

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

Recuperação de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) sobreviventes à intoxicação aguda por fipronil

Naiara Fernanda Ignácio

Bióloga, Mestra e Doutora em Biologia Aquática

Jaboticabal, São Paulo
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

**Recuperação de alevinos de pacu (*Piaractus
mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis
niloticus*) sobreviventes à intoxicação aguda
por fipronil**

Naiara Fernanda Ignácio

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Aquática.

Jaboticabal, São Paulo
2018

I44r Ignácio, Naiara Fernanda
Recuperação de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e
tilápia (*Oreochromis niloticus*) sobreviventes à intoxicação com fipronil.
– – Jaboticabal, 2018
vii, 88 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Centro de Aquicultura da UNESP
(CAUNESP) 2018

Orientador: Joaquim Gonçalves Machado Neto
Banca examinadora: Cynthia Venâncio Ikefuti, Luciana Maria
Saran, Marcello Pardi de Castro, Sílvia Patrícia Carraschi.
Bibliografia

1. Fipronil-contaminação. 2. Histologia. 3. Acetilcolinesterase. 4.
Biomarcadores. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.31:611



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

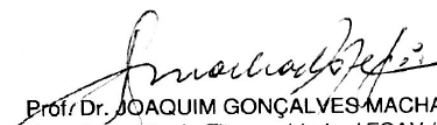
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Recuperação de alevinos de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) sobreviventes à intoxicação aguda por fipronil

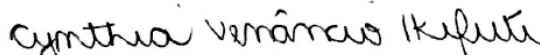
AUTORA: NAIARA FERNANDA IGNÁCIO

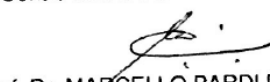
ORIENTADOR: JOAQUIM GONÇALVES MACHADO NETO

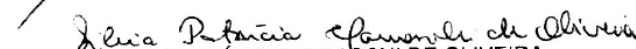
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOAQUIM GONÇALVES MACHADO NETO
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. LUCIANA MARIA SARAN
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. CYNTHIA VENÂNCIO IKEFUTI
./ Centro Universitário do Norte Paulista, UNORP, São José do Rio Preto-SP


Prof. Dr. MARCELLO PARDI DE CASTRO
./ Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto-SP


Profa. Dra. SILVIA PATRÍCIA CARRASCHI DE OLIVEIRA
Curso de Agronomia / Universidade de Araraquara, UNIARA, Araraquara-SP

Jaboticabal, 25 de maio de 2018.

Dedico

***Aos meus queridos pais, Shirley e Luiz,
por serem as melhores pessoas que já conheci e pelo esforço em oferecer
as melhores oportunidades para mim e para minha irmã.***

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto, pela orientação, dedicação e paciência. Obrigada por ter investido seu tempo e atenção em meus estudos, no desenvolvimento deste trabalho e por todo o ensinamento durante meu curso.

Agradecimento especial aos meus pais, Shirley Ferreira Ignácio e Luiz Carlos Vieira Ignácio, e minha irmã, Natália Ariele Ignácio, pelo apoio, convivência neste tempo de doutoramento e por sempre estarem dispostos a ajudar. Ao meu companheiro de todas as horas e motivador para ser uma pessoa melhor, Kenai, por ser o melhor cachorro e amigo que alguém poderia ter.

Ao meu namorado, amigo e companheiro Felipe Escudeiro Pavani, que esteve comigo em todo o meu processo de formação acadêmica, nos momentos difíceis e nos dias finais deste trabalho, oferecendo toda ajuda, atenção e carinho que eu poderia receber.

Aos amigos, Cynthia Venâncio Ikefuti, Silvia Patrícia Carraschi, Érica Soares Roncoletta, Aline Marcari Marques, Tiago Benatti e Lais Bellodi que acreditaram em mim e me apoiaram em todas as minhas decisões, obrigada pelos bons momentos e pelas boas conversas que sempre me ajudaram a traçar o melhor caminho.

Aos amigos e colegas de laboratório (Laborseg): Nicoli Mello, Ângela A. Machado e Ana Carla Coleone, pela amizade e colaboração. A toda equipe do laboratório de Bioquímica da UFSCAR pela paciência e ajuda em uma etapa crucial deste trabalho.

À Secretária da Pós-graduação do CAUNESP, Veralice Capatto e David Oliveira Lorente pela amizade e atendimento.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP pelo oferecimento e oportunidade da realização do curso de Doutorado.

E também agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento deste projeto.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	vi
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo geral.....	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Contaminação ambiental por agrotóxicos	6
3.2. Fipronil.....	8
3.3. Ensaio ecotoxicológico com o inseticida fipronil	10
3.4. Biomarcadores de intoxicação	12
3.5. Limite de Aceitabilidade de Inibição da AChE	18
3.6. Organismos-teste	18
3.6.1. Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	19
3.6.2. Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Período de observação e aclimação	21
4.2. Avaliação da toxicidade aguda em condições de laboratório	21
4.2.1. Ensaio para o controle de sensibilidade e sanidade dos peixes	21
4.2.2. Ensaio preliminares e definitivos com o fipronil.....	23
4.3. Ensaio em condições de mesocosmos para avaliação da recuperação dos peixes após a exposição aguda ao fipronil	24
4.4. Análise histológica de brânquias, fígado e rins	26
4.5. Análise da atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE).....	28
4.6. Limite de aceitabilidade de inibição da AChE.....	30
4.7. Análises estatísticas do peso corpóreo e da atividade da AChE	30

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Avaliação da toxicidade aguda em condições de laboratório	31
5.1.1. <i>Piaractus mesopotamicus</i> (pacu).....	31
5.1.2. <i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia)	33
5.2. Avaliação da recuperação dos peixes após a exposição aguda ao fipronil	36
5.2.1. <i>Piaractus mesopotamicus</i> (pacu).....	36
5.2.1.1. Análise Histológica	41
5.2.1.1.1. Brânquias	41
5.2.1.1.3. Rim.....	46
5.2.1.2. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE).....	49
5.2.1.2.1. Cérebro dos peixes pacu	49
5.2.1.2.2. Músculo dos peixes pacu	52
5.2.1.3. Limite de aceitabilidade de inibição da AChE para o pacu.....	54
5.2.1.4. Análise da qualidade de água	56
5.2.2. <i>Oreochromus niloticus</i> (Tilápia)	57
5.2.2.1. Análise histológica.....	61
5.2.2.1.1. Brânquias	61
5.2.2.1.2. Fígado	63
5.2.2.1.3. Rim.....	65
5.2.2.2. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE).....	66
5.2.2.2.1. Cérebro dos peixes tilápia	66
5.2.2.2.2. Músculo dos peixes tilápia.....	69
5.2.2.3. Limite de aceitabilidade de inibição da AChE para tilápia	71
5.2.2.4. Análise de qualidade de água	73
6. CONCLUSÃO	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

INDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Esquema da inibição de GABA pelo inseticida fipronil. (FONTE: https://www.pragaseeventos.com.br)	9
Figura 2. Esquema de inibição da AChE. A) Fosforilação. B) Carbamilação. Glu – glutamato; Ser – serina; Ala – alanina; R – grupo alquil; O – grupo alquil ou amida; R1 – grupo O-alquil ou amida; X – grupo abandonador. (HORNBERG, TUNEMALM e EKSTROM, 2007).	14
Figura 3. Esquema da liberação da enzima AChE. (Fonte: PETRONILHO, PINTO & VILLAR, 2011).	14
Figura 4. Carta controle de sensibilidade e sanidade do laboratório para o peixe tilápia.	22
Figura 5. Ensaios definitivos com inseticida fipronil para o pacu e para a tilápia. A) Ensaio preliminar com fipronil para o pacu. B) Observação dos sinais de intoxicação no ensaio preliminar com fipronil para o pacu: natação errática (seta). C) Avaliação da mortalidade no ensaio preliminar com fipronil para tilápia.	24
Figura 6. Experimentos de recuperação. A) Administração de fipronil na água de um dos tanques do ensaio de recuperação de pacu. B) Administração de fipronil no ensaio de recuperação de tilápia. C) Caixas para a transferência dos peixes sobreviventes.	25
Figura 7. A) Pesagem de um dos peixes sobreviventes de tilápia coletado no 1º dia após a exposição aguda ao fipronil, para fazer as análises histológica e enzimática. Coleta de brânquias do peixe pacu (1º dia de coleta). C) Coleta de músculo do peixe tilápia (1º dia de coleta). D) Observação das lâminas histológicas no sistema de microscopia. E) Preparação da placa para leitura da enzima AChE de cérebro e músculo do peixe pacu.	27
Figura 8. Observação dos sinais de intoxicação em pacu após administração do fipronil. A) Perda da capacidade de arfagem (seta). B) Mudança de coloração de claro para escuro. C) Mortalidade dos peixes na maior concentração (0,64 mg.L ⁻¹).	37

Figura 9. Fotomicrografia de cortes transversais das brânquias de pacu. Coloração HE. **A)** Aumento de 40x: Histoarquitetura das brânquias do peixe pacu no controle, lamelas primárias (LP) e secundárias (LS). **B)** Aumento de 40x: LP e LS de pacu sobrevivente à 0,56 mg.L⁻¹ de fipronil. **C)** Aumento de 40x: hiperplasia do epitélio lamelar (círculo vermelho), estase (círculo preto) e início de aneurisma (círculo vermelho com asterisco) no peixe sobrevivente à 0,61 mg.L⁻¹. **D)** Aumento de 100x: Edema subepitelial (seta) no peixe sobrevivente à 0,64 mg.L⁻¹. Barra: 50 µm. 42

Figura 10. Fotomicrografia de cortes transversais de fígado de pacu. Coloração HE. Aumento de 40x. **A)** pacu do controle, hepatócitos normais. **B)** congestão da veia central de pacu sobrevivente à 0,59 mg.L⁻¹ de fipronil. **C)** hepatócitos de pacu sobrevivente à 0,61 mg.L⁻¹. **D)** núcleo excêntrico da célula (seta pequena) e vacuolização citoplasmática (seta) em pacu sobrevivente à 0,64 mg.L⁻¹. Barra: 50 µm. 45

Figura 11. Fotomicrografia de cortes transversais de rim de pacu. Coloração HE. Aumento 40x. **A e B)** peixe do controle (A) e sobrevivente à 0,59 mg.L⁻¹ de fipronil, túbulo distal (TD); túbulo proximal (TP); glomérulo (GI). **C e D)** pacu sobrevivente à 0,64 mg.L⁻¹; aumento do espaço de Bowman (seta), rompimento (*) e vacuolização celular (**) e oclusão do túbulo (OC). Barra: 50 µm. 48

Figura 12. Inibição da enzima AChE no cérebro de pacu nas três coletas realizadas. Médias de porcentagens de inibição da AChE em cada concentração durante o período de recuperação seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si. 55

Figura 13. Inibição da enzima AChE no músculo de pacu nas três coletas realizadas. Médias de porcentagens de inibição da AChE em cada concentração durante o período de recuperação seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si. 55

Figura 14. Observação dos sinais de intoxicação e comportamento do peixe tilápia após administração do fipronil. **A)** Perda da capacidade de arfagem (seta) e mortalidade (seta). **B)** Permanência dos animais no fundo da caixa. **C)** Comportamento e alimentação normal dos peixes. 58

Figura 15. Fotomicrografia de cortes transversais das brânquias de tilápia. Coloração HE. Aumento 40x. **A)** Histoarquitetura das brânquias do peixe tilápia no controle,

lamelas primárias (LP) e secundárias (LS). **B)** LS com desarranjo de tilápia sobrevivente à 0,11 mg.L⁻¹ de fipronil. **C)** Hiperplasia do epitélio lamelar (seta) no peixe sobrevivente à 0,15 mg.L⁻¹. **D)** Edema subepitelial (seta) no peixe sobrevivente à 0,20 mg.L⁻¹. Barra: 50 µm..... 61

Figura 16. Fotomicrografia de cortes transversais de fígado de tilápia. Coloração HE. Aumento 40x. **A)** Capilar sinusóide (seta grande) e núcleo excêntrico do hepatócito em peixe sobrevivente à 0,15 mg.L⁻¹ (seta pequena). **B)** Vacuolização citoplasmática (seta) em peixe sobrevivente à 0,20 mg.L⁻¹. Barra: 50 µm..... 63

Figura 17. Fotomicrografia de cortes transversais de rim de tilápia. Coloração HE. Aumento 40x. **A)** Sobrevivente à 0,15 mg.L⁻¹ de fipronil, túbulo distal (TD); túbulo proximal (TP); glomérulo (GI). **B)** Peixe sobrevivente à 0,20 mg.L⁻¹, aumento do espaço de Bowman (seta), rompimento (*) e vacuolização celular (**). Barra: 50 µm. 65

Figura 18. Inibição da enzima AChE no cérebro de tilápia nas três coletas realizadas. Médias de porcentagens de inibição da AChE em cada concentração durante o período de recuperação seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si. 72

Figura 19. Inibição da enzima AChE no músculo de tilápia nas três coletas realizadas. Médias de porcentagens de inibição da AChE em cada concentração durante o período de recuperação seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si. 72

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Tabela 1. Valores de concentração letal 50% (96 horas) obtidos em estudos na literatura.....	11
Tabela 2. Porcentagem de mortalidade nos três ensaios definitivos com fipronil para o pacu, média geral e desvios padrões (DP) após 24 horas de exposição aguda.	31
Tabela 3. Valores médios das variáveis de qualidade da água nos três ensaios definitivos com fipronil para os peixes da espécie pacu após 24 horas de exposição. ...	32
Tabela 4. Porcentagem de mortalidade nos três testes definitivos com fipronil para a tilápia, média e desvios padrões (DP) após 24 horas de exposição aguda.	33
Tabela 5. Valores médios das variáveis de qualidade da água nos três ensaios definitivos com fipronil para os peixes da espécie tilápia (24 horas de exposição).....	35
Tabela 6. Mortalidade dos peixes pacu após 24 horas de exposição ao fipronil.	36
Tabela 7. Valores médios do peso corpóreo dos peixes pacu e desvio padrão (DP) nas três coletas realizadas..	40
Tabela 8. Alterações histológicas nas brânquias de pacu e estágios de dano.	43
Tabela 9. Alterações histológicas no fígado de pacu e estágios de dano.....	46
Tabela 10. Alterações histológicas nos rins de pacu e estágios de dano.	48
Tabela 11. Valores médios da atividade da AChE (mmol/mg ptn/min) e desvio padrão (DP) no cérebro de pacu nas três coletas realizadas durante o período de recuperação.....	50
Tabela 12. Valores médios da atividade da AChE (mmol/mg ptn/min) e desvio padrão (DP) no músculo de pacu nas três coletas realizadas durante o período de recuperação.....	53
Tabela 13. Valores médios das variáveis de qualidade da água durante o ensaio de recuperação dos peixes da espécie pacu aos 1, 15, 21 e 30 dias após a transferência dos sobreviventes às concentrações de fipronil.	56

Tabela 14. Mortalidade dos peixes tilápia após 24 horas de exposição ao fipronil.	57
Tabela 15. Mortalidade dos peixes da espécie tilápia nos tanques de recuperação.	59
Tabela 16. Valores médios do peso corpóreo dos peixes tilápia e desvio padrão (DP) nas três coletas realizadas.	60
Tabela 17. Alterações histológicas nas brânquias de tilápia e estágios de dano.	63
Tabela 18. Alterações histológicas no fígado de tilápia e estágios de dano.	64
Tabela 19. Alterações histológicas nos rins de tilápia e estágios de dano.	66
Tabela 20. Valores médios da atividade da AChE (mmol/mg ptn/min) e desvio padrão (DP) no cérebro de tilápia nas três coletas realizadas durante o período de recuperação.	67
Tabela 21. Valores médios da atividade da AChE (mmol/mg ptn/min) e desvio padrão (DP) no músculo de tilápia nas três coletas realizadas durante o período de recuperação.	69
Tabela 22. Valores médios das variáveis de qualidade da água durante o ensaio de recuperação dos peixes da espécie tilápia aos 1, 15, 21 e 30 dias após a transferência dos sobreviventes às concentrações de fipronil.	73

RESUMO

Objetivou-se avaliar a capacidade de recuperação de alevinos de peixes das espécies de cativo pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) após a intoxicação aguda com fipronil. A capacidade de recuperação foi avaliada nos peixes sobreviventes as concentrações de fipronil (Regent® 800WG) (0,56; 0,59; 0,61 e 0,64 mg.L⁻¹ para o pacu; e 0,9; 0,11; 0,15 e 0,20 mg.L⁻¹ para a tilápia) que causaram aproximadamente 10, 30, 50 e 70% de mortalidade após 24 horas de exposição aguda. Os peixes sobreviventes foram transferidos para água limpa. As avaliações foram realizadas no dia da transferência para a água limpa, e aos 15 e 30 dias de recuperação. Foram avaliadas as lesões em tecidos de brânquias, fígado e rins, e a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e no músculo. Os sinais observados foram natação errática, espasmos musculares e mudança de coloração. Após 24 horas de exposição aguda, o fipronil, nas concentrações avaliadas, causou lesões estruturais nas brânquias, fígado e rins dos peixes, entre 70 e 73% de inibição da atividade da AChE no cérebro e entre 20 e 35% da AChE no músculo. Os peixes se recuperaram completamente dos sinais de intoxicação no terceiro dia. Aos 30 dias de recuperação, os peixes das duas espécies se recuperaram das lesões nos tecidos das brânquias, fígado e rins causadas pelo fipronil em concentração nas águas de até 0,61 mg.L⁻¹ para o pacu, que causa até 54,2 % mortalidades; e de até 0,15 mg.L⁻¹ para a tilápia, que causa até 46,7% de mortalidade. Em concentrações superiores a estas, o fipronil causou maior mortalidade e os peixes não se recuperaram totalmente. Os 30 dias em água limpa não são suficientes para a recuperação total da atividade da AChE, o que não altera o peso corpóreo. Portanto, os limites de aceitabilidade de inibição da atividade da AChE após 24 horas de exposição aguda ao fipronil é de 70% no cérebro dos peixes de ambas as espécies, 30% no músculo de pacu e 22% no da tilápia. As concentrações de fipronil não alteram as variáveis de qualidade de água.

Palavras-chave: fipronil; contaminação, histologia, acetilcolinesterase, biomarcadores

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the recovery capacity of juvenile fishes of the species pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) after acute intoxication with fipronil. Recovery capacity was evaluated in fishes survivors from fipronil concentrations (Regent® 800WG) (0,56; 0,59; 0,61 e 0,64 mg.L⁻¹ para for pacu; e 0,9; 0,11; 0,15 e 0,20 mg.L⁻¹ for tilápia) in water that caused about 10, 30, 50 and 70% of mortality after 24 hours of acute exposure. The survivors were transferred to clean water. The evaluations were done on the day of transfer to clean water, and at 15 and 30 days of recovering. Damages were evaluated in gills, liver and kidneys tissues and the enzyme acetylcholinesterase (AChE) activity in the brain and muscle. The signs observed were erratic swimming, muscle spasms and color change. After 24 hours of acute exposure, fipronil at the tested concentrations causes histological damages in the gills, liver and kidneys of the fishes, 70 to 73% inhibition of AChE activity in the brain and between 20 and 35% in AChE in the muscle. The fishes recover completely from the intoxication signs on the third day. At 30 days of recovering, fishes from both species recovered from the damage in gills, liver and kidneys caused by fipronil at concentrations up to 0.61 mg.L⁻¹ for pacu, which cause up to 54.2% of mortality; and up to 0.15 mg.L⁻¹ for tilapia, which cause up to 46.7% of mortality. In higher concentrations than these, fipronil causes higher mortalities and the fishes do not recover fully. The 30 days in clean water are not enough for the total recovery of AChE activity, which does not change the body weight. Therefore, the acceptability of inhibition limit of AChE activity after 24 hours of acute fipronil exposure is 70% in fish brain of both species, 30% in pacu muscle and 22% in tilapia muscle. Fipronil concentrations do not alter the water quality variables.

Key-words: fipronil, contamination, histology, acetylcholinesterase, biomarkers.

1. INTRODUÇÃO

A utilização intensiva de agrotóxicos na produção agrícola é necessária para do controle dos organismos danosos às plantas cultivadas e para evitar perdas na produtividade agrícola.

O fipronil é uma substância derivada do fenilpirazol que intoxica os animais por meio da ação inibidora não competitiva no receptor pós-sináptico do ácido gama-aminobutírico (neurotransmissor inibitório GABA). O fipronil é um dos inseticidas mais utilizados no controle de insetos prejudiciais à cultura de cana-de-açúcar, como cupins, besouros e broca da cana (OHI et al., 2004).

A aplicação do fipronil em grandes áreas, como a cultura da cana-de-açúcar, resulta em grande quantidade desta substância no ambiente. As movimentações de águas das chuvas ou de irrigação carregam o fipronil diluído e contaminam as águas da rede hidrográfica dentro e no entorno.

As águas das pisciculturas localizadas na rede hidrográfica próxima ou até mesmo dentro de áreas de cultivo agrícola podem ser contaminadas com o fipronil oriundo das áreas agrícolas no entorno e os peixes de cativeiro serem intoxicados pelo contato direto com o inseticida (SOSO et al., 2007).

Pelo fato de a contaminação das águas ser um problema de grande importância mundial, ocorreu um grande aumento nas pesquisas realizadas para a avaliação das alterações causadas por estas substâncias químicas em organismos aquáticos.

Os peixes intoxicados devido à contaminação das águas morrem ou sobrevivem à intoxicação, com ou sem sequelas. Os animais sobreviventes à intoxicação com o fipronil sofrem alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Além disso, tais alterações afetam as taxas de crescimento, reprodução e comportamento dos animais aquáticos (VAN DER OOST et al., 2003).

Assim, é necessário questionar: os animais sobreviventes à intoxicação aguda com o fipronil se recuperam de tais sequelas suficientemente para serem mantidos no sistema de produção?

Além das perdas econômicas dos piscicultores após a contaminação da água com inseticidas, intoxicação e se ocorrer a morte de uma parte do lote surge a questão: o que fazer com os peixes sobreviventes à intoxicação? Descartar ou continuar na produção?

Observa-se que existem poucos estudos sobre a recuperação dos peixes intoxicados e da intensidade de intoxicação, ou porcentagem de sobrevivência dos peixes, que possibilita o aproveitamento dos animais sobreviventes no sistema de produção.

Os estudos de contaminação das águas pelo inseticida fipronil, a intoxicação e a sobrevivência dos peixes expostos são de interesse da pesquisa aplicada e de piscicultores. Os produtores de peixes ainda não têm o conhecimento de o que fazer com os animais sobreviventes nas águas contaminadas com concentrações de fipronil que causa mortalidade de parte do lote de peixes.

Neste cenário, destaca-se com grande relevância a informação de qual a porcentagem de mortalidade de peixes do lote em que os animais sobreviventes podem ser aproveitados sem redução da produtividade da piscicultura.

Os efeitos de agrotóxicos no ambiente aquático são avaliados por meio de ensaios ecotoxicológicos que auxiliam na antecipação e no diagnóstico de possíveis impactos ecológicos (ESPÍNDOLA et al., 2003). A expressão dos efeitos de substâncias químicas torna-se visível quando estão presentes em altas concentrações, como as que causam mortalidade dos peixes. Porém, também provocam alterações histológicas e fisiológicas não externalizadas em organismos não alvos, no caso os peixes sobreviventes à intoxicação aguda.

Portanto, os conhecimentos das alterações fisiológicas e histológicas nos peixes expostos às concentrações de fipronil que causam entorno de 10, 30, 50 e 70% de mortalidade são fundamentais para determinar a porcentagem de mortalidade dos peixes do lote e se os animais sobreviventes podem ser aproveitados sem redução na produtividade da piscicultura.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a capacidade de recuperação de alevinos de peixes das espécies pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) sobreviventes à exposição aguda ao inseticida fipronil e definir qual a porcentagem de mortalidade dos peixes em que os sobreviventes podem continuar no sistema de produção.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar as concentrações do fipronil que resultam em aproximadamente 10, 30, 50 e 70% de mortalidade de alevinos dos peixes pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) em exposição aguda (24h).
- 2) Avaliar os sinais clínicos de intoxicação em ambas as espécies causados pela exposição aguda (24h) ao fipronil nas concentrações determinadas.
- 3) Registrar as alterações histológicas causadas pela exposição aguda (24h) às concentrações de fipronil parcialmente letais em brânquias, fígado e rins de pacu e tilápia.
- 4) Quantificar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e nos músculos de pacu e tilápia sobreviventes à exposição aguda (24h) às concentrações de fipronil avaliadas.
- 5) Avaliar a recuperação de pacu e tilápia intoxicados com fipronil com relação aos sinais clínicos de intoxicação, às alterações histológicas e aos efeitos na atividade da enzima AChE em 15 e 30 dias após a exposição aguda em água livre de contaminantes.
- 6) Determinar o limite de aceitabilidade de inibição da AChE no cérebro e no músculo de pacu e tilápia sobreviventes à exposição aguda ao fipronil.
- 7) Registrar as alterações nas variáveis de qualidade de água causadas pelo fipronil durante os ensaios em condições de laboratório e de recuperação dos peixes.
- 8) Determinar a porcentagem de mortalidade dos peixes do lote em que os animais sobreviventes ao fipronil podem ser aproveitados na piscicultura.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Contaminação ambiental por agrotóxicos

O ambiente sofre contínua degradação pela ação do homem em atividades agrícolas e urbanas como, por exemplo, a liberação de poluentes na água, na terra e no ar.

O uso de agrotóxicos na agricultura brasileira causa danos tanto para o ambiente quanto para a saúde pública, devido a fatores como o uso indiscriminado, alta toxicidade e precariedade da vigilância (RABOUILLE et al., 2006).

O Brasil é considerado o maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Segundo boletim anual do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama). Em 2016, o relatório descreve que o Brasil produziu mais de 510 milhões toneladas de ingredientes ativos para agrotóxicos e importou mais de 420 milhões, as quais são quantidades preocupantes nos dias atuais para o Brasil e os órgãos ambientais (IBAMA 2016).

Os ambientes aquáticos próximos aos locais em que se realizam atividades agrícolas podem ser contaminados pelos agrotóxicos. Estas substâncias químicas alcançam a água de rios e do mar por diversas vias, tanto com o carreamento pelas chuvas e pelo ar quanto por acidentes durante o uso de substâncias tóxicas em processos agrícolas, e por lançamento de esgotos domésticos e efluentes industriais (ARIAS et al., 2007).

A vulnerabilidade do ambiente aquático depende das propriedades físicas e químicas dos contaminantes, da concentração que chega ao ecossistema, se a descarga do contaminante é pontual ou difusa, da localização do ecossistema em relação ao ponto onde o contaminante foi liberado e da capacidade dos organismos deste ecossistema de armazenar e biotransformar estas substâncias (AZEVEDO e CHASIN, 2003; MOZETO e ZAGATTO, 2006).

As substâncias tóxicas podem pertencer a diversas classes de compostos como agrotóxicos e fertilizantes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (compostos emergentes) (RASHED, 2001). Com o passar do tempo, as atividades

agrícolas são cada vez mais reconhecidas pelo impacto ambiental que causam por meio de resíduos de agrotóxicos e fertilizantes (MORON et al., 2006).

Os agrotóxicos e as demais substâncias químicas, mesmo utilizadas em baixas concentrações no ambiente, afetam os ecossistemas e causam redução da biodiversidade (GRISOLIA, 2005). Os inseticidas, por exemplo, geralmente são aplicados em grande quantidade em áreas extensas, o que resulta em longa permanência no ambiente e causam sérios problemas na qualidade das águas superficiais e subterrâneas (BAIRD, 2002), além de resultar em intoxicação de muitas espécies não-alvo, inclusive os peixes de cativeiro (CARR e CHAMBERS, 1996).

Dentre os processos que levam as substâncias químicas para o ambiente aquático, destacam-se a ocorrência de volatilização do produto para a atmosfera e, conseqüentemente, a deposição na água através da precipitação (SPADOTTO et al., 2010).

Outra ocorrência importante é a lixiviação dos agrotóxicos que tem grande influência na contaminação de águas subterrâneas, sendo que o alcance desta contaminação depende das características da molécula, do solo, da velocidade de drenagem das águas nos solos e da profundidade do lençol freático. Além disso, o carreamento superficial causado pela enxurrada também é uma rota preocupante, pois pode causar a contaminação de áreas não alvo, bem como escoar para águas no entorno das lavouras (SPADOTTO et al. 2010).

A intensidade do vento também influencia na dispersão das moléculas dos agrotóxicos pelo processo de deriva, no qual o composto é transportado durante a aplicação nas culturas ou no solo. No caso de ausência de vento, as gotas muito finas ficam suspensas no ar devido à estabilidade atmosférica, sendo dispersas por vários quilômetros do local de aplicação e, muitas vezes, removidas da atmosfera pela ação da chuva (SPADOTTO, 2006).

Portanto, o monitoramento destas substâncias tóxicas liberadas no ambiente permite a implementação de medidas de prevenção de danos nos ecossistemas e a elaboração de medidas corretivas e educativas (KRÜGER, 2001).

3.2. Fipronil

As atividades agrícolas são reconhecidas como causadoras de impactos e alterações ambientais, sendo os resíduos de agrotóxicos e fertilizantes as principais causas de contaminação das águas superficiais e subterrâneas locais.

Os inseticidas causam intoxicações e provocam lesões em pontos vitais dos organismos alvos de controle e dos organismos não-alvos presentes no ambiente, quando ambos possuem o ponto de ação tóxica (DOGAN & CAN, 2011).

O fipronil tem o nome químico 5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)-fenil][(trifluorometil) sulfinil]-1H-pirazole-3-carbonitril, de acordo com a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

Este inseticida pertence ao grupo dos compostos fenil pirazólicos, cuja ação tóxica principal é a interferência na passagem de íons cloreto pelos canais de cloro nas membranas citoplásticas dos neurônios, processo que é regulado pelo ácido gama aminobutírico (GABA) (MOHLER et al., 2004).

Os canais iônicos na membrana citoplasmática de neurônios são compostos por várias subunidades, que são o sítio de reconhecimento do GABA e de substâncias antagonistas e agonistas (MOHLER et al., 2004).

O GABA é caracterizado como um neurotransmissor inibitório essencial para o sistema nervoso central. Portanto, o inseticida fipronil atua no sistema nervoso, paralisa ou mata os organismos alvos e não alvos que possuem neurônios (RHÔNE-POULENC, 1998) (Figura 1).

Em animais domésticos, o fipronil é usado no controle de carrapatos e pulgas e também é usado em ambientes domésticos para a eliminação de formigas, baratas e cupins.

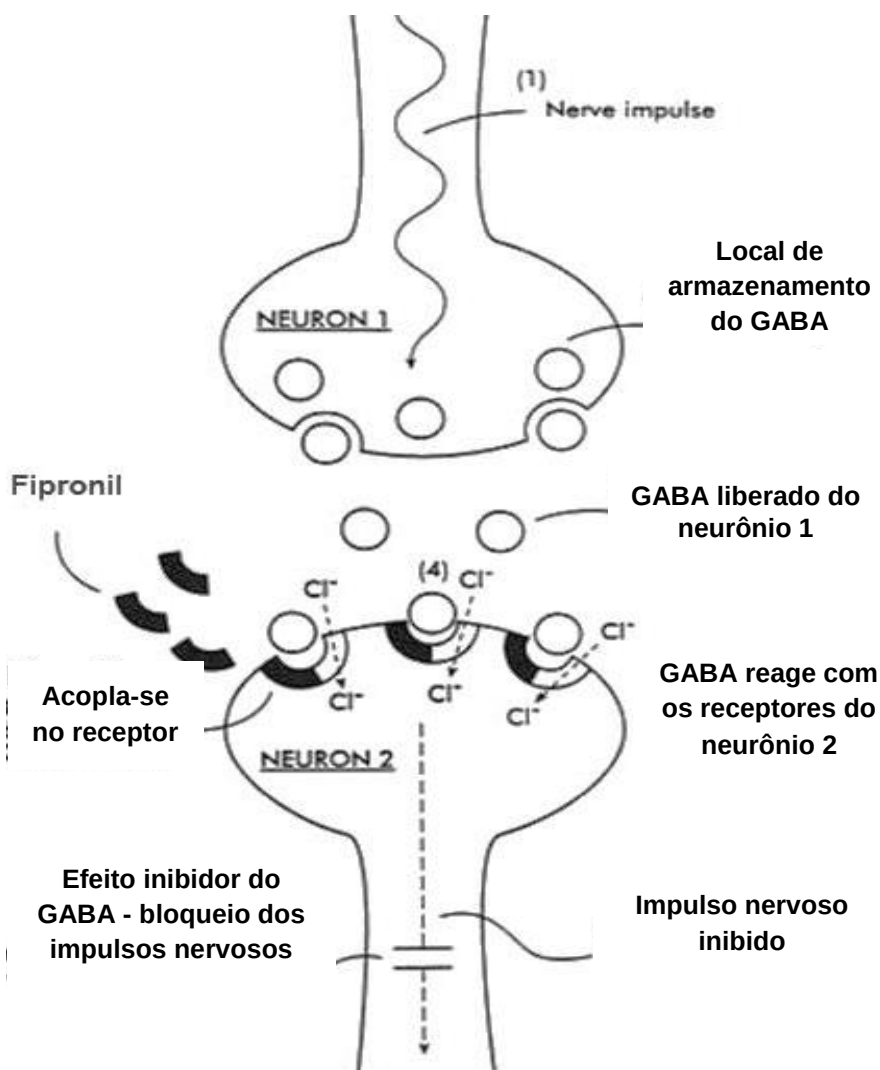


Figura 1. Esquema da inibição de GABA pelo inseticida fipronil.
(FONTE: <https://www.pragaseeventos.com.br>)

No país, a formulação Regent[®] 800WG, com 80% de fipronil, é registrada para formar uma “barreira química” para controlar os insetos na sub-superfície do solo como cupins, besouros, lagartas e brocas nas culturas de algodão, batata, cana-de-açúcar, milho e soja (AGROFIT, 2007). A utilização deste composto em ampla escala deve-se à alta eficácia contra insetos resistentes a outros pesticidas (BOBE et al., 1997).

A dose recomendada da formulação para esta aplicação varia entre 200 e 500 g.ha⁻¹, a depender do inseto a ser controlado (MANRIQUE et al., 2013). A concentração máxima permitida de agrotóxicos na água é estabelecida na resolução CONAMA 357/05 (CONAMA 20/86 revisada). Entretanto, para

compostos fenil-pirazólicos como o fipronil não existem limites definidos para corpos d'água no Brasil.

O fipronil está classificado como um inseticida de moderada mobilidade no solo e com alto potencial de dissolução e transporte em água (Koc¹ varia de 244 a 628), o que contribui para a contaminação da rede hidrográfica próxima à área de aplicação (TINGLE et al., 2003).

Em meio aquático, o fipronil é degradado em desulfinil, um subproduto com ação neurotóxica nos organismos expostos e muito similar à molécula original do fipronil (CONNELLY, 2001), fipronil sulfona que é mais danoso ao ambiente do que o composto original (PERET et al., 2010).

Com relação às águas de rios, o fipronil é detectado devido à degradação lenta e a meia-vida (DT50) de até 100 dias, a depender do modo de aplicação (tratamento de sementes ou da planta) (TINGLE et al., 2003).

Em monitoramento de agrotóxico em dois mananciais no Rio Grande do Sul, o fipronil estava presente em 16% das análises de resíduos, quantificados por Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD). A máxima concentração encontrada deste inseticida foi cerca de 380 vezes superior ao limite de detecção ($1,14 \mu\text{g.L}^{-1}$), que corresponde a $0,003 \mu\text{g.L}^{-1}$ (GRÜTZMACHER et al. 2008).

Em aplicação de fipronil realizada nas lavouras em épocas de chuvas, há grande chance de ocorrer o transporte deste inseticida para o meio aquático mais próximo. Portanto, é essencial o monitoramento do fipronil e demais agrotóxicos em ambientes aquáticos localizados próximos às lavouras.

3.3. Ensaios ecotoxicológicos com o inseticida fipronil

Os ensaios com todos os tipos de organismos aquáticos são realizados para aprimorar os conhecimentos sobre os efeitos dos agentes químicos na biota

¹ Coeficiente de partição na matéria orgânica: coeficiente que gera estimativa da tendência de partição de determinado produto da fase líquida para a matéria orgânica do solo.

aquática, sob condições de campo e de laboratório (ARAÚJO, 2000), para avaliação da toxicidade dos compostos.

A avaliação da toxicidade por meio de ensaios em que se utilizam organismos vivos como bioindicadores é importante para a avaliação da contaminação de ambientes aquáticos. A avaliação da toxicidade dos compostos tóxicos é utilizada para a compreensão dos efeitos de impactos antropogênicos sobre o ambiente.

Por meio de ensaios de avaliação da toxicidade é possível detectar a capacidade de um agente tóxico ou de uma mistura de produzir efeitos deletérios nos organismos vivos, o que permite saber o quão danosa uma substância química pode ser, como e onde se manifestam os efeitos (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

Estudos realizados com fipronil em condições de laboratório determinaram valores de CL50;96 h (mg.L⁻¹) para algumas espécies aquáticas (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de concentração letal 50% (96 horas) obtidos em estudos na literatura.

ESPÉCIE	CL50;96h (mg.L ⁻¹)	REFERÊNCIA
<i>Amphiascus tenuiremis</i>	0,0068	CHANDLER et al., 2004
<i>Daphnia pulex</i>	0,0160	STARK et al., 2005
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,248	USEPA, 1996
<i>Poecilia reticulata</i>	0,080	MANRIQUE et al., 2013
<i>Danio rerio</i>	0,34	CELLA, 2009
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	1,04	CELLA, 2009

Para a espécie de anfíbio *Scinax fuscovarius* foram testadas as concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg.L⁻¹ de fipronil na formulação Regent® 800WG por 96 horas e 30 dias de exposição. Nesse estudo foi avaliada a atividade

da enzima acetilcolinesterase (AChE) do anfíbio. O fipronil não causou nenhum efeito significativo na atividade da AChE, nem na fase larval e nem na fase pós-larval (STEFANI MARGARIDO, 2011).

Em estudo de toxicidade aguda, Cella (2009) calculou a CL₅₀;96h do fipronil para duas espécies de peixes. Para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) foi de 1,04 mg.L⁻¹, que o classifica como moderadamente tóxico para essa espécie de peixe. Para a espécie paulistinha (*Danio rerio*), a CL₅₀;96h do fipronil foi de 0,34 mg.L⁻¹, que o classifica como altamente tóxico.

Até o momento, poucos estudos com o fipronil foram conduzidos com peixes de água doce da América do Sul para avaliação de toxicidade (RABITTO et al., 2005) e sobre as respostas biológicas de espécies de peixes endêmicas brasileiras.

3.4. Biomarcadores de intoxicação

Dentre as estratégias de avaliação de contaminação aquática, uma das mais utilizadas em estudos ecotoxicológicos é o uso de biomarcadores. Os biomarcadores são indicadores de alterações biológicas a nível molecular, celular ou fisiológico nos organismos e que expressam a exposição e os efeitos tóxicos causados pelos poluentes presentes no ambiente (WALKER, 1996).

Entre os Biomarcadores fisiológicos sensíveis aos toxicantes se destacam as enzimas. Existem dois tipos de enzimas estudadas dentre as colinesterases: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), com afinidade pela butirilcolina e conhecida como esterase não-específica ou pseudocolinesterase. Em peixes encontram-se ambas no tecido muscular, enquanto que no cérebro encontra-se somente a AChE (VAN DER OOST et al., 2003).

A acetilcolina é um neurotransmissor responsável pela transmissão de impulsos nervosos. Esta enzima sai do neurônio para a sinapse e após a excitação ser realizada, a acetilcolina precisa retornar para o interior do neurônio onde a célula nervosa volta ao estado de repouso e pode, novamente, ser excitada.

A enzima AChE quebra a acetilcolina em colina e acetato, devido à ligação entre a acetilcolina e o grupo hidroxila do resíduo de serina 203 no centro ativo da

AChE e forma um intermediário-enzima. Este intermediário é responsável por regenerar a acetilcolina para um novo impulso nervoso (KWONG, 2002).

O mecanismo molecular de toxicidade de inseticidas, consiste na fosforilação ou carbamilação do mesmo resíduo de serina. Este processo forma um intermediário organofósforo/carbamilo com a AChE (Figura 2). A enzima fosforilada/carbamilada é muito mais estável e tem uma menor taxa de hidrólise e de regeneração da enzima ativa (KWONG, 2002).

A inibição da AChE causa o acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas, que resulta em hiperexcitação do organismo e pode causar a morte (Figura 3). A enzima acetilcolinesterase (AChE) pode ser utilizada como biomarcador do efeito de compostos tóxicos (BRAGA e VALLE, 2007; VARÓ et al., 2008).

A taxa de regeneração de algumas enzimas fosforiladas é extremamente lenta. Neste caso específico, a AChE fosforilada é inativa. Quando a AChE é inibida por um inseticida, o acúmulo de acetilcolina nas sinapses e junções neuromusculares causa hiperexcitabilidade devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos (KWONG, 2002).

O principal mecanismo de ação tóxica do fipronil é a inibição dos receptores do GABA nos canais de cloro, mas em alguns estudos foi constatado que esse inseticida também causa alterações na atividade da enzima AChE pela fosforilação (Figura 2 A).

Ramsdorf (2011) verificou que o fipronil, nas concentrações de 0,05; 0,10 e 0,23 $\mu\text{g L}^{-1}$, aumentou a atividade da AChE cerebral de peixes da espécie *Rhamdia quelen* e diminuiu em *Anstyanax* sp. e *Danio rerio* depois de 60 dias de exposição.

A AChE está associada às membranas dos terminais axonais colinérgicos pois é produzida em neurônios colinérgicos e secretada na fenda sináptica (Figura 3). Também é considerada uma enzima de alta eficiência catalítica e alta taxa de hidrólise enzimática, de aproximadamente 5.000 moléculas de Ach/s.

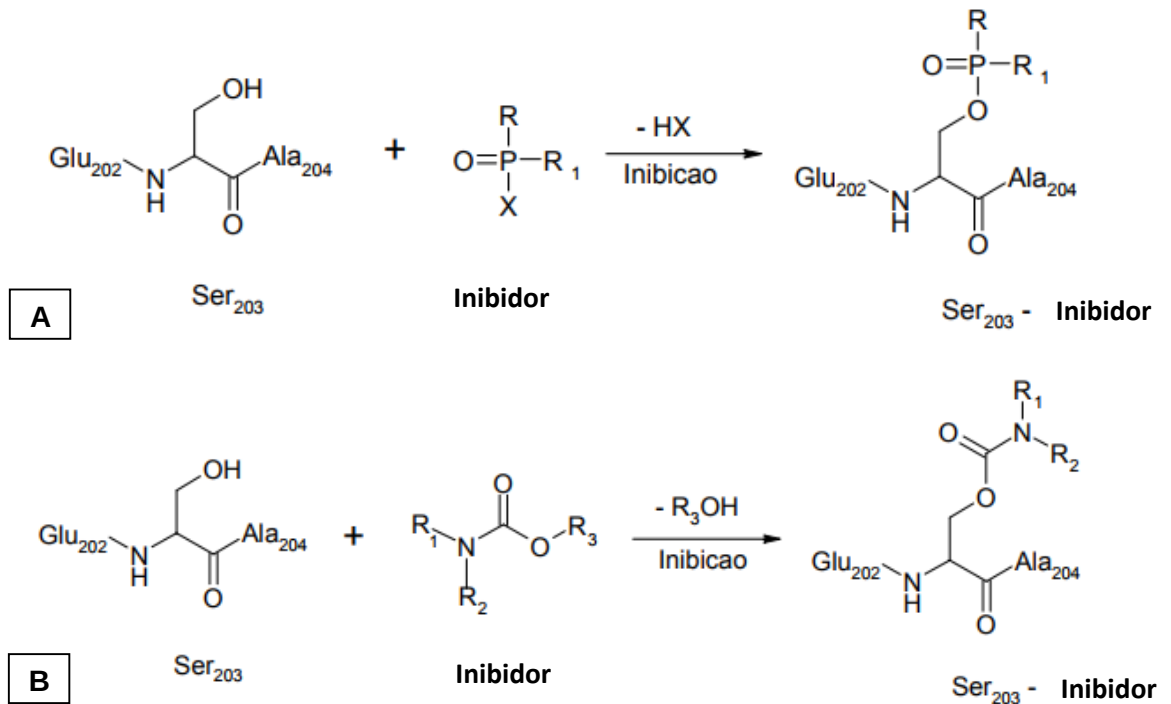


Figura 2. Esquema de inibição da AChE. **A)** Fosforilação. **B)** Carbamilação. Glu – glutamato; Ser – serina; Ala – alanina; R – grupo alquil; O – grupo alquil ou amida; R1 – grupo O-alquil ou amida; X – grupo abandonador. (HORNBERG, TUNEMALM e EKSTROM, 2007).

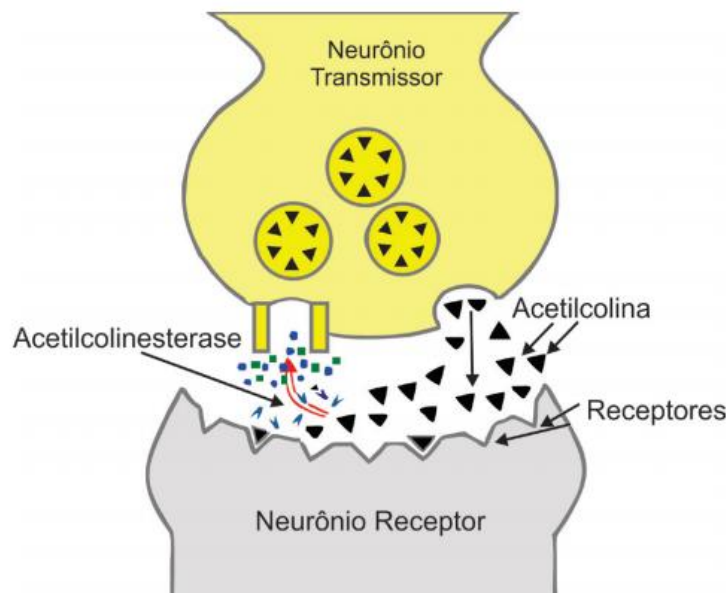


Figura 3. Esquema da liberação da enzima AChE. (FONTE: PETRONILHO, PINTO & VILLAR, 2011).

Em 1914, Dale classificou as ações da acetilcolina em muscarínicas e nicotínicas. Esta classificação foi baseada nos subtipos de receptores colinérgicos

capazes de se ligar na nicotina e na muscarina, respectivamente, e respondem à ativação colinérgica com alta afinidade (VENTURA et al., 2010).

Os receptores colinérgicos nicotínicos (RCN) pertencem à família de receptores ionotrópicos que, quando ativados, adquirem a conformação de canal aberto permeável aos íons Na^+ e K^+ .

Esses receptores são constituídos por cinco subunidades proteicas e estão distribuídos em vários tecidos, incluindo o cérebro e o tecido muscular. Os RCNs presentes nos músculos são heteropentâmeros constituídos por subunidades α , β , γ , δ e ϵ , enquanto que os receptores do cérebro são formados por várias subunidades $\alpha 2$ -10 e $\beta 2$ -47 (VENTURA et al., 2010).

Os RCNs localizados no cérebro distribuem-se nas regiões pré-, pós-, peri- e extrassinápticas, e modulam a liberação de neurotransmissores e, conseqüentemente, a atividade sináptica neuronal (VENTURA et al., 2010).

Os RCNs tem importância em diversos processos, como o aprendizado e a memória, o desenvolvimento neuronal e participa do sistema de recompensa. Essa versatilidade funcional se correlaciona com as diferentes estruturas que esses receptores possuem nas diversas áreas do sistema nervoso. Como exemplo, pode-se citar receptores com subunidades $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ que regulam a transmissão ganglionar e receptores com a subunidade $\alpha 4$ que regulam parcialmente a liberação de dopamina e de glutamato (VENTURA et al., 2010).

Os receptores localizados na região estriatal que possuem a subunidade $\beta 3$ alteram a atividade motora por modular a liberação de dopamina, enquanto que os receptores com a subunidade $\beta 2$ controlam a liberação de GABA e a resposta de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo (VENTURA et al., 2010).

Uma disfunção do gene que sintetiza a subunidade $\beta 2$ é responsável pela atrofia do córtex e perda de neurônios, o que sugere que os RCNs estejam envolvidos em processos de sobrevivência de neurônios, além da fisiologia e manutenção dos circuitos sinápticos neuronais (VENTURA et al., 2010).

Portanto, quando o inseticida fipronil causa a inibição do GABA, ele altera os RCNs no momento em que a molécula se acopla aos mesmos, e altera também a entrada e saída de outras moléculas, como a liberação da enzima AChE.

Além da avaliação de enzimas, as alterações histológicas nos organismos expostos também podem ser utilizadas com biomarcadores para a determinação do grau de poluição do ambiente aquático (CENGIZ, 2006).

Os peixes, geralmente, são sensíveis às mudanças no ambiente, de tal modo que os efeitos tóxicos dos xenobióticos presentes na água são observados em células e tecidos, antes da observação de mudanças no comportamento ou na aparência externa (VAN DYK, 2005).

As principais vias de absorção de poluentes pelos peixes são por meio da alimentação com alimentos contaminados, pelas brânquias, ingestão de água contaminada e através da pele. Os órgãos primeiramente atingidos e afetados pelos agentes químicos tóxicos nos peixes são as brânquias e a pele, devido à grande superfície de contato e por terem células mucosas; que promovem a resistência a patógenos e substâncias tóxicas (SHEPHARD, 1994).

As brânquias dos peixes são compostas por quatro arcos branquiais, dos quais se estendem duas fileiras de lamelas primárias. A partir das lamelas primárias saem as lamelas secundárias, onde ocorrem as trocas gasosas. Estas lamelas secundárias são compostas por células pavimentosas apoiadas na membrana basal revestidas por células pilares, as quais formam espaços entre si por onde o sangue circula (MALLATT, 1985; TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

A água passa pelas brânquias no sentido contrário ao fluxo de sangue. Este fluxo contracorrente facilita a eficiência no uso de oxigênio, pois a concentração de oxigênio na água é alta enquanto que no sangue é baixa (SCHMIDT–NIELSEN, 1996). No entanto, o íntimo contato entre a superfície epitelial e o meio externo facilita a entrada de poluentes, pois o epitélio branquial é sensível e altamente dinâmico.

As funções vitais como a respiração, osmorregulação e excreção são comprometidas caso ocorram alterações morfológicas pela contaminação do organismo por poluentes. Portanto, qualquer alteração na estrutura das brânquias, certamente comprometerá a sobrevivência dos peixes (MORGAN & TOWELL, 1973) e o desempenho produtivo.

Após a absorção pelas brânquias, os agentes químicos atingem o fígado, órgão responsável pelo metabolismo e, finalmente, os rins; que atuam na

manutenção da estabilidade interna e na excreção (JOBLING e SUMPTER, 1993). Grande parte dos poluentes absorvidos são biotransformados no fígado e nos rins, onde sofrem ação de enzimas e se tornam hidrossolúveis para então serem excretados.

O fígado dos peixes é composto por dois lobos: o direito está localizado ao lado da vesícula biliar e o esquerdo próximo ao baço. Este órgão é formado por hepatócitos, células epiteliais dos ductos biliares, macrófagos, células sanguíneas e células endoteliais (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

Por ser um órgão importante no metabolismo de xenobióticos e sensível às substâncias tóxicas, o fígado pode sofrer alterações histológicas, portanto, é utilizado como bioindicador de contaminação no meio aquático (FANTA et al., 2003).

O rim é um órgão localizado junto à coluna vertebral dos peixes e se divide em anterior e cefálico, sendo composto por células interrenais e células cromafins.

A estrutura do rim cefálico dos peixes é composta por néfrons com corpúsculo renal (glomérulo e cápsula de Bowman) e túbulos renais. Os túbulos renais são divididos em porções proximal e distal. Os rins eliminam substâncias químicas durante a formação da urina, são alvos de contaminantes e podem sofrer alterações histológicas (EVANS, 1993).

A análise histológica dos órgãos é um método rápido para se determinar os efeitos dos agentes químicos tóxicos aos tecidos e órgãos, pois possibilita a observação das lesões causadas nos tecidos em resposta ao estresse subletal ou crônico (JOHNSON et al., 1993).

Os estudos de alterações morfo-fisiológicas nos órgãos dos peixes são utilizados como indicadores de qualidade de água e como modelo de estudos de impacto ambiental (FANTA et al., 2003).

Na revisão bibliográfica realizada, não foram encontrados estudos sobre a recuperação de peixes sobreviventes à intoxicação com o fipronil, nem sobre as alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em períodos após as exposições agudas. Observa-se que também não existem indicações para os piscicultores sobre a possibilidade de uso dos animais sobreviventes a intoxicação

aguda ao fipronil em função da porcentagem de mortalidade dos animais do lote de cativeiro, ou seja, da intensidade da intoxicação dos animais.

3.5. Limite de Aceitabilidade de Inibição da AChE

Nos estudos que utilizam a AChE como biomarcador de intoxicação por agrotóxicos não há discussões e não se propõem um nível de aceitabilidade de inibição da AChE no cérebro e no músculo dos peixes em que os animais se recuperem e se desenvolvam normalmente.

Em pisciculturas, leva-se em consideração a importância econômica do lote de peixes. Portanto, é importante que se consiga o máximo de aproveitamento dos peixes, inclusive dos sobreviventes às intoxicações com agrotóxicos.

Sendo assim, determinar um limite de aceitabilidade de inibição da AChE de acordo com a porcentagem de mortalidade de peixes ocorrida do lote é uma maneira prática que o piscicultor terá para definir se é válido levar os sobreviventes para a recuperação. O produtor pode observar se os peixes sobreviventes à intoxicação poderão continuar no sistema de produção a partir dos seguintes parâmetros objetivos:

1. Porcentagem de mortalidade ocorrida;
2. Comportamento dos animais; e
3. Ganho de peso corpóreo no período de recuperação em água limpa após a exposição aguda de 24 horas ao fipronil, ou a qualquer outra substância tóxica.

3.6. Organismos-teste

Nos estudos de monitoramento ambiental, a utilização de peixes como bioindicadores de qualidade do ecossistema aquático está crescendo (BARCAROLLI e MARTINEZ, 2004). Isso se deve ao fato de que os peixes ocupam vários ambientes aquáticos e são importantes comercialmente como fontes de proteínas essenciais na alimentação da população.

A aquicultura é considerada uma produção totalmente dependente do ecossistema no qual está inserida, pois os peixes e demais organismos produzidos estão em contato direto com o meio e são afetados por qualquer mudança causada por diferentes agentes físicos, químicos e biológicos (VALENTI et al., 2000). A exploração econômica dos peixes requer conhecimentos básicos dos principais fatores que direta ou indiretamente estão ligados ao ambiente.

Em piscicultura, além da escolha de espécies importantes economicamente, é preciso selecionar os animais pelo tamanho. Os peixes maiores e com maior teor em gordura podem apresentar maior tolerância a alguns tóxicos devido à bioacumulação nas gorduras (MUNOZ-DE-TORO et al., 2006). Portanto, a utilização de animais pequenos e jovens proporciona avaliações mais precisas dos efeitos tóxicos de diferentes produtos.

3.6.1. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) tem grande importância na piscicultura brasileira, pois é uma das espécies mais representativas entre os peixes nativos. A produção de pacu é vantajosa no que diz respeito ao custo de manutenção, a resistência aos patógenos e a facilidade de adaptação ao cativeiro em tanques e viveiros (JOMORI et al., 2008).

O sucesso na produção de pacu pelas pisciculturas também se deve à boa aceitação da alimentação artificial (arraçoamento), à presença de características como precocidade, rusticidade, carne de sabor agradável e bom crescimento, que favorecem a criação intensiva (DIAS-KOBERSTEIN et al., 2005).

3.6.2. Tilápia (*Oreochromis niloticus*)

O nome “Tilápia” é comum de uma grande variedade de espécies de peixes ciclídeos do gênero *Oreochromis* que se distribuem originalmente do Centro-Sul da África até o Norte da Síria (POPMA e PHELPS, 1998).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é original da Costa do Marfim no Oeste africano e foi introduzida no nordeste do Brasil em 1971, onde é criada desde a bacia do rio Amazonas até o Estado do Rio Grande do Sul (LOVSHIN e CIRYNO, 1998).

Esta espécie é utilizada em estudos de toxicidade por ser espécie cosmopolita, rústica, precoce e muito produzida no Brasil (SCORVO-FILHO et al., 2010), principalmente em tanques próximos às atividades agrícolas. A espécie se adapta bem devido à resistência a variações de temperatura e de oxigênio dissolvido na água.

A tilápia-do-Nilo é uma espécie de grande interesse para a aquicultura pelas características zootécnicas, alta qualidade de carne e para o processamento industrial. Destaca-se como a espécie mais criada, com 45,4% da produção de peixes no Brasil (IBGE, 2017).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional (LABORSEG). As análises histológicas foram realizadas no Setor de Análises Morfológicas do Laboratório de Anatomia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal. As análises da enzima AChE foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Os peixes foram provenientes da Piscicultura São Geraldo, localizada no município de Sertãozinho, São Paulo e do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Jaboticabal. O fipronil testado foi da formulação de nome comercial Regent® 800WG fornecido pela empresa BASF S.A. do Brasil.

4.1. Período de observação e aclimação

Os alevinos das duas espécies de peixes foram previamente mantidos em observação por um período de 14 dias nas condições dos ensaios para a verificação de possíveis sinais clínicos de doenças.

A aclimação dos peixes utilizados nos ensaios em laboratório foi realizada em tanques de 150 litros com renovação e aeração constante da água. Os tanques foram colocados em sala de ensaio climatizada com a temperatura controlada entre 25 e 27 °C e com fotoperíodo de 12/12 horas por sete dias antes da realização dos ensaios.

Os peixes utilizados no ensaio de recuperação à intoxicação aguda, que estavam com 7,0 g de massa corpórea média, foi realizada em tanques mesocosmos (semi-campo) de 1000 litros por 14 dias. Os mesocosmos estavam dentro de um recinto coberto com telhas de cimento amianto a 3,0 m de altura. Durante o período de aclimação a temperatura do ar do ambiente variou entre 25 e 27 °C.

A oxigenação das águas dos tanques foi mantida com aeração contínua por bombas de ar de aquário durante a exposição dos peixes ao fipronil. Neste período, os peixes foram alimentados à vontade, uma vez ao dia até a saciedade, com ração comercial da marca Fri Ribe (35% de proteína bruta).

4.2. Avaliação da toxicidade aguda em condições de laboratório

4.2.1. Ensaios para o controle de sensibilidade e sanidade dos peixes

A sensibilidade e sanidade dos organismos-teste foram avaliadas periodicamente por meio de ensaios de toxicidade aguda para ambas as espécies, em sala climatizada (25-27°C) e com fotoperíodo de 12/12 horas.

Os ensaios foram realizados em sistema estático de exposição contínua dos animais por 48 horas, sem substituição da água e sifonagem de resíduos sólidos

dos aquários e sem alimentação. O cloreto de potássio (KCl) foi utilizado como substância de referência, de acordo com a norma NBR 15088:2011 (ABNT, 2011).

As parcelas experimentais foram recipientes de vidro contendo três litros no total (água + KCl em concentrações crescentes) e o delineamento foi inteiramente casualizado (DIC). A avaliação da mortalidade foi realizada diariamente, com a retirada dos peixes mortos nos recipientes.

As variáveis iniciais da água utilizada nos ensaios estavam de acordo com as recomendações da norma NBR 15088:2011 (ABNT, 2011), que são: temperatura de $26, \pm 2$ °C; pH $7,00 \pm 0,5$; oxigênio dissolvido superior a $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$; condutividade elétrica de $0,180 \text{ }\mu\text{S.cm}^{-1}$.

A concentração letal 50% (CL₅₀;48h) calculada da substância referência cloreto de potássio (KCl) para o pacu neste ensaio foi de $1,35 \text{ g.L}^{-1}$, com limite superior de $1,62 \text{ g.L}^{-1}$ e inferior de $1,13 \text{ g.L}^{-1}$.

A CL₅₀;48h do KCl calculada para a tilápia foi de $1,13 \text{ g.L}^{-1}$, com limite superior de $1,31 \text{ g.L}^{-1}$ e inferior de $0,93 \text{ g.L}^{-1}$ (Figura 4).

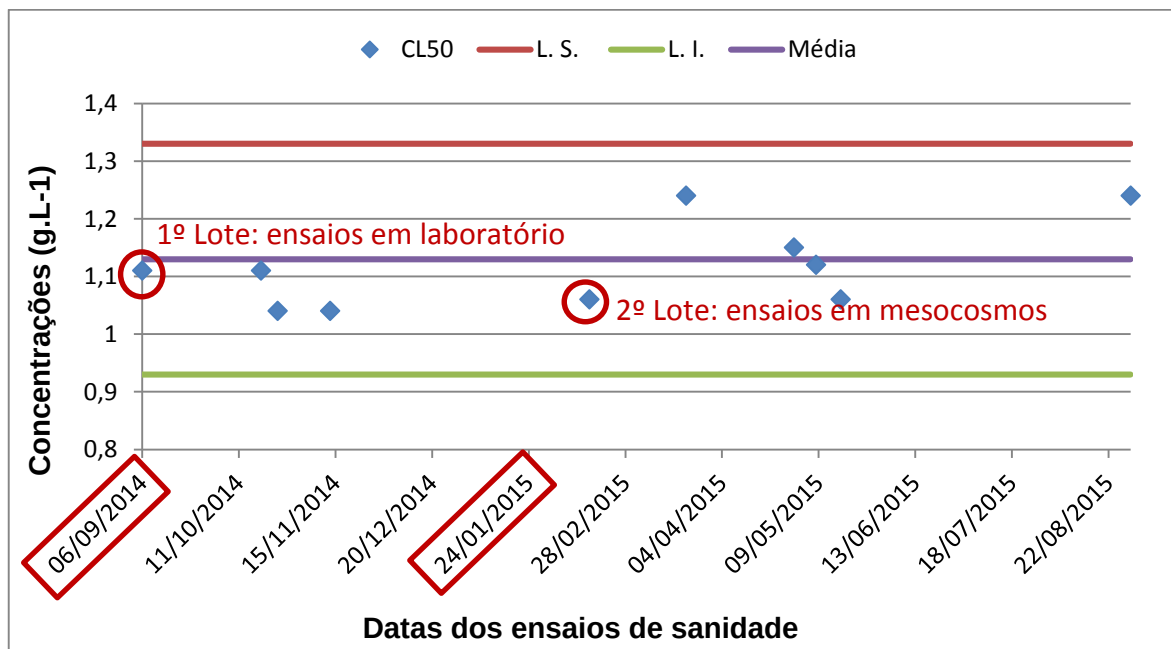


Figura 4. Carta controle de sensibilidade e sanidade do laboratório para o peixe tilápia.

De acordo com a carta controle de sensibilidade para ensaios de toxicidade nas condições de laboratório, os animais estavam aptos para serem utilizados nos ensaios.

4.2.2. Ensaios preliminares e definitivos com o fipronil

Os ensaios preliminares foram conduzidos para se determinar as concentrações que causam aproximadamente 10, 30, 50 e 70% de mortalidade com as espécies pacu e tilápia (Figura 5 A).

As porcentagens de mortalidade foram escolhidas com o objetivo de representar as perdas na produção de pacu e tilápia em cenários de uma contaminação das águas das pisciculturas com o fipronil e mortalidade dos peixes. Os valores diferem entre si em 20%, que é uma variação baixa em relação à dificuldade de quantificar estas porcentagens de mortalidade em condições de laboratório.

As parcelas experimentais foram recipientes de vidro contendo dez litros no total (água + fipronil nas concentrações que causam 10, 30, 50 e 70% de mortalidade) com aeração constante. O ensaio definitivo para laboratório foi realizado com quatro concentrações e um controle, com oito animais por aquário no caso do pacu e dez animais por aquário, no caso da tilápia. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC).

O número de tilápias por aquário foi maior devido à interação entre os peixes, pois é notado que o aumento no número de animais diminui o estresse e o comportamento agressivo durante o período de ensaio.

Os ensaios foram conduzidos em sala climatizada com temperatura entre 25 e 27 °C e fotoperíodo 12/12 horas, em sistema estático, sem substituição e sifonagem de água durante o período de exposição (24h) dos animais ao fipronil.

A avaliação da ocorrência de sinais externos de intoxicação dos peixes foi realizada visualmente (Figura 5 B), com a retirada dos peixes mortos dos recipientes (Figura 5 C).

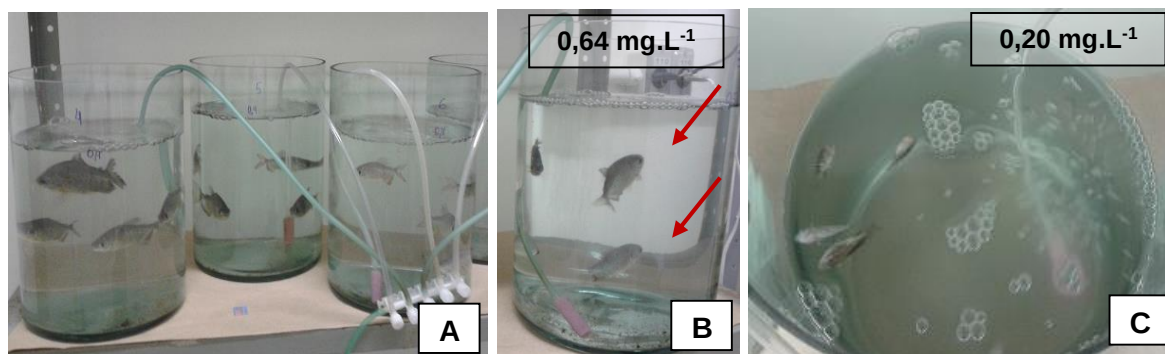


Figura 5. Ensaios definitivos com inseticida fipronil para o pacu e para a tilápia. **A)** Ensaio preliminar com fipronil para o pacu. **B)** Observação dos sinais de intoxicação no ensaio preliminar com fipronil para o pacu: natação errática (seta). **C)** Avaliação da mortalidade no ensaio preliminar com fipronil para tilápia.

Nas águas dos recipientes foram registrados os dados de oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}), pH, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$) com um sistema de sonda portátil do modelo YSI 556 MPS, da YellowSpring Co.

A análise dos resultados de porcentagem de mortalidade dos peixes dos ensaios de toxicidade aguda foi realizada por comparação das médias e os respectivos desvios-padrões.

4.3. Ensaios em condições de mesocosmos para avaliação da recuperação dos peixes após a exposição aguda ao fipronil

A recuperação dos peixes após a exposição aguda às concentrações de fipronil que causam 10, 30, 50 e 70% de mortalidade foi avaliada em mesocosmos, que são as condições mais próximas às condições ambientais.

Os mesocosmos utilizados foram tanques de cimento amianto com 1000 L de água, com fluxo contínuo de água de abastecimento (Figura 6 A e B). Os tanques simularam tanques de pisciculturas que poderiam estar em uma região agrícola em que o inseticida fipronil foi aplicado.

Um ensaio de exposição aguda foi realizado em cinco mesocosmos (1000L): quatro mesocosmos foram contaminadas com as concentrações pré-determinadas que causam aproximadamente 10, 30, 50 e 70% de mortalidade dos peixes e um

tratamento controle (Figura 6). Os peixes utilizados estavam com peso corpóreo médio entre 7 e 10 g.

O fluxo de água dos mesocosmos foi interrompido momentos antes e até 24 h após a diluição dos volumes do fipronil (Figura 6 A e B), para manter os peixes expostos às concentrações de fipronil que causam 10, 30, 50 e 70% de mortalidade. As águas dos mesocosmos foram aeradas com bombas elétricas de aquário, para manter a concentração do oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) necessária à sobrevivência dos peixes.

Após as 24 horas de exposição nos mesocosmos contaminados pelas concentrações de fipronil, foram retirados 15 peixes sobreviventes e transferidos para cada um dos quatro mesocosmos de recuperação de 150 L com fluxo contínuo por concentração avaliada (Figura 6).

Os peixes permaneceram por 30 dias em recuperação com fluxo de água de abastecimento contínuo (vazão de $0,5 \text{ L.minuto}^{-1}$) durante o período experimental.

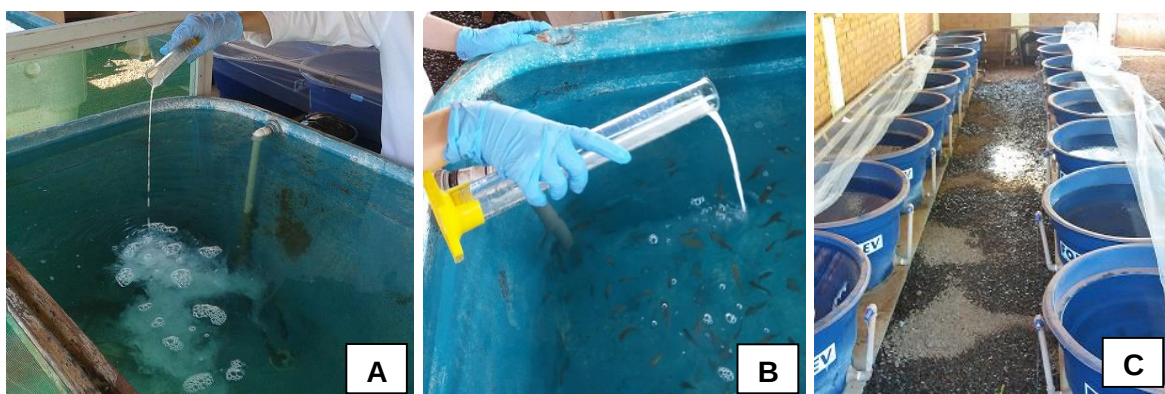


Figura 6. Experimentos de recuperação. **A)** Administração de fipronil na água de um dos mesocosmos de exposição do ensaio de recuperação de pacu. **B)** Administração de fipronil na água de um dos mesocosmos de exposição do ensaio de recuperação de tilápia. **C)** Vista geral dos mesocosmos de recuperação após a transferência dos peixes sobreviventes.

Os peixes foram coletados no 1º, 15º e 30º dia de cada mesocosmo de recuperação e passaram pelos processos de dessensibilização na coluna vertebral e pesagem para se avaliar o peso em gramas durante a recuperação (Figura 7 A). Em seguida, fragmentos de tecidos de brânquias, fígados, rins, cérebros e músculos de oito peixes (dois peixes de cada um dos quatro mesocosmos de 150L

de recuperação) foram coletados em cada dia de coleta para a realização de avaliações histológicas e da atividade da enzima AChE.

Os dados de mortalidade e efeitos de intoxicação obtidos nos ensaios de recuperação dos peixes foram utilizados para determinar qual a porcentagem de peixes de um lote pode ser mantida na produção após passar por uma exposição aguda com fipronil.

As variáveis de qualidade de água (temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica) foram registradas em cada tanque de recuperação dos peixes para avaliar se os parâmetros estavam dentro dos valores ideais para os animais.

4.4. Análise histológica de brânquias, fígado e rins

Foram coletadas amostras de brânquias, fígado e rins de oito animais (n=8) por tratamento por dia de coleta dos peixes sobreviventes (Figura 7 B).

Os fragmentos dos tecidos dos órgãos foram retirados e imersos em solução de formaldeído tamponado (0,1 M; pH 7,3), por 24 horas. Após a fixação, os fragmentos dos tecidos sofreram desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em Histosec® (Merck).

Em seguida, foi realizada microtomia dos blocos de historresina em micrótomo automático (Leica-RM2155,) em cortes de 3 a 5 µm de espessura em sequência semi-seriada (um corte para 100 µm desprezados).

Os tecidos cortados foram corados com o corante hematoxilina-eosina, segundo as metodologias propostas por BEHMER et al. (1976) e fixados entre lâmina e lamínula. As lesões foram observadas e registradas para os tecidos das brânquias, fígado e rins (Figura 7 D).

As análises histológicas foram realizadas a partir da observação das lâminas preparadas de cada tecido, seguida de fotodocumentação e descrição das alterações histológicas.

As alterações histológicas foram avaliadas semi quantitativamente pelo cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH), com base na severidade de

cada lesão. Para tanto, as alterações foram classificadas em classes de estágios de alterações adaptadas de Poleksic & Mitrovic – Tutundzic (1994).

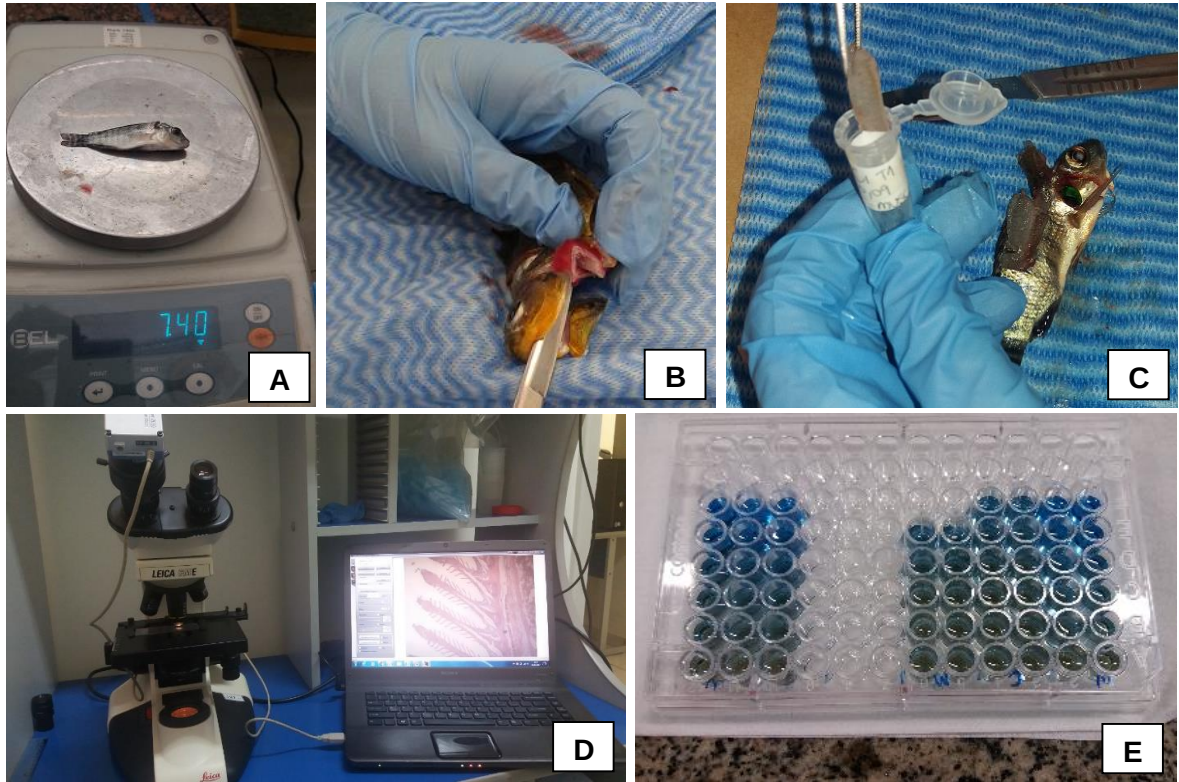


Figura 7. **A)** Pesagem de um dos peixes sobreviventes de tilápia coletado no 1º dia após a exposição aguda ao fipronil, para fazer as análises histológica e enzimática. **B)** Coleta de brânquias do peixe pacu (1º dia de coleta). **C)** Coleta de músculo do peixe tilápia (1º dia de coleta). **D)** Sistema de microscopia para a observação das lâminas histológicas. **E)** Placas com as amostras para leitura da enzima AChE de cérebro e músculo do peixe pacu.

As classes de estágios progressivos utilizadas para classificar as alterações histológicas observadas quanto ao comprometimento das funções do órgão foram as seguintes:

- Estágio I = Lesões que não comprometem o funcionamento do órgão;
- Estágio II = Lesões mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão;
- Estágio III = Lesões muito severas e irreversíveis.

O valor de IAH foi calculado para cada animal com a fórmula de Poleksic e Mitrovic–Tutundzic (1994), que é a seguinte:

$$\text{IAH} = 10^0 \sum \text{I} + 10^1 \sum \text{II} + 10^2 \sum \text{III}$$

Onde I, II e III correspondem ao número de alterações de estágio I, II e III, respectivamente.

O valor médio de IAH foi dividido em 5 categorias citadas por Poleksic & Mitrovic- Tutundzic (1994):

IAH entre 0 e 10 = Funcionamento normal do tecido;

11 e 20 = Danificação leve para moderada do tecido;

21 e 50 = Modificação moderada para severa do tecido;

51 e 100 = Modificação severa do tecido;

> 100 = Danificação irreparável do tecido.

Este índice permitiu a comparação da severidade das lesões branquiais, hepáticas e renais entre os peixes coletados.

4.5. Análise da atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE)

O cérebro foi coletado por meio da remoção do osso da cabeça dos peixes e a exposição da caixa encefálica. O cérebro foi retirado com auxílio de pinça cirúrgica e colocado em tubo tipo *eppendorf*. Após a retirada do cérebro, foram coletadas amostras de músculo da região dorsal de cada animal (Figura 7 C).

As amostras foram acondicionadas em uma caixa de isopor contendo gelo para o imediato resfriamento do músculo e cérebro dos peixes. Os *eppendorfs* contendo as amostras foram armazenados em freezer à temperatura de -80 °C, para posterior análise da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE).

A análise da AChE foi realizada por meio da quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976) (Figura 7 E). O reagente de Bradford contém o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução ácida. O reagente, ao se ligar às proteínas, tem absorbância alterada de 465 nm para 595 nm devido à mudança de coloração de castanho para tons de azul, que é proporcional à concentração da proteína, em consequência da interação entre a proteína e o corante, estabilizando-o em forma aniônica.

O valor de absorbância é determinado por espectrofotometria em 595 nm e é feita a comparação dos resultados com a curva analítica, a qual contém valores de concentração proteica conhecidos, usando-se a Soro Albumina Bovina (BSA), para o cálculo da concentração da proteína nas amostras em estudo.

Em microtubos adicionou-se 995 μL de Reagente de Bradford comercial e 5 μL de amostra. As amostras e os padrões da curva analítica foram agitadas e mantidas em ambiente escuro por aproximadamente 10 minutos.

Em seguida foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro ajustado com o comprimento de onda em 595 nm. A concentração de proteínas nas amostras foi calculada com base na curva de calibração preparada com soro albumina bovina (BSA) e reagente de Bradford.

A atividade de AChE no cérebro e músculo dos peixes foi determinada de acordo com o método modificado de ELLMAN et al. (1961). Para a realização da reação foi utilizado a mistura: acetilcolina 1,875 mM e 5,5' -ditiobis-2-nitrobenzoico ácido 0,32 mM, como cromogênio (diluído com 100 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,5).

As amostras de tecidos de cérebro e de músculo foram homogeneizadas com tampão fosfato 10 mM pH 7,0 em 50% de glicerina (v/v) e centrifugadas a 12,000 x G, por 30 segundos. O sobrenadante foi usado como fonte de enzima e ajustado a uma concentração final de 2,5 mg de tecido fresco. mL^{-1} . O plasma total foi utilizado com o volume final da amostra de 500 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$.

A atividade enzimática foi quantificada por meio da leitura da absorbância no comprimento de onda de 412 nm por 4 minutos a 25°C em um espectrofotômetro com detector de ultravioleta visível (UV-VIS). A atividade da AChE foi expressa em unidades de acetilcolina hidrolisada por miligrama de proteína (mmol/mg ptn/min).

O coeficiente de extinção molar (412= 16,950 $\text{M}.\text{cm}^{-1}$) utilizado foi previamente determinado. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para transformar um μmol de substrato.minuto⁻¹.

Os valores obtidos após as análises da atividade da enzima AChE muscular e cerebral foram utilizados para comparação entre si, com a observação do aumento ou diminuição da atividade desta enzima.

4.6. Limite de aceitabilidade de inibição da AChE

A determinação do limite de aceitabilidade de inibição da AChE no cérebro e no músculo dos peixes foi realizada com base nos resultados obtidos no ensaio de recuperação dos peixes sobreviventes às concentrações crescentes do fipronil que causaram aproximadamente 10, 30, 50 e 70% de mortalidade dos peixes, presença de sinais de intoxicação, lesões histológicas em brânquias, fígado e rins e avaliação de peso corpóreo em dias de recuperação em água limpa.

Foi considerado como limite de aceitabilidade a taxa de inibição da AChE no cérebro e no músculo correspondente à concentração que causa os maiores danos em 24 horas e em que os peixes juvenis de pacu e tilápia são capazes de se recuperarem dos efeitos tóxicos no comportamento.

4.7. Análises estatísticas do peso corpóreo e da atividade da AChE

As análises estatísticas dos parâmetros avaliados peso corpóreo e atividade da AChE foram realizadas por meio do delineamento experimental inteiramente ao acaso. As análises estatísticas foram a de variância pelo teste F, e quando o valor de F calculado foi significativo, o teste de Scott & Knott ($p=0,05$) foi aplicado, para a comparação das médias dos tratamentos.

O teste de Scott & Knott utiliza a razão de verossimilhança para atestar a significância de que n tratamentos podem ser divididos em grupos que maximizem a soma dos quadrados entre grupos (SCOTT e KNOTT, 1974).

As análises de variância e de comparação de médias foram realizadas com o programa computacional Assistat 7.7 beta Registro nº 0004051-2 (SILVA et al., 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da toxicidade aguda em condições de laboratório

5.1.1. *Piaractus mesopotamicus* (pacu)

O intervalo de concentrações de letalidade do fipronil na água foi determinado nos ensaios preliminares e utilizado nos ensaios definitivos. Com base neste estudo preliminar, as concentrações utilizadas para o pacu foram 0,56; 0,59; 0,61 e 0,64 mg.L⁻¹ e causaram médias de mortalidade de 12,5; 25,0; 54,2 e 79,2%; respectivamente, em 24 horas (Tabela 1).

As diferenças entre as porcentagens de mortalidades esperadas e as médias ocorridas nos três ensaios definitivos são inferiores a 10%. Portanto, as concentrações ensaiadas são adequadas para realizar o estudo em condições de mesocosmo.

Os baixos valores de desvio padrão entre os números de peixes mortos nas mesmas concentrações nos três ensaios (Tabela 2) caracteriza o alto rigor experimental do estudo.

Tabela 2. Porcentagem de mortalidade nos três ensaios definitivos com fipronil para o pacu, média geral e desvios padrões (DP) após 24 horas de exposição aguda.

Conc. (mg.L ⁻¹)	Nº de peixes mortos			Média Geral			% Mortes esperada	Diferença % mortes
	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 3	Nº	DP	%		
Controle	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,56	3	3	3	3	0,0	12,5	10,0	+ 2,5
0,59	6	6	6	6	0,0	25,0	30,0	- 5,0
0,61	12	15	12	13	1,7	54,2	50,0	+ 4,2
0,64	18	21	18	19	1,7	79,2	70,0	+ 9,2

Durante a condução dos ensaios não foram observados sinais de intoxicação nos animais no tratamento controle. Porém, nos tratamentos com as concentrações

de 0,56 e 0,59 mg.L⁻¹ foram observados a perda da capacidade de arfagem e o aumento do batimento opercular dos peixes. Nas concentrações de 0,61 0,64 mg.L⁻¹ ocorreram espasmos musculares, natação errática e permanência dos peixes na superfície da coluna d'água.

Tabela 3. Média e desvio padrão das variáveis de qualidade da água nos três ensaios definitivos com fipronil para os peixes da espécie pacu após 24 horas de exposição.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Temperatura				Desvio padrão	pH				Desvio padrão
	1º	2º	3º	Média		1º	2º	3º	Média	
Controle	26,03	25,90	26,50	26,14	0,316	8,57	8,57	8,90	8,68	0,191
0,56	26,81	25,89	26,47	26,39	0,468	8,60	8,60	8,90	8,70	0,173
0,59	26,48	25,65	26,50	26,21	0,486	8,65	8,65	8,10	8,47	0,318
0,61	26,68	25,71	26,53	26,31	0,525	8,61	8,61	8,30	8,51	0,179
0,64	26,72	25,77	26,57	26,35	0,508	8,63	8,62	8,40	8,55	0,130
Concentração (mg.L ⁻¹)	Condutividade elétrica				Desvio padrão	Oxigênio dissolvido				Desvio padrão
	1º	2º	3º	Média		1º	2º	3º	Média	
Controle	0,239	0,232	0,242	0,237	0,005	5,78	4,78	4,80	5,12	0,572
0,56	0,262	0,246	0,258	0,255	0,008	5,65	5,65	4,83	5,38	0,472
0,59	0,247	0,228	0,261	0,245	0,017	5,75	5,75	4,33	5,28	0,818
0,61	0,233	0,218	0,225	0,225	0,007	5,74	5,74	3,97	5,15	1,024
0,64	0,241	0,223	0,236	0,233	0,009	5,80	5,80	4,10	5,23	0,981

Na análise das variáveis de qualidade de água nos ensaios com fipronil para o pacu foi registrada a ocorrência de pequenas alterações em todas as variáveis após 24 horas da diluição do fipronil, exceto na temperatura. A temperatura manteve-se praticamente constante: entre 26,03 °C no tratamento controle para 26,72 °C no da concentração de 0,64 mg.L⁻¹.

A condutividade elétrica variou de 0,237 ± 0,005 µS.cm⁻¹ no controle para 0,233 ± 0,009 µS.cm⁻¹ na concentração de 0,64 mg.L⁻¹. A variação média do pH foi de 8,68 ± 0,191 no controle para 8,55 ± 0,130 na concentração de 0,64 mg.L⁻¹. O oxigênio dissolvido variou de 5,12 ± 0,572 mg.L⁻¹ no controle para 5,23 ± 0,981 mg.L⁻¹ na concentração de 0,64 mg.L⁻¹ (Tabela 3).

5.1.2. *Oreochromis niloticus* (tilápia)

O intervalo de concentrações de letalidade do fipronil na água foi determinado nos ensaios preliminares e utilizado nos ensaios definitivos. Com base neste estudo preliminar, as concentrações utilizadas para a tilápia foram 0,09; 0,11; 0,15 e 0,20 mg.L⁻¹ e causaram as porcentagens médias de mortalidade em 24 horas de 13,3; 26,7; 46,7 e 73,3; respectivamente (Tabela 4).

Os baixos valores de desvio padrão entre os números de peixes mortos nas mesmas concentrações nos três ensaios (Tabela 4) caracteriza o alto rigor experimental do estudo.

As diferenças entre as porcentagens de mortalidades esperadas e as médias ocorridas nos três ensaios definitivos são inferiores a 3,4%. Portanto, as concentrações ensaiadas são adequadas para realizar o estudo de mesocosmo.

Os sinais de intoxicação não foram observados nos animais do tratamento controle durante a condução dos ensaios para a determinação das concentrações. Na concentração de 0,09 mg.L⁻¹ foi observado aumento da frequência do batimento opercular dos peixes.

Tabela 4. Porcentagem de mortalidade nos três testes definitivos com fipronil para a tilápia, média e desvios padrões (DP) após 24 horas de exposição aguda.

Conc. (mg.L ⁻¹)	Nº de peixes mortos			Média Geral			% Mortes esperada	Diferença % mortes
	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 3	Nº	DP	%		
Controle	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,09	3	6	3	4	1,7	13,3	10,0	+ 3,3
0,11	6	9	9	8	1,7	26,7	30,0	- 3,3
0,15	12	15	15	14	1,7	46,7	50,0	- 3,3
0,20	21	24	21	22	1,7	73,3	70,0	+ 3,3

Nas concentrações de 0,11; 0,15 e 0,20 mg.L⁻¹ foram observados: espasmo muscular nos peixes, mudança de coloração para cor mais escura, natação errática e letargia; com a permanência dos animais no fundo do aquário.

O fato de que o fipronil causa inibição do GABA pode explicar os sinais de intoxicação observados em ambas as espécies de peixes estudadas: pacu e tilápia. Porém, é necessário levar em consideração também a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que também afeta o sistema nervoso do animal e pode levar à morte.

Outro sinal observado nos peixes foi a paralisação dos músculos, principalmente os intercostais, que impede a respiração e provoca efeitos como natação errática, perda da capacidade de arfagem e, por fim, morte devido à asfixia (TIERNEY et al., 2010).

Os inseticidas neurotóxicos causam intoxicação em diversos pontos do sistema nervoso, alteram a transmissão do impulso nervoso e causam diversos efeitos nos organismos, como espasmos musculares e redução das respostas do sistema olfativo dos peixes, o qual é de extrema importância na sobrevivência (TIERNEY et al., 2010).

Sinais de intoxicação como os observados neste estudo foram constatados em pesquisas realizadas com outros inseticidas neurotóxicos como os organofosforados trichlorfon e o methyl parathion, que inibem a ação da enzima acetilcolinesterase (TIERNEY et al., 2010).

Na análise das variáveis de qualidade de água nos ensaios com fipronil para a tilápia, também ocorreram pequenas alterações em todas as variáveis. A temperatura variou de $26,12\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,119$ para $26,27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,210$ na concentração de $0,20\text{ mg.L}^{-1}$.

A condutividade elétrica variou de $0,253 \pm 0,012\text{ }\mu\text{S.cm}^{-1}$ no controle para $0,254 \pm 0,008\text{ }\mu\text{S.cm}^{-1}$ na concentração de $0,20\text{ mg.L}^{-1}$. A variação média do pH foi de $8,36 \pm 0,272$ no controle para $8,24 \pm 0,125$ na concentração de $0,20\text{ mg.L}^{-1}$. O oxigênio dissolvido variou de $5,03 \pm 0,572\text{ mg.L}^{-1}$ no controle para $5,34 \pm 0,641\text{ mg.L}^{-1}$ na concentração de $0,20\text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 5).

Em ambos os ensaios, o fipronil não afetou as variáveis de qualidade de água. Portanto, a molécula deste inseticida é a única causa para os sinais de intoxicação e mortalidade dos peixes em 24 horas nas concentrações avaliadas.

As concentrações de fipronil avaliadas para ambas as espécies, mesmo em condições controladas de laboratório, são muito baixas para afetar as variáveis de qualidade de água.

Tabela 5. Média das variáveis de qualidade da água nos três ensaios definitivos com fipronil para os peixes da espécie tilápia (24 horas de exposição).

Concentração (mg.L ⁻¹)	Temperatura				Desvio padrão	pH				Desvio padrão
	1º	2º	3º	Média		1º	2º	3º	Média	
Controle	26,02	26,08	26,25	26,12	0,119	8,32	8,11	8,65	8,36	0,272
0,09	26,55	25,96	26,86	26,46	0,457	8,35	8,23	8,26	8,28	0,062
0,11	26,85	26,87	26,63	26,78	0,133	8,40	8,19	7,85	8,15	0,278
0,15	26,58	26,71	26,62	26,64	0,067	8,36	8,21	8,05	8,21	0,155
0,20	26,05	26,47	26,28	26,27	0,210	8,38	8,18	8,15	8,24	0,125
Concentração (mg.L ⁻¹)	Condutividade elétrica				Desvio padrão	Oxigênio dissolvido				Desvio padrão
	1º	2º	3º	Média		1º	2º	3º	Média	
Controle	0,241	0,254	0,264	0,253	0,012	5,69	4,69	4,71	5,03	0,572
0,09	0,283	0,268	0,280	0,277	0,008	5,56	5,56	4,79	5,30	0,445
0,11	0,262	0,250	0,283	0,265	0,017	5,66	5,66	4,33	5,22	0,768
0,15	0,253	0,240	0,247	0,247	0,006	5,65	5,65	4,11	5,14	0,889
0,20	0,259	0,245	0,258	0,254	0,008	5,71	5,71	4,60	5,34	0,641

As propriedades químicas do fipronil bem como de outros defensivos agrícolas, juntamente com as condições meteorológicas, microrganismos no solo, presença ou ausência de plantas, localização do solo na topografia e práticas de manejo dificultam o monitoramento da contaminação da água.

A ação de processos como adsorção, absorção, decomposição, degradação, deriva, volatilização, lixiviação, escoamento superficial e, principalmente, as interações entre os mesmos, a agressividade de uma substância tóxica é alterada e torna o estudo dessas moléculas no ambiente mais complexo (SPADOTTO et al., 2010).

5.2. Avaliação da recuperação dos peixes após a exposição aguda ao fipronil

5.2.1. *Piaractus mesopotamicus* (pacu)

A aplicação do fipronil nas concentrações pré-definidas (0,56; 0,59; 0,61 e 0,64 mg.L⁻¹) foi realizada pela manhã e os peixes permaneceram expostos por 24 horas. No controle, não ocorreram mortes, pois os animais estavam aclimatados e a água estava livre de fipronil.

No tanque em que foi aplicada a menor concentração de fipronil avaliada (0,56 mg.L⁻¹) ocorreu 15% de mortalidade; com 0,59 mg.L⁻¹, 30%; com 0,61 mg.L⁻¹, 44,5% e com a maior concentração (0,64 mg.L⁻¹), 65% (Tabela 6) (Figura 8 C).

As porcentagens de mortalidade não foram similares ao que foi observado nos ensaios definitivos. Os resultados entre ensaios em condições de laboratório e de mesocosmos podem apresentar variabilidade devidas às variações nas próprias condições ambientais, como diferença entre equipamentos, mudanças nas condições ambientais, variação entre lotes de organismos teste, entre outras.

Quando um experimento é instalado, há um grande cuidado ao controlar a variabilidade em cada um desses fatores, que é de extrema importância para se alcançar resultados de boa qualidade (OPAZO, 2008).

Tabela 6. Mortalidade dos peixes pacu após 24 horas de exposição ao fipronil.

Concentração (mg.L ⁻¹)	N.I.	Nº Mortos	% de Mortalidade
Controle	100	0	0,0
0,56	100	15	15,0
0,59	200	60	30,0
0,61	200	89	44,5
0,64	300	195	65,0

N.I. = Número inicial de peixes da espécie pacu.

Os animais do controle não apresentaram sinais de intoxicação. Após duas horas de exposição ao fipronil, foram observados sinais de intoxicação como

natação errática e perda da capacidade de arfagem nos peixes expostos a todas as concentrações avaliadas (Figura 8 A).

Nos animais expostos a 0,56 e 0,59 mg.L⁻¹ foi observado batimento opercular acelerado, enquanto que nos animais expostos à 0,61 e 0,64 mg.L⁻¹ o batimento opercular estava lento. Estes sinais também foram observados nos ensaios definitivos em laboratório para a determinação das concentrações.

Entre seis e 12 horas de exposição ao fipronil, nos animais expostos à 0,61 e 0,64 mg.L⁻¹ foram observados mudança na coloração da pele de claro para escuro e espasmos musculares, além dos sinais já observados anteriormente (Figura 8 B). Na concentração de 0,56 e 0,59 mg.L⁻¹, foram observados os mesmos sinais do início ao final da avaliação (24 horas).

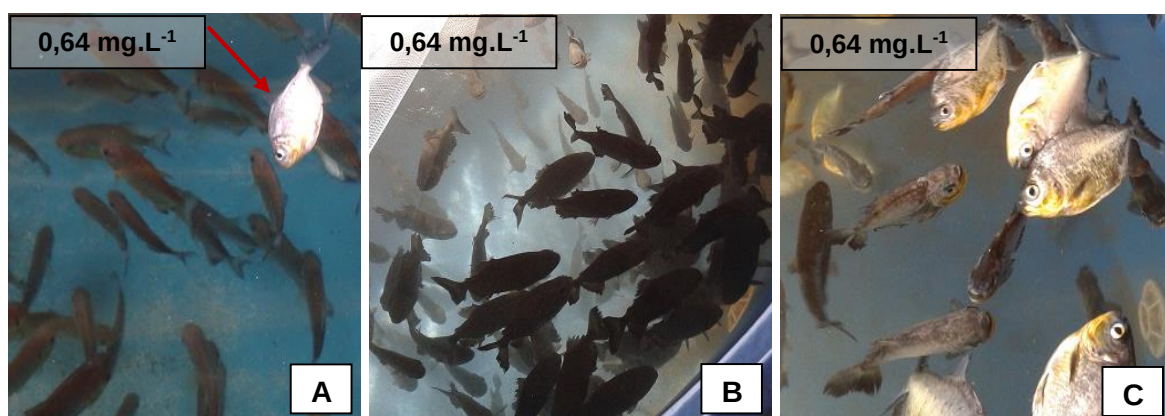


Figura 8. Sinais de intoxicação em pacu após administração do fipronil. **A)** Animais com a perda da capacidade de arfagem (seta). **B)** Animais com mudança de coloração de claro para escuro. **C)** Mortalidade dos peixes na maior concentração (0,64 mg.L⁻¹).

Ao completar 24 horas de exposição ao fipronil, foi observado sinais de letargia nos animais sobreviventes às concentrações de 0,61 e 0,64 mg.L⁻¹. Os animais sobreviventes às concentrações 0,56 e 0,59 mg.L⁻¹ estavam com o comportamento ativo e de fuga após estímulos na água.

Os sinais de intoxicação observados foram similares nos peixes das espécies pacu e tilápia. A mudança de coloração da pele ocorreu nos animais expostos às maiores concentrações avaliadas para cada espécie. Esta mudança na coloração da pele dos peixes de claro para escuro está relacionada com fatores

estressores no ambiente e ocorre devido à quantidade e migração de pigmentos nos cromatóforos (FANOURAQUI et al, 2007).

A coloração dos peixes pode ser classificada como: estrutural, na qual a estrutura tegumentar do animal é capaz de produzir diferentes cores a partir da luz incidente; e a pigmentar. Na pigmentar, a produção de pigmentos é oriunda de compostos químicos que podem absorver ou refletir determinados comprimentos de onda de modo seletivo.

Os cromatóforos são células pigmentares dos peixes que armazenam os pigmentos como: eritróforos (vermelhos), xantóforos (amarelos), leucóforos (brancos), iridóforos (metálicos) e melanóforos (marrons ou pretos). A migração pigmentar que ocorre posteriormente à mudança de coloração do peixe se dá por estes pigmentos, os quais possuem prolongamentos citoplasmáticos que facilitam esta movimentação (CURI et al., 2005).

Além do fato de os peixes estarem sobre estresse devido à contaminação da água com fipronil, também ocorreu a interferência deste inseticida no sistema nervoso dos animais.

Em peixes teleósteos, as mudanças de coloração da pele são reguladas pelo sistema nervoso ou hormonal, ou geralmente por ambos. Os terminais nervosos liberam catecolaminas, mais comumente a noradrenalina, diretamente na membrana do cromatóforo. Dependendo da proteína à qual a catecolamina se liga, a resposta do cromatóforo pode ser agregação ou dispersão (FANOURAQUI, 2007). A resposta de mudança de cor da pele é imediata ao início do estresse, mas de curta duração. No entanto, se o estímulo ambiental for constante, passam a atuar os hormônios e permite que a resposta se mantenha enquanto o estímulo estiver presente.

Pode-se explicar, assim, o comportamento dos cromatóforos dos peixes em resposta ao fipronil diluído na água. A coloração escura da pele tanto no pacu quanto na tilápia permaneceu enquanto estavam expostos ao fipronil. Além disso, após a morte, a pele dos animais voltava à uma cor clara, pois o sistema nervoso não mais interfere nos cromatóforos dos peixes.

Uma situação de estresse pode causar diversos efeitos sobre os animais além da mudança de coloração da pele. Em geral, para os peixes a primeira

resposta de defesa é o comportamento de fuga, pois fugir diminui a probabilidade do mesmo de ser predado ou capturado. Há também a possibilidade de ocorrer um comportamento contrário, permanecer imóvel para economia de energia e manter a homeostase fisiológica do organismo (SCHRECK et al., 1997).

A letargia, no caso dos peixes expostos nas maiores concentrações de fipronil avaliadas, é explicada pela redução da atividade metabólica como estratégia de proteção contra agentes agressores temporários. Esta estratégia só será eficaz se a energia economizada para a mitigação do processo tóxico for suficiente para suprir o período de exposição (BAGANZ, 2005).

O tempo de exposição de 24 horas escolhido para estes ensaios é um período satisfatório, pois no caso de uma contaminação com baixas concentrações de fipronil, o produtor poderá observar os sinais de intoxicação pelo comportamento dos peixes.

Augusto et al. (2015) citam que as alterações ambientais e no nível bioquímico dos peixes são as primeiras respostas detectáveis e quantificáveis, constituindo-se em indicadores mais sensíveis porque podem ser detectados com um tempo de exposição mais curto do que o demandado nas observações dos sinais externos nos organismos expostos aos agente estressores.

Todos os sinais de intoxicação observados anteriormente desapareceram após 72 horas em recuperação. Durante o período de recuperação, os peixes se alimentaram normalmente a partir do segundo dia em água limpa, livre de fipronil.

No primeiro dia, os peixes apresentaram um comportamento de fuga, provavelmente devido ao manejo no momento da transferência dos peixes do mesocosmo de exposição aguda para os mesocosmos de recuperação com água limpa.

A análise estatística do peso corpóreo dos animais do tratamento controle e os sobreviventes às concentrações de fipronil se mantiveram sem grandes variações de perda ou ganho durante os 30 dias de recuperação (Tabela 7).

Tabela 7. Valores médios do peso corpóreo dos peixes pacu e desvio padrão (DP) nas três coletas realizadas.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Peso (gramas) por coleta					
	24h		15 dias		30 dias	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle	10,71	1,72	12,32	1,75	13,18	1,27
0,56	8,45	1,27	10,56	1,50	12,57	1,81
0,59	10,87	1,64	11,74	1,66	12,99	1,94
0,61	9,78	1,73	11,93	1,27	13,58	1,64
0,64	9,63	1,12	10,81	1,63	12,42	1,18
F Concentrações = 0,30 ^{ns}		F Coletas = 0,05 ^{ns}		F Concentrações x Coletas =0,10 ^{ns}		
CV% = 9,08						

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si. *, ** e ns: Significativo a 1 e 5% de probabilidade e não significativo.

Existem alguns fatores que podem afetar o ganho de peso e crescimento dos peixes durante o período de criação, como a densidade de estocagem. No entanto, neste estudo os animais foram colocados para recuperação de modo a evitar este problema.

Outro fator seria o potencial de bioacumulação de determinado composto, que pode se correlacionar com os parâmetros biométricos de um animal (BARRON, 1990). No entanto, em estudos de toxicidade aguda e bioconcentração com o inseticida trichlorfon para a espécie pacu, não foi encontrada correlação entre a bioconcentração e a biometria dos animais após os ensaios (LOPES, 2005).

O experimento de recuperação dos peixes sobreviventes foi realizado de modo a simular condições de campo em mesocosmos. Esta simulação e a coleta de amostras são importantes para a avaliação e compreensão dos efeitos biológicos de um xenobiótico sob condições naturais (WINKALER et al., 2001).

Portanto, as vantagens do estudo em condições de mesocosmo estão mais próximas das condições de campo que estudos de laboratório, que são conduzidos em meio neutro e padronizado. Nos mesocosmos se podem determinar os efeitos que serão observados caso ocorra uma contaminação das águas com fipronil, o

que torna a extrapolação de resultados mais próxima para as condições de campo, ou no ecossistema.

5.2.1.1. Análise Histológica

5.2.1.1.1. Brânquias

Após a exposição de 24 horas inicial (1º dia) ao fipronil nas águas dos mesocosmos, não foram observadas alterações nas brânquias dos animais do tratamento controle e nas dos animais sobreviventes à concentração de 0,56 mg.L⁻¹ (Figura 9 A e B).

Nas brânquias dos peixes sobreviventes às concentrações de 0,59 e 0,61 mg.L⁻¹ de fipronil nas águas foram observadas lesões nos tecidos como hiperplasia do epitélio interlamelar, estase e o início de aneurisma (Figura 9 C). As brânquias dos peixes sobreviventes à 0,64 mg.L⁻¹ de fipronil apresentaram estas mesmas alterações, porém também foi observado o edema subepitelial (Figura 9 D).

Nas amostras coletadas no 15º dia de recuperação, as brânquias dos peixes apresentaram as mesmas lesões observadas nas brânquias dos peixes coletados no 1º dia, porém com menor frequência. Nas amostras de tecido do 30º dia (final) foram observadas somente alterações leves nos animais sobreviventes à 0,64 mg L⁻¹ como hiperplasia e elevação epitelial. As brânquias dos animais sobreviventes às demais concentrações estavam totalmente recuperadas.

A hiperplasia do epitélio interlamelar é uma alteração que leva ao aumento da distância entre o ambiente externo e o sangue dos peixes, e forma uma barreira que impede a entrada de contaminantes (ERKMEN e KOLANKAYA, 2000). Esta alteração é considerada comum em estudos histológicos de brânquias, como foi constatado para a espécie *Cichlasoma dimerus* exposta ao endosulfan (DA CUNA et al., 2001) e a espécie *Poecilia reticulata* exposta ao herbicida glifosato (ROCHA et al., 2005).

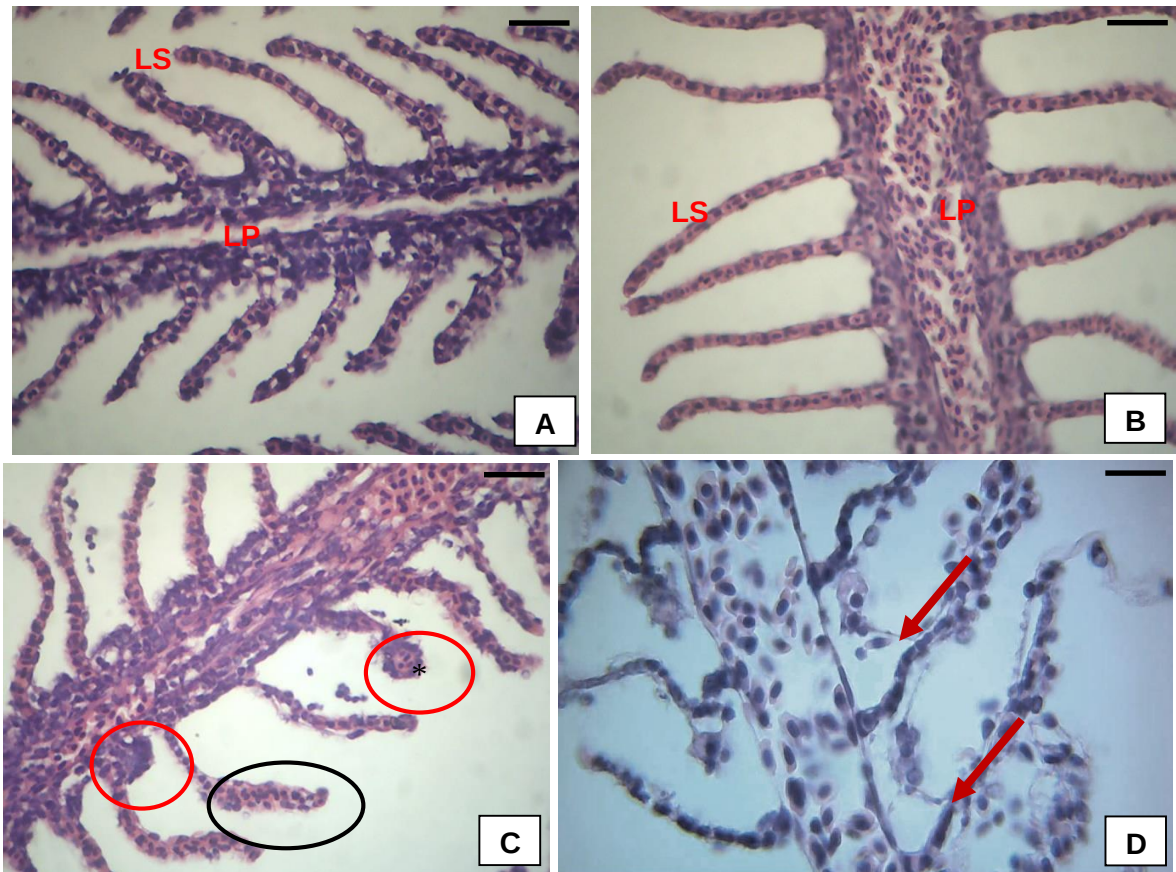


Figura 9. Fotomicrografia de cortes transversais das brânquias de pacu após exposição aguda ao fipronil. Coloração HE. **A)** Aumento de 40x: Histoarquitetura das brânquias do peixe pacu no controle, lamelas primárias (LP) e secundárias (LS). **B)** Aumento de 40x: LP e LS de pacu sobrevivente à $0,56 \text{ mg.L}^{-1}$ de fipronil. **C)** Aumento de 40x: hiperplasia do epitélio lamelar (círculo vermelho), estase (círculo preto) e início de aneurisma (círculo vermelho com asterisco) no peixe sobrevivente à $0,61 \text{ mg.L}^{-1}$. **D)** Aumento de 100x: Edema subepitelial (seta) no peixe sobrevivente à $0,64 \text{ mg.L}^{-1}$. Barra: $50 \mu\text{m}$.

A estase é caracterizada por um fechamento das lamelas secundárias causado por um excesso de células sanguíneas (MALLAT, 1985). Essa alteração também é muito comum quando o peixe está exposto a algum xenobiótico. Assim como neste estudo, Santos et al. (2015) também verificaram estase nas brânquias de pacu após a exposição ao herbicida atrazina na água.

O edema subepitelial ocorre devido à ação de agrotóxicos como fipronil. Os agrotóxicos causam a perda da adesão entre a célula epitelial e o sistema subjacente de células pilares acompanhado por um colapso na integridade estrutural das lamelas secundárias (KATULI et al., 2014). Além disso, essa desorganização da estrutura branquial faz com que a eficiência de absorção de

oxigênio seja comprometida pelo aumento da espessura do tecido de difusão lamelar (FANTA et al., 2003).

As alterações que ocorreram nas brânquias do pacu após 24 horas de exposição ao fipronil se enquadram nas lesões de primeiro e de segundo estágio propostas por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) (Tabela 8).

Nestes estágios, as alterações são reversíveis contanto que as condições ambientais do meio em que o animal está sejam melhoradas. O valor médio do IAH para as brânquias dos peixes pacu expostos à 0,64 mg.L⁻¹ de fipronil por 24 horas foi 23, que classifica as lesões como uma modificação moderada para severa do tecido.

Tabela 8. Alterações histológicas nas brânquias de pacu e estágios de dano após 24 horas de exposição aguda ao fipronil.

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS BRANQUIAIS	ESTÁGIO
▪ Hiperplasia do epitélio lamelar	I
▪ Desarranjo lamelar	I
▪ Estase	II
▪ Ruptura e edema subepitelial	II
▪ Aneurisma lamelar	I

As alterações encontradas nas brânquias dos animais sobreviventes à maior concentração de fipronil testada (0,64 mg.L⁻¹), no final do período de recuperação, podem ser consideradas como respostas adaptativas do indivíduo, pois a lesão causou espessamento do tecido lamelar e aumento da distância entre o meio externo e o sangue dos peixes, o que se tornou uma barreira protetora (SEPICI-DINÇEL et al., 2009).

De acordo com Reimshuessel (2001) e Gernhofer et al. (2001), a regeneração das células e da estrutura dos tecidos inicia-se em aproximadamente duas semanas após a exposição ao contaminante, sendo que este tempo varia de acordo com o estágio das alterações.

Os estudos de recuperação após intoxicação por inseticidas ainda são pouco realizados. Neste estudo, 30 dias de recuperação foi um período satisfatório para a regeneração dos tecidos lesionados pelo fipronil na ocorrência de uma contaminação das águas com concentrações de até $0,61 \text{ mg.L}^{-1}$. Além disso, é um período de tempo não tão longo para que o produtor mantenha o lote de peixes em sua piscicultura sem a necessidade de descarte dos animais.

No caso de uma contaminação com uma concentração igual ou maior que $0,64 \text{ mg.L}^{-1}$ de fipronil, a qual causaria uma perda de aproximadamente 70% do lote, 30 dias não são suficientes para que os peixes estejam totalmente recuperados com relação às alterações nas brânquias.

5.2.1.1.2. Fígado

Após a exposição inicial de 24 horas, o fígado dos peixes do controle apresentaram as características normais deste órgão, bem como dos animais sobreviventes às concentrações $0,56$; $0,59$ e $0,61 \text{ mg.L}^{-1}$ de fipronil (Figura 10 A, B e C). Foi observado somente congestão da veia central no tecido hepático.

A congestão da veia central pode indicar um aumento do fluxo sanguíneo do fígado, que pode ser uma estratégia de eliminação dos resíduos produzidos por este órgão para posterior excreção renal ou branquial (VENTURINI, 2010).

No fígado dos animais sobreviventes à concentração de $0,64 \text{ mg.L}^{-1}$ de fipronil, foram observadas algumas alterações nos hepatócitos como o núcleo excêntrico da célula, deformação do contorno celular e vacuolização citoplasmática (Figura 10 D).

O núcleo excêntrico do hepatócito ocorre devido ao aumento no número de organelas responsáveis por metabolizar o xenobiótico (SIMONATO et al., 2007). Outro motivo é a alta taxa de mitose que o tecido hepático possui no processo de regeneração. Portanto quando é observado células sem o contorno celular e núcleo deslocado podemos considerar a mitose celular como causa.

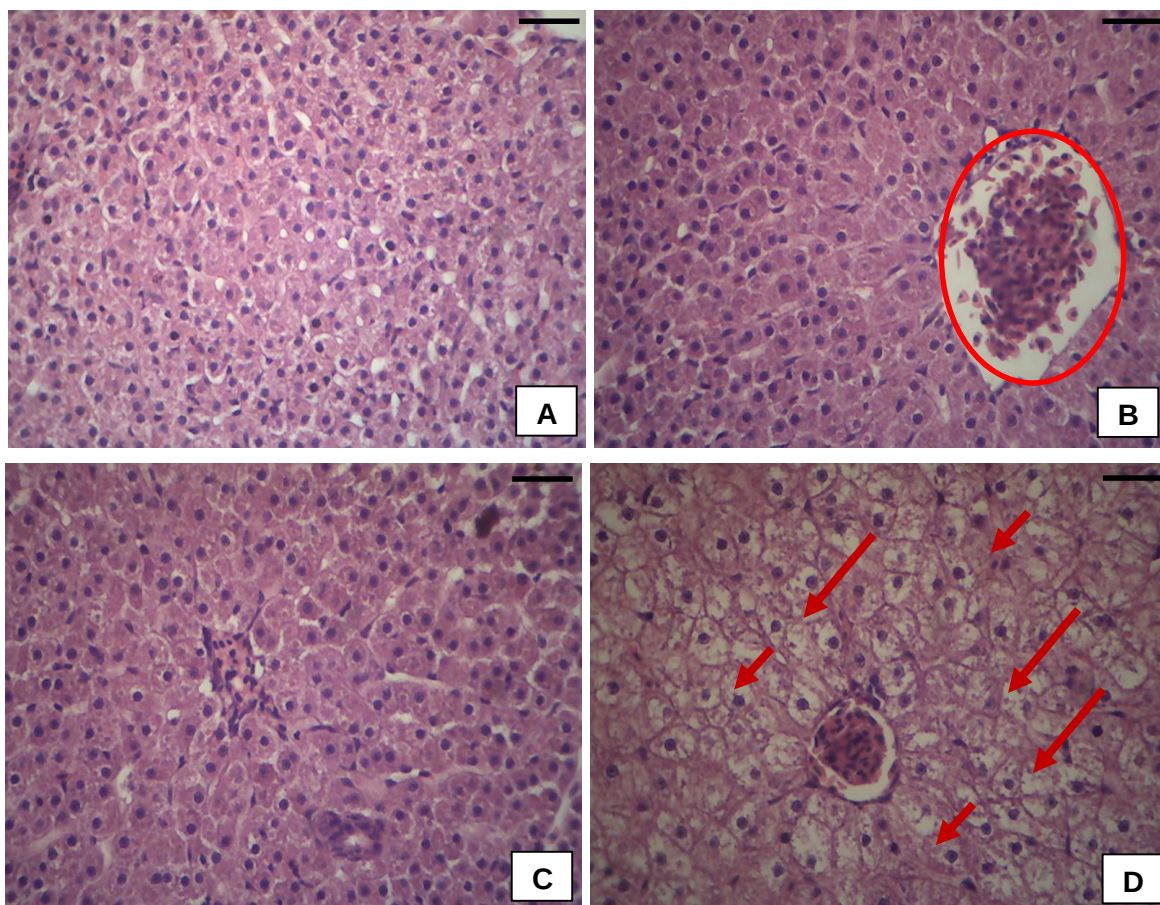


Figura 10. Fotomicrografia de cortes transversais de fígado de pacu após exposição aguda ao fipronil. Coloração HE. Aumento de 40x. **A)** Pacu do controle, hepatócitos normais. **B)** Congestão da veia central de pacu sobrevivente à $0,59 \text{ mg.L}^{-1}$ de fipronil. **C)** Hepatócitos de pacu sobrevivente à $0,61 \text{ mg.L}^{-1}$. **D)** Núcleo excêntrico da célula (seta pequena) e vacuolização citoplasmática (seta) em pacu sobrevivente à $0,64 \text{ mg.L}^{-1}$. Barra: $50\mu\text{m}$.

O mesmo ocorreu em outros estudos como, por exemplo, para o pacu na exposição ao glifosato (SHIOGIRI et al., 2012) e no tratamento com florfenicol contra a infecção bacteriana por *Aeromonas hydrophila* (CARRASCHI et al., 2011).

Nas amostras coletadas no 15º dia de recuperação, no fígado dos peixes foram observadas as mesmas alterações, porém com menor frequência. Nas amostras do 30º dia (final) não foram observadas alterações e as células apresentaram as mesmas estruturas observadas no fígado dos animais do controle. Portanto, foram restauradas no período de 30 dias recuperação.

As alterações que ocorreram no fígado do pacu após 24 horas de exposição ao fipronil se enquadram nas lesões de primeiro e de segundo estágio propostas por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) (Tabela 9).

Tabela 9. Alterações histológicas no fígado de pacu e estágios de dano após 24 horas de exposição aguda ao fipronil.

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS HEPÁTICAS	ESTÁGIO
1. Alteração nos hepatócitos	
▪ Núcleo excêntrico	I
▪ Deformação do contorno celular	I
▪ Vacuolização citoplasmática	II

O valor médio do IAH para o fígado do pacu expostos à 0,64 mg.L⁻¹ de fipronil por 24 horas foi 12, que classifica as lesões como uma danificação leve para moderada do tecido.

As alterações histológicas no fígado são caracterizadas como leves quando comparadas ao jundiá (*Rhamdia quelen*) exposto ao inseticida do grupo dos fosforados parathion metílico na concentração de 0,01 mL.L⁻¹ por 4 horas. No fígado destes peixes foi observada a perda do contorno celular e núcleo picnótico (alterações necróticas) e após 48 e 72 horas ocorrem focos de necrose (MELO et al., 2008).

No fígado de jundiás expostos a 25 mg.L⁻¹ do inseticida diflubenzuron durante 96 horas também ocorrem lesões como o aumento do núcleo e do volume celular, degeneração citoplasmática e nuclear, e vacuolização (MADUENHO e MARTINEZ, 2008).

O fígado é considerado o órgão mais importante na desintoxicação de xenobióticos, pois o tamanho dos hepatócitos reflete o estado funcional, a hipertrofia pode ser considerada uma resposta ao estresse que não compromete as funções normais do órgão (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

Portanto, em 30 dias após a exposição aguda de até 0,64 mg.L⁻¹ de fipronil ocorre a recuperação e regeneração satisfatória das células hepáticas de pacu.

5.2.1.1.3. Rim

Após 24 horas de exposição (1º dia), os rins dos animais sobreviventes às concentrações de 0,56 e 0,59 mg.L⁻¹ de fipronil nas águas estavam normais (Figura 11 A e B). Nos animais sobreviventes às de 0,61 e 0,64 mg.L⁻¹ de fipronil foram observadas alterações nos rins como: aumento do espaço de Bowman, vacuolização celular, oclusão da luz tubular e rompimento celular (Figura 11 C e D).

Nos animais coletados no 15º dia de recuperação foram observadas as mesmas alterações iniciais nos rins dos peixes, mas com menor frequência. Nos rins dos peixes aos 30º dia (final) foram observadas somente alterações leves nos animais sobreviventes à concentração de 0,64 mg.L⁻¹ de fipronil como alguns pontos de vacuolização celular.

O rim é o órgão responsável por excretar os metabolitos do fígado e, portanto, é considerado um bom indicador de contaminação por agrotóxicos (XING et al., 2012).

O aumento do espaço de Bowman ocorre para melhorar a eliminação da substância tóxica, no caso o fipronil. Esta alteração também foi observada em outros estudos como para a espécie *Leporinus macrocephalus* exposta ao glifosato (ALBINATI et al., 2009) e para a espécie *Carassius auratus* exposta ao chumbo (KHAN et al., 2014).

A oclusão da luz tubular ou edema do epitélio e a vacuolização celular podem ocorrer pelo acúmulo de materiais no lúmen e pela expansão das células epiteliais, que dificulta o fluxo do filtrado, reabsorção e secreção no túbulo (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

Estudos com outras espécies expostas a contaminantes também resultaram nestas alterações, como para espécie *Labeo rohita* exposta ao fenol (BUTCHIRAM et al., 2013) e *Poecilia* sp. em esgostos domésticos tratados (SANTOS et al., 2015).

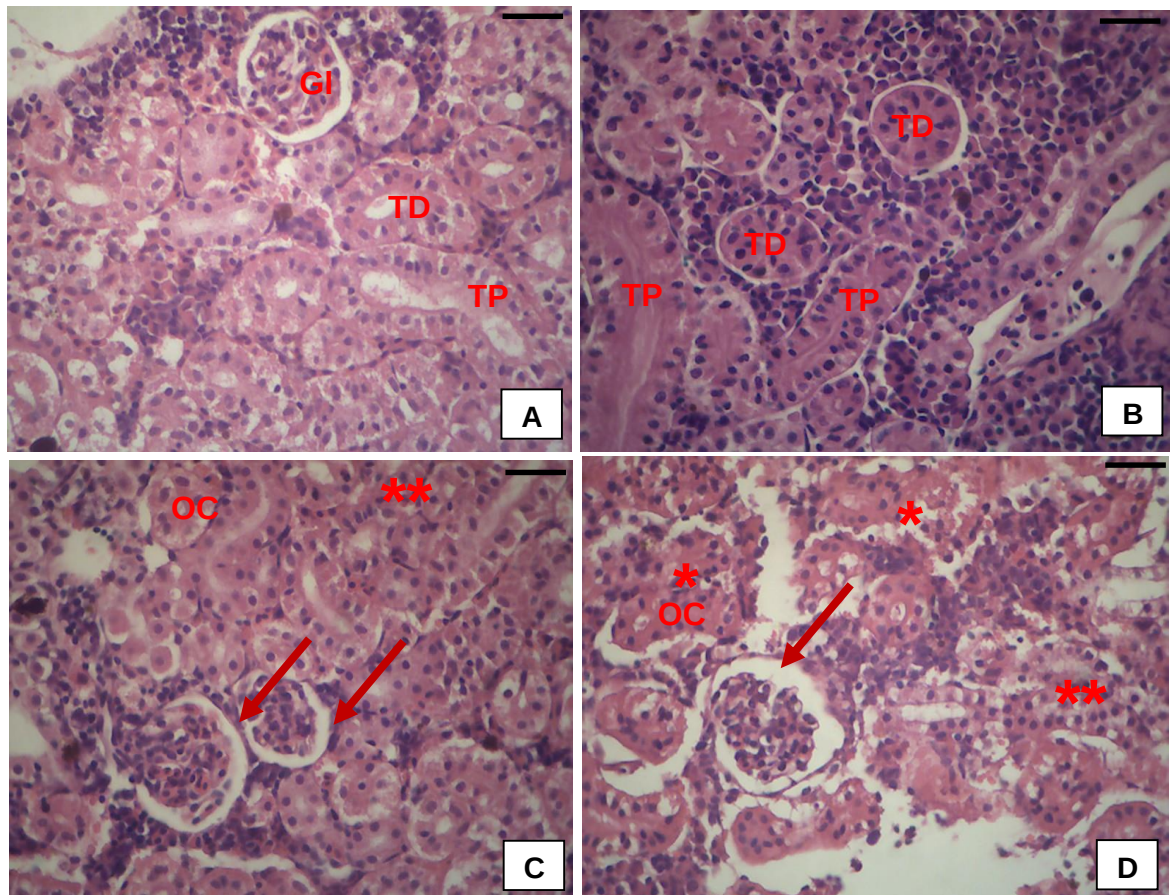


Figura 11. Fotomicrografia de cortes transversais de rim de pacu após exposição aguda ao fipronil. Coloração HE. Aumento 40x. **A e B)** peixe do controle (A) e sobrevivente à 0,59 mg.L⁻¹ de fipronil, túbulo distal (TD); túbulo proximal (TP); glomérulo (GI). **C e D)** Pacu sobrevivente à 0,64 mg.L⁻¹; aumento do espaço de Bowman (seta), rompimento (*) e vacuolização celular (**) e oclusão do túbulo (OC). Barra: 50 µm.

As alterações que ocorreram nos rins do pacu após 24 horas de exposição ao fipronil se enquadram nas lesões de primeiro e de segundo estágio propostas por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) (Tabela 10).

O valor médio do IAH para o fígado dos peixes pacu coletados após 24 horas de exposição às concentrações de 0,61 e 0,64 mg.L⁻¹ de fipronil foi 13; que classifica as alterações como modificação entre leve a moderada do tecido.

O período de 30 dias de recuperação da exposição aguda ao fipronil é suficiente para a regeneração das células dos rins de pacu na ocorrência de uma contaminação do tanque de criação com concentrações de até 0,61 mg.L⁻¹ nas águas, que causariam aproximadamente 50% de mortalidade dos animais do lote.

Tabela 10. Alterações histológicas nos rins de pacu e estágios de dano após 24 horas de exposição aguda ao fipronil.

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS RENAIIS	ESTÁGIO
1. Alterações tubulares	
▪ Vacuolização celular	I
▪ Rompimento celular	I
▪ Oclusão da luz tubular	I
2. Alterações glomerulares	
▪ Aumento do espaço de Bowman	II

No entanto, na ocorrência de uma contaminação com uma concentração igual ou maior que $0,64 \text{ mg.L}^{-1}$ de fipronil, 30 dias não são suficientes para que os rins estejam totalmente regenerados dos peixes sobreviventes a mortalidades superiores a 75%.

5.2.1.2. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

5.2.1.2.1. Cérebro dos peixes pacu

A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) cerebral do pacu foi reduzida significativamente na comparação entre os animais do tratamento controle e dos tratamentos com as concentrações de fipronil, avaliada nas coletas até os 30 dias de recuperação.

Na avaliação de 24 horas após a exposição aguda dos peixes ao inseticida fipronil, todas as concentrações avaliadas causaram inibições significativas da atividade da enzima AChE.

As inibições da AChE variaram entre 70% ($0,56 \text{ mg.L}^{-1}$) e 73% ($0,64 \text{ mg.L}^{-1}$), pois os valores obtidos dos animais após 24 horas de exposição ao fipronil foram significativamente inferiores às atividades da enzima AChE no cérebro dos animais do controle (Tabela 11).

O coeficiente de variação alto obtido se justifica pelo fato de que a diferença entre os valores de AChE dos animais do controle são muito altos em relação aos valores de AChE dos peixes expostos às concentrações de fipronil durante 24 horas.

O intervalo de concentrações de fipronil avaliado causou porcentagens de inibição da atividade da enzima AChE cerebral similares, portanto concentrações de 0,56 à 0,64 mg.L⁻¹ de fipronil (mortalidade > 12,5%) causará danos ao sistema nervoso no pacu em caso de contaminação da água com este inseticida.

Os valores de atividade enzimática da AChE obtidos foram muito menores em comparação com os valores obtidos no estudo de Ramsdorf (2011) para a espécie jundiá (*Rhamdia quelen*) em ensaios também com o inseticida fipronil.

Tabela 11. Valores médios da atividade da AChE (mmol/mg ptn/min) e desvio padrão (DP) no cérebro de pacu nas três coletas realizadas durante o período de recuperação.

Concentração (mg.L ⁻¹)	24 horas		15 dias		30 dias	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle	96,82 aA	12,54	93,44 aA	10,22	92,51 aA	11,55
0,56	28,13 bA	3,87	77,07 aB	6,25	85,86 aB	7,14
0,59	28,09 bA	4,23	77,12 aB	5,12	73,08 aB	6,11
0,61	28,52 bA	3,08	71,91 aB	6,32	62,28 aB	5,63
0,64	25,47 bA	3,98	43,76 bA	5,57	41,92 bA	5,19
F Concentrações = 4,19** F Coletas = 5,05** F Concentrações x Coletas = 0,63*						
CV% = 80,62						

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si. *, ** e ns: Significativo a 1 e 5% de probabilidade e não significativo.

Na avaliação realizada após 15 dias de recuperação dos animais em água livre de contaminantes, ocorreu recuperação da atividade da enzima AChE nos peixes que foram expostos à todas as concentrações avaliadas, porém com menor intensidade para a maior concentração avaliada (0,64 mg.L⁻¹). A inibição da

atividade da enzima AChE variou de 17% nos peixes expostos à 0,56 mg.L⁻¹ para 53% nos que foram expostos à 0,64 mg.L⁻¹.

Portanto, em 15 dias a recuperação da atividade da AChE cerebral é mais baixa nos peixes pacu sobreviventes a intoxicação com concentrações maiores ou iguais à 0,64 mg.L⁻¹ de fipronil, correspondente à 65% de mortalidade do lote.

Na avaliação feita após 30 dias de recuperação, os animais que foram expostos à 0,56 mg.L⁻¹ de fipronil apresentaram recuperação quase total da atividade da enzima AChE cerebral, sendo somente 7% de inibição em relação aos animais do tratamento controle.

Os animais expostos à 0,59 e 0,61 mg.L⁻¹ permaneceram com porcentagens de inibição da AChE cerebral próximas às observadas na avaliação de 15 dias de recuperação, ou seja, não houve recuperação no mesmo nível observado na concentração de 0,56 mg.L⁻¹. O mesmo ocorreu com os animais expostos à 0,64 mg.L⁻¹ de fipronil, sendo a porcentagem de inibição de 54%.

Portanto, a atividade da enzima AChE no cérebro do pacu pode ser recuperada com no mínimo 30 dias em água livre de contaminantes no caso de uma intoxicação de até 0,56 mg.L⁻¹ de fipronil por 24 horas (Figura 12).

Em água com concentrações de fipronil acima deste valor, a contaminação pode causar inibição mais acentuada e a recuperação dos peixes não é satisfatória até os 30 dias após exposição aguda ao fipronil.

O fipronil causou, nos peixes do presente estudo, severa inibição da AChE cerebral, enquanto que para o jundiá o fipronil causa aumento da AChE no cérebro. Os valores para as concentrações de 0,05; 0,10 e 0,23 µg.L⁻¹ testadas para o jundiá foram, em média, de 159,6 ± 5,22; 146,1 ± 6,52 e 194,3 ± 10,14 ηmol.min⁻¹.mg prot.⁻¹, respectivamente (RAMSDORF, 2011).

MODESTO e MARTINEZ (2010) verificaram a inibição em 70% da atividade da enzima AChE cerebral *Prochilodus lineatus* exposta ao Roundup® por 24 e 96 horas. DEMBÉLÉ et al. (2000) também constataram 70% de inibição da atividade da AChE no cérebro em *Cyprinus carpio* por inseticidas organofosfatos e carbamatos após 96 horas de exposição na água.

O inseticida endosulfan também causa inibição significativa da AChE no cérebro de *Lepomis macrochirus* após exposição de $1,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ durante uma semana (DUTTA e ARENDS, 2003). Em piavas (*Leporinus obtusidens*), os herbicidas clomazone e quinclorac ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), em formulações comerciais, inibiram a AChE cerebral após 30 dias de exposição (MORAES et al., 2007).

A recuperação da AChE cerebral pode não ocorrer dependendo da espécie, produto e tempo de exposição e tempo de recuperação. No caso da espécie piava (*Leporinus obtusidens*), exposta ao herbicida clomazone por 96 horas na concentração utilizada de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, ocorre inibição de 83% da AChE cerebral. Após o período de recuperação de oito dias em água livre de contaminantes, não ocorre recuperação desta enzima (MIRON, 2009).

5.2.1.2.2. Músculo dos peixes pacu

Os valores da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) muscular para o pacu não diferem estatisticamente entre os peixes do tratamento controle e os que foram expostos às concentrações de fipronil, e nem entre as coletas durante a recuperação dos animais.

No entanto, pode se observar uma diminuição da quantidade de enzima AChE no músculo dos animais expostos às concentrações avaliadas em comparação com os valores do controle após 24 horas de exposição ao fipronil.

Após 24 horas de exposição ao inseticida fipronil ocorreu inibição entre 25% ($0,56 \text{ mg.L}^{-1}$) e 36% ($0,64 \text{ mg.L}^{-1}$) da atividade da enzima AChE muscular. O intervalo de concentrações avaliado resultou em porcentagens de inibição similares e os valores de desvio padrão estão adequados com relação aos altos valores de enzima obtidos. (Tabela 12).

O coeficiente de variação da AChE muscular obtido é menor que o obtido nos valores de AChE cerebral, pois ocorreu inibição desta enzima em menor grau.

Tabela 12. Valores médios da atividade da AChE (mmol/mg ptn/min) e desvio padrão (DP) no músculo de pacu nas três coletas realizadas durante o período de recuperação.

Concentração (mg.L ⁻¹)	24 horas		15 dias		30 dias	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle	184,19	22,14	189,16	24,52	186,38	23,22
0,56	137,17	16,87	188,68	21,56	186,52	21,54
0,59	129,54	14,23	188,77	19,85	186,30	22,11
0,61	127,26	15,52	187,80	20,25	185,42	22,59
0,64	116,86	13,62	174,06	20,09	177,87	22,87
F Concentrações = 0,28 ^{ns} F Coletas = 2,61 ^{ns} F Concentrações x Coletas = 0,14 ^{ns}						
CV% = 19,75						

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si. *, ** e ns: Significativo a 1 e 5% de probabilidade e não significativo.

Os valores de atividade enzimática da AChE para o pacu foram similares aos valores obtidos no estudo de Ramsdorf (2011), em ensaios também com o inseticida fipronil. Assim como nestes resultados, a análise da atividade da AChE no músculo de jundiá (*Rhamdia quelen*) também não diferiu da dos peixes do grupo controle em relação aos grupos expostos às concentrações de fipronil.

A atividade da acetilcolinesterase média do grupo controle foi $241,3 \pm 24,92$ $\eta\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$. Nas concentrações avaliadas de 0,05; 0,10 e 0,23 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ os valores da atividade enzimática foram $192,2 \pm 14,19$; $202,3 \pm 18,05$ e $192,3 \pm 12,13$ $\eta\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente (RAMSDORF, 2011).

Com 15 dias de recuperação dos animais em água limpa, os peixes, expostos a todas as concentrações de fipronil avaliadas, tiveram a atividade da enzima AChE muscular totalmente recuperada, exceto em 0,64 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ que ainda resultou em 7% de inibição.

Aos 30 dias de recuperação, os resultados são similares aos dos 15 dias. Os peixes expostos a todas as concentrações de fipronil avaliadas tiveram recuperação total da atividade da enzima AChE, exceto em 0,64 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ que ainda resultou em 4% de inibição.

No caso de uma intoxicação de até $0,64 \text{ mg.L}^{-1}$ de fipronil (70% de mortalidade) a recuperação da atividade da enzima AChE no músculo do pacu ocorre em, no mínimo, 15 dias em água limpa.

Além do inseticida fipronil, outras moléculas causam a inibição da enzima AChE muscular. Em *Prochilodus lineatus*, a atividade da enzima AChE muscular diminui quando esta espécie é exposta ao Roundup® por exposição aguda de 24 horas e de 96 horas (MODESTO e MARTINEZ, 2010).

No presente estudo a recuperação da AChE no músculo foi evidente, assim como em estudos com outras espécies. A espécie *Channa striata* exposta ao diazinon ($0,13 \text{ mg.L}^{-1}$) em aplicação na lavoura de arroz apresenta redução da atividade da AChE de 30% no músculo e 21 dias após a aplicação esta taxa diminuiu para 9%, ou seja, ocorre uma recuperação de 70% desta perda (CONG et al. 2008).

O processo de recuperação da AChE pode ser mais acentuado em um determinado órgão do que em outro. A espécie *Ctenopharyngodon idellus* exposta à $2,41 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ do inseticida organofosforado chlorpyrifos (CPF) apresentou recuperação de 99,54% da atividade da AChE no fígado após 60 dias em água livre de contaminantes (JINDAL e KAUR, 2014).

No entanto, a recuperação pode não ocorrer como no caso da espécie piava (*Leporinus obtudidens*), exposta ao herbicida clomazone por 96 horas na concentração utilizada em lavoura de arroz ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e submetida à recuperação de oito dias em água livre de contaminantes. Esta espécie apresenta inibição da AChE muscular (89%) e a inibição permanece mesmo após oito dias em água limpa sem indícios de recuperação (MIRON, 2009).

5.2.1.3. Limite de aceitabilidade de inibição da AChE para o pacu

A análise conjunta dos parâmetros de mortalidade, peso corpóreo, alterações histológicas e recuperação define um limite de aceitabilidade de inibição da enzima AChE cerebral para o pacu e para a tilápia.

Portanto, a partir dos resultados já descritos, o limite de aceitabilidade de inibição da AChE no cérebro do pacu é de 70% e no músculo é de 30% no caso de

contaminação da água com fipronil em concentrações de até $0,61 \text{ mg.L}^{-1}$, que causam até 50% de mortalidade (Figura 12 e 13).

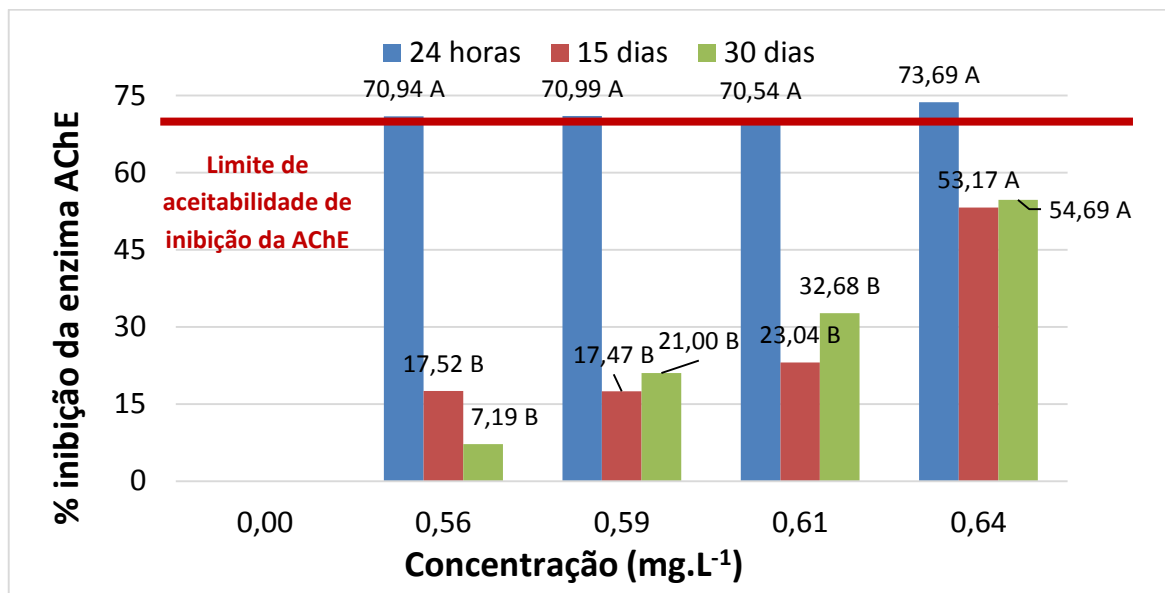


Figura 12. Inibição da enzima AChE no cérebro de pacu nas três coletas realizadas. Médias de porcentagens de inibição da AChE em cada concentração durante o período de recuperação seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si.

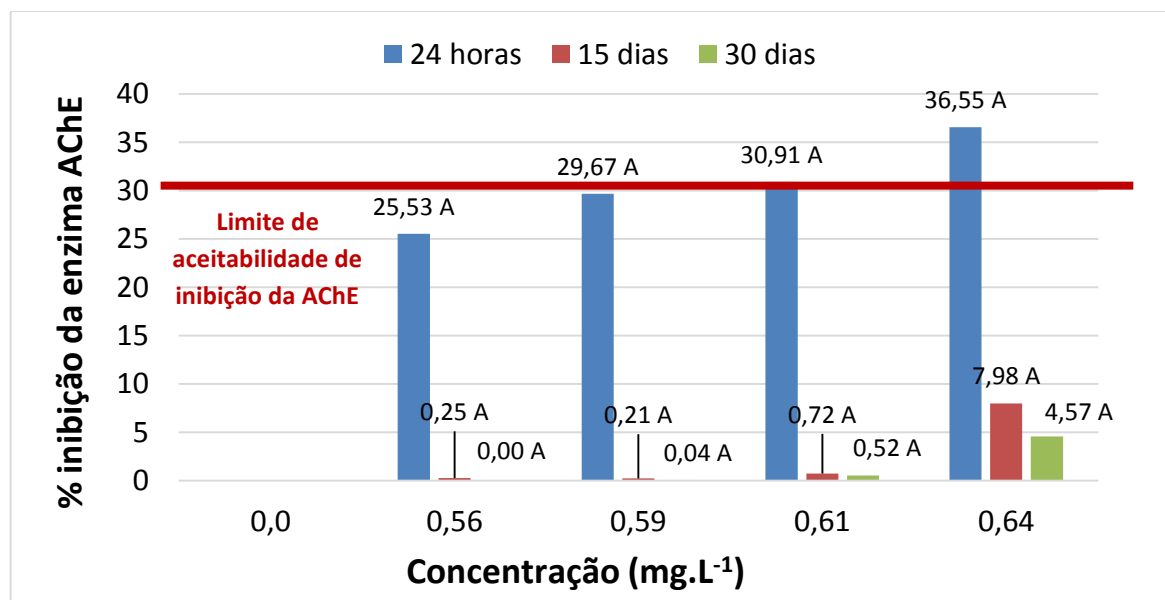


Figura 13. Inibição da enzima AChE no músculo de pacu nas três coletas realizadas. Médias de porcentagens de inibição da AChE em cada concentração durante o período de recuperação seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si.

Este limite de aceitabilidade da AChE deve ser respeitado com relação à espécie pacu e ao agrotóxico ao qual foi exposta, no caso o fipronil, pois outros produtos podem interferir de maneira diferente na AChE no cérebro do pacu. Destaca-se que este limite também precisa ser definido para outras espécies para que possa servir de base no aproveitamento de peixes sobreviventes à intoxicações com agrotóxicos.

5.2.1.4. Análise da qualidade de água

A partir do primeiro dia de recuperação em que as variáveis de qualidade de água foram mensuradas, pode-se observar que não ocorreram grandes variações nos parâmetros avaliados (Tabela 13).

Tabela 13. Média dos valores das variáveis de qualidade da água durante o ensaio de recuperação dos peixes da espécie pacu aos 1, 15, 21 e 30 dias após a transferência dos sobreviventes às concentrações de fipronil.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Temperatura				Desvio Padrão	pH				Desvio Padrão
	1d	15 d	21d	30d		1d	15 d	21d	30d	
Controle	26,61	26,58	26,73	26,34	0,163	7,32	7,93	8,26	8,21	0,432
0,56	26,82	26,47	26,74	26,95	0,204	7,96	8,07	8,12	8,08	0,068
0,59	26,58	26,84	26,71	26,16	0,295	7,79	8,01	7,54	7,97	0,214
0,61	26,26	26,29	26,70	26,20	0,228	7,97	7,97	7,66	7,78	0,152
0,64	26,30	26,35	26,88	26,53	0,262	7,99	7,89	7,97	7,84	0,070
Concentração (mg.L ⁻¹)	Condutividade elétrica				Desvio Padrão	Oxigênio dissolvido				Desvio Padrão
	1d	15 d	21d	30d		1d	15 d	21d	30d	
Controle	0,284	0,291	0,271	0,283	0,008	5,87	5,21	5,36	5,29	0,298
0,56	0,275	0,280	0,288	0,281	0,005	5,47	5,89	5,07	5,54	0,335
0,59	0,265	0,287	0,295	0,281	0,013	5,99	5,90	5,07	5,39	0,435
0,61	0,268	0,277	0,284	0,296	0,012	5,98	5,11	5,22	5,65	0,401
0,64	0,274	0,282	0,295	0,291	0,009	5,70	5,08	5,18	5,16	0,283

No primeiro dia (24 horas depois da diluição de fipronil, a temperatura média variou de 26,61 no controle para 26,30 na maior concentração avaliada (0,64 mg.L⁻¹); a condutividade elétrica variou de 0,284 para 0,274 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ na maior

concentração; o pH variou de 7,32 para 7,99 na maior concentração e o oxigênio dissolvido variou de 5,87 para 5,70 mg.L⁻¹ na maior concentração.

Nas avaliações feitas após 15, 21 e 30 dias, as variáveis de qualidade de água mantiveram-se similares ao que foi obtido em 24 horas, com pequenas variações.

Portanto, assim como nos ensaios em laboratório, o fipronil não causou alteração na temperatura, pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido na água durante a recuperação do pacu.

5.2.2. *Oreochromus niloticus* (Tilápia)

A aplicação do fipronil nas concentrações definidas nos ensaios definitivos no laboratório para a tilápia (0,09; 0,11; 0,15 e 0,20 mg.L⁻¹) foi realizada pela manhã. No controle, não ocorreram mortes, pois a água estava livre de contaminantes.

No tanque em que foi aplicada a menor concentração de fipronil avaliada (0,09 mg L⁻¹) ocorreu 8% de mortalidade; em 0,11 mg.L⁻¹, 27%; em 0,15 mg.L⁻¹, 52% e em 0,20 mg.L⁻¹, 73% de mortalidade (Tabela 14).

Tabela 14. Mortalidade dos peixes tilápia após 24 horas de exposição ao fipronil.

Concentração (mg.L ⁻¹)	N.I.	Mortos	% de Mortalidade
Controle	100	0	0,0
0,09	100	8	8,0
0,11	200	54	27,0
0,15	200	104	52,0
0,20	300	219	73,0

N.I. = Número inicial de peixes da espécie tilápia.

Logo após a aplicação de fipronil nos mesocosmos, foram observados sinais de intoxicação nos peixes. Estes sinais apareceram mais rápido para a tilápia do

que para o pacu. Portanto, a tilápia é mais sensível às concentrações de fipronil testadas.

Não foram observados sinais de intoxicação nos animais do controle. Apenas 15 minutos depois da aplicação de fipronil foi observado lentidão, espasmos musculares, perda da capacidade de arfagem e mudança na coloração nos animais expostos às concentrações de 0,11; 0,15 e 0,20 mg.L⁻¹ nas águas (Figura 14 A). Em todas as concentrações avaliadas foram observados estes mesmos sinais de intoxicação após seis horas de exposição.

Os animais expostos à 0,09 e 0,11 mg.L⁻¹ de fipronil apresentaram diminuição do batimento opercular, enquanto que em 0,15 e 0,20 mg.L⁻¹ apresentaram aumento do batimento opercular, porém permaneceram imóveis no fundo do tanque (Figura 14 B). Estes sinais permaneceram até o momento de transferência dos peixes para os tanques de recuperação após 24 horas de aplicação do fipronil.

A natação é essencial para a biologia dos peixes, sendo que este movimento aumenta a passagem de água pelas brânquias e aumenta as trocas gasosas do animal. Redução da natação ou imobilidade do peixe causadas pela exposição à agentes tóxicos diminui o contato da água com as brânquias e, conseqüentemente, a entrada destes agentes tóxicos na corrente sanguínea.

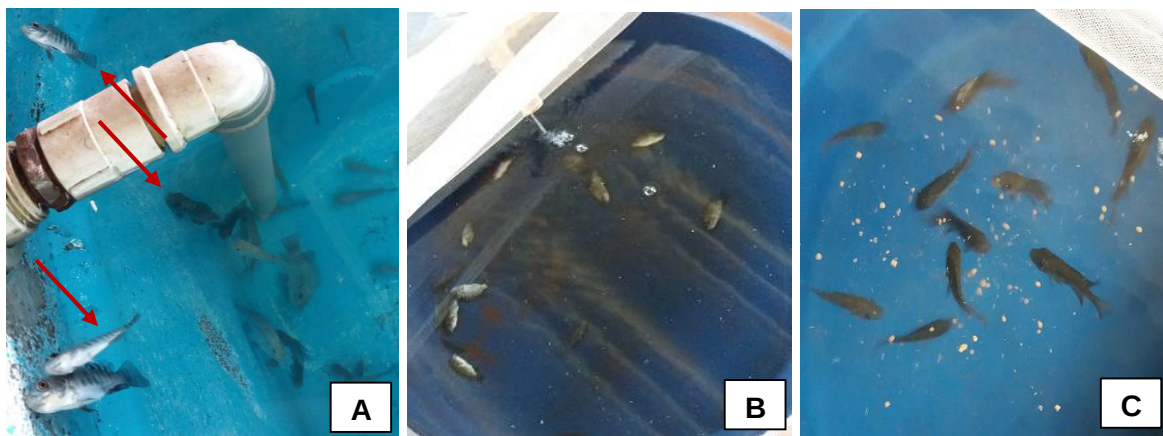


Figura 14. Observação dos sinais de intoxicação e comportamento do peixe tilápia após administração do fipronil. **A)** Perda da capacidade de arfagem (seta) e mortalidade (seta). **B)** Permanência dos animais no fundo da caixa. **C)** Comportamento e alimentação normal dos peixes.

Em comparação com os resultados do pacu, os mesmos sinais de intoxicação foram observados, exceto esta imobilidade observada nas tilápias nas maiores concentrações de fipronil avaliadas.

No entanto, as concentrações utilizadas nos ensaios de recuperação com a tilápia são mais baixas que as concentrações utilizadas nos ensaios com pacu, o que indica que a tilápia é uma espécie mais sensível à este inseticida que o pacu.

Após a transferência dos animais para os tanques de recuperação, ainda ocorreu mortalidade de alguns peixes em todas as concentrações avaliadas, exceto no controle. A porcentagem total de mortalidade foi contabilizada (Tabela 15).

No primeiro dia de recuperação, assim como durante a exposição, os animais permaneceram com um comportamento letárgico. Os peixes expostos à 0,20 mg.L⁻¹ estavam praticamente imóveis mesmo em água livre de contaminantes.

A partir do segundo dia (48 horas), os peixes estavam com comportamento mais ativo e alerta, além da busca por alimento no momento da alimentação. Em 72 horas, os animais que foram expostos já estavam com comportamento normal em comparação com os do tratamento controle, assim como ocorreu para o pacu.

Tabela 15. Valores de mortalidade dos peixes da espécie tilápia nos mesocosmos de recuperação.

Concentração (mg.L ⁻¹)	48h	72h	Mortalidade total	% Mortalidade
Controle	0	0	0	0,0
0,09	4	2	14	14,0
0,11	1	1	56	28,0
0,15	4	1	109	54,5
0,20	3	0	222	74,0

Com relação ao ganho e perda de peso durante o período de recuperação das tilápias, os peixes se alimentaram normalmente a partir do terceiro dia em água limpa livre de contaminantes (Figura 14 C). Não ocorreu diferença significativa no peso dos animais do controle em relação aos que foram expostos (Tabela 16).

Tabela 16. Valores médios do peso corpóreo dos peixes tilápia e desvio padrão (DP) nas três coletas realizadas.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Peso (gramas) por coleta					
	24h		15 dias		30 dias	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle	8,12	1,23	9,54	1,88	10,69	1,05
0,09	7,58	1,69	8,45	1,72	9,81	1,39
0,11	7,89	1,75	8,66	1,68	9,38	1,96
0,15	8,36	1,12	9,13	1,84	9,97	1,54
0,20	8,41	1,41	9,78	1,87	9,82	1,09
F Concentrações = 0,79 ^{ns}		F Coletas = 0,73 ^{ns}		F Concentrações x Coletas =0,59 ^{ns}		
CV% = 6,01						

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si. *, ** e ns: Significativo a 1 e 5% de probabilidade e não significativo.

A análise de ganho de peso dos peixes frente à uma intoxicação aguda com fipronil é importante para o produtor, pois a grande preocupação em uma piscicultura é a comercialização do peixe.

Para a realização da piscicultura, algumas condições básicas são exigidas, tais como: tanques e viveiros bem preparados; emprego de técnicas apropriadas para os cativeiros; estradas adequadas; energia elétrica; e a existência de mercado consumidor.

Portanto, se tudo estiver adequado, mesmo após um acidente como uma contaminação por fipronil, os animais sobreviventes poderão permanecer em recuperação e as perdas econômicas serão menores, principalmente no caso da tilápia.

Conforme ressalta Sperandio (2014), a tilápia é uma espécie precoce que apresenta excelente desempenho em qualquer regime de criação. Em sistemas extensivos alcança produtividade de até 3.500 kg/ha/ano, em densidades entre 8.000 e 10.000 peixes/ha. Em regime semi-intensivo chega a produzir 15.000 kg de pescado/ha/ano, em densidades de 20.000 a 30.000 peixes/ha.

5.2.2.1. Análise histológica

5.2.2.1.1. Brânquias

Após a exposição de 24 horas inicial (1º dia) das tilápias, nas brânquias dos animais do tratamento controle e dos animais sobreviventes à 0,09 mg.L⁻¹ de fipronil não foram observadas alterações (Figura 15 A).

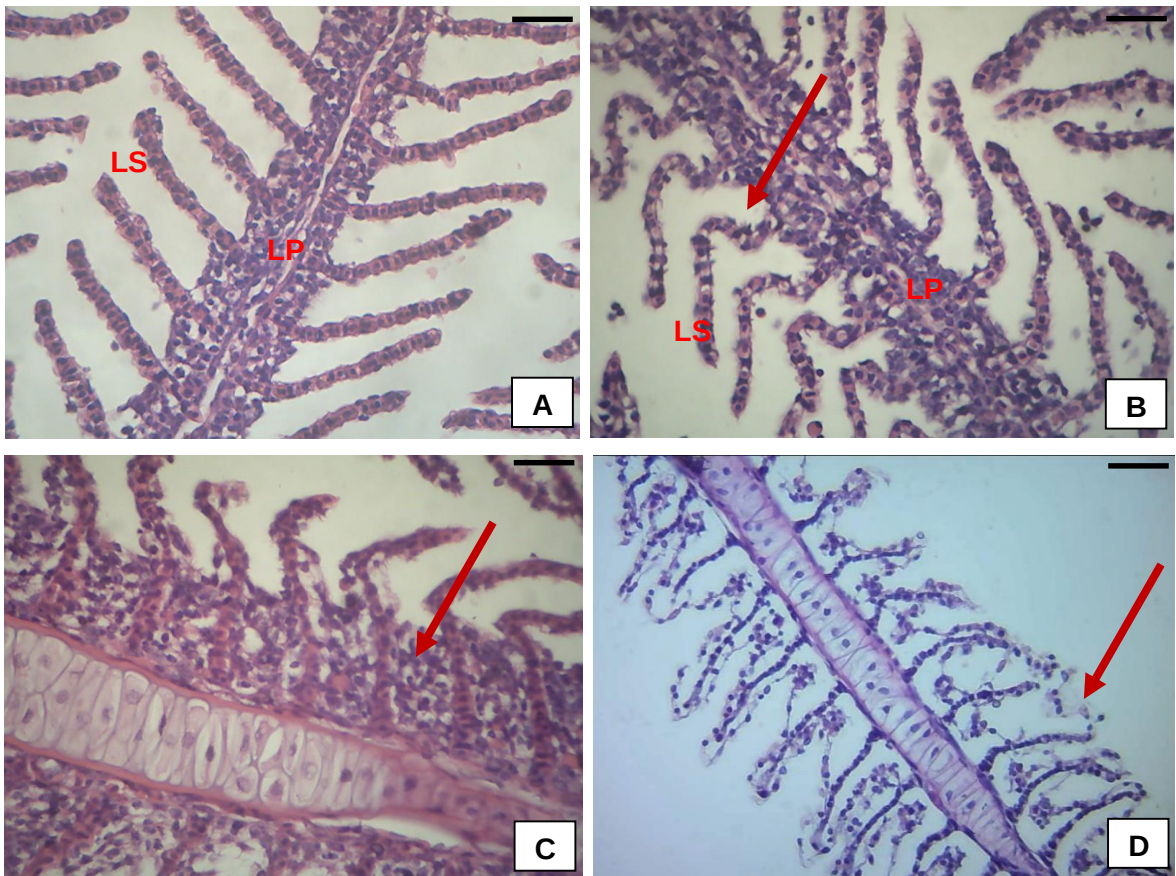


Figura 15. Fotomicrografia de cortes transversais das brânquias de tilápia após exposição aguda ao fipronil. Coloração HE. Aumento 40x. **A)** Histoarquitetura das brânquias do peixe tilápia no controle, lamelas primárias (LP) e secundárias (LS). **B)** LS com desarranjo de tilápia sobrevivente à 0,11 mg.L⁻¹ de fipronil. **C)** Hiperplasia do epitélio lamelar (seta) no peixe sobrevivente à 0,15 mg.L⁻¹. **D)** Edema subepitelial (seta) no peixe sobrevivente à 0,20 mg.L⁻¹. Barra: 50 µm.

Nas brânquias dos peixes sobreviventes às concentrações de 0,11 e 0,15 mg.L⁻¹ de fipronil nas águas foram observadas as seguintes alterações: hiperplasia do epitélio interlamelar, perda da estrutura normal das lamelas secundárias (Figura

15 B e C). Nas brânquias dos animais expostos à $0,20 \text{ mg.L}^{-1}$ foi observado um grande edema subepitelial (Figura 15 D).

Nas amostras coletadas no 15º dia de recuperação, as brânquias dos peixes apresentaram as mesmas alterações e com a mesma frequência na maior concentração avaliada ($0,20 \text{ mg.L}^{-1}$) e as mesmas alterações mas com menor frequência nas amostras dos sobreviventes a $0,11$ e $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ de fipronil.

Nas amostras do 30º dia (final) foram observadas as mesmas alterações nos animais sobreviventes à $0,20 \text{ mg.L}^{-1}$, com menor frequência, enquanto que nas amostras dos animais sobreviventes as demais concentrações foi observado que as brânquias foram restauradas à estrutura normal.

Assim como nos resultados das amostras de 24 horas, as brânquias dos animais expostos à $0,09 \text{ mg.L}^{-1}$ de fipronil permaneceram sem alterações nas avaliações do 15 e 30º dia de recuperação.

Portanto, no caso de contaminação do tanque de criação de tilápia com uma concentração igual ou menor que $0,09 \text{ mg.L}^{-1}$ de fipronil, não ocorrerá danos nas células das brânquias dos animais expostos por um período igual ou inferior à 24 horas.

As alterações que ocorreram nas brânquias de tilápia após 24 horas de exposição ao fipronil se enquadram nas lesões de primeiro e de segundo estágio propostas por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) (Tabela 17).

O valor médio do IAH para as brânquias das tilápias expostas à $0,11$; $0,15$ e $0,20 \text{ mg.L}^{-1}$ de fipronil por 24 horas foi 21, e classifica as lesões como uma danificação moderada para severa do tecido.

Assim como para o pacu, a maior concentração de fipronil avaliada para a tilápia ($0,20 \text{ mg.L}^{-1}$) equivalente à mortalidade de aproximadamente 70% do lote causou alterações branquiais mais acentuadas e incapazes de regeneração em um período de 30 dias.

Tabela 17. Alterações histológicas nas brânquias de tilápia e estágios de dano após 24 horas de exposição aguda ao fipronil.

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS BRANQUIAIS	ESTÁGIO
▪ Hiperplasia do epitélio lamelar	II
▪ Desarranjo lamelar	I
▪ Ruptura e edema subepitelial	II

5.2.2.1.2. Fígado

Na avaliação das amostras coletadas após 24 horas de exposição ao fipronil, o fígado dos peixes do tratamento controle, bem como dos sobreviventes às concentrações 0,09 e 0,11 mg.L⁻¹ de fipronil estavam normais.

No fígado dos animais sobreviventes à 0,15 mg.L⁻¹ de fipronil foi observado núcleo excêntrico do hepatócito, deformação do contorno celular e início de vacuolização citoplasmática (Figura 16 A).

No fígado dos animais sobreviventes à 0,20 mg.L⁻¹ de fipronil, foram observadas as mesmas alterações, porém mais acentuadas (Figura 16 B).

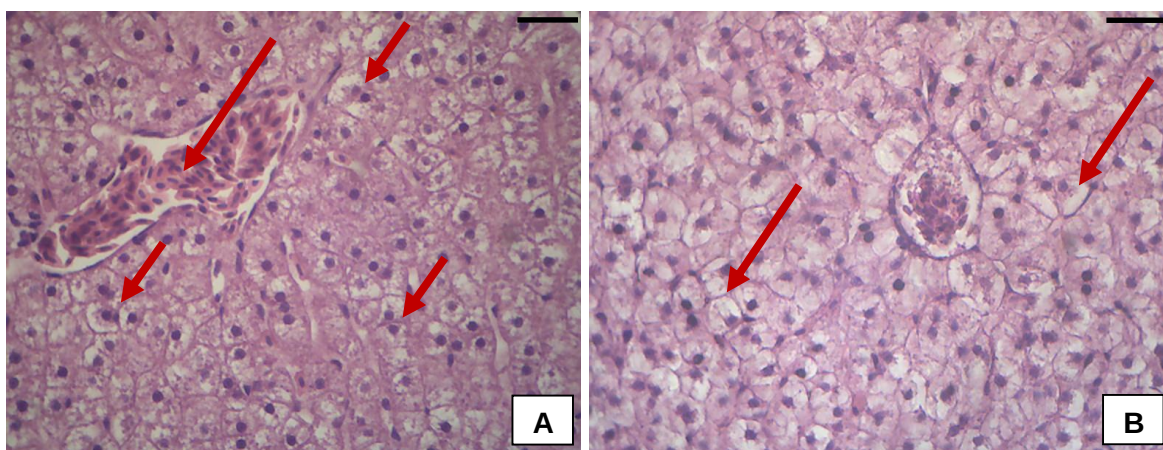


Figura 16. Fotomicrografia de cortes transversais de fígado de tilápia após exposição aguda ao fipronil. Coloração HE. Aumento 40x. **A)** Capilar sinusóide (seta grande) e núcleo excêntrico do hepatócito em peixe sobrevivente à 0,15 mg.L⁻¹ (seta pequena). **B)** Vacuolização citoplasmática (seta) em peixe sobrevivente à 0,20 mg.L⁻¹. Barra: 50 µm.

Na avaliação das amostras de fígado em 15 dias de recuperação, foram observadas as alterações descritas com menor frequência somente para os animais sobreviventes à 0,20 mg.L⁻¹ de fipronil. O fígado dos peixes sobreviventes às demais concentrações avaliadas de fipronil estavam com composição normal em relação aos peixes do controle. Na avaliação de 30 dias de recuperação, o fígado de todos os sobreviventes às concentrações de fipronil avaliadas estavam regenerados.

As alterações que ocorreram no fígado de tilápia, após 24 horas de exposição ao fipronil, se enquadram nas lesões de primeiro e de segundo estágio propostas por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) (Tabela 18).

O valor médio de IAH para o fígado dos peixes pacu expostos à 0,15 e 0,20 mg.L⁻¹ de fipronil por 24 horas foi 12, e classifica as lesões como uma danificação leve para moderada do tecido.

Portanto, 15 dias é um período suficiente para que os animais recuperem a composição normal do fígado se a contaminação com fipronil for de uma concentração igual ou menor que 0,15 mg.L⁻¹. Para uma contaminação com 0,20 mg.L⁻¹ de fipronil ou mais, 30 dias são suficientes para a recuperação do fígado das tilápias.

Tabela 18. Alterações histológicas no fígado de tilápia e estágios de dano após 24 horas de exposição aguda ao fipronil.

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS HEPÁTICAS	ESTÁGIO
1. Alteração nos hepatócitos	
▪ Núcleo excêntrico	I
▪ Deformação do contorno celular	I
▪ Vacuolização citoplasmática	II

5.2.2.1.3. Rim

Nas amostras de rins dos peixes do controle e dos sobreviventes às concentrações de 0,09; 0,11 e 0,15 mg.L⁻¹ de fipronil após 24 horas de exposição, não foram observadas alterações com relação ao estado normal (Figura 17 A).

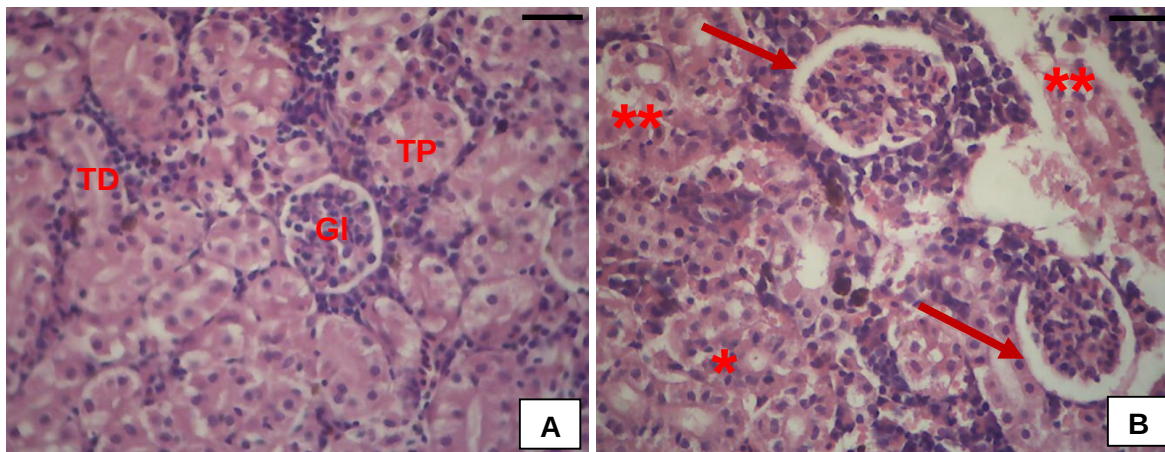


Figura 17. Fotomicrografia de cortes transversais de rim de tilápia após exposição aguda ao fipronil. Coloração HE. Aumento 40x. **A)** Sobrevivente à 0,15 mg.L⁻¹ de fipronil, túbulo distal (TD); túbulo proximal (TP); glomérulo (GI). **B)** Peixe sobrevivente à 0,20 mg.L⁻¹, aumento do espaço de Bowman (seta), rompimento (*) e vacuolização celular (**). Barra: 50 µm.

Nos peixes sobreviventes à 0,20 mg.L⁻¹ de fipronil foram observadas alterações no fígado como aumento do espaço de Bowman, vacuolização e rompimento celular (Figura 17 B).

Nas avaliações de 15 e 30 dias de recuperação, nos rins dos sobreviventes à 0,20 mg.L⁻¹ de fipronil foram observadas modificações leves como alguns pontos de vacuolização celular.

As alterações que ocorreram nos rins de tilápia se enquadram nas lesões de primeiro e de segundo estágio propostas por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) (Tabela 19).

O valor médio de IAH para os rins das tilápias coletados após 24 horas de exposição à 0,20 mg.L⁻¹ de fipronil foi 12, que classifica as lesões como uma modificação leve para moderada do tecido.

Tabela 19. Alterações histológicas nos rins de tilápia e estágios de dano após 24 horas exposição aguda ao fipronil.

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS RENAIIS	ESTÁGIO
1. Alterações tubulares	
▪ Vacuolização celular	I
▪ Rompimento celular	I
2. Alterações glomerulares	
▪ Aumento do espaço de Bowman	II

Portanto, como no caso das brânquias, a maior concentração de fipronil avaliada para a tilápia ($0,20 \text{ mg.L}^{-1}$) equivalente à mortalidade de aproximadamente 70% do lote causou alterações mais acentuadas nos rins e incapazes de regeneração em um período de 30 dias.

5.2.2.2. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

5.2.2.2.1. Cérebro dos peixes tilápia

Na análise da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) cerebral para a tilápia verifica-se que ocorreram diferenças significativas entre o tratamento controle e os com as concentrações de fipronil nas águas avaliadas nas três coletas realizadas, porém não ocorreu diferença significativa entre as coletas (Tabela 20).

A atividade da AChE foi inibida em 70 e 72% no cérebro dos animais expostos à $0,09$ e $0,20 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, após as 24 horas de exposição aguda ao fipronil nas águas.

O intervalo de concentrações de fipronil avaliado causou porcentagens de inibição da atividade da enzima AChE cerebral similares, sendo que concentrações de $0,09$ à $0,20 \text{ mg.L}^{-1}$ causarão danos ao sistema nervoso da tilápia em caso de contaminação com este inseticida.

O coeficiente de variação da AChE do cérebro de tilápia alto obtido se justifica pelo fato de que a diferença entre os valores de AChE dos animais do tratamento controle são muito altos em relação aos valores de AChE dos peixes expostos às concentrações de fipronil durante 24 horas.

Tabela 20. Valores médios da atividade da AChE (mmol/mg ptn/min) e desvio padrão (DP) no cérebro de tilápia nas três coletas realizadas durante o período de recuperação.

Concentração (mg.L ⁻¹)	24 horas		15 dias		30 dias	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle	52,54 aA	7,56	49,40 aA	6,92	48,39 aA	7,04
0,09	15,60 bA	2,98	18,31 bA	3,44	16,76 bA	2,15
0,11	15,46 bA	2,71	19,69 bA	3,09	16,45 bA	3,32
0,15	15,54 bA	3,55	18,92 bA	3,88	20,46 bA	2,61
0,20	14,44 bA	2,26	16,05 bA	3,68	16,76 bA	2,79
F Concentrações = 23,93* F Coletas = 0,10 ^{ns} F Concentrações x Coletas = 0,19 ^{ns}						
CV% = 71,43						

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si. *, ** e ns: Significativo a 1 e 5% de probabilidade e não significativo.

Diferentemente do efeito do fipronil na atividade da AChE cerebral da tilápia, em *Astyanax sp* (lambaris) a mesma não apresentou diferença entre os grupos controle e expostos à contaminação, em nenhuma das concentrações (RAMSDORF, 2011). A atividade média no grupo controle foi $28,87 \pm 2,26 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$ e nas concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de fipronil foi $31,30 \pm 3,44$; $35,80 \pm 3,22$ e $36,03 \pm 2,52 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente (RAMSDORF, 2011).

Após 15 dias de recuperação dos peixes em água livre de contaminantes, apesar dos valores de AChE serem maiores, a atividade da enzima AChE permaneceu com o mesmo grau de inibição observado na primeira coleta (24 horas de exposição).

A inibição foi de 62% nos animais expostos à 0,09 mg.L⁻¹ e 67% nos animais expostos à 0,20 mg.L⁻¹, portanto os peixes não tiveram recuperação na atividade da enzima AChE após 15 dias.

Na avaliação realizada após 30 dias de recuperação, foi observada a mesma intensidade de inibição da atividade da enzima AChE que ocorreu na primeira e na segunda coleta. A inibição foi de 65% nos peixes expostos à menor (0,09 mg.L⁻¹) e à maior concentração (0,20 mg.L⁻¹) avaliada.

Com base nestes valores e no teste estatístico, é possível afirmar que as tilápias expostas às concentrações de 0,09 a 0,20 mg.L⁻¹ de fipronil por 24 horas não se recuperaram com relação à atividade da enzima AChE cerebral, e que 30 dias não são suficientes para que esta enzima reestabeleça a atividade normal.

Os níveis da enzima AChE podem sofrer alterações devido aos fatores naturais no meio ambiente. No estudo de Durieux et al. (2011), a AChE cerebral foi medida em peixes da espécie *Morone saxatilis* durante as estações do ano. Os autores verificaram também que o aumento da temperatura diminuiu a atividade da AChE e que a salinidade das águas e o tamanho dos peixes não afetam a atividade da enzima. O efeito da temperatura não ocorreu nas tilápias em estudo.

De acordo com Gagné (2014), a mudança na atividade da enzima AChE pode causar alterações no comportamento e na atividade neuromuscular, sendo considerada como um biomarcador de neurotoxicidade, o qual é muito utilizado em estudos ecotoxicológicos com organismos não-alvo, como peixes, expostos a agrotóxicos.

Uma inibição de 20% na atividade da enzima AChE em peixes indica exposição a neurotóxicos, de 20-50% indica que ocorreu impactos subletais e acima de 70% está associada a mortalidade (AMIARD-TRIQUET; AMIARD; MOUNEYRAC, 2015), como pode ser observado nas maiores concentrações de fipronil tanto para o pacu quanto para a tilápia.

5.2.2.2.2. Músculo dos peixes tilápia

Na análise da atividade da enzima AChE muscular para a tilápia, é possível afirmar que não ocorreu diferença estatística entre os valores obtidos nos animais do controle e nas concentrações avaliadas e nem entre as coletas durante a recuperação dos animais (Tabela 21).

Na primeira coleta com 24 horas de exposição ao inseticida fipronil ocorreu uma inibição de 23 (0,09 mg.L⁻¹) à 24% (0,20 mg.L⁻¹) da atividade da enzima AChE muscular (Tabela 21). Apesar do intervalo de concentrações causar porcentagens de mortalidade crescentes, pode ser observado que o mesmo resultou em porcentagens de inibição quase iguais.

Tabela 21. Valores médios da atividade da AChE (mmol/mg ptn/min) e desvio padrão (DP) no músculo de tilápia nas três coletas realizadas durante o período de recuperação.

Concentração (mg.L ⁻¹)	24 horas		15 dias		30 dias	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle	70,66	12,32	61,49	10,15	61,17	11,20
0,09	54,26	9,62	52,06	7,06	51,76	8,77
0,11	54,68	8,71	52,00	8,58	50,17	7,45
0,15	54,77	9,33	50,96	6,55	50,42	7,98
0,20	53,02	9,78	49,97	7,18	50,62	7,80
F Concentrações = 1,21* F Coletas = 0,43 ^{ns} F Concentrações x Coletas = 0,53 ^{ns}						
CV% = 15,23						

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si. *, ** e ns: Significativo a 1 e 5% de probabilidade e não significativo.

O coeficiente de variação da AChE do músculo de tilápia é menor que o obtido nos valores de AChE do cérebro, pois ocorreu inibição desta enzima em menor grau (Tabela 21).

Pela comparação dos valores da atividade da AChE no musculo da tilápia (Tabela 21), verifica-se que foram similares aos observados em lambari (*Astyanax sp*), inclusive o efeito do fipronil sobre a enzima (RAMSDORF, 2011).

Neste estudo de Ramsdorf (2011), ocorreu diferença entre o grupo controle (média de $45,14 \pm 4,01 \text{ } \eta\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$) e os grupos expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fipronil ($18,97 \pm 1,29$; $19,08 \pm 3,13$ e $29,31 \pm 2,36 \text{ } \eta\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente). Portanto, houve uma inibição da atividade da AChE no músculo nos grupos expostos (RAMSDORF, 2011).

Na avaliação de 15 dias de recuperação dos animais em água livre de contaminantes, a atividade da enzima AChE muscular permaneceu com valores próximos aos que foram observados com 24 horas de exposição.

A menor concentração de fipronil avaliada (0,09 mg.L^{-1}) inibiu 15% da atividade da enzima AChE muscular e a maior (0,20 mg.L^{-1}) inibiu 18%. Portanto, não ocorreu recuperação dos animais estatisticamente significativa em nenhuma das concentrações de fipronil avaliadas.

O mesmo comportamento ocorreu nos resultados das amostras após 30 dias de recuperação. A menor concentração de fipronil avaliada (0,09 mg.L^{-1}) inibiu 15% da atividade da enzima AChE muscular e a maior (0,20 mg.L^{-1}) inibiu 17%.

É possível afirmar que apesar de estas concentrações de fipronil causarem baixa inibição da atividade da enzima AChE muscular, sendo a maior inibição em 24 horas na maior concentração avaliada (24%), os peixes não conseguem recuperar e normalizar a AChE no músculo aos 30 dias de recuperação em água limpa após a exposição aguda de 24 horas a concentrações de até 0,20 mg.L^{-1} de fipronil nas águas.

Outros agrotóxicos também causam inibição da enzima AChE muscular em tilápia, como o trichlorfon, que causou a inibição a partir de uma única dosagem (0,25 mg.L^{-1} = dose recomendada para tratamento de parasitos em peixes) durante oito horas de exposição (GUIMARÃES et al., 2007). Outro exemplo é o pesticida organoflurine chamado etoxazole, que causou inibição de até 80% da atividade da enzima AChE nas tilápias (SEVGILER et al., 2004).

A atividade da enzima AChE pode variar de acordo com a espécie de peixe, como pode ser observado na diferença entre os valores obtidos para o pacu e para a tilápia. Nos animais do tratamento controle, observa-se que a atividade da enzima AChE naturalmente é menor nas tilápias que nos pacus.

A atividade normal da enzima AChE também varia entre outras espécies de peixes. Chuiko (2000) cita que o nível da atividade da enzima AChE de peixes da família Cyprinidae é maior que nos peixes das famílias Percidae e Esocidae.

Os toxicantes nas águas podem causar aumento ou redução na atividade a AChE muscular. Reddy et al. (1993) verificaram aumento na atividade da AChE de peixes da espécie *Channa punctatus* expostos a 6,6 mg.L⁻¹ de fenol na água por 15 dias.

Por outro lado, em matrinxã (*B. amazonicus*) o fenol, na concentração de 2 mg.L⁻¹, causou inibição da atividade da AChE muscular depois de 96 horas de exposição. Entretanto, os peixes recuperaram a atividade da AChE depois de 14 dias em água limpa (AVILEZ, 2008).

5.2.2.3. Limite de aceitabilidade de inibição da AChE para tilápia

O limite de aceitabilidade de inibição da AChE no cérebro definido para a tilápia é de 70% e no músculo é de 22% no caso de contaminação com fipronil em concentrações de até 0,15 mg.L⁻¹ de fipronil e que causem até 50% de mortalidade (Figura 18 e 19).

Apesar do limite de aceitabilidade de inibição da atividade da AChE em ambos os peixes ser de 70%, é possível observar que no caso da tilápia a concentração de fipronil necessária para causar esta alta taxa de inibição da AChE cerebral é menor (0,15 mg.L⁻¹). Portanto, a enzima AChE no cérebro da tilápia é mais sensível à molécula de fipronil que no cérebro de pacu.

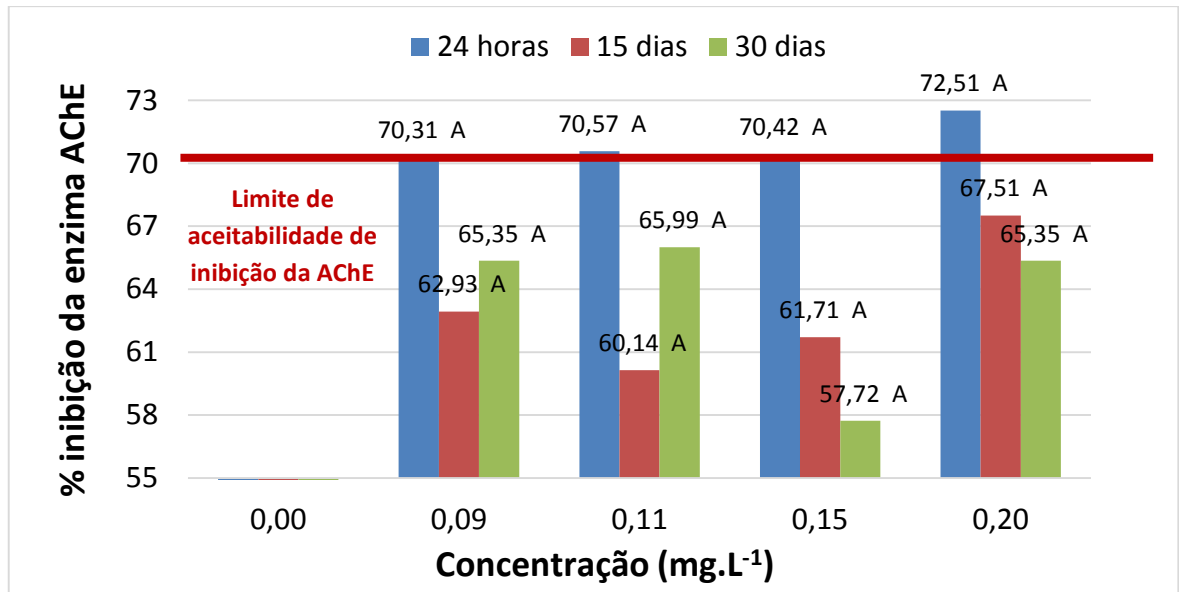


Figura 18. Inibição da enzima AChE no cérebro de tilápia nas três coletas realizadas. Médias de porcentagens de inibição da AChE em cada concentração durante o período de recuperação seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si.

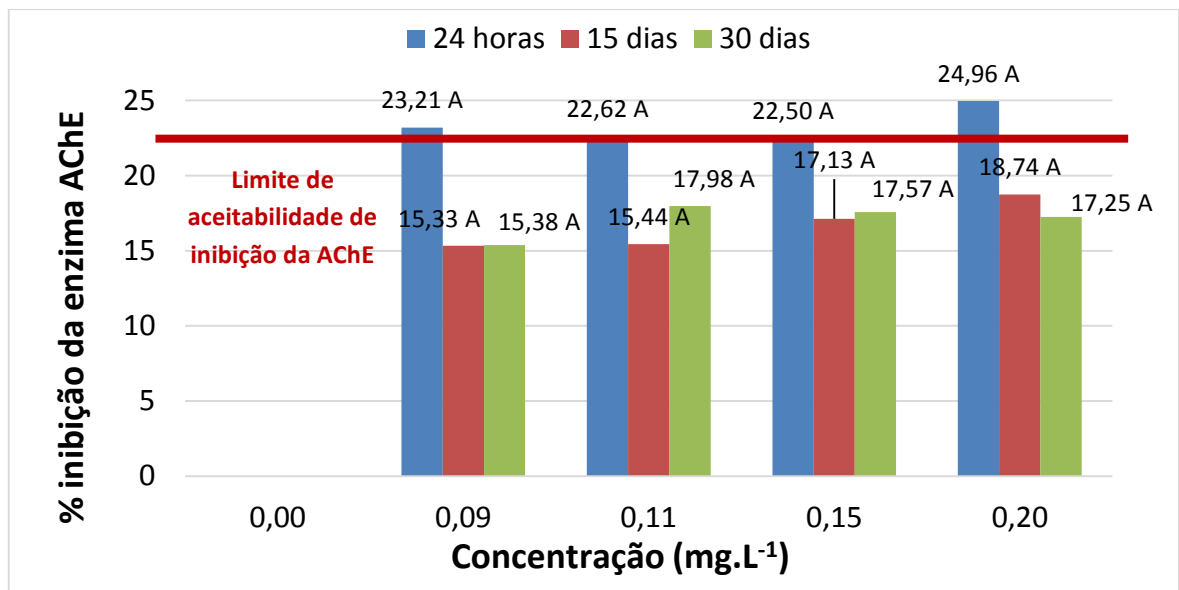


Figura 19. Inibição da enzima AChE no músculo de tilápia nas três coletas realizadas. Médias de porcentagens de inibição da AChE em cada concentração durante o período de recuperação seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si.

5.2.2.4. Análise de qualidade de água

Na avaliação da qualidade de água a partir do primeiro dia de recuperação dos peixes tilápia, assim como para o pacu, não ocorreram grandes variações nos parâmetros avaliados no ensaio para tilápia (Tabela 22).

A temperatura média variou de 26,22 no controle para 26,63 na maior concentração avaliada (0,20 mg.L⁻¹); a condutividade elétrica variou de 0,269 para 0,286 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ na maior concentração; o pH variou de 7,87 para 7,70 na maior concentração e o oxigênio dissolvido variou de 5,46 para 5,80 mg.L⁻¹ na maior concentração.

Nas avaliações feitas após 15, 21 e 30 dias, as variáveis de qualidade de água permaneceram com valores similares aos que foram obtidos em 24 horas, com pequenas variações. Assim como nos ensaios em laboratório e no ensaio de recuperação para o pacu, não ocorreu alteração na temperatura, pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido na água durante a recuperação da tilápia.

No estudo realizado por Ngim & Crosby (2001) com diferentes formulações de fipronil avaliadas em condições de lavoura, a degradação de fipronil resultou em tempos de meia vida variável de 10,5 a 125h (DT50 médio = 5,2 dias) em água a 44,5 a 533 h (DT50 médio = 22 dias) no solo, indicando que a persistência de fipronil variou de baixa a moderada.

Como o fluxo de água foi contínuo na recuperação para as duas espécies e não foi colocado nenhum tipo de solo no fundo, os resíduos de fipronil oriundos dos animais provavelmente foram diluídos e/ou dissipados muito rapidamente.

Em temperaturas mais elevadas (27°C a 29°C), o crescimento destas espécies é mais rápido, enquanto que temperaturas mais baixas tornam o crescimento mais lento, sendo a faixa ótima em temperatura de 26 a 28 °C (KUBITZA, 2000).

O valor de pH recomendado para um ótimo desenvolvimento da grande maioria das espécies de peixes varia de 6,5 a 8,5. Valores inferiores a 6,5 ou superiores a 8,5 causam problemas fisiológicos diversos tanto no crescimento quanto na reprodução. Com relação ao oxigênio dissolvido, os valores obtidos

permaneceram dentro dos padrões considerados bons para desenvolvimento das espécies pacu e tilápia (acima de 4 mg.L⁻¹) (ARANA, 1997). Portanto, os parâmetros de qualidade de água durante os ensaios favoreceram a recuperação dos peixes.

Tabela 22. Valores médios das variáveis de qualidade da água durante o ensaio de recuperação dos peixes da espécie tilápia aos 1, 15, 21 e 30 dias após a transferência dos sobreviventes às concentrações de fipronil.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Temperatura				Desvio Padrão	pH				Desvio Padrão
	1d	15 d	21d	30d		1d	15 d	21d	30d	
Controle	26,22	26,22	26,06	25,97	0,124	7,87	7,43	7,81	7,92	0,223
0,09	26,44	26,16	26,38	25,72	0,327	7,67	7,96	7,91	7,79	0,130
0,11	26,22	26,46	26,35	26,49	0,123	7,75	7,51	7,43	7,70	0,152
0,15	26,59	25,91	26,32	25,89	0,339	7,68	7,62	7,37	7,67	0,146
0,20	26,63	26,67	26,21	26,17	0,267	7,70	7,85	7,86	7,62	0,117
Concentração (mg.L ⁻¹)	Condutividade elétrica				Desvio Padrão	Oxigênio dissolvido				Desvio Padrão
	1d	15 d	21d	30d		1d	15 d	21d	30d	
Controle	0,269	0,291	0,283	0,261	0,013	5,46	5,40	5,55	5,60	0,090
0,09	0,287	0,292	0,298	0,296	0,005	5,78	5,11	5,34	5,76	0,328
0,11	0,277	0,287	0,274	0,275	0,006	5,21	5,21	5,17	5,52	0,162
0,15	0,285	0,277	0,284	0,283	0,003	5,20	5,29	5,41	5,84	0,283
0,20	0,286	0,282	0,295	0,293	0,006	5,80	5,18	5,49	5,38	0,259

6. CONCLUSÃO

O inseticida fipronil causa mortalidade de aproximadamente 10, 30, 50 e 70% do lote de peixes em 24 horas se ocorrerem contaminações das águas dos tanques de produção de pacu com concentrações de 0,56; 0,59; 0,61 e 0,64 mg.L⁻¹, respectivamente. O mesmo ocorre em tanque de produção de tilápia se as contaminações das águas com fipronil forem com 0,09; 0,11; 0,15 e 0,20 mg.L⁻¹ de fipronil, respectivamente. Por serem concentrações muito baixas, é possível que este inseticida chegue nos tanques de pisciculturas próximas às culturas onde foi aplicado.

Em poucas horas de exposição às determinadas concentrações, o fipronil causa sinais de intoxicação, principalmente natação errática, espasmos musculares e mudanças na coloração, que o responsável pela piscicultura poderá observar no comportamento dos peixes, tanto do pacu quanto da tilápia.

Com 24 horas de exposição aguda ao fipronil ocorrem alterações histológicas nos tecidos de ambas as espécies, cuja intensidade depende diretamente da concentração na água. As concentrações que causam aproximadamente 70% de mortalidade dos peixes do lote para as duas espécies são as que causam os danos mais acentuados nos tecidos avaliados, principalmente em brânquias. Além disso, o fipronil causa altas taxas de inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro (em torno de 70%) e, em taxas mais baixas, no músculo (de 20 à 35%) no pacu e na tilápia.

No período de recuperação, o responsável pela piscicultura verá que os animais aparentemente se recuperam, pois os sinais de intoxicação tanto no pacu quanto na tilápia desaparecem com três dias (72 horas) em água livre de contaminantes.

Os peixes pacu sobreviventes à 0,56 mg.L⁻¹ de fipronil recuperam a atividade da enzima AChE muscular em 15 dias e a cerebral em 30 dias, porém permanecem com altas taxas de inibição da AChE cerebral. Para os sobreviventes às demais concentrações, 30 dias causa uma melhora, porém a inibição da AChE cerebral permanece alta (20 à 55%).

Para a tilápia, a atividade da enzima AChE cerebral permanece altamente inibida (até 66%) após 30 dias de recuperação da exposição aguda ao fipronil. Apesar da menor intensidade inicial de inibição da AChE muscular (até 24%), também não ocorre recuperação em 30 dias.

A tilápia é mais sensível ao inseticida fipronil do que o pacu, tanto nas concentrações que causam mortalidade do lote quanto nas alterações causadas por este inseticida.

Para ambas as espécies avaliadas, 30 dias não são suficientes para total recuperação da atividade enzimática da AChE. Estas altas taxas de inibição são responsáveis pelos sinais de intoxicação que o produtor poderá observar no comportamento dos peixes.

O limite de aceitabilidade de inibição da AChE no cérebro foi de 70% para as duas espécies, e no músculo foi de 30% para o pacu e 22% para a tilápia. Estes valores correspondem às concentrações de até 0,61 mg.L⁻¹ de fipronil para o pacu e de até 0,15 mg.L⁻¹ para a tilápia, as quais causaram até 50% de mortalidade do lote.

As concentrações de fipronil avaliadas não causam alterações nas variáveis de qualidade de água tanto em 24 horas de diluição quanto em água com constante renovação. Todos os danos ocorridos nos animais são exclusivamente causados pelo inseticida fipronil, sendo de extrema importância a manutenção das ótimas condições da água para que os peixes possam se recuperar mais rapidamente.

Não há interferência no ganho de peso dos peixes de ambas as espécies até 30 dias de recuperação após a exposição aguda a concentrações que causam até 70% de mortalidade dos lotes, sendo este fator de extrema importância para o piscicultor.

Portanto, no caso de contaminação dos tanques de criação de pacu e tilápia com fipronil que causem mortalidade de até 70% do lote, a recuperação dos peixes sobreviventes durante 30 dias é satisfatória para manter os peixes no sistema de produção da piscicultura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15088: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. São Paulo, 19p. 2011.

ADELMAN, I.R. SMITH, L.L. SIESENNOP, G. Acute toxicity of sodium choride, pentachlorophenol, guthion® and hexavalent chromium to fathead minnows (*Pimephales promelas*) and gold fish (*Carassius auratus*). **J. Fish. Res. Board. Can.** v. 33, p. 203-208, 1976.

AGROFIT, **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Regent 800 WG: Relatório de produtos formulados**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2007, 3p.

ALBINATI, A. C.; MOREIRA, E. T.; ALBINATI, R. C.; CARVALHO, J. V.; DE LIRA, A. D.; SANTOS, G. B.; VIDAL, L. V. Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 61(3), p. 621-627, 2009.

AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J. C.; MOUNEYRAC, C. **Aquatic Ecotoxicology: advancing tools for dealing with emerging risks**. London, San Diego, Waltham, Oxford: Elsevier, 2015. 504 p.

ANVISA BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. **Anvisa divulga resultado do monitoramento de agrotóxico em alimentos**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014.

ANVISA – AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; UFPR. Seminário MERCADO DE AGROTÓXICO E REGULAÇÃO, Brasília, 2012. In: Dossiê ABRASCO: **Uma alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Rio de Janeiro/São Paulo, 2015. 628p.

ARANA, L. V. **Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura**. Florianópolis: Ed. da UFSC, 1997.

ARAÚJO, A. **Toxicologia aquática: metodologias e aplicação**. São Paulo, p.32, 2000.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M. EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p. 61-72, 2007.

AUGUSTO, L. G. S.; CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W. A.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; FARIA, N. M. X.; BÚRIGO, A. C.; FREITAS, V. M. T. Saúde, ambiente e sustentabilidade. In: CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. (Org.). **Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. Parte 2.

AVILEZ, I. M. **Estudo do metabolismo antioxidativo, a biotransformação hepática e as alterações histológicas de *Brycon amazonicus* (Agassiz, 1829), matrinxã, (Teleostei; Characidae), submetido ao fenol**. 159f. Tese de doutorado, Programa de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos – SP: Editora Rima, 2003.

BAGANZ, D. **Comparing locomotor behaviour of fish species *Danio rerio* and *Leucaspis delineatus* under the influence of Chemical stressors** (tese de doutorado). Berlin: Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I, der Humboldt-Universität zu Berlin. 2005.

BARCAROLLI, I. F.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of aluminium in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 72(3), p. 639 – 646, 2004.

BAIRD, C. **Química ambiental**. 2 ed. Bookman, Porto Alegre, 2002, 622 p.

BARRON, M. G. Bioconcentration: will water-borne organic chemicals accumulate in aquatic animals? *Environmental Science and Technology*, Easton, v. 24, n. 11, p. 1612 – 1618, 1990.

BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS-NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 1976, 239p.

BERNET, D. SCHMIDT, H. MEIER, W. BURKHARD-HOLM, P. WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.

BOBE, A., COOPER, J. F., COSTE, C. M. Factors Influencing the adsorption of fipronil on soils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 45, p. 4861-4865, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding assay. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, I. A. e VALLE, V. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.16, p.279-293, 2007.

BUTCHIRAM, M. S., KUMAR, M. V., TILAK, K. S. Studies on the histopathological changes in selected tissues of fish *Labeo rohita* exposed to phenol. **Journal of Environmental Biology**. v. 34(2), p. 247-251, 2013.

CARR, R. L.; CHAMBERS, J. E. Kinetic analysis of the in vitro inhibition, aging, and reactivation of brain acetylcholinesterase from rat and channel catfish by paraoxon and chlorpyrifos-oxon. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 139(2), p. 365-373, 1996.

CARRASCHI, S. P., CRUZ, C., MACHADO NETO, J. G., CASTRO, M. P., BORTOLUZZI, N. L., GIRIO, A. C. F. Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 63(3), p. 579-583, 2011.

CELLA, A. L. **Ecotoxicologia do agrotóxico fipronil em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e paulistinha (*Danio rerio*) e resíduos de agrotóxicos na bacia do rio Corumbataí**. 2009. 93 p. Tese (Doutorado), Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo, Brasil.

CENGIZ, E. I. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** n. 22, p. 200-204, 2006.

CHANDLER, G. T.; CARY, L. T.; VOLZ C. D.; WALSE, S. S.; FERRY, I. J.; KLOSTERHAUS, I.S. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.23, n.1, p.117–124, 2004.

CHUIKO, G. M. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 127, p. 233-242, 2000.

CONG, N.V.; PHUONG, N.T.; BAYLEY, M. Brain cholinesterase response in the snakehead fish (*Channa striata*) after field exposure to diazinon. **Ecotox. Environ. Saf.** v. 71, n. 2, p. 314-318, 2008.

CONNELLY, P. **Environmental fate of fipronil**: California Environmental Protection Agency, Department of Pesticide Regulation. 2001. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/fipronilrev.pdf>>. Acesso em: novembro de 2014.

CURI, R.; PROCOPIO, J.; FERNANDES, L. C. **Praticando Fisiologia**. Manole, Barueri – SP, 2005.

DA CUNA, R. H., VAZQUEZ, G. R., PIOL, M. N., GUERRERO, N. V., MAGGESE, M. C., NOSTRO, F. L. L. Assessment of the acute toxicity of the organochlorinepesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 74(4) p. 1065-1073, 2011.

DALE, H. H.; The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.6, p.147-90, 1914.

DEMBELÉ, K.; HEUBRUGE, E.; GASPARD, C. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, p. 49-54, 2000.

DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R.; CARNEIRO, D. J.; URBINATI, E. C. Tempo de trânsito gastrointestinal e esvaziamento gástrico do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em diferentes temperaturas de cultivo. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 27, n. 3, p.413-417, 2005.

DOGAN, D.; CAN, C. Hematological, biochemical and behavioral responses of *Onchorhynchus mykiss* to dimethoate. **Fish, physiology and biochemistry**, 2011: DOI 10.1007/s10695-011-9492-1.

DURIEUX, E. D. H; FARVER, T. B.; FITZGERALD, P. S.; EDER, J. K.; OSTRACH, D. J. Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in Young-Of-Year striped bass (*Morone saxatilis*). **Fish Physiol. Biochem.**, v.37, p. 21–29, 2011.

DUTTA, H. M.; ARENDS, D. A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environmental Research** v. 91, p. 157-162, 2003.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, J. R., FEATHERSTONE, R. M. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, n. 7, p. 88-95, 1961.

ERKMEN, B., KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River. **Turkey Bulletin Environmental Contamination Toxicology**. v. 64, p. 418–425, 2000.

ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J.; DORNFELD, C. B. Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu. In: BRIGANTE, J., ESPÍNDOLA, E. L. G. **Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu**. São Carlos: Rima, 2003. p.129–148.

EVANS, D. H. **The Physiology of Fishes**. Boca Raton: CRC Press, 1993.

FANOURAQUI, E.; LAITINEN, J. T.; DIVANACH, P.; PAVLIDIS, M. Endocrine Regulation of Skin Blanching in Red Porgy, *Pagrus pagrus*. **Ann. Zool. Fenicci**, v. 44, p. 241 – 248, 2007.

FANTA, E.; RIOS, F.S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A.C.C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotox. Environ. Saf.** n. 54, p. 119-130, 2003.

GAGNÉ, F. **Biochemical Ecotoxicology: principles and methods**. London, Waltham, San Diego: Elsevier, 2014. 257 p.

GERNHOFER, M.; PAWET, M.; SCHRAMM, M.; MÜLLER, E.; TRIEBSKORN, R. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. **Journal of Aquatic Ecosystem, Stress and Recovery**. v. 8, p. 241-260, 2001.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Brasília: UNB, 2005.

GRÜTZMACHER, D. D., GRÜTZMACHER A. D., AGOSTINETTO, D., LOECK, A. E., ROMAN, R., PEIXOTO, S. C., ZANELLA, R. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12(6), p. 632–637, 2008.

GUIMARÃES, A. T. B. ASSIS, H. C. S. BOEGER, W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. **Ecotox. Environm. Safety**, v. 68, p. 57-62, 2007.

GUNASEKARA, A. S., TROUNG, T. Environmental fate of Fipronil. Environmental Monitoring Branch. Department of Pesticide Regulation. **California Environmental Protection Agency**. USA, 2007.

HAMILTON, M.A. RUSSO, R.C. THURSTON, V. Trimed Sperman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. **Environ. Scien. Technol.**, v. 7, p.714-719, 1977.

HENARES, M. N. P.; CRUZ, C.; GOMES, G. R.; PITELLI, R. A.; MACHADO, M. R. F. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.30, n.1, p. 77-82, 2008.

HORNBERG, A., TUNEMALM, A., EKSTROM, F. Crystal structure os acethylcholinesterase in complex with organophosphorus compounds suggest that the actyl pocket modulates the aging reaction by precluding the formation of the trigonal bypyramidal transition state. **Biochemistry**, New York, v. 46, n. 16, p. 4815 – 4825, 2007.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v.41, 2017. 108p.

JINDAL, R. & KAUR, M. Acetylcholinesterase inhibition and assessment of its recovery response in some organs of *Ctenopharyngodon idellus* induced by chlorpyrifos. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v. 3, n. 2, p. 473 – 480, 2014.

JOBLING, S.; SUMPTER, J.P. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Aquatic Toxicol.** v. 27, p.361-372, 1993.

JOHNSON, L.L.; STEHR, C.M.; OLSON, O.P. MYERS, M.S.; PIERCE, S.M.; WIGREN, C.A.; MCCAIN, B.B.; VARANASI, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States. **Envir. Scie. Technol.**, v. 27, p. 2759-2771, 1993.

JOMORI, R.K.; C. DUCATTI; D.J. CARNEIRO AND M.C. PORTELLA. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 370-381, 2008.

JOSE A. S.; FRANCISCATO, C.; SONEGO, F.; FIGUEIRO, M.; THIESEN, F. V.; GARCIA, S. C. Sensitivity of young rats to nicotine exposure: Physiological and biochemical parameters. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v.72, p.242-247, 2009.

KATULI, K., AMIRI, B. M., YELGHI, S. Sublethal effects of organophosphate, diazinon on gill tissue and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fingerling kept in fresh water and brackish water. **Iranian Journal of Aquatic Animal Health**. v. 1(1), p. 37-44, 2014.

KHAN, S. A., LIU, X., SHAH, B. R. Impact of acute toxicity of lead acetate on the level of essential trace metals and histopathological changes in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). **JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences**. v. 24(5), p. 1405-1414, 2014.

KWONG, T. C. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. **Ther Drug Monit**, v. 24, p. 144-149, 2002.

KRÜGER, L. E. Uma abordagem sistêmica da atual crise ambiental. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 4, p. 37-43, 2001.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiá: Fernando Kubitza, 2000.

LOPES, R. B. **Análise ecotoxicológica dos xenobióticos trichlorfon e diflubenzuron empregados na aquicultura continental**. 2005. Tese de doutorado em Ciências – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

LOVSHIN, L. L.; CYRINO, J. E. P. Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2., 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: CBNA, 1998. p.1-20.

MADUENHO, L.P.; MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol. Part C**. n.148, p.265-272, 2008.

MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n.3, p. 355-381, 2008.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal Fisheries Aquatic Science**. v. 42, p. 630-648, 1985.

MANRIQUE, W. G.; FIQUEIREGO, M. A. P.; MACHADO-NETO, J. G. Dissipation and environmental risk of fipronil on aquatic environment. **The Biologist (Lima)**, vol. 11, n. 1, p. 107-117, 2013.

MELO, G.C.; DONATTI, L.; RUDNIKI, C.A.M.; FANTA, E. Hepatic alterations in the fish *Rhamdia quelen* contaminated with Folidol 600®. **Ecotox. Environ. Saf.** n.71, p.821-829, 2008.

MIRON, D. S. **Respostas metabólicas e enzimáticas em jundiás *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) e piavas *Leporinus obtusidens* (Anostomidae) expostos a herbicidas utilizados na cultura de arroz irrigado**. Tese de doutorado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2009. 113 p.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, p. 294-299, 2010.

MOHLER, H.; FRITSCHY, J. M.; CRESTANI, F.; HENSCH, T.; RUDOLPH, U. Specific GABA(A) circuits in brain development and therapy. **Biochem. Pharmacol.**, v.15, n.8, p.1685-1690, 2004.

MORAES, B. S.; LORO, V. L.; GLUCSZAK, L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; MARCHEZAN, E.; MACHADO, S. O. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v. 68, p. 1597-1601, 2007.

MORGAN, M.; TOWELL, P.W.A. The structure of the gill of the *Salmo Gairdneri* (Richardson). **Zoology Zellforsh**, v. 142, p. 147-162, 1973.

MORON, S. E. et al. Estudo de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida atrazina. **Journal of the brazilian society of ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 27-30, 2006.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: Editora RiMa, p. 464, 2006.

MUNOZ-DE-TORO, M.; BELDOMENICO, H. R.; GARCIA, S. R. Organochlorine levels in adipose tissue of women from a littoral region of Argentina. **Environ. Res.**, v. 102, p. 107-112, 2006.

NGIM, K. K.; CROSBY, D. G. Abiotic processes influencing fipronil and desthiofipronil dissipation in California, USA, rice fields. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 972-977, 2001.

OHI, M.; DALSENTER, P. R.; ANDRADE, A. J. M.; NASCIMENTO, A. J. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 146, p. 121-127, 2004.

OPAZO, M. A. U. **Gráficos de controle**. 2008. Acesso em: 15 de agosto de 2017. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/53805106/Grafico-Controle-Cap2A-2008>.

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

PETRONILHO, E. C.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e Guerra química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, v.28, p. 3-14, 2011.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDŽIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. IN: MÜLLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. **Oxford: Fishing News Books**, cap. 30, p. 339-352, 1994.

POPMA, T. J.; PHELPS, R. P. Status report to commercial tilápia producers on monosex fingerling productions techniques. In: AQUICULTURA BRASIL, 1998, Recife. **Anais...** Recife: Simbraq, 1998. p.127-145.

RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, E.; AKAISHI, F. M.; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary

Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 147-156, 2005.

RABOUILLE, C.; AMOUROUX, D.; ANSCHUTZ, J.; JOUANNEAUX, J. M.; GILBERT, F.; COSSA, D.; PREVOT, F. Biogeochemical and contaminant cycling in sediments from a human-impacted coastal lagoon – Introduction and summary. **Estuarine Coastal Shelf Science**, v. 72, p. 387-392, 2006.

RAMSDORF, W. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. 2001. 178 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

RASHED, M. N.; Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser lake. **Environment International**, v. 27 p. 27-33, 2001.

REDDY, M. M.; KUMAR, V. V.; REDDY, P. S.; REDDY, S. L. N. Phenol induced alterations in the brain and muscle of a fresh water fish *Channa punctatus* during toxicosis. **Ecotoxicol. Environ. Monit.**, n. 3, p. 13-17, 1993.

REIMSCHUESSEL, R. A fish model of renal regeneration and development. **Ilar Journal**. v. 42, p. 285-291, 2001.

RHÔNE-POULENC AG COMPANY. 1998. **Application for Registration**. Volume No. 52062-071. v. 1. Department of pesticide regulation, California Environmental Protection Agency, Sacramento, CA.

ROCHA, T. L., DOS SANTOS, A. P. R., YAMADA, Á. T., DE ALMEIDA SOARES, C. M., BORGES, C. L., BAILÃO, A. M., SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 40(1), p. 175-186, 2015.

SANTOS, C. A. A toxidade dos agrotóxicos usados na lavoura de soja na cidade de Catalão-GO, e seus impactos no ambiente - Um estudo de caso. **Novos Direitos**. v. 1(1), p. 58-76, 2015.

SCHMIDT – NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. 5.ed. São Paulo: Santos, 1996. p. 600.

SCHRECK C. B.; OLLA B. L.; DAVIS, M. W. Behavioral response to stress. In: Iwama GK, Pickering, AAD, Sumpter JP, Schreck CB, editors. **Fish stress and Health in Aquaculture**. Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 145-170. 1997.

SCORVO FILHO, J. D.; FRASCA-SCORVO, C. M. D.; ALVES, J. M. C.; SOUZA, F. R. A. A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. **R. Bras. Zootec.**, vol.39, pp. 112-118, 2010.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974.

SEPIC-DINÇEL, A.; CALAN, K. B. A.; SELVI, M.; SARIKAYA, R.; SAHIN, D.; AYHAN OZKUL, I.; ERKOC, F. Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations. **Ecotoxicol Environmental Safety**. v. 72, p. 1433-1439, 2009.

SEVGILER, Y.; ELIF, E. O.; OZCAN, O.; NEVIN, E. U. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 78: 1-8, 2004.

SHEPHARD, K. L. **Functions for fish mucus**. Review in fish biology and fisheries. Vv.4, p. 401-429, 1994.

SHIOGIRI, N. S.; PAULINO, M. G.; CARRASCHI, S. P.; BARALDI, F. G.; DA CRUZ, C.; FERNANDES, M. N. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 34(2), p. 388-396, 2012.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, Africa, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SIMONATO, J. D., GUEDES, C. L. B., MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 69(1), p. 112-120, 2007.

SOSO, A. B.; BARCELLOS, L. J. G.; RANZANI-PAIVA, M. J.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; ANZILIERO, D.; LIMA, M.; SILVA, L. B.; RITTER, F.; BEDIN, A. C.; FINCO, J. A. Chronic exposure to sub-lethal concentration of glyphosate based herbicide alters hormone profiles and effects reproduction of female jundiá (*Rhamdia quelen*). **Environ. Toxicol. Pharm.**, v. 23, p. 308-313, 2007.

SPADOTTO, C. A.; SCORZA JUNIOR, R. P.; DORES, E. F. G. de C.; GEBLER, L.; MORAES, D. A. de C. Fundamentos e aplicações da modelagem ambiental de agrotóxicos. **Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite**, 2010. 46 p. (Embrapa Monitoramento por Satélite. Documentos, 78).

SPERANDIO, Luciane Messias. Criação de tilápias em tanque-rede. In: Disponível: <http://www.gestaonocampo.com.br/biblioteca/criacao-de-tilapias-em-tanque-rede/> Acesso em: 14.11.2017.

STARK, D. J.; VARGAS, I. R. Toxicity and hazard assessment of fipronil to *Daphnia pulex*. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v.62, p.11–16, 2005.

STEFANI MARGARIDO, T. C. **Biomarcadores bioquímicos de contaminação em girinos de anfíbios anuros expostos a Regent®800WG (Fipronil)** / Tatiana Cristina Stefani Margarido. - São José do Rio Preto: [s.n.], Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE UNESP), 2011.

TAKASHIMA, F., HIBYA, T., 1995. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**, 2nd ed. Tokyo, Kodansha. p.283–331.

TIERNEY, K. B., BALDWIN, D. H., HARA, T. J., ROSS, P. S., SCHOLZ, N. L., KENNEDY, C.J. Olfactory toxicity in fishes **Aquat. Toxicol.** n.96, p. 2-26, 2010.

TINGLE, C. C.; ROTHER, J. A.; DEWHUST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** v. 176, p. 1–66, 2003.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. New Pesticide Fact Sheet. PB96-181516.EPA737-F-96-005. U.S. **EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances**, p1-10, 1996.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. **Methods for mensuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. 5ª ed. October, 2002. 275p.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VAN DYK, J.C. **Fish histopathology as a monitoring tool for aquatic health: a preliminary investigation**. 47f. Tese (Doutorado) - University of Johannesburg, Johannesburg, South Africa, 2005.

VARÓ, I.; AMAT F.; NAVARRO, J. C. Acute toxicology of dichlorvos to *Aphamcis iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterases effects on this species. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 53-61, 2008.

VENTURA, A. L. M.; ABREU, P. A.; FREITAS, R. C. C.; SATHPILER, P. C.; LOUREIRO, N.; CASTRO, H. C. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com

a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Revista Psiq Clínica**; v. 3, n. 2, p. 66-72, 2010.

VENTURINI, F. P.; MORAES, F. D.; CORTELLA, L. R.; ROSSI, P. A.; CRUZ, C.; MORAES, G. Metabolic effects of trichlorfon (Masoten®) on the neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 41(1), p. 299-309, 2015.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of ecotoxicology**. Ed. Taylor & Francis, 2006, 315p.

WINKALER, E. U.; SILVA, A. G.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. dos R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 507 – 514, 2001.