  $200 \text{ mg/kg}$  de massa corpórea/semana, observando também, em análise histológica, danos como hipertrofia e hiperplasia celular.

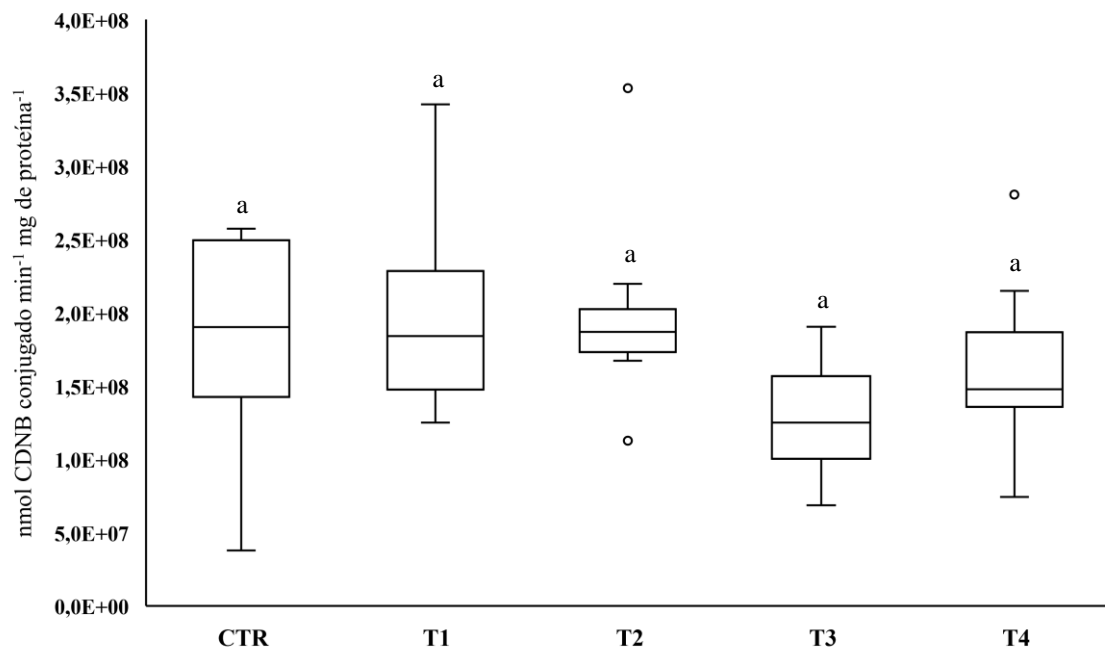
No entanto, escassos são os trabalhos que tenham avaliado a influência do pesticida na cinética da CAT em brânquias de peixes, para que se possa, de fato, concluir os reais efeitos deste composto em relação à atividade desta enzima. Neste sentido, a presente avaliação toxicológica tem o intuito de enriquecer o arcabouço científico, figurando, os resultados aqui apresentados, como referências comparativas à futuras avaliações.

Figura 13 - Atividade da catalase nas brânquias dos organismos expostos ao fipronil. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 14 - Atividade da glutatona s-transferase nas brânquias dos organismos expostos ao fipronil. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.



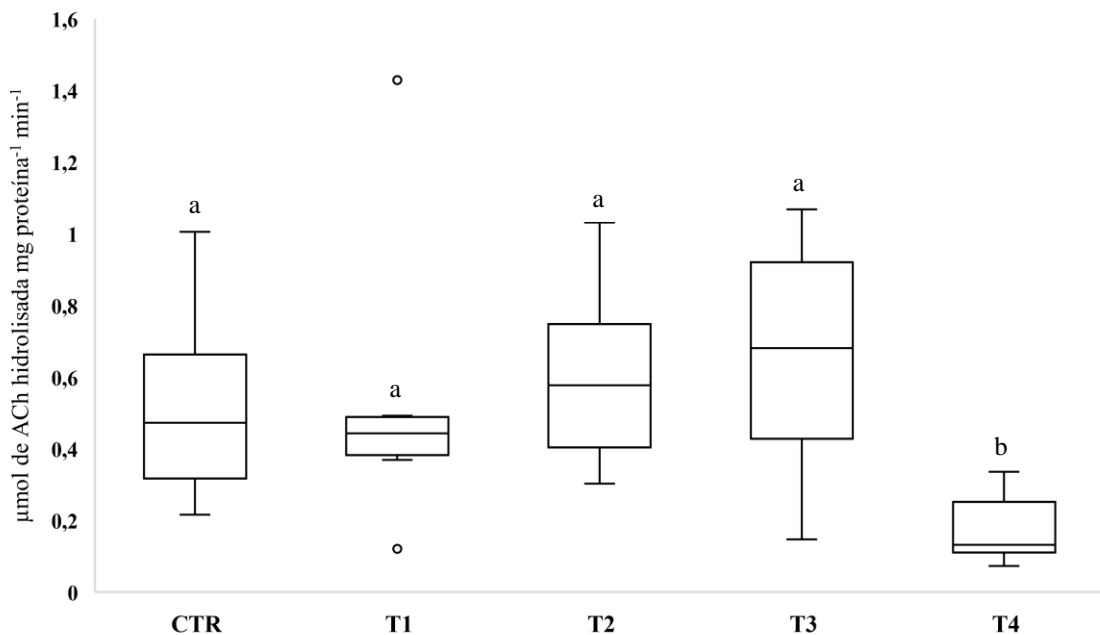
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

### 4.2.3 Cérebro

Os resultados da atividade da AChE, submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ), com valor-p corrigido pelo método de Bonferroni, apresentaram diferença para o tratamento T4 quando comparado com os demais, todavia, não fora verificada alteração entre os tratamentos CTR, T1, T2 e T3 (Figura 15).

Ainda são escassos os trabalhos que tenham avaliado, de forma específica, alterações da AChE no cérebro de *O. niloticus* expostos ao fipronil. Não obstante, sabe-se que a inibição desta enzima chave ao funcionamento do SNC leva ao acúmulo de acetilcolina, resultando em efeitos citotóxicos, resultando, por consequência, em alterações comportamentais (PEAKALL, 2012).

Figura 15 - Atividade da acetilcolinesterase no cérebro dos organismos expostos ao fipronil. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Ramsdorf (2011), avaliando os efeitos do fipronil em *Astyanax sp.*, não constatou diferença na atividade da AChE cerebral para as doses de 0,05; 0,1; e 0,23  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Todavia, a autora, em análise no tecido muscular, verificou inibição da enzima para estas mesmas doses. Dourado (2019), em estudo sobre o efeito do fipronil em *O. niloticus*, em condição de hipóxia ( $\text{OD} < 2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), constatou redução na atividade dos receptores GABA no cérebro dos indivíduos. Park *et al.* (2020), em ensaio com embriões de *Danio rerio*, observou degeneração da medula espinhal, redução no comprimento dos nervos motores, e apoptose neural.

Estes achados, indicam que o pesticida, ainda que em baixas concentrações, resulta em danos neuronais aos peixes, justificando, deste modo, a ocorrência de espasmos e de dificuldades natatórias, conforme constatado no item 4.2.

Desta forma, salienta-se a necessidade da execução de novos ensaios que busquem quantificar não só a atividade da AChE no cérebro de *O. niloticus*, quando expostos ao fipronil, como também nos músculos. Outrossim, avaliações nos níveis do GABA também são recomendadas como objeto de futuras pesquisas.

Por fim, pode-se inferir que o fipronil, apesar da sua seletividade para invertebrados, é capaz de provocar alterações nos mecanismos da AChE, essencial ao funcionamento do SNC em peixes vertebrados; podendo ser atribuída à exposição ao pesticida alterações comportamentais em *O. niloticus*.

## 5 CONCLUSÕES

Ante à exposição ao herbicida Roundup®, as avaliações da atividade das enzimas catalase e glutathione s-transferase, quando avaliadas no fígado de *Oreochromis niloticus*, apresentaram alterações pontuais para as doses de 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>. Todavia, não foram observadas interferências na cinética destas mesmas enzimas para o tecido das brânquias. A acetilcolinesterase, quando avaliada no cérebro dos organismos, não apresentou alteração.

O fipronil não apresentou influência sobre a atividade das enzimas catalase e glutathione s-transferase nas brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus*, contudo, verificou-se redução expressiva da acetilcolinesterase no cérebro dos organismos quando expostos à dose de 0,1 mg L<sup>-1</sup>.

Atingidos, por fim, os objetivos da presente pesquisa, pode-se inferir que tanto o Roundup® quanto o fipronil causaram alterações metabólicas pontuais nos peixes, todavia, observadas as diferentes respostas enzimáticas aos agentes perniciosos, em função do tecido analisado e do tempo de exposição, e a carência de achados acadêmicos que tenham estudado os efeitos do Roundup® e do fipronil em *Oreochromis niloticus*, denota-se a necessidade de avaliações histológicas, bem como da atividade de outras enzimas associadas aos processos de biotransformação, para o fígado; osmorregulação, para as brânquias; e dos níveis do GABA no cérebro, para que possa-se melhor compreender os efeitos destes compostos no metabolismo da espécie.

## REFERÊNCIAS

- ALBINATI, A. C. L. *et al.* Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v. 61, n. 3, p. 621-627, 2009.
- ALMEIDA, P. R.; RODRIGUES, M. V.; IMPERADOR, A. M. Toxicidade aguda (LC50) e efeitos comportamentais e morfológicos de formulado comercial com princípio ativo glifosato em girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae) e *Rhinella icterica* (Anura, Bufonidae). **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [s.l.], v. 24, n. 6, p. 1115-1125, 2019.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. *et al.* Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quimica Nova**, Araraquara, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2001.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.158-170, 2003.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A Pharmacological Interesting Enzyme. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.1818-1834, 2016.
- ARDESHIR, R. A. *et al.* CYP1A gene expression as a basic factor for fipronil toxicity in *Caspian kutum* fish. **Toxicology Reports**, [s.l.], v. 5, p. 113-124, 2018.
- ARMILIATO, N. *et al.* Changes in Ultrastructure and Expression of Steroidogenic Factor-1 in Ovaries of Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to Glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, [s.l.], v. 77, n. 7, p. 405-414, 2014.
- AYROZA, L. M. S *et al.* Custos e rentabilidade da produção de juvenis de tilápia-do-nylo em tanques-rede utilizando-se diferentes densidades de estocagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l.], v. 40, n. 2, p. 231-239, 2011.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (Org.). **As bases ecotoxicológicas da toxicologia**. São Carlos: Rima, 2003. 340 p.
- BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844 p.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.



BARRETTO, M. L. M. *et al.* Avaliação neurocomportamental e níveis de acetilcolinesterase cerebral em ratos expostos subcronicamente ao fipronil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v. 72, n. 1, p. 169-176, 2020.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism**: A manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton, 2. ed. 1975. 160 p.

BRAGA, B. *et al.* **Introdução à Engenharia Ambiental**. 1. ed. São Paulo: Prentice Hall. 336 p., 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria de consolidação nº 05 de 28 de dezembro de 2017**. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Anexo XX. Diário Oficial da União. Brasília, 2017.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 327-336, 2007.

CARMO, T. L. L. *et al.* Overview of the toxic effects of titanium dioxide nanoparticles in blood, liver, muscles, and brain of a Neotropical detritivorous fish. **Environmental Toxicology**, [s.l.], v. 34, n. 4, p. 457-468, 2019.

CARRETERO, M. E. **Estudo de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) como bioindicadores da poluição por mercúrio nos lagos do Parque Ibirapuera e do Parque Ecológico do Tietê na Grande São Paulo**. 2012. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CELLA, A. L. *et al.* Evaluation of organochlorine pesticide residues and fipronil in Corumbataí river basin, Piracicaba, São Paulo, Brazil. **The IOSR Journal of Pharmacy**. [s.l.], p. 60-65. 2012.

CHAGURI, J. L. *et al.* Exposure to fipronil elevates systolic blood pressure and disturbs related biomarkers in plasma of rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s.l.], v. 42, p. 63-68, 2016.

CLASEN, B. *et al.* Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: implications for rice-fish cultivation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 77, p. 45-51, 2012.

COELHO, C. N. *et al.* Eficácia do fipronil em cães infestados com diferentes cargas parasitárias de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: pulicidae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s.l.], v. 35, n. 3, p. 270-273, 2015.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. **Química Nova**, [s.l.], v. 28, n. 6, p. 1038-1045, 2005.

DERISIO, J. C. **Introdução ao controle de poluição ambiental**. 3. ed. São Paulo: Signus, 2007. 188 p.

DOURADO, P. L. R. **Interferência do inseticida fipronil nas respostas ao estresse oxidativo de tilápias do nilo mediadas pelo ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), durante períodos de hipóxia**. 2019. 119 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Biociências, Universidade do Estado de São Paulo, São José do Rio Preto, 2019.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. In: **Biochemical Pharmacology**. Department of Pharmacology, University of California Medical Center, San Francisco, California, USA, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

EL-MURR, A. E. *et al.* Histopathological, Immunological, Hematological and Biochemical Effects of Fipronil on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Veterinary Science & Technology**, [s.l.], v. 06, n. 05, p. 26-35, 2015.

EMBRAPA (ed.). **A introdução da tilápia em ambientes diversos de sua origem e as consequências negativas**. Macapá, 2019. 3 p.

FREITAS, D. R. J.; VAZ JUNIOR, I. S.; MASUDA, A. Expressão e atividade enzimática de glutathione s-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.99-104, 2008.

FUJIOKA, K.; CASIDA, J. E. Glutathione s-transferase conjugation of organophosphorus pesticides yields s-phospho-, s-aryl-, and s-alkylglutathione derivatives. **Chemical Research in Toxicology**, [s.l.], v. 20, n. 8, p. 1211-1217, 2007.

GHOLAMI-SEYEDKOLAEI, S. J. *et al.* Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 98, p. 135-141, 2013.

GLUSCZAK, L. *et al.* Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 65, n. 2, p. 237-241, 2006.

HAN, S. *et al.* Blood acetylcholinesterase level is a potential biomarker for the early detection of cerebral amyloid deposition in cognitively normal individuals. **Neurobiology of Aging**, [s.l.], v. 73, p. 21-29, 2019.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione s-transferase supergene family: regulation of *gst* and the contribution of the Isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology**, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 445-520, 1995.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.1170-1179, 2008.

IGNÁCIO, N. F. **Recuperação de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) sobreviventes à intoxicação aguda por fipronil**. 2018. 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, 2018.

JIRAUNGKOORSKUL, W. *et al.* Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology**, [s.l.], v. 18, n. 4, p. 260-267, 2003.

JIRAUNGKOORSKUL, W. *et al.* Histopathological Effects of Roundup, a Glyphosate Herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Scienceasia**, [s.l.], v. 28, n. 2, p. 121, 2002.

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

KIM, J. *et al.* Characterization of a catalase from red-lip mullet (*Liza haematocheila*): demonstration of antioxidative activity and mrna upregulation in response to immunostimulants. **Gene**, [s.l.], v. 712, 2019.

LANGIANO, V. C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 147, n. 2, p. 222-231, 2008.

LOPES, F. M.; SANDRINI, J. Z.; SOUZA, M. M. Toxicity induced by glyphosate and glyphosate-based herbicides in the zebrafish hepatocyte cell line (ZF-L). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 162, p. 201-207, 2018.

LUNARDELLI, B. *et al.* Chromium accumulation and biomarker responses in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* caged in a river under the influence of tannery activities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 153, p. 188-194, 2018.

MANRIQUE, W. G.; MACHADO NETO, J. G. Toxicidad aguda y riesgo ambiental del fipronil para el guppy (*Poecilia reticulata*). **The Biologist**, [s.l.], v. 6, p. 85-93, 2008.

MARTINS, A. P. **Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos**. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MEDEIROS, H. C. D. *et al.* Effect of fipronil on energy metabolism in the perfused rat liver. **Toxicology Letters**, [s.l.], v. 236, n. 1, p. 34-42, 2015.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, [s.l.], v. 81, n. 6, p. 781-787, 2010.

MOTA, W. M. *et al.* Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.624-628, 2012.

OOST, R. D.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.57-149, 2003.

PARK, H. *et al.* Developmental toxicity of fipronil in early development of zebrafish (*Danio rerio*) larvae: disrupted vascular formation with angiogenic failure and inhibited neurogenesis. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 385, p. 121531, 2020.

PEAKALL, D. **Animal biomarkers as pollution indicators**, 1 ed. Londres: Chapman & Hall, 1992.

PEREIRA, R. S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. In: **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**. IPH - UFRGS. v. 1, n. 1, p. 20-36, 2004.

PERRY, S. F. THE CHLORIDE CELL: structure and function in the gills of freshwater fishes. **Annual Review of Physiology**, [s.l.], v. 59, n. 1, p. 325-347, 1997.

PETRONILHO, E. C.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. Acetilcolinesterase: alzheimer e guerra química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.3-14, 2011.

QUEIROZ, G. M. P. *et al.* Transporte de glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 190-195, 2011.

RAMSDORF, W. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. 2011. 178 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

RESENDE, M. *et al.* **Pedologia**: base para distinção de ambientes. 5. ed. Lavras: Ufla, 322 p., 2007.

RODRIGUES, H. G. **Effect of glyphosate on the stability of erythrocytes from humans and rattus norvegicus in physiologic saline solution**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

SÁNCHEZ, J. A. A. *et al.* Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*. **Chemosphere**, [s.l.], v. 177, p. 200-210, 2017.

SANDRINI, J. Z. *et al.* Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: in vitro studies. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 130-131, p. 171-173, 2013.

SHIOGIRI, N. S. *et al.* Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 388-396, 2012.

SILVA, C. C. *et al.* Effect of mixture of diazinon and benzo[a]pyrene in glutathione s-transferase of Nile tilapia. **O Mundo da Saúde**, [s.l.], p. 9-15, 2014.

SILVA, G. F. *et al.* **Tilápia-do-Nilo**: criação e cultivo em viveiros no estado do paraná. Curitiba: Gia, 2015. 290 p.

SOUSA, S. R. *et al.* Toxicidade aguda de glifosato em alevinos de pacamã. In: **AQUACIÊNCIA**, Belo Horizonte. AQUACIÊNCIA, 2016. v. 1.

STECKERT, L. D. *et al.* Trace elements and microbiological parameters in farmed Nile tilapia with emphasis on muscle, water, sediment and feed. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, [s.l.], v. 54, n. 4, p. 237-246, 2019.

TRÍDICO, C. P. *et al.* Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo[a]pyrene and diazinon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 73, n. 5, p. 858-863, 2010.

TUCCI, C. E. M. **Águas urbanas**. Estudos Avançados, [S. l.], v. 22, n. 63, p.97-112, 2008.

USEPA. **New pesticide fact sheet**. PB96- 181516. EPA737-F-96-005. Washington: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 1996. p. 1-10.

WU, H. *et al.* Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 115, p. 9-14, 2014.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: Rima, 486 p., 2008.

ZAIA, D. A. M; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, [s.l.], v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZHAO, X. *et al.* Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s.l.], v. 310, n. 1, p. 192-201, 2004.