

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Taís Belan dos Santos

Bióloga

**AÇÃO DO B-GLUCANO NA MODULAÇÃO IMUNE E
MITIGAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM TILÁPIAS
SUBMETIDAS AO CLORPIRIFÓS**

Dracena

2025

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Taís Belan dos Santos

Bióloga

**AÇÃO DO B-GLUCANO NA MODULAÇÃO IMUNE E
MITIGAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM TILÁPIAS
SUBMETIDAS AO CLORPIRIFÓS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Câmpus de Dracena como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Jaqueline Dalbello Biller

Dracena

2025

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pela Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Campus de Dracena

S237a

Santos, Taís Belan dos

Ação do β -glucano na modulação imune e mitigação do estresse oxidativo em tilápias submetidas ao clorpirifós / Taís Belan dos Santos. -- Dracena: [s.n.], 2025.

65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2025.

Orientadora: Jaqueline Dalbello Biller

1. Compostos organofosforados. 2. Tilápia-do-Nilo. 3. Estresse oxidativo. 4. Fatores imunológicos. I. Título.

Bibliotecário Fábio S. Rosas
CRB 8/6665

IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE

A pesquisa amplia o conhecimento sobre a interação entre imunonutrientes e xenobióticos em peixes, com potencial para o desenvolvimento de dietas funcionais e estratégias sustentáveis na aquicultura. O estudo integra imunologia e toxicologia molecular ao avaliar o efeito do β -glucano frente à toxicidade do clorpirifós.

EXPECTED IMPACT ON SOCIETY

The research expands knowledge on the interaction between immunonutrients and xenobiotics in fish, with potential for the development of functional diets and sustainable strategies in aquaculture. The study integrates immunology and molecular toxicology by evaluating the effect of β -glucan against chlorpyrifos toxicity.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Ação do β -glucano na modulação imune e mitigação do estresse oxidativo em tilápias submetidas ao clorpirifós.

AUTORA: **TAÍS BELAN DOS SANTOS**

ORIENTADORA: JAQUELINE DALBELLO BILLER

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

Documento assinado digitalmente
 **JAQUELINE DALBELLO BILLER**
Data: 09/12/2025 18:22:19-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Assoc. JAQUELINE DALBELLO BILLER (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT - Unesp Câmpus de Dracena

Documento assinado digitalmente
 **BRUNNO DA SILVA CEROZI**
Data: 12/12/2025 13:50:26-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. BRUNNO DA SILVA CEROZI (Participação Virtual)
Universidade de São Paulo

Documento assinado digitalmente
 **FABIO ERMINIO MINGATTO**
Data: 11/12/2025 12:49:32-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Titular FABIO ERMINIO MINGATTO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Unesp / Câmpus de Araraquara - IQAr

Dracena, 09 de dezembro de 2025.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Taís Belan dos Santos, nascida em 09 de março de 1988, na cidade de Dracena/SP. Especialista em "Farmacologia" (2011) pela UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista. Graduada em Ciências Biológicas (2016) pela UNIFADRA. Graduada em Farmácia Generalista (2009) pela FAI - Faculdades Adamantinenses Integradas. Em 2012, ingressou como professora determinada através de processo seletivo para ministrar aulas no curso de Técnico em Química na ETEC Prof. Carmelina Barbosa de Dracena-SP. Em 2013, foi contratada como Docente Indeterminada via concurso público pela mesma instituição, onde contribui com seu ofício até a presente data.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, cuja presença constante iluminou meu caminho, fortaleceu minha fé e sustentou minha determinação em cada etapa desta jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A Deus, expresso minha profunda gratidão pela proteção, sabedoria e discernimento concedidos ao longo deste percurso.

À minha orientadora, Prof.^a Jaqueline, agradeço pela orientação competente, pela confiança depositada em meu trabalho e pelo compromisso incansável com minha formação científica.

Ao meu marido e à minha filha, manifesto sincero reconhecimento pela compreensão diante de minha ausência e pelas inúmeras renúncias feitas para que eu pudesse prosseguir.

Aos meus pais e à minha sogra, agradeço por acolherem minha filha com tanto amor, oferecendo-lhe cuidado, presença e afeto nos momentos em que eu não pude estar.

Aos integrantes da equipe do LIA, registro meu apreço pela colaboração, pelas contribuições técnicas e pelo apoio constante, que foram essenciais para a realização deste estudo.

Por fim, presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A aquicultura, atividade essencial para a segurança alimentar global, enfrenta desafios sanitários e ambientais decorrentes da exposição a contaminantes químicos, como os compostos organofosforados. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito imunomodulador da suplementação com β -glucano sobre a resposta antioxidante e imunológica de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas ao clorpirifós. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×2, envolvendo dietas com e sem B-glucano, exposição ou não ao clorpirifós em dois tempos de coleta (15 e 30 dias), totalizando quatro tratamentos com três repetições cada. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%, sendo as diferenças entre os grupos testadas pelo teste post-hoc de Tukey (5%), utilizando o programa estatístico SAS OnDemand. A expressão dos genes das enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT, GPx, GST), do sistema enzimático (CYP), citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF, IL-10) e dano celular (HSP70) foram analisadas por PCR em tempo real (qPCR-RT). Também foram realizadas as análises de atividade enzimática da SOD, CAT e GPx e estresse oxidativo através da lipoperoxidação hepática (LPO) pelo método MDA. Os resultados indicaram que o clorpirifós induziu a expressão gênica do sistema antioxidante e imunológico, evidenciado pela elevada expressão de SOD, GPx e GST, bem como pela ativação de proteínas de estresse (HSP70) e de citocinas pró-inflamatórias (TNF). Em contrapartida, a suplementação com B-glucano reduziu a intensidade dessas respostas, demonstrando efeito antioxidante e imunomodulador. A atividade enzimática da SOD não foi influenciada pelo B-glucano, apenas pela exposição ao estressor. Para a atividade de GPx não houve efeitos significativos e para CAT, aos 15 dias, houve efeito significativo para a dieta com B-glucano dependente da condição de exposição. Para a lipoperoxidação, aos 15 dias, os animais alimentados com B-glucano apresentaram maior valor de MDA, não sendo a exposição significativa. Aos 30 dias de tratamento com as dietas e os 4 dias de exposição ao estressor foi observado efeito altamente significativo para os animais não expostos, que apresentaram maior nível de MDA e não houve efeito significativo para dieta. A suplementação com B-glucano modulou principalmente parâmetros imunológicos e de biotransformação, reduzindo vias inflamatórias, embora seu efeito antioxidante tenha sido limitado. Assim, o B-glucano apresenta potencial como aditivo funcional, porém com eficácia parcial, reforçando a necessidade de integrar manejo nutricional e monitoramento ambiental na aquicultura.

Palavras-chave: Compostos organofosforados. Tilápia-do-Nilo. Estresse oxidativo. Fatores imunológicos.

ABSTRACT

Aquaculture, a key activity for global food security, faces increasing sanitary and environmental challenges associated with exposure to chemical contaminants, such as organophosphorus compounds. This study aimed to evaluate the immunomodulatory effect of β -glucan supplementation on the antioxidant and immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to chlorpyrifos. The experiment was conducted in a completely randomized design under a 2 $\times$ 2 factorial arrangement, including diets with or without β -glucan and exposure or non-exposure to chlorpyrifos, evaluated at two sampling times (15 and 30 days), totaling four treatments with three replicates each. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) at a 5% significance level, and differences among groups were assessed using Tukey's post hoc test (5%) with SAS OnDemand software. Gene expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx, GST), biotransformation enzymes (CYP), pro- and anti-inflammatory cytokines (TNF, IL-10), and cellular stress markers (HSP70) was analyzed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Enzymatic activities of SOD, CAT, and GPx and hepatic oxidative stress were also evaluated by lipid peroxidation (LPO) using the malondialdehyde (MDA) method. Results showed that chlorpyrifos increased the expression of antioxidant and immune system genes, evidenced by elevated SOD, GPx, and GST transcription, as well as the activation of stress proteins (HSP70) and pro-inflammatory cytokines (TNF). Conversely, β -glucan supplementation attenuated the magnitude of these responses, indicating immunomodulatory and antioxidant-related effects. SOD activity was influenced only by stressor exposure, not by β -glucan supplementation. GPx activity showed no significant effects, while CAT activity at 15 days was significantly affected by β -glucan in an exposure-dependent manner. Regarding lipid peroxidation, at 15 days, fish fed β -glucan exhibited higher MDA levels, with no significant effect of exposure. At 30 days of dietary treatment and four days of stressor exposure, a highly significant effect was observed for non-exposed fish, which showed higher MDA levels, with no significant dietary effect. β -Glucan supplementation primarily modulated immunological and biotransformation parameters, reducing inflammatory pathways, although its direct antioxidant effect was limited. Therefore, β -glucan shows potential as a functional feed additive, albeit with partial efficacy, reinforcing the need to integrate nutritional management with environmental monitoring in aquaculture systems.

Keywords: Organophosphorus compounds. Nile tilapia. Oxidative stress. Immunological factors.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Xenobióticos e agrotóxicos na aquicultura	18
3.1.1 Organofosforados: mecanismo de ação, toxicidade para organismos aquáticos	19
3.1.2 Clorpirifós: Características e uso na agricultura	20
3.1.3 Ocorrência de Clorpirifós em ambientes aquáticos	21
3.1.4 Efeitos tóxicos do clorpirifós em peixes (imunidade e estresse oxidativo)	21
3.1.5 Importância do fígado e sua resposta à exposição ao clorpirifós ...	22
3.2 Sistema imune e antioxidante em peixes	23
3.2.1 Mecanismos de defesa inata/adaptativa.....	23
3.2.2 Dano celular (HSP70) e enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPX, GST)	25
3.2.3 Citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF, IL-10).	26
3.3 B-glucano: características e mecanismos de ação	26
3.3.1 Estrutura e fontes do β -glucano	26
3.3.2 Ação imunomoduladora e antioxidante do β -glucano.....	27
3.3.3 Estudos em animais aquáticos: β -glucano melhora a resistência a doenças bacterianas, virais e parasitárias.	27
3.3.4 Efeitos do β -glucano sobre o estresse de manejo.....	28
3.3.5 Potencial antioxidante e imunomodulador do β -glucano.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Instalação do biotério.....	30

4.1.1 Animais.....	30
4.2 Dieta	30
4.3 Delineamento experimental.....	32
4.4 Desafio com clorpirifós	33
4.5 Coleta das amostras.....	34
4.6 Biologia molecular	35
4.7 Análises Enzimáticas do Sistema Antioxidante	37
4.7.1 Preparo do homogenato	37
4.7.2 Dosagem de proteína – Biureto.....	37
4.7.3 Catalase (CAT).....	38
4.7.2 Superóxido dismutase (SOD).....	38
4.7.3 Glutathione peroxidase (GPx)	38
4.8 Estresse oxidativo	39
4.9 Análise estatística	39
4 Resultados.....	41
4.1 Superóxido dismutase (SOD).....	41
4.2 Catalase	43
4.3 Glutathione peroxidase (GPx)	46
4.4 Glutathione S-Transferase (GST)	49
4.5 Interleucina 10 (IL-10)	50
4.6 Fator de necrose tumoral (TNF).....	51
4.7 Citocromo P450 (CYP)	52
4.8 HSP70	53
4.9 Lipoperoxidação - MDA	54

Figura 17 - Concentração de MDA em fígado de tilápias suplementadas com e sem β -glucano por 15 dias, expostas e não expostas ao clorpirifós. 54

Figura 18. Concentração de MDA em fígado de tilápias suplementadas com e sem β -glucano por 30 dias, expostas e não expostas ao clorpirifós. 55

5 DISCUSSão.....	56
6 Conclusão.....	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura tem se consolidado como um setor estratégico para o abastecimento alimentar mundial, contribuindo significativamente para a segurança nutricional e a oferta de proteína animal de alta qualidade. Sua relevância deriva não apenas da capacidade de reduzir a pressão sobre os estoques pesqueiros naturais, mas também da eficiência do processo produtivo, que combina ciclos curtos, alta densidade de produção e avanços tecnológicos (Barreto; Oliveira; Henry-Silva, 2024). Globalmente, a atividade vem apresentando crescimento contínuo. Em 2022, a produção mundial atingiu 130,9 milhões de toneladas, respondendo por mais da metade da oferta de animais aquáticos destinados ao consumo humano, com projeções de expansão até 2032 em todas as regiões, incluindo América Latina e Caribe (FAO, 2024).

No Brasil, esse cenário de expansão é igualmente notável, sobretudo pela força da tilapicultura. A espécie correspondeu a 63,9% da produção nacional de peixes cultivados em 2022, com 550 mil toneladas, volume que subiu para 662 mil toneladas em 2024 — um salto de 14,3%, o maior percentual da história recente. Com esse avanço, a tilápia passou a representar mais de dois terços da produção aquícola nacional (Peixe BR, 2023; 2025). Esse desempenho coloca o país como quarto maior produtor mundial da espécie, com perspectivas de alcançar posições ainda mais elevadas no ranking global. Além de consolidar-se no mercado interno, a tilápia responde por 88% das exportações brasileiras de pescado, principalmente para os Estados Unidos e Taiwan (Peixe BR, 2023).

A expansão da piscicultura, no entanto, enfrenta importantes desafios sanitários e ambientais. A intensificação da produção aumenta a exposição a surtos de doenças, oscilações de mercado e impactos decorrentes das mudanças climáticas, como variabilidade hídrica e eventos extremos. Questões ligadas à poluição, perda de biodiversidade e ao uso intensivo de recursos naturais também se somam às preocupações sobre a sustentabilidade do setor (FAO, 2024). No caso da tilápia, a instabilidade nos preços pagos ao produtor e os custos de insumos são fatores que comprometem a rentabilidade e a estabilidade de longo prazo. Além disso, em escala global, fatores de manejo inadequado e desafios sanitários foram determinantes para conter um crescimento ainda maior em 2024, indicando a necessidade de práticas produtivas mais sustentáveis e resilientes (Peixe BR, 2025).

Assim, a aquicultura se encontra em uma encruzilhada: ao mesmo tempo em que se fortalece como fonte essencial de alimento e oportunidade econômica, deve enfrentar questões estruturais relacionadas à biossegurança, à eficiência ambiental e à governança setorial. Esse equilíbrio entre expansão e sustentabilidade será decisivo para garantir não apenas a continuidade do crescimento, mas também sua contribuição efetiva para a segurança alimentar global e o desenvolvimento socioeconômico regional.

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie que compõe aproximadamente 40% da produção de aquicultura no Brasil, sendo escolhida por suas características de fácil manejo e pela palatabilidade de sua carne (Schulter, 2017). Esta espécie teleóstea se apresenta como resistente a doenças e capaz de tolerar condições bióticas adversas, o que a torna uma opção rentável para a aquicultura (Casas Solis *et al.*, 2007).

Adaptando-se bem a diferentes ambientes, a tilápia nilótica é uma das mais importantes para a aquicultura mundial, especialmente devido à sua resistência e adequação a ambientes de cativeiro (El-Sayed, 2002).

Embora as tilápias-do-Nilo possuam defesas naturais contra patógenos, a exposição a praguicidas compromete sua resposta imunológica e a eficácia do sistema antioxidante, principalmente sob condições inadequadas de manejo que podem resultar em estresse. O uso excessivo de praguicidas é uma preocupação crescente, uma vez que pode desencadear surtos de doenças infecciosas, especialmente em sistemas de cultivo intensivos (Zago *et al.*, 2014).

Xenobióticos são compostos químicos que não são naturais a um organismo ou sistema biológico, incluindo praguicidas e fármacos. Em aquicultura, os praguicidas organofosforados (POFs) são frequentemente utilizados para controlar o desenvolvimento de parasitas em peixes. Esses praguicidas podem ser introduzidos no ambiente aquático tanto diretamente, por meio da aplicação na água, quanto indiretamente, através do uso na agricultura, onde substâncias como os organofosforados acabam contaminando os corpos hídricos (ATSDR, 1997).

Entre os organofosforados, destaca-se o clorpirifós (O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato), que é amplamente utilizado no combate a pragas em culturas como algodão, milho e verduras. A contaminação resultante pode levar à bioacumulação desses compostos, ocasionando efeitos letais para a fauna aquática, especialmente para peixes (El-Murr *et al.*, 2019). O clorpirifós tem mostrado também

interferir no sistema antioxidante dos peixes, provocando estresse oxidativo e prejudicando as respostas imunes inatas, resultando em alterações teciduais nos organismos expostos (Ali *et al.*, 2020).

Estudos demonstram que a exposição a praguicidas, como o clorpirifós, pode afetar diretamente o sistema imunológico dos peixes, prejudicando a produção de células e compostos que são fundamentais para a defesa contra microrganismos e xenobióticos (Bols *et al.*, 2021). A resposta imunológica nos peixes envolve tanto mecanismos específicos quanto não específicos que ativam o sistema de defesa para neutralizar antígenos (Meena *et al.*, 2013).

Além disso, os praguicidas afetam o sistema antioxidante, que é crucial para proteger o organismo contra espécies reativas de oxigênio (ERO). O desequilíbrio na produção dessas substâncias pode levar ao estresse oxidativo, influenciando células e material genético (Biller Takahashi *et al.*, 2015). As enzimas antioxidantes constituem a primeira e mais eficiente linha de defesa celular contra a oxidação, sendo capazes de modular diretamente os níveis de radicais livres e seus derivados (Mazmanci; Çavaş, 2010).

A superóxido dismutase (SOD) atua convertendo o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, impedindo sua acumulação e reduzindo o potencial de oxidação inicial. Em sequência, duas enzimas complementares participam da remoção do peróxido de hidrogênio: a catalase (CAT), que o decompõe em água e oxigênio, e a glutathione peroxidase (GPx), que utiliza glutathione reduzida para neutralizar tanto H₂O₂ quanto hidroperóxidos orgânicos. A ação coordenada desses sistemas impede que o peróxido de hidrogênio seja convertido em radicais mais reativos, como hidroxilas, capazes de promover forte dano celular (Mazmanci; Çavaş, 2010). Para mitigar esses efeitos, vacinas e compostos imunomoduladores, como o β-glucano, têm sido explorados como alternativas promissoras.

O β-glucano é reconhecido como um imunomodulador pluripotente, apresentando propriedades anti-infecciosas e anti-inflamatórias, além de aumentar a produção de anticorpos e estimular a atividade dos macrófagos. A inclusão de β-glucanos na alimentação de peixes têm demonstrado resultados promissores em termos de sobrevivência e proteção contra patógenos (De Assis Beneti *et al.*, 2023)

Os efeitos benéficos do β-glucano são atribuídos principalmente ao seu conteúdo de polissacarídeos, que se ligam por ligações glicosídicas e são derivados de paredes celulares de diversas fontes, como plantas, fungos e algas (Robertsen *et*

al., 1990). Embora a investigação sobre esses compostos esteja avançando, as opiniões sobre sua eficácia podem variar conforme a espécie, a dosagem, a duração da suplementação e os tipos de patógenos enfrentados (Jefferies *et al.*, 2017); Paulsen *et al.*, 2001).

A combinação de vacinas e imunomoduladores como o β -glucano pode resultar em um aumento da produção de citocinas e de células imunes efetivas, promovendo um controle mais eficaz sobre as infecções (Jin; Li; Wang, 2018; Wei *et al.*, 2020). A vacinação associada à administração de β -glucanos pode reduzir a dependência de antibióticos e, assim, amenizar os impactos da exposição a contaminantes (Reis *et al.*, 2021).

Considerando que diversos estudos já investigaram os efeitos do β -glucano em peixes, mas poucos exploraram sua atuação frente à exposição a praguicidas organofosforados, como o clorpirifós, levanta-se a hipótese de que esse imunomodulador possa atenuar os efeitos tóxicos desse praguicida. Especificamente, supõe-se que o β -glucano seja capaz de modular respostas em nível molecular, refletidas na expressão gênica e atuação de enzimas antioxidantes, contribuindo para a mitigação dos impactos adversos provocados pela exposição ao clorpirifós.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do trabalho foi avaliar se a suplementação com β -glucano promove ação protetora em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas ao praguicida clorpirifós, através da expressão de genes dos sistemas antioxidante, imunológico e enzimático, atividade enzimática e estresse oxidativo.

2.2 Objetivos Específicos

Investigar, em nível molecular, o efeito modulador da suplementação com β -glucano através de análises com tecido hepático das tilápias-do-Nilo:

- Antioxidante: através da expressão dos genes das enzimas SOD, CAT, GPx e GST;
- Imunológico: com avaliação da expressão de dos genes TNF- α e IL-10.
- Enzimático: expressão do gene CYP.
- Dano celular: expressão do gene HSP70.
- Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo enzimáticos em fígado de tilápias-do-Nilo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Xenobióticos e agrotóxicos na aquicultura

A intensificação da produção aquícola trouxe benefícios econômicos e sociais, mas também ampliou os riscos associados à presença de contaminantes químicos nos ecossistemas aquáticos. A ecotoxicologia aquática se consolidou como um campo fundamental nesse contexto, uma vez que estuda os efeitos adversos de agentes químicos e de outros compostos exógenos sobre organismos aquáticos. Essa abordagem possibilita a avaliação da qualidade ambiental por meio de ensaios ecotoxicológicos, que identificam tanto ações letais como subletais causadas por xenobióticos. Esses testes servem de base para estimar o risco de contaminação e compreender o grau de comprometimento da biota frente à exposição a contaminantes (Lombardi, 2006).

Na piscicultura, os agrotóxicos representam uma das principais fontes de contaminação, já que são amplamente utilizados em práticas agrícolas e podem alcançar os corpos d'água de forma direta, por escoamento superficial, ou indireta, por lixiviação e percolação do solo. Uma vez presentes no ambiente aquático, esses compostos ameaçam a qualidade da água, a biodiversidade e a segurança alimentar, podendo inclusive afetar a saúde humana por meio da bioacumulação nos organismos cultivados (Lombardi, 2008; Matos, 2022).

Estudos apontam que, globalmente, a agricultura utiliza milhões de toneladas de agrotóxicos anualmente, o que contribui significativamente para a poluição de rios e riachos. Esse cenário é considerado uma ameaça tanto para ecossistemas aquáticos quanto para recursos hídricos destinados ao consumo humano. No Brasil, onde a produção agrícola tem papel de destaque, o uso intensivo desses insumos aumenta o risco de contaminação de ecossistemas aquáticos adjacentes, especialmente em regiões com forte integração entre agricultura e aquicultura (Matos, 2022).

No campo da toxicologia aplicada à aquicultura, observa-se que substâncias químicas usadas no manejo, incluindo medicamentos, agrotóxicos e hormônios, podem comprometer não apenas a qualidade ambiental, mas também a segurança do pescado destinado ao consumo humano. Além disso, organismos cultivados em ambientes contaminados podem transferir contaminantes como metais pesados e

xenobióticos ao longo da cadeia alimentar, intensificando o risco de bioacumulação e biomagnificação (Lombardi, 2006).

Uma das principais ferramentas para estudar tais impactos são os biomarcadores, que permitem avaliar respostas biológicas em diferentes níveis de organização, desde alterações moleculares até danos histológicos. Enzimas como a glutathione S-transferase (GST), a acetilcolinesterase (AChE) e a gama glutamiltransferase (GGT) têm sido amplamente utilizadas como indicadores de estresse oxidativo, neurotoxicidade e danos hepáticos em peixes expostos a agrotóxicos. Essas respostas bioquímicas e histológicas constituem evidências relevantes para compreender a toxicidade de xenobióticos e seus efeitos sobre a homeostase dos organismos (Matos, 2022).

3.1.1 Organofosforados: mecanismo de ação, toxicidade para organismos aquáticos

Os compostos organofosforados (OPs) constituem uma classe de agrotóxicos amplamente empregados na agricultura, indústria e saúde pública devido à sua elevada eficácia no controle de pragas. Seu mecanismo de ação está diretamente relacionado à inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase (AChE), o que provoca o acúmulo de acetilcolina nas sinapses e, conseqüentemente, a estimulação contínua dos receptores colinérgicos no sistema nervoso central e periférico. Essa condição gera manifestações de toxicidade aguda, como paralisia, disfunção neurológica e morte em organismos expostos. Além da AChE, estudos apontam que os OPs também podem inibir a fosfolipase A2 (PLA2) e outras serino lipases, interferindo na sinalização lipídica e no metabolismo neuronal, intensificando os efeitos neurotóxicos desses compostos (Carli, 2023).

Em ambientes aquáticos, a presença de organofosforados representa uma ameaça significativa aos organismos não-alvo, especialmente os peixes, que são amplamente utilizados como bioindicadores em estudos ecotoxicológicos. A exposição ao clorpirifós, por exemplo, tem sido associada a alterações comportamentais, estresse oxidativo, danos hepáticos e distúrbios na microbiota intestinal de zebrafish. Além disso, em fases iniciais do desenvolvimento, foram observadas malformações embrionárias, como deformidades caudais, edema pericárdico e do saco vitelínico, bem como redução da frequência cardíaca e da

eclodibilidade dos ovos, indicando elevada toxicidade mesmo em baixas concentrações (Garcia, 2024).

De forma semelhante, o malathion apresenta efeitos adversos importantes sobre organismos aquáticos. Ensaio conduzidos com zebrafish evidenciaram a inibição da atividade da PLA2, confirmando sua interferência no metabolismo lipídico e indicando o potencial uso desta enzima como biomarcador de contaminação aquática. Observou-se ainda que a exposição ao inseticida induz alterações comportamentais, como redução da atividade natatória e maior permanência dos peixes no fundo do aquário, características compatíveis com neurotoxicidade. Essas alterações foram acompanhadas de modificações na atividade de enzimas cerebrais relacionadas à regulação de lipídeos e à neurotransmissão, como a própria acetilcolinesterase, sugerindo que a exposição ambiental ao malathion compromete o desempenho fisiológico e adaptativo dos organismos aquáticos (Carli, 2023).

De modo geral, a literatura demonstra que os organofosforados exercem efeitos letais e subletais relevantes sobre os ecossistemas aquáticos, ocasionando desde alterações comportamentais e fisiológicas até deformidades embrionárias e comprometimento de sistemas enzimáticos essenciais. Esses resultados reforçam a necessidade de monitoramento contínuo dessas substâncias no ambiente, uma vez que mesmo em concentrações ambientalmente realistas apresentam risco elevado para espécies não-alvo e podem comprometer a integridade ecológica de ambientes aquáticos (Oliveira, 2025).

3.1.2 Clorpirifós: Características e uso na agricultura

O clorpirifós O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato é um inseticida pertencente ao grupo dos organofosforados, caracterizado por sua ação inibidora da enzima acetilcolinesterase, fundamental para a transmissão de impulsos nervosos. Essa inibição resulta no acúmulo de acetilcolina nas sinapses, promovendo efeitos neurotóxicos que podem atingir tanto organismos-alvo quanto organismos não-alvo, incluindo humanos e espécies aquáticas (Cunha, 2014; Marques; Américo-Pinheiro, 2020).

O clorpirifós é amplamente utilizado na agricultura devido à sua eficácia no controle de pragas de diferentes culturas, como algodão, batata, milho, soja e café, sendo comercializado sob diversas formulações, como Lorsban 480BR®, Fersol 450

EC® e Dursban® (Cunha, 2014). No Brasil, figura entre os agrotóxicos mais empregados, principalmente em razão do clima tropical que favorece a proliferação contínua de pragas agrícolas. Apesar disso, seu uso já foi banido em países da União Europeia e nos Estados Unidos, em virtude da elevada toxicidade e da comprovação de seus impactos sobre a saúde humana e ambiental (Marques; Américo-Pinheiro, 2020).

Quimicamente, trata-se de um éster derivado do ácido fosforotióico, de natureza lipofílica, o que favorece sua adsorção ao solo e sua persistência no ambiente. No contexto da agricultura, sua aplicação está associada ao aumento da produtividade e à proteção fitossanitária das lavouras. Contudo, há crescente preocupação acerca da contaminação de solos e águas subterrâneas, especialmente em regiões de agricultura intensiva. Estudos recentes revelaram a persistência de clorpirifós em aquíferos mesmo após restrições regulatórias, evidenciando riscos à saúde pública e ao meio ambiente (De Rosa *et al.*, 2025).

Assim, embora o clorpirifós desempenhe papel importante como inseticida de largo espectro, suas características químicas e seu uso extensivo configuram um desafio para a sustentabilidade agrícola e para a gestão de riscos ambientais e à saúde humana (Panis; Candioto; Gaboardi, 2024).

3.1.3 Ocorrência de Clorpirifós em ambientes aquáticos

Estudos indicam que sua meia-vida pode variar de 16 a 77 dias em águas superficiais, dependendo de fatores ambientais como pH, temperatura e presença de matéria orgânica, o que reforça sua capacidade de contaminação de ecossistemas aquáticos (Cunha, 2014; Marques; Américo-Pinheiro, 2020).

O estudo de Marques e Pinheiro (2020) apresentou dados de detecção do clorpirifós em diferentes ambientes aquáticos, indicando sua presença frequente devido ao uso intensivo na agricultura e manejo de culturas, sobretudo em regiões com uso agrícola difundido.

3.1.4 Efeitos tóxicos do clorpirifós em peixes (imunidade e estresse oxidativo)

O clorpirifós foi detectado em diferentes bioindicadores aquáticos, como peixes, crustáceos e organismos planctônicos, demonstrando sua capacidade de bioacumulação (Marques; Américo-Pinheiro, 2020).

Foram observados efeitos subletais, incluindo alterações comportamentais, dificuldades na alimentação, mudanças na reprodução e mortalidade em alguns organismos testados. O clorpirifós, apesar de ser um praguicida eficiente, apresenta risco considerável ao ambiente aquático devido às suas propriedades químicas e persistência no meio ambiente (Marques; Américo-Pinheiro, 2020).

Díaz-Resendiz e Girón-Pérez (2014) avaliaram o efeito do praguicida clorpirifós na resposta imunológica do tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). A exposição ao clorpirifós (0,051, 0,102 e 0,255 mg L⁻¹) não provocou mudanças significativas na capacidade de proliferação de linfócitos da tilápia comparado ao grupo controle. Entretanto, a concentração de IgM no plasma dos peixes expostos a 0,051 mg L⁻¹ do praguicida diminuiu. Já nos peixes expostos às concentrações mais altas (0,102 e 0,255 mg L⁻¹), os níveis de IgM permaneceram similares ao controle. A atividade de lisozima no plasma aumentou em peixes expostos a 0,255 mg L⁻¹ do praguicida, e esse aumento foi dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração, maior a atividade.

Outros estudos de imunotoxicidade relacionados ao clorpirifós indicam efeitos variados, como diminuição do número de linfócitos e redução da capacidade fagocítica, além de alterações na expressão de proteínas de choque térmico e citocinas, embora esses efeitos variem de acordo com a espécie e a condição do experimento (Díaz-Resendiz e Girón-Pérez, 2014).

Díaz-Resendiz e Girón-Pérez (2014) concluíram que o clorpirifós nas concentrações avaliadas apresentou baixo efeito imunotóxico na tilápia, mas induziu um aumento na atividade de lisozima, sugerindo uma resposta de defesa inespecífica.

3.1.5 Importância do fígado e sua resposta à exposição ao clorpirifós

O fígado é o principal órgão envolvido na biotransformação e eliminação de xenobióticos em peixes, desempenhando funções vitais relacionadas ao metabolismo de nutrientes, síntese de proteínas plasmáticas e manutenção da homeostase redox. Por ser altamente vascularizado e possuir um extenso sistema enzimático, o fígado atua como o primeiro local de acúmulo e metabolização de compostos tóxicos absorvidos pela corrente sanguínea (Ismail *et al.*, 2021). Em organismos aquáticos expostos a agrotóxicos organofosforados, como o clorpirifós, esse órgão é particularmente vulnerável, pois concentra enzimas do sistema do citocromo P450,

responsáveis pela conversão do composto original em metabólitos menos reativos (Tawfeek *et al.*, 2024).

Durante o processo de biotransformação do clorpirifós, o fígado converte o composto em clorpirifós-oxon, um metabólito altamente tóxico que pode inibir a acetilcolinesterase e induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). O excesso dessas moléculas provoca danos oxidativos às membranas celulares, ao DNA e a proteínas hepáticas, desencadeando processos inflamatórios e disfunções metabólicas (Sule; Condon; Gomes, 2022). Essa condição, conhecida como estresse oxidativo, é acompanhada por alterações na expressão de genes e na atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutational peroxidase (GPX) e glutational S-transferase (GST), que atuam de forma integrada para neutralizar o excesso de ERO e preservar a integridade celular (Santana *et al.*, 2022).

Além disso, a exposição prolongada ao clorpirifós pode comprometer a capacidade de regeneração hepática e reduzir as reservas de glutational (GSH), agravando os efeitos tóxicos e a vulnerabilidade celular. Alterações histopatológicas, como degeneração vacuolar e necrose de hepatócitos, são frequentemente relatadas em peixes intoxicados com esse agrotóxico (Ismail *et al.*, 2021; Tawfeek *et al.*, 2024). Tais alterações indicam que o fígado é um biomarcador sensível e eficaz para o monitoramento da toxicidade ambiental de organofosforados em organismos aquáticos.

3.2 Sistema imune e antioxidante em peixes

3.2.1 Mecanismos de defesa inata/adaptativa.

A intensificação da aquicultura, com altas densidades de estocagem e condições ambientais frequentemente desfavoráveis, tem aumentado a exposição dos peixes a estressores físicos, químicos e biológicos. Essa realidade afeta diretamente a eficiência do sistema imune e o equilíbrio do sistema antioxidante, componentes fundamentais para a manutenção da saúde e do desempenho produtivo das espécies cultivadas (Guimarães, 2024).

Nos peixes, o sistema imune apresenta duas frentes principais: a imunidade inata e a adaptativa. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa, caracterizada pela ação rápida e inespecífica contra patógenos. Essa resposta

envolve barreiras físicas como pele, muco e brânquias, além da ação celular de macrófagos, neutrófilos e células “natural killer”, e da participação de moléculas humorais, como o sistema complemento e a lisozima. Já a imunidade adaptativa é mais específica e gera memória imunológica, embora se manifeste de forma mais lenta em comparação a mamíferos, com destaque para o papel dos linfócitos T e B e das imunoglobulinas, principalmente IgM (Guimarães, 2024).

O equilíbrio do sistema imune é fortemente influenciado pelo estresse, que pode levar à imunossupressão e, conseqüentemente, ao aumento da suscetibilidade a infecções. Fatores como qualidade da água, temperatura, poluição e manejo intensivo favorecem a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), comprometendo a saúde dos peixes (Fernandes, 2023). De fato, a intensificação dos sistemas de produção aquícola submete os animais a condições de estresse que enfraquecem a resposta imunológica, tornando-os mais vulneráveis a patógenos oportunistas, especialmente bactérias do gênero *Streptococcus* spp. (Butt *et al.*, 2021; Van Doan *et al.*, 2022).

Nesse contexto, o sistema antioxidante atua como regulador essencial, prevenindo ou reparando danos celulares causados pelo excesso de radicais livres. Esse sistema é composto por mecanismos enzimáticos – como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glutathione S-transferase (GST) – e não enzimáticos, incluindo vitaminas C e E, carotenoides, selênio, zinco e outros compostos fenólicos. O funcionamento adequado desses mecanismos garante a neutralização de ERO e a preservação da integridade de lipídios, proteínas e DNA (Guimarães, 2024; Fernandes, 2023). A melatonina, em especial, apresenta efeito duplo, atuando como antioxidante e modulador da resposta imune (Matos, 2022).

A interação entre sistema imune e antioxidante é estreita, visto que a ativação da resposta imunológica gera radicais livres como mecanismo de defesa contra patógenos. Entretanto, a produção exacerbada dessas moléculas pode resultar em danos celulares e morte tecidual, o que reforça a necessidade de equilíbrio entre imunidade e estresse oxidativo para a manutenção da saúde dos peixes (Fernandes, 2023).

Nesse cenário, estratégias nutricionais vêm sendo estudadas como alternativas ao uso de xenobióticos, não só a contaminação por agrotóxicos, mas também alternativa aos antimicrobianos, visando a prevenção de doenças à remediação. Entre

elas, destaca-se a suplementação com imunoestimulantes, como β -glucanos, capazes de modular positivamente o sistema imune e antioxidante. Evidências mostram que a inclusão de β -glucanos na dieta de tilápias-do-Nilo promove aumento da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx), estimula a produção de anticorpos e lisozima e melhora significativamente a sobrevivência frente a infecções bacterianas (Guimarães, 2024; Fernandes, 2023).

3.2.2 Dano celular (HSP70) e enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPX, GST)

Diversas enzimas e proteínas desempenham papéis essenciais na regulação do sistema antioxidante e no controle do sistema imunológico em peixes. Entre elas, a proteína HSP70, uma chaperona celular fundamental para a estabilização de proteínas desnaturadas em situações de estresse térmico e imunológico, favorecendo a sobrevivência celular em condições adversas (Sathyamoorthy *et al.*, 2017).

O sistema antioxidante celular atua de forma coordenada para manter o equilíbrio entre a produção e a remoção de ERO evitando danos celulares. Entre os principais componentes desse sistema estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e glutathione S-transferase (GST), cuja expressão é regulada em resposta a alterações do estado redox (Santana *et al.*, 2022).

No contexto do sistema antioxidante, a enzima SOD representa a primeira linha de defesa contra ERO catalisando a conversão do ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), especialmente na mitocôndria. Em seguida, a CAT atua na decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio, prevenindo sua acumulação e os danos oxidativos adicionais. Complementarmente, GPX exerce função na redução de peróxidos orgânicos e de H_2O_2 , utilizando glutathione como cofator, o que contribui para a neutralização de peróxidos lipídicos e para a manutenção da integridade celular (Crawford *et al.*, 2012).

Outra enzima de destaque é a GST, responsável pela detoxificação de xenobióticos e subprodutos da peroxidação lipídica. Sua ação consiste na conjugação da glutathione a compostos tóxicos, facilitando a eliminação dessas moléculas do organismo (Gonçalves *et al.*, 2009).

Além disso, a família do citocromo P450 (CYP) desempenha papel central no metabolismo de xenobióticos e de esteroides. Contudo, sua atividade metabólica pode

gerar ERO como subproduto, contribuindo indiretamente para o estresse oxidativo (Schenkman; Jansson, 2003).

Esses genes, do sistema antioxidante, portanto, estão diretamente relacionados à manutenção da homeostase celular em peixes, seja pela ativação de mecanismos imunológicos de proteção, seja pela regulação da resposta antioxidante que impede os efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio.

3.2.3 Citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF, IL-10).

As citocinas representam elementos-chave na regulação do sistema imunológico de peixes, atuando de maneira coordenada na ativação ou na resolução da resposta inflamatória. A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina com reconhecida função anti-inflamatória. Sua principal ação está na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), favorecendo, assim, a resolução da inflamação e a restauração da homeostase imunológica (Wu *et al.*, 2021).

Por outro lado, o TNF- α constitui uma citocina pró-inflamatória de grande relevância. Ele atua na ativação de macrófagos, promovendo a fagocitose e a liberação de mediadores inflamatórios, além de participar da indução da apoptose em células-alvo. O aumento da expressão de TNF- α está diretamente associado a processos de inflamação aguda, sendo considerado um marcador importante da ativação imunológica em peixes (Li *et al.*, 2021).

Dessa forma, a interação entre IL-10 e TNF- α ilustra o equilíbrio necessário entre mecanismos pró e anti-inflamatórios, o qual é determinante para a eficiência e a modulação adequada da resposta imune em organismos aquáticos.

3.3 B-glucano: características e mecanismos de ação

3.3.1 Estrutura e fontes do β -glucano

β -glucanos são polissacarídeos presentes em plantas, algas, bactérias, leveduras e fungos. Possuem ligações $\beta(1,3)$ na cadeia principal, com possíveis ramificações $\beta(1,6)$ e variam em peso molecular e grau de ramificação. Leveduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, são fontes comuns em dietas de peixes (Dalmo; Bøgwald, 2008).

Atualmente é utilizado como aditivo alimentar, com evidências de melhora na resposta imune inespecífica e específica em peixes, além de potencial para uso como adjuvante de vacinas (Dalmo; Bøgwald, 2008)

3.3.2 Ação imunomoduladora e antioxidante do β -glucano

Os receptores de β -glucanos são Dectin-1, TLR2, TLR4, CR3, e outros, participam do reconhecimento do β -glucano, levando à ativação de diferentes vias de sinalização imunológica (Dalmo; Bøgwald, 2008)

São capazes de estimular células apresentadoras de antígenos, promovendo uma resposta de Th1 ou Th2, com produção de citocinas como IFN- γ e IL-4. Logo, estudos mostram que o β -glucano pode aumentar a resistência a doenças, melhorar o crescimento em algumas espécies de peixe, e potencialmente induzir resistência à infecções por vírus e bactérias (Dalmo; Bøgwald, 2008)

Na resposta específica e adaptativa os β -glucanos influenciam a diferenciação de células T, incluindo Th1, Th2, e Th17, sendo promissores para modular respostas imunológicas contra patógenos intracelulares e extracelulares (Dalmo; Bøgwald, 2008)

3.3.3 Estudos em animais aquáticos: β -glucano melhora a resistência a doenças bacterianas, virais e parasitárias.

Em camarões, β -glucanos melhoram a resistência contra vírus e bactérias, incluindo o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), com efeitos na ativação de células imunológicas e expressão gênica relacionada à defesa imunológica (Dalmo; Bøgwald, 2008)

Reis (2021), suplementou tilápias-do-Nilo com β -glucano e avaliou a expressão de genes do sistema imune, após vacinação e desafio com *Streptococcus agalactiae* inativada. A pesquisa mostrou que o β -glucano, quando usado com a vacina, ajuda o sistema imunológico das tilápias-do-Nilo a se defender melhor contra uma bactéria. Ele aumenta a resposta de defesa do peixe, tornando a vacinação mais eficaz. Portanto, o β -glucano pode ser útil para proteger os peixes contra doenças na aquicultura.

Quispe, (2022) desenvolveu um estudo com o objetivo de avaliar a influência da suplementação alimentar com β -glucano na sobrevivência de tilápias-do-Nilo

(*Oreochromis niloticus*) expostas à bactéria *Francisella orientalis*, considerada um patógeno emergente de alta relevância para a aquicultura mundial e endêmico na tilapicultura brasileira.

Segundo Quispe (2022), a suplementação com 3 g β -glucano/kg de ração (0,3%) promoveu aumento expressivo na sobrevivência das tilápias-do-Nilo, evidenciando o efeito imunoprotetor do composto frente à infecção bacteriana.

3.3.4 Efeitos do β -glucano sobre o estresse de manejo

No experimento de Fernandes (2023) os peixes foram alimentados com B-glucano e expostos a agentes estressantes durante manejos e infectados com *S. agalactiae* inativada. Mais especificamente, os grupos 2 e 4 foram desafiados com estresse e infecção com $1,0 \times 10^8$ UFC de *S. agalactiae*/peixe inativada aos 14 dias. Os grupos 6 e 8 foram desafiados com manejos estressantes aos 29 dias. E concluiu que o β -glucano ajuda a proteger as tilápias-do-Nilo do estresse causado pelo manejo, melhorando sua defesa contra danos e fortalecendo seu sistema imunológico.

3.3.5 Potencial antioxidante e imunomodulador do β -glucano

Fierro-Castro *et al.* (2024) investigou a resposta imunológica inata de macrófagos de tilápia-do-Nilo expostos *in vitro* ao praguicida triclorfon. Seus principais resultados apontam que a dieta com β -glucano melhorou a viabilidade celular dos macrófagos expostos ao triclorfon e aumentou sua capacidade antioxidante, exercendo um papel de proteção contra danos oxidativos.

A suplementação com β -glucano reduziu a produção de ERO, proporcionando um efeito protetor contra o dano celular causado pelo praguicida. Contudo, o β -glucano não foi suficiente para prevenir a redução da capacidade microbida dos macrófagos após exposição ao triclorfon, ou seja, ela não conseguiu manter a capacidade de matar bactérias eficientemente (Fierro-Castro *et al.*, 2024).

A expressão de genes relacionados à resposta inflamatória, como TNF- α foi modulada após exposição *in vitro* ao triclorfon, variando entre os grupos de peixe controlado e alimentado com β -glucano (Fierro-Castro *et al.*, 2024).

De Assis Beneti *et al.* (2023) também investigou como a administração de β -glucano influencia a resposta imunológica da tilápia-do-Nilo sob estresse após desafio com *Streptococcus agalactiae* e observou que a administração de β -glucano por 30

dias aumentou a expressão dos genes dos receptores TLR1, TLR2, da proteína MYD88 e do fator de transcrição para expressão de genes inflamatórios e de defesa NFkB1 no rim cranial e baço, especialmente após desafio com a bactéria. Isso sugere que o β -glucano estimula essa importante via de resposta imune inata.

A expressão do gene TLR1 aumentou significativamente após o estresse, especialmente no tecido do rim e baço, mas foi reduzida em determinados momentos por intervenção com β -glucano e o TLR2 mostrou aumento na expressão no baço após 15 dias de β -glucano, mas reduziu no rim após 30 dias. A expressão do gene MYD88 apresentou aumento em ambos os órgãos após 30 dias, especialmente em peixes desafiados. A NFkB1 foi regulada de modo a reduzir sua expressão no rim com β -glucano, porém aumentou no baço após o desafio no período de 15 dias (De Assis Beneti *et al.*, 2023).

Os autores concluíram que a administração de β -glucano ativa a via de sinalização TLR-MYD88-NFkB, promovendo uma resposta imunológica potencialmente protetora. Essa ativação ocorre principalmente no baço após 30 dias de alimentação, indicando que o β -glucano pode ser uma estratégia útil para estimular a defesa imunológica da tilápia-do-Nilo, ajudando na resistência a doenças infecciosas, como a estreptococose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalação do biotério

O estudo foi conduzido nas instalações do biotério pertencente ao Laboratório de Imunologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, localizada no Câmpus de Dracena, em São Paulo. Foram empregadas 24 caixas de polietileno, de 130 L, com aeração elétrica. O sistema hídrico utilizado era do tipo aberto, com renovação diária da água a 28°C e controle de iluminação artificial por 12h.

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP de Dracena, com registro nº09/2023.

4.1.1 Animais

Foram utilizadas 405 juvenis de tilápias-do-Nilo, sexualmente revertidas, oriundas de uma unidade de piscicultura localizada na região de Santa Fé do Sul, no estado de São Paulo. Os animais, com peso médio inicial de aproximadamente 25 gramas e 10 cm, foram distribuídos em 12 caixas. Durante o período de aclimação, que teve duração de 30 dias, os peixes receberam ração comercial (Raguife, Nutrição Animal, Mirassol/SP, 32% de PP) duas vezes ao dia para treinamento alimentar e engorda.

4.2 Dieta

Neste experimento, foram elaboradas duas formulações alimentares (Tabela 1): uma dieta controle, isenta de β -glucano, e uma dieta experimental, suplementada com 0,1% (m/m) de β -glucano. Ambas foram preparadas no Instituto de Pesca, localizado em São José do Rio Preto – SP, seguindo as exigências nutricionais específicas da espécie estudada. Após a preparação, as dietas foram acondicionadas em recipientes plásticos devidamente identificados conforme o tratamento e a caixa correspondente, sendo armazenadas sob refrigeração ao longo de todo o período experimental.

Tabela 1. Formulação da ração da dieta controle e com β -glucano.

Ingredientes	%	%
	Controle	β -glucano
Farelo de soja	34,218	34,218
Farinha de vísceras	18,000	18,000
Milho	17,511	17,511
Farelo de trigo	9,000	9,000
Quirera de arroz	8,000	8,000
Farinha de carne e ossos	6,686	6,686
Protenose	3,446	3,446
Fosfato bicálcico	0,755	0,755
Óleo de soja	1,000	1,000
Premix	0,500	0,500
Antifúngico	0,200	0,200
Sal	0,300	0,300
DL-metionina	0,168	0,168
Antioxidante	0,050	0,050
Calcário	0,167	
Betaglucano		0,167
Total	100,00	100,00

Enriquecimento por quilograma de ração: Vit. A: 12000 UI; Vit. D3: 3000 UI; Vit. E: 150,00 mg; Vit. B1: 20,00 mg; Vit. B2: 20,00 mg; Vit. B6: 17,50 mg; Vit. B12: 40,00 mg; Vit. C: 300,00 mg; Vit. K: 15,00 mg; ácido fólico: 6,00 mg; ácido pantotênico: 50,00 mg; biotina: 1,00 mg; cobre: 17,50 mg; ferro: 100,00 mg; iodo: 0,80 mg; manganês: 50,00 mg; niacina: 100,00 mg; zinco: 120,00 mg; colina: 500,00 mg; selênio: 0,50 mg; cobalto: 0,40 mg.

O produto contém antioxidantes naturais, concebidos para proteger a alimentação animal da deterioração oxidativa e preservar a sua frescura. Contém tocoferol (ins 307), lecitina de soja (ins 322), extrato de óleo de alecrim, óleo de girassol alérgicos: contém derivados de soja, sem glúten.

© β -glucano MacroGard® Biorigin, São Paulo, Brasil.

Fonte: elaborado por Giovani Sampaio Gonçalves.

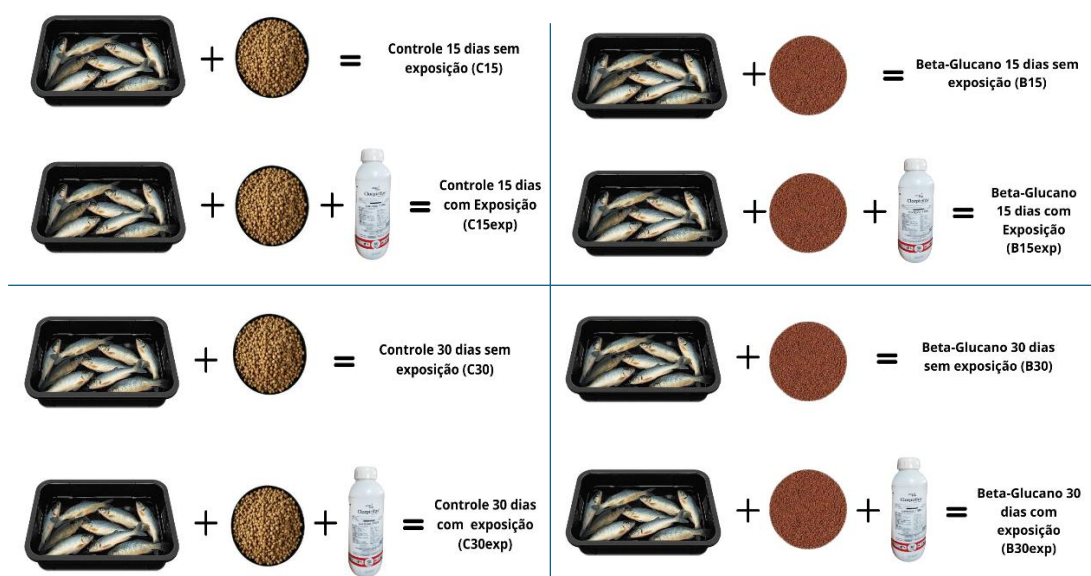
A oferta alimentar ocorreu até a saciedade aparente dos animais, sendo realizada duas vezes ao dia, às 8h e às 18h. A saciedade foi determinada quando os peixes cessavam a ingestão da ração, a qual era administrada em pequenas quantidades ao longo de alguns minutos, com atenção ao comportamento alimentar dos animais, a fim de evitar desperdício. O consumo alimentar diário foi monitorado

por meio da pesagem dos potes de armazenamento de ração correspondentes a cada unidade experimental (caixa).

4.3 Delineamento experimental

O estudo foi conduzido em dois períodos experimentais independentes (15 e 30 dias). Em cada período, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×2 , totalizando quatro tratamentos: duas dietas (controle e β -glucano) e duas condições de exposição (com ou sem clorpirifós). Cada tratamento contou com três repetições, cada conforme Figura 1.

Figura 1: Ilustração do delineamento do experimento. Na figura da esquerda os tratamentos com a ração sem adição de B-glucano e a direita os tratamentos com ração com adição de B-glucano.



Fonte: Criado com Canva pela autora.

EXPERIMENTO 15 DIAS

- Tratamento 01 (C15). Tilápias-do-Nilo receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 15 dias sem exposição ao praguicida e amostradas após 15 dias de experimento;
- Tratamento 02 (B15). Tilápias-do-Nilo receberam dietas com β -glucano por 15 dias sem exposição ao praguicida e amostradas após 15 dias de experimento;
- Tratamento 03 (C15e). Tilápias-do-Nilo receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 15 dias com exposição ao praguicida por 4 dias;

- Tratamento 04 (B15e). Tilápias-do-Nilo receberam dieta com β -glucano por 15 dias, expostas ao clorpirifós por 4 dias.

EXPERIMENTO 30 DIAS

- Tratamento 01 (C30). Tilápias-do-Nilo receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 30 dias sem exposição ao praguicida e amostradas após 30 dias de experimento.
- Tratamento 02 (B30). Tilápias-do-Nilo receberam dietas com β -glucano por 30 dias sem exposição ao praguicida e amostradas após 30 dias de experimento;
- Tratamento 03 (C30e). Tilápias-do-Nilo receberam dietas controle (livre de β -glucano) por 30 dias, com 4 dias de exposição ao praguicida;
- Tratamento 04 (B30e). Tilápias-do-Nilo receberam dieta com β -glucano por 30 dias, expostas ao clorpirifós por 4 dias;

4.4 Desafio com clorpirifós

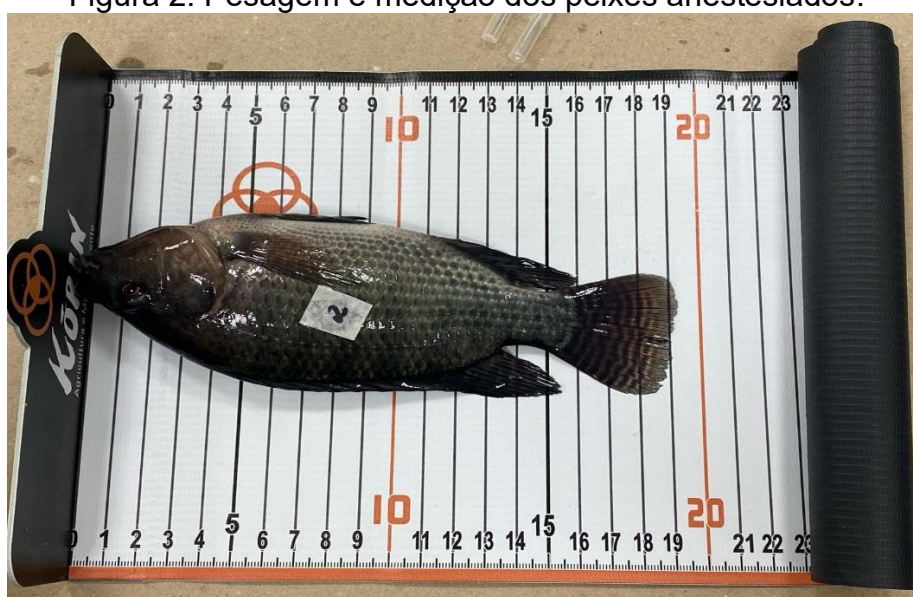
Para a realização do ensaio de exposição ao composto organofosforado clorpirifós, foram utilizados 12 aquários de vidro, cada um com capacidade para 100 litros de água. O sistema adotado era do tipo fechado, com aeração garantida por bombas submersas próprias para aquarofilia, e monitoramento contínuo da temperatura, mantida em 26 ± 1 °C. Considerando a disposição dos aquários e as características do ambiente experimental, não houve necessidade de instalação de sistema de iluminação artificial programada.

A exposição dos peixes ($n = 12$) foi realizada por imersão em solução contendo clorpirifós, utilizando-se 7,2 mg do princípio ativo por aquário. Para isso, foram adicionados 15 μ L do produto comercial clorpirifós 48 EC (Gharda), com concentração de 48% m/v (480 g L^{-1}), em cada aquário com volume total de 100 L de água, resultando na concentração final desejada. A concentração de exposição correspondeu a 30% da concentração subletal média (LC_{50}), sendo, portanto, considerada uma dose subletal do princípio ativo, conforme descrito por Dawood *et al.* (2020) e Oruc (2012). Os peixes permaneceram expostos por 96h em sistema hídrico fechado. Ao final do período experimental de quatro dias, os peixes foram coletados para posterior análise.

4.5 Coleta das amostras

Ao final de cada experimento (aos 15 e 30 dias), 2 peixes de cada caixa ($n=12$), de todos os tratamentos foram amostrados. Os peixes foram submetidos a um jejum de 24 horas, coletados aleatoriamente, anestesiados com Eugenol (1g/10L de água), individualmente pesados em balança digital semianalítica, e medidos em ictiometro. Nesta fase, foram utilizados 24 juvenis de tilápia-do-Nilo revertidas ou masculinizada, com o peso inicial médio de 75 g aproximadamente 15 cm (Figura 2).

Figura 2: Pesagem e medição dos peixes anestesiados.



Fonte: Arquivo do Laboratório de Imunologia Animal.

Foram coletados o fígado dos peixes amostrados (Figura 3) para avaliação da expressão das enzimas do sistema antioxidante (CAT, SOD, GST e GPx), dano celular (HSP70), das citocinas pró e anti-inflamatória TNF- α e IL-10), da enzima CYP por PCR RealTime, atividade enzimática (CAT, SOD E GPx) e estresse oxidativo pelo método de lipoperoxidação.

Figura 3: Extração do fígado. As amostras foram armazenadas em criotubos e mantidos na refrigeração -80°C.



Fonte: Arquivo do Laboratório de Imunologia Animal.

4.6 Biologia molecular

Após a coleta os fígados foram armazenados em freezer à -80°C até a realização das análises. Os tecidos passaram por extração do RNA para análise da expressão dos genes (CAT, SOD e GPx, GST, HSP70, IL-10, CYP, TNF) por PCR RealTime.

O RNA total foi isolado a partir das amostras do fígado (100 mg) utilizando o reagente TRI Reagent® (Sigma, St. Louis, MO, EUA), conforme as instruções do fabricante. Em seguida, 1 μg do RNA extraído foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa, empregando o kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA). A concentração e a pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher, Pleasanton, CA, EUA), com leituras nas absorvâncias de 260 e 280 nm, sendo calculada a razão entre esses valores.

As reações de RT-qPCR foram realizadas em placas de 96 poços, em triplicata, com volume final de 20 μL por reação, contendo 10 μL do SYBR® Green PCR Master Mix (2×), primers a 200 nM e 2 μL de cDNA. As amplificações foram conduzidas e monitoradas em tempo real no sistema CFX96 Touch Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA), sob as seguintes condições: 95°C por 5 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 s, 56°C por 30 s e 68°C por 30 s. Ao final, foi gerada uma curva de dissociação (melting curve) para confirmar a amplificação de um único produto específico.

A determinação molecular da expressão gênica foi realizada pelo método da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR-RT), e os resultados foram analisados por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (PFAFFL, 2004).

Tabela 2. Sequência de primers específicos das enzimas antioxidantes, proteínas de estresse e citocinas pró e antiinflamatórias que foram usados para amplificação dos RNAs transcritos extraídos do fígado de tilápias-do Nilo.

Gene	Sequência Fw/Rv (5'-3')	PB	Nº de acesso	Referência
<i>SOD</i>	F:TCCAGCCTGCCCTCAA GTT R:CCAAAGTCCCGTTTGA TTGC	127	JF801727	Malachy N.O. <i>et al.</i> 2017
<i>CAT</i>	F:CCCAGCTCTTCATCCA GAAAC R:GCCTCCGCATTGTACT TCTT	103	JF801726.1/ XM_003447 521	E, S. dos Reis Goes <i>et al.</i> 2019
<i>GPX</i>	F:CGCCGAAGGTCTCGT TATTT R:TCCCTGGACGGACATA CTT	107	NM_001279 711.1	E, S. dos Reis Goes <i>et al.</i> 2019
<i>GSTα</i>	F:TAATGGGAGAGGGAA GATGG R:CTCTGCGATGTAATTC AGGA	202	NM_001279 635.1	Rui Jia <i>et al.</i> 2019
<i>IL-10</i>	F:CAGCAGCAGGAGCAT CAGCATT R:CACAGGAGGACGGTC TGAGAAGT	107	KP645180.1	Dong-Liang Lu <i>et al.</i> (2019)
<i>TNF-α</i>	F:CAGAAGCACTAAAGGC GAAGAACA R:TTCTAGATGGATGGCT GCCTTG	98	NM_001279 533 / AY428948.1	Dong-Liang Lu <i>et al.</i> (2019)
<i>CYP1α</i> <i>Cytochrome P450</i>	F:CCGTCGTTGTCTCTGT TGCC R:CATCGTCGTGGTGGT CATAGC	71	NM_001279 489.1	Rui Jia <i>et al.</i> 2019
<i>Hsp70</i>	F:CATCGCCTACGGTCTG GACAA	107	FJ207463.1	J. Qiang <i>et al.</i> 2016

	R: TGCCGTCTTCAATGGT CAGGAT			
<i>EF-1α_A</i>	F: ATCAAGAAGATCGGCT ACAACCCT R: ATCCCTTGAACCAGCT CATCTTGT	109	AB075952.1	Dong-Liang Lu <i>et al.</i> (2019)

Fonte: elaborado pela autora.

4.7 Análises Enzimáticas do Sistema Antioxidante

4.7.1 Preparo do homogenato

O meio de homogeneização foi preparado com Tris HCl, EDTA, Triton x-100 e mantido refrigerado e na hora da utilização sempre no gelo.

Os fígados foram pesados na proporção de 1g de tecido para 4ml do meio de homogeneização e levados para o copo homogeneizador Potter e centrifugados a 22065g por uma hora e vinte minutos à 4°C. O sobrenadante foi translúcido rosado foi pipetado para tubos de ensaio de vidro e mantidos no gelo.

4.7.2 Dosagem de proteína – Biureto

A dosagem de proteína é importante para os valores exatos a serem pipetados de cada amostra para as análises seguintes. Foram realizadas algumas adaptações nos procedimentos.

A dosagem foi realizada em microplacas e a absorbância lida no leitor de microplacas. Foram utilizados 13 µL de ácido cólico em cada poço (padrão, branco e amostra). A mesma quantidade de BSA 1% no padrão, 1 µL nos poços de amostra e 54 µL de reagente de biureto em cada poço. E quantidade suficientes de água Milli-Q para completar os 200 µL dos poços.

A placa permaneceu por vinte minutos sem exposição à luz e depois foi levada ao leitor a 545nm. Os resultados foram submetidos ao cálculo:

Proteína total = (absorbância da amostra / absorbância padrão) x 100 = mg prot/

4.7.3 Catalase (CAT)

A atividade hepática da CAT foi determinada medindo a diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio pela absorbância a 240 nm de acordo com Aebi (1984). O coquetel de reação consistiu em H_2O_2 10,6 mM preparado no momento da utilização. Foram utilizados 10 μL de amostra e 190 μL de H_2O_2 para a realização da leitura da atividade enzimática. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para transformar um substrato por minuto sob as condições analíticas descritas. A atividade da CAT foi determinada pela absorbância de 240 nm, à 25° C, em leitor de microplacas tipo ELISA (Thermo Scientific™ Multiskan GO Microplate Spectrophotometer).

4.7.2 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade hepática da SOD foi quantificada pelo método do ferricitocromo C usando xantina / xantina oxidase como fonte de radicais superóxido. O coquetel de reação formado em tampão de fosfato de potássio a 50 mM (pH 7,8), EDTA a 0,1 mM, xantina a 0,1 mM, citocromo C a 0,013 mM e xantina oxidase a 0,024 UI mL^{-1} . Foram utilizados 180 μL de coquetel de reação, 10 μL de amostra e 10 μL de xantina oxidase para a realização da leitura da atividade enzimática. A atividade foi expressa em unidades de SOD por miligrama de proteína. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma inibição de 50% da taxa de redução do ferricitocromo C (Pérez-Jiménez *et al.*, 2009). A atividade da SOD foi determinada pela absorbância de 550 nm, à 25° C, em leitor de microplacas tipo ELISA (Thermo Scientific™ Multiskan GO Microplate Spectrophotometer).

4.7.3 Glutathione peroxidase (GPx)

A atividade hepática da GPx foi medida seguindo o método de Pérez-Jiménez *et al.* (2009). A glutathione na forma oxidada (GSSG) gerada pela GPx foi reduzida pela glutathione redutase (GR) e a oxidação de NADPH foi monitorada pela absorbância a 340 nm. O coquetel de reação formado com tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,1), 3,6 mM de glutathione reduzida (GSH), 3,6 mM de azida de sódio, 1 UI/mL de

glutathiona redutase, 0,2 mM de NADPH e 1,2 mM de H_2O_2 . Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para transformar um substrato μmol por minuto, nas condições analíticas descritas. A atividade da GPx foi determinada pela absorbância de 340 nm, à 25° C, em leitor de microplacas tipo ELISA (Thermo Scientific™ Multiskan GO Microplate Spectrophotometer).

4.8 Estresse oxidativo

Para a determinação da lipoperoxidação, foram adicionados 3 mg de proteína provenientes (teste de Biureto) do sobrenadante do homogenato em tubos de ensaio de vidro devidamente identificados. Para cada amostra e para o respectivo branco, foram acrescentados os seguintes reagentes: 120 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 8,1%, 900 μL de ácido acético a 20%, 900 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67%, Água Milli-Q suficiente para completar o volume final de 2,4 mL (480 μL).

Após a adição dos reagentes, os tubos foram homogeneizados e submetidos a aquecimento em banho-maria a 95 °C por 60 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de água Milli-Q e 5 mL de álcool butílico. O material foi homogeneizado no vórtex e centrifugado em 2000g por 10 min. Alíquotas de 200 μL foram extraídas do sobrenadante orgânico (fase butanol) e depositadas em microplacas. A quantidade do complexo MDA-TBA foi determinada pela absorbância de 535 nm, à 25° C, em leitor de microplacas tipo ELISA (Thermo Scientific™ Multiskan GO Microplate Spectrophotometer).

4.9 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 (2 dietas: controle e β -glucano, x 2 exposições: com ou sem exposição ao clorpirifós) em 2 tempos: 15 e 30 dias de experimento, com 4 tratamentos com 3 repetições cada. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%, sendo as diferenças entre os grupos testadas pelo teste post-hoc de Tukey (5%), utilizando o programa estatístico SAS OnDemand.

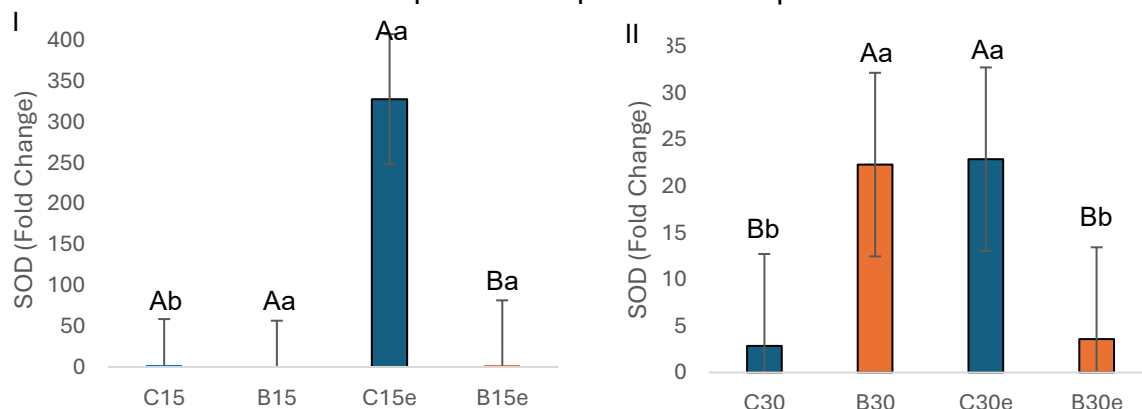
A identificação de valores extremos (outliers) foi realizada por inspeção visual mediante boxplots e por análise dos resíduos studentizados obtidos no modelo linear

misto (PROC MIXED, SAS®). Foram considerados outliers potenciais valores com $|r_{\text{student}}| > 2$ e extremos quando $|r_{\text{student}}| > 3$. A exclusão de observações foi realizada apenas quando identificada causa técnica justificável, como erro de mensuração ou falha experimental.

4 RESULTADOS

4.1 Superóxido dismutase (SOD)

Figura 4 - Expressão gênica relativa da SOD, por qPCR-RT, em fígado de tilápias-do-Nilo em 15 (I) e 30 (II) dias de tratamento com as dietas controle e Beta-glucano, não expostas e expostas ao clorpirifós.



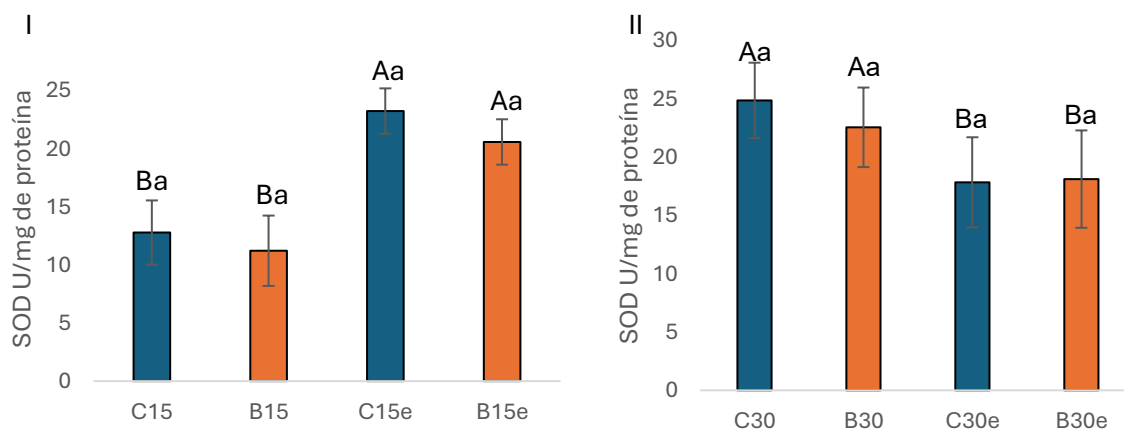
Nota: Os valores representam médias $\pm$ IC95%. A análise estatística foi conduzida por modelo linear misto (PROC MIXED), seguida pelo teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Dieta controle (C) ou suplementada com beta-glucano (B) por 15 dias ou 30 dias, e expostas (e) ou não ao contaminante por 4 dias. Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas dentro da mesma condição de exposição, e letras minúsculas indicam diferenças entre exposições dentro da mesma dieta.

Fonte: Dados da pesquisa (2025).

Foi observada interação significativa entre dieta e exposição sobre a expressão do gene da SOD aos 15 dias ($p = 0,0018$). Na dieta controle, a exposição promoveu aumento expressivo da expressão gênica ($p < 0,05$), enquanto na dieta com beta-glucano não foram observadas diferenças entre condições de exposição. Adicionalmente, sob exposição, a controle resultou em maior expressão gênica quando comparada à dieta com beta-glucano, evidenciando modulação dependente da dieta frente ao estressor (Fig.4, I).

Aos 30 dias, foi observada interação significativa entre dieta e exposição sobre a expressão gênica da SOD ($p = 0,0048$). Na dieta controle, a expressão gênica foi significativamente maior nos animais expostos em comparação aos não expostos, enquanto na dieta com beta-glucano ocorreu padrão inverso, com maior expressão nos grupos não expostos. Esses resultados demonstram que a resposta transcricional da SOD foi dependente da combinação entre condição nutricional e exposição ao estressor (Fig.4, II).

Figura 5 - Atividade da SOD em fígado de tilápias-do-Nilo em 15 (I) e 30 (II) dias de tratamento com as dietas controle e Beta-glucano, não expostas e expostas ao clorpirifós.



Nota: Os valores representam médias $\pm$ IC95%. A análise estatística foi conduzida por modelo linear misto (PROC MIXED), seguida pelo teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Dieta controle (C) ou suplementada com beta-glucano (B) por 15 dias ou 30 dias, e expostas (e) ou não ao contaminante por 4 dias. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$) (I). Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas dentro da mesma condição de exposição, e letras minúsculas indicam diferenças entre exposições dentro da mesma dieta (II).

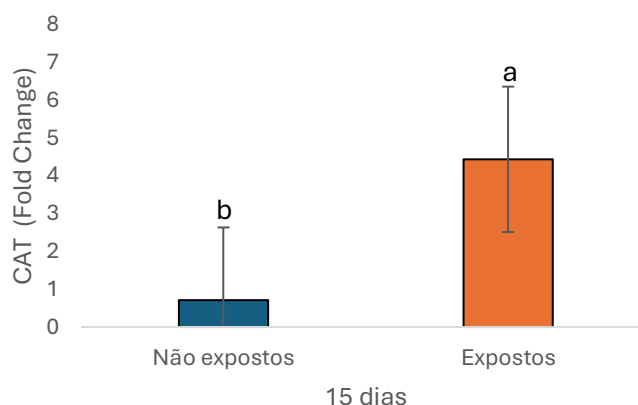
Fonte: Dados da pesquisa (2025).

A análise de variância indicou efeito significativo apenas da exposição sobre a atividade da SOD ($F = 61,73$; $p < 0,0001$), enquanto dieta (controle vs. beta-glucano) não apresentou efeito significativo ($p = 0,1036$), assim como a interação dieta $\times$ exposição ($p = 0,6676$). Esses resultados demonstram que, neste período, a resposta da SOD foi predominantemente determinada pela presença ou ausência do estressor, independentemente da suplementação dietética (Fig.5, I).

Para 30 dias, novamente observou-se efeito significativo da exposição ($F = 9,27$; $p = 0,0050$), sem efeito de dieta ($p = 0,5944$) e sem interação dieta $\times$ exposição ($p = 0,4987$). Diferentemente do observado aos 15 dias, os valores médios indicaram redução da atividade de SOD nos grupos expostos (Fig.5, II).

4.2 Catalase

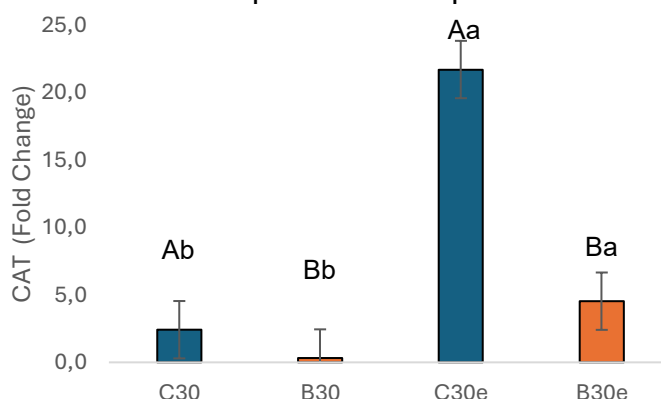
Figura 6 - Expressão gênica relativa da CAT, por qPCR-RT, em fígado de tilápias-do-Nilo em 15 dias de tratamento com as dietas controle e Beta-glucano, não expostas e expostas ao clorpirifós.



Nota: Não expostos ao clorpirifós por 4 dias e expostos ao clorpirifós por 4 dias. Os valores representam médias $\pm$ IC95%. A análise estatística foi realizada por modelo linear misto (PROC MIXED), seguido do teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as condições de exposição. Não foi observada interação entre dieta e exposição. Fonte: Dados da pesquisa (2025).

Aos 15 dias de alimentação, a atividade da catalase (CAT) foi significativamente influenciada pela exposição ($p = 0,0025$), independentemente da dieta fornecida aos animais. Não foram observados efeitos significativos da dieta ($p = 0,0802$) nem interação entre dieta e exposição ($p = 0,4246$). Os grupos expostos apresentaram maior atividade da CAT em relação aos grupos não expostos (Fig.6).

Figura 7 - Expressão gênica relativa da CAT, por qPCR-RT, em fígado de tilápias-do-Nilo em 30 dias de tratamento com as dietas controle e Beta-glucano, não expostas e expostas ao clorpirifós.



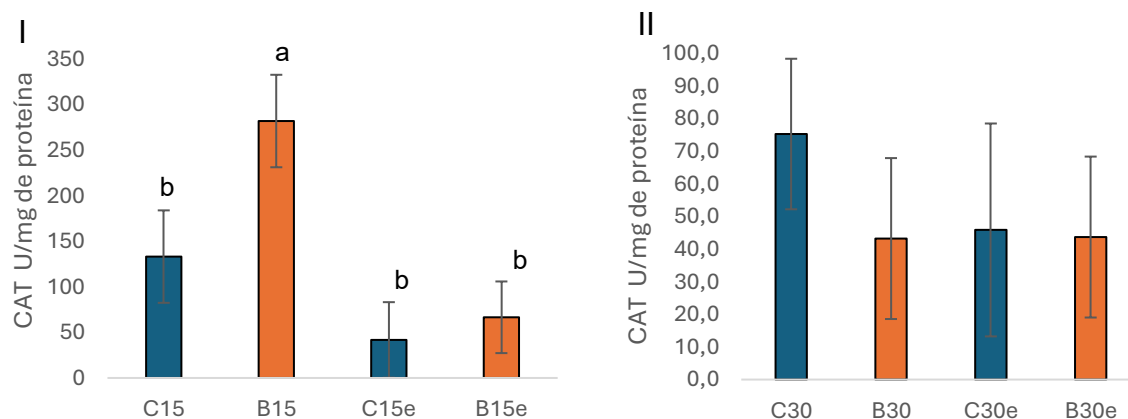
Nota: Os valores representam médias $\pm$ IC95%. A análise estatística foi conduzida por modelo linear misto (PROC MIXED), seguida pelo teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Dieta controle (C) ou suplementada com beta-glucano (B) 30 dias, e expostas (e) ou não ao contaminante por 4 dias. Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas dentro da mesma condição de exposição, e letras minúsculas indicam diferenças entre exposições dentro da mesma dieta.

Fonte: Dados da pesquisa (2025).

A análise da expressão gênica da catalase (CAT) aos 30 dias demonstrou efeito significativo da dieta ($p < 0,0001$), da exposição ($p < 0,0001$) e da interação entre os fatores ($p < 0,0001$). Observou-se maior expressão no grupo C30e o qual diferiu significativamente dos demais ($p < 0,05$). O grupo B30 apresentou o menor nível de expressão, sendo estatisticamente inferior a todos os outros grupos. Os grupos C15 e B30e não apresentaram diferença significativa entre si, configurando um padrão intermediário de expressão gênica (Fig.7).

Os resultados indicam que, na ausência de suplementação, a exposição induziu fortemente a expressão da CAT. Entretanto, quando associada à suplementação, a resposta não foi potencializada de forma proporcional.

Figura 8 - Atividade da CAT em fígado de tilápias-do-Nilo em 15 (I) e 30 (II) dias de tratamento com as dietas controle e Beta-glucano, não expostas e expostas ao clorpirifós.



Nota: Os valores representam médias $\pm$ IC95%. A análise estatística foi conduzida por modelo linear misto (PROC MIXED), seguida pelo teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Dieta controle (C) ou suplementada com beta-glucano (B) por 15 dias ou 30 dias, e expostas (e) ou não ao contaminante por 4 dias. Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos ($p > 0,05$) (I). Não houve efeito significativo da dieta, da exposição nem da interação dieta $\times$ exposição sobre a atividade da catalase aos 30 dias (II).

Fonte: Dados da pesquisa (2025).

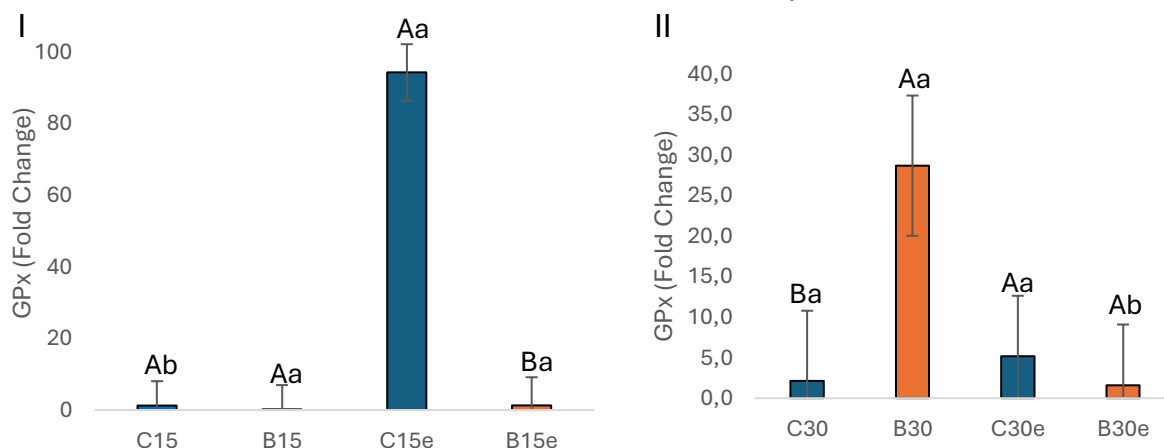
Como houve interação significativa entre os fatores aos 15 dias, as comparações foram realizadas entre as combinações dos tratamentos, e não entre os efeitos principais isoladamente.

Para a atividade da catalase (CAT) aos 15 dias de alimentação, foi observado efeito significativo da dieta ($p = 0,0009$), da exposição ($p < 0,0001$) e da interação entre os fatores ($p = 0,0133$). A presença de interação indica que o efeito do beta-glucano depende da condição de exposição. Nos peixes não expostos, a dieta suplementada promoveu aumento expressivo da atividade da CAT em relação ao controle. Nos peixes expostos, embora o beta-glucano também tenha causado elevação da enzima, os valores permaneceram inferiores aos observados nos grupos não expostos (Fig.8, I).

Aos 30 dias, a atividade da catalase (CAT) não foi significativamente afetada pela dieta ($p = 0,2192$), pela exposição ao contaminante ($p = 0,2964$) nem pela interação entre ambos os fatores ($p = 0,2817$). As médias ajustadas variaram entre 43,19 e 75,22 unidades, entretanto, as diferenças observadas entre os grupos não foram estatisticamente significativas. Esses resultados indicam que, no período avaliado, não houve modulação da resposta antioxidante enzimática da CAT em função da suplementação dietética ou da exposição ao agente tóxico (Fig.8, II).

4.3 Glutathiona peroxidase (GPx)

Figura 9 - Expressão gênica relativa da GPx, por qPCR-RT, em fígado de tilápias-do-Nilo em 15 (I) e 30 (II) dias de tratamento com as dietas controle e Beta-glucano, não expostas e expostas ao clorpirifós.



Nota: Os valores representam médias $\pm$ IC95%. A análise estatística foi conduzida por modelo linear misto (PROC MIXED), seguida pelo teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Dieta controle (C) ou suplementada com beta-glucano (B) por 15 dias ou 30 dias, e expostas (e) ou não ao contaminante por 4 dias. Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas dentro da mesma condição de exposição, e letras minúsculas indicam diferenças entre exposições dentro da mesma dieta.

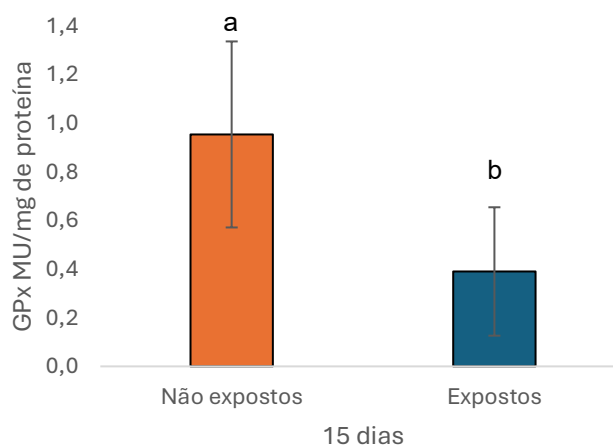
Fonte: Dados da pesquisa (2025).

A análise da expressão gênica da GPx revelou efeito altamente significativo da dieta, da exposição e da interação entre esses fatores ($p < 0,0001$). A expressão foi fortemente aumentada no grupo alimentado com dieta controle 15 dias e exposto (C15e), cuja média foi superior a 90, enquanto os demais grupos apresentaram valores próximos ao basal. Não foram observadas diferenças entre as dietas na ausência de exposição, nem entre os grupos alimentados com beta-glucano, independentemente da exposição. Esses resultados indicam que o aumento da expressão da GPx ocorreu de forma dependente da interação entre dieta controle e exposição ao contaminante (Fig.9, I).

Aos 30 dias revelou efeito significativo da dieta, da exposição e da interação entre esses fatores. A maior expressão foi observada no grupo alimentado com beta-glucano e não exposto ao contaminante (B30), cuja média foi significativamente superior à dos demais grupos. O grupo alimentado com dieta controle e exposto (C30e) apresentou valores intermediários, embora não significativamente diferentes daqueles observados em C30 e B30e. Essa resposta evidencia que a dieta suplementada modulou expressivamente a expressão da GPx em condições basais,

enquanto a exposição ao contaminante promoveu redução da expressão no grupo tratado (Fig.9, II).

Figura 10 - Atividade da GPx em fígado de tilápias-do-Nilo em 15 dias de tratamento com as dietas controle e Beta-glucano, não expostas e expostas ao clorpirifós.

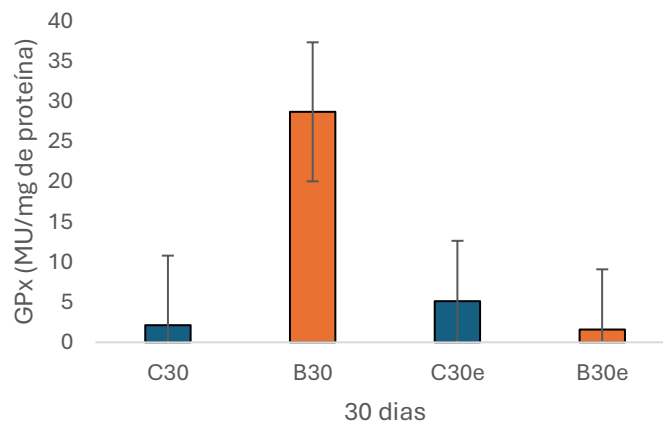


Nota: Os valores representam médias $\pm$ IC95%. As comparações estatísticas foram realizadas por meio de modelo linear misto (PROC MIXED), seguido do teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa entre as condições de exposição. Não foi observada interação significativa entre dieta e exposição.

Fonte: Dados da pesquisa (2025).

Aos 15 dias de alimentação, a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi significativamente influenciada pela exposição ao agente estressor ($p = 0,0021$), independentemente da dieta fornecida aos animais. Não foi observado efeito significativo da dieta ($p = 0,5046$), nem interação entre dieta e exposição ($p = 0,8645$). Os grupos submetidos à exposição apresentaram redução da atividade da GPx em relação aos grupos não expostos, indicando comprometimento da resposta antioxidante frente ao estresse oxidativo induzido (Fig.10).

Figura 11 - Atividade da GPx em fígado de tilápias-do-Nilo em 30 dias de tratamento com as dietas controle e Beta-glucano, não expostas e expostas ao clorpirifós.



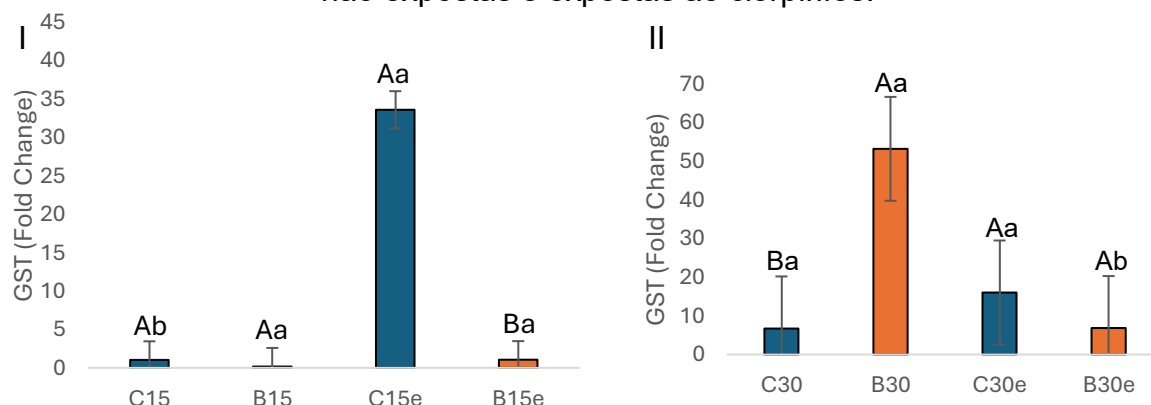
Nota: Os valores representam médias $\pm$ IC95%. As comparações estatísticas foram realizadas por meio de modelo linear misto (PROC MIXED), seguido do teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Não foi observada interação significativa entre os tratamentos.

Fonte: Dados da pesquisa (2025).

Aos 30 dias de alimentação, não foram observados efeitos significativos da dieta ($p = 0,2884$), da exposição ($p = 0,6746$) ou da interação entre os fatores ($p = 0,0959$) sobre a atividade da glutathione peroxidase (GPx). Esses resultados indicam que, sob as condições experimentais avaliadas, a suplementação com beta-glucano não modulou significativamente a resposta antioxidante mediada por essa enzima após 30 dias de alimentação (Fig.11).

4.4 Glutationa S-Transferase (GST)

Figura 12 - Expressão gênica relativa da GST, por qPCR-RT, em fígado de tilápias-do-Nilo em 15 (I) e 30 (II) dias de tratamento com as dietas controle e Beta-glucano, não expostas e expostas ao clorpirifós.



Nota: Os valores representam médias $\pm$ IC95%. A análise estatística foi conduzida por modelo linear misto (PROC MIXED), seguida pelo teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Dieta controle (C) ou suplementada com beta-glucano (B) por 15 dias ou 30 dias, e expostas (e) ou não ao contaminante por 4 dias. Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas dentro da mesma condição de exposição, e letras minúsculas indicam diferenças entre exposições dentro da mesma dieta.

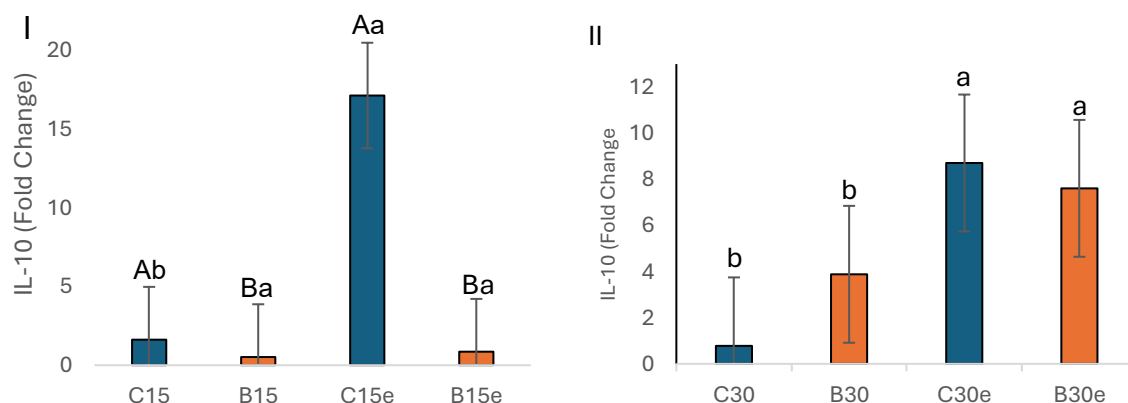
Fonte: Dados da pesquisa (2025)

Observou-se efeito significativo da dieta, da exposição e da interação entre os fatores sobre a expressão do gene GST ($p < 0,001$). O grupo controle exposto apresentou elevação acentuada da expressão gênica após 15 dias de tratamento, enquanto os animais alimentados com beta-glucano mantiveram níveis semelhantes aos controles não expostos (Fig.12, I).

Embora os efeitos isolados de dieta e exposição não tenham sido significativos ($p > 0,05$), a interação entre os fatores foi significativa ($p = 0,0154$) após 30 dias de tratamento. O grupo alimentado com beta-glucano e não exposto apresentou maior expressão do gene GST em comparação aos demais grupos (Fig.12, II).

4.5 Interleucina 10 (IL-10)

Figura 13 - Expressão gênica relativa da IL-10, por qPCR-RT, em fígado de tilápias-do-Nilo em 15 (I) e 30 (II) dias de tratamento com as dietas controle e Beta-glucano, não expostas e expostas ao clorpirifós.



Nota: Os valores representam médias $\pm$ IC95%. A análise estatística foi conduzida por modelo linear misto (PROC MIXED), seguida pelo teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Dieta controle (C) ou suplementada com beta-glucano (B) por 15 dias ou 30 dias, e expostas (e) ou não ao contaminante por 4 dias. Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas dentro da mesma condição de exposição, e letras minúsculas indicam diferenças entre exposições dentro da mesma dieta.

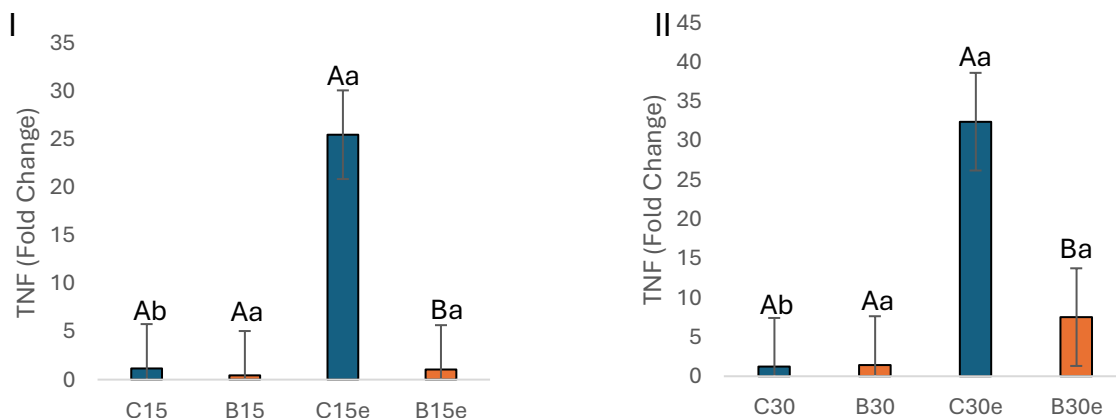
Fonte: Dados da pesquisa (2025).

A expressão gênica da IL-10 aos 15 dias foi significativamente influenciada pela dieta, pela exposição e pela interação entre esses fatores. Observou-se acentuado aumento da expressão no grupo alimentado com dieta controle e exposto ao contaminante (C15e), cujo valor foi significativamente superior aos demais grupos. Dentro da dieta controle, a exposição induziu aumento significativo da expressão da IL-10, enquanto na dieta suplementada não houve diferença entre peixes expostos e não expostos. Adicionalmente, na condição de exposição, a dieta controle resultou em maior expressão da IL-10 em comparação à dieta contendo beta-glucano (Fig.13, I).

Aos 30 dias de alimentação, a expressão gênica da IL-10 foi significativamente influenciada apenas pela exposição ao contaminante, não sendo observado efeito da dieta nem interação entre os fatores. Em ambas as dietas, os peixes expostos apresentaram níveis significativamente maiores de expressão de IL-10 quando comparados aos não expostos. A suplementação com beta-glucano não alterou significativamente essa resposta, indicando que o efeito observado foi predominantemente decorrente da exposição ao estressor (Fig.13, II)

4.6 Fator de necrose tumoral (TNF)

Figura 14 - Expressão gênica relativa da TNF, por qPCR-RT, em fígado de tilápias-do-Nilo em 15 (I) e 30 (II) dias de tratamento com as dietas controle e Beta-glucano, não expostas e expostas ao clorpirifós.



Nota: Os valores representam médias $\pm$ IC95%. A análise estatística foi conduzida por modelo linear misto (PROC MIXED), seguida pelo teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Dieta controle (C) ou suplementada com beta-glucano (B) por 15 dias ou 30 dias, e expostas (e) ou não ao contaminante por 4 dias. Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas dentro da mesma condição de exposição, e letras minúsculas indicam diferenças entre exposições dentro da mesma dieta.

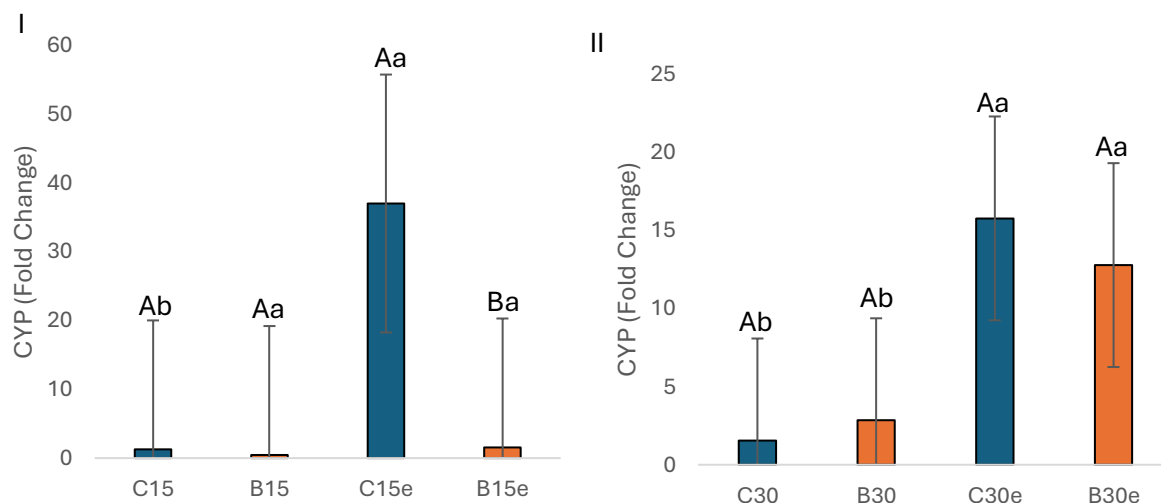
Fonte: Dados da pesquisa (2025).

Após 15 dias de alimentação, verificou-se efeito significativo da dieta, da exposição e da interação entre os fatores sobre a expressão do gene TNF ($p < 0,001$). Animais alimentados com dieta controle e submetidos à exposição apresentaram aumento expressivo na transcrição de TNF, em comparação a todos os demais grupos. Em contrapartida, os peixes suplementados com beta-glucano não apresentaram aumento significativo da expressão gênica após a exposição, mantendo níveis semelhantes aos grupos não expostos, independentemente da dieta (Fig.14, I).

Após 30 dias, observou-se elevação acentuada da expressão gênica de TNF no grupo controle exposto, significativamente superior aos demais tratamentos. Embora os animais suplementados com beta-glucano e expostos tenham apresentado aumento da transcrição, este foi significativamente menor em relação ao grupo controle exposto. Nos grupos não expostos, não houve diferença significativa entre as dietas (Fig.14, II)

4.7 Citocromo P450 (CYP)

Figura 15 - Expressão gênica relativa da CYP, por qPCR-RT, em fígado de tilápias-do-Nilo em 15 (I) e 30 (II) dias de tratamento com as dietas controle e Beta-glucano, não expostas e expostas ao clorpirifós.



Nota: Os valores representam médias $\pm$ IC95%. A análise estatística foi conduzida por modelo linear misto (PROC MIXED), seguida pelo teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Dieta controle (C) ou suplementada com beta-glucano (B) por 15 dias ou 30 dias, e expostas (e) ou não ao contaminante por 4 dias. Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas dentro da mesma condição de exposição, e letras minúsculas indicam diferenças entre exposições dentro da mesma dieta.

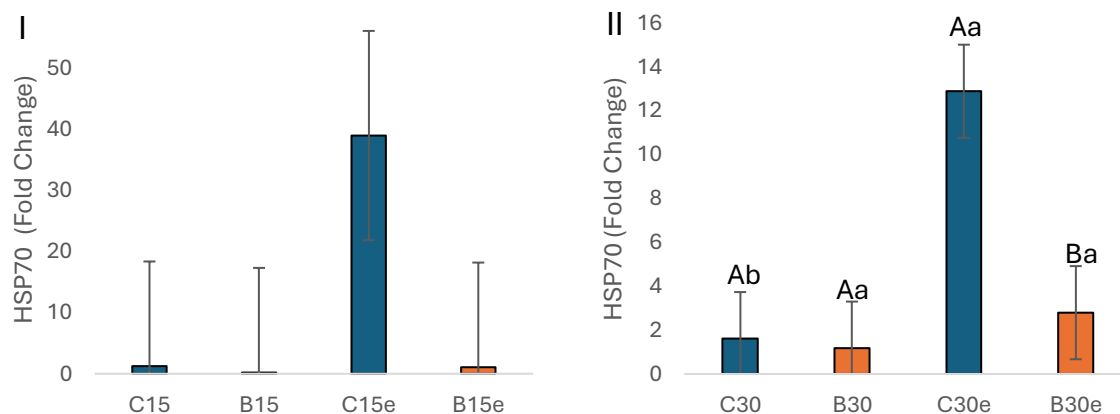
Fonte: Dados da pesquisa (2025).

Após 15 dias de alimentação, verificou-se efeito significativo da dieta, da exposição e da interação entre os fatores sobre a expressão do gene CYP ($p < 0,001$). Animais alimentados com dieta controle e submetidos à exposição apresentaram aumento expressivo na transcrição de CYP, em comparação a todos os demais grupos. Em contrapartida, os peixes suplementados com beta-glucano não apresentaram aumento significativo da expressão gênica após a exposição, mantendo níveis semelhantes aos grupos não expostos, independentemente da dieta (Fig.15, I).

Após 30 dias, verificou-se efeito significativo da exposição na expressão gênica de CYP, sendo os animais expostos caracterizados por maior transcrição em comparação aos não expostos ($p = 0,0035$). Não foram observados efeitos significativos da dieta nem da interação entre os fatores (Fig.15, II).

4.8 HSP70

Figura 16 - Expressão gênica relativa da HSP70, por qPCR-RT, em fígado de tilápias-do-Nilo em 15 (I) e 30 (II) dias de tratamento com as dietas controle e Beta-glucano, não expostas e expostas ao clorpirifós.



Nota: Os valores representam médias $\pm$ IC95%. A análise estatística foi conduzida por modelo linear misto (PROC MIXED), seguida pelo teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Dieta controle (C) ou suplementada com beta-glucano (B) por 15 dias ou 30 dias, e expostas (e) ou não ao contaminante por 4 dias. Letras maiúsculas indicam diferenças entre dietas dentro da mesma condição de exposição, e letras minúsculas indicam diferenças entre exposições dentro da mesma dieta.

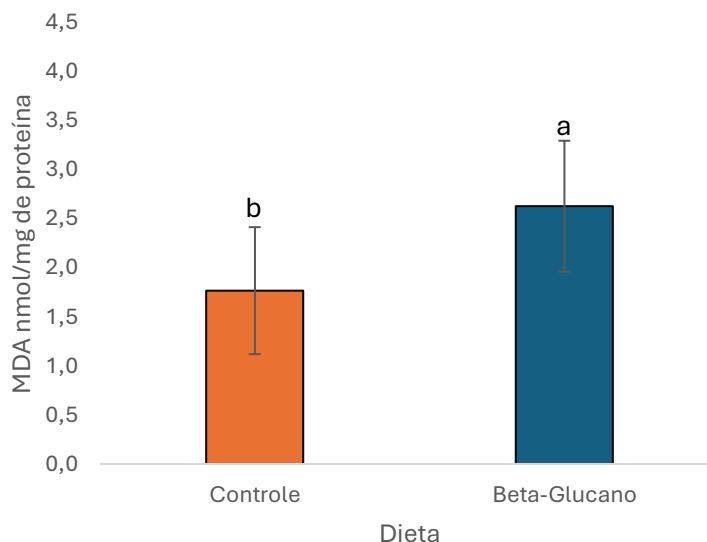
Fonte: Dados da pesquisa (2025).

Após 15 dias de alimentação, não foram observadas diferenças significativas na expressão do gene HSP70 em função da dieta, da exposição ou da interação entre os fatores ($p > 0,05$), indicando ausência de modulação transcricional detectável nesse período (Fig.16, I).

Aos 30 dias, observou-se efeito significativo da dieta, da exposição e da interação entre os fatores ($p < 0,05$). A expressão de HSP70 foi significativamente maior no grupo controle exposto, enquanto os animais suplementados com beta-glucano apresentaram menor expressão gênica sob exposição (Fig.16, II).

4.9 Lipoperoxidação - MDA

Figura 17 - Concentração de MDA em fígado de tilápias suplementadas com e sem β -glucano por 15 dias, expostas e não expostas ao clorpirifós.



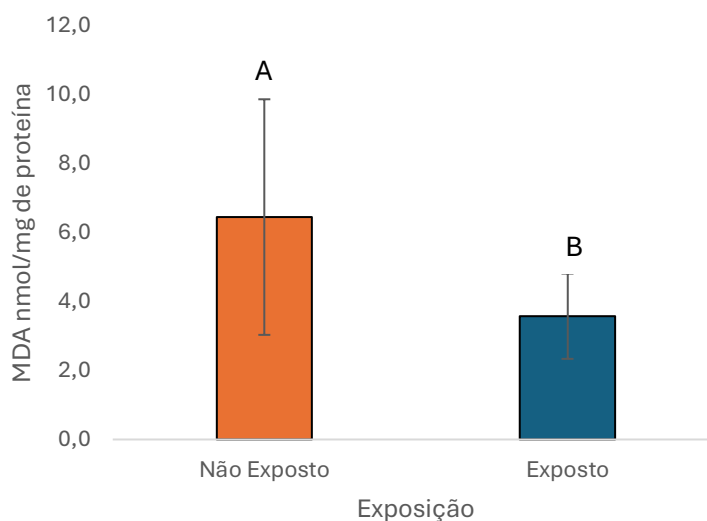
Nota: Os valores representam médias $\pm$ IC95%. A análise estatística foi conduzida por modelo linear misto (PROC MIXED), seguida pelo teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Dieta controle (C) ou suplementada com beta-glucano (B). Letras distintas indicam diferenças entre dietas.

Fonte: Dados da pesquisa (2025).

Aos 15 dias de experimento, observou-se efeito significativo da dieta sobre os níveis de lipoperoxidação hepática ($p = 0,0185$), enquanto o fator exposição ao clorpirifós não apresentou efeito estatístico relevante ($p = 0,5987$). A interação entre dieta e exposição não foi significativa ($p = 0,1629$), indicando que o comportamento da lipoperoxidação não dependeu da combinação entre os fatores.

As médias ajustadas (LSMeans) confirmaram esse padrão: os grupos submetidos à dieta com beta-glucano apresentaram valores superiores de MDA (B15 = 2,78; B15e = 2,47) em relação aos grupos sob a dieta Controle (C15 = 1,43; C15e = 2,10), evidenciando maior peroxidação lipídica associada à dieta beta-glucano, independentemente da exposição. A ausência de efeito da exposição indica que, nesse intervalo experimental, o estresse oxidativo aferido pelo MDA foi determinado predominantemente pela composição da dieta, e não pelo desafio aplicado (Fig.17).

Figura 18. Concentração de MDA em fígado de tilápias suplementadas com e sem β -glucano por 30 dias, expostas e não expostas ao clorpirifós.



Nota: Os valores representam médias $\pm$ IC95%. A análise estatística foi conduzida por modelo linear misto (PROC MIXED), seguida pelo teste de Tukey–Kramer ($p < 0,05$). Dieta controle (C) ou suplementada com beta-glucano (B). Letras distintas indicam diferenças entre dietas. Fonte: Dados da pesquisa (2025).

Aos 30 dias de alimentação experimental, observou-se efeito altamente significativo do fator exposição ao clorpirifós sobre os níveis de lipoperoxidação hepática ($p < 0,0001$). As médias ajustadas (LSMeans) indicaram que os animais não expostos apresentaram níveis significativamente mais elevados de MDA em comparação aos animais expostos, tanto nos grupos alimentados com dieta controle quanto naqueles suplementados com beta-glucano (LSMeans não expostos $\approx 5,86$; expostos $\approx 3,57$). Não foi detectado efeito significativo do fator dieta ($p = 0,3450$) nem da interação dieta $\times$ exposição ($p = 0,3430$) (Fig.18).

5 DISCUSSÃO

O clorpirifós é amplamente descrito como indutor de estresse oxidativo em organismos aquáticos, promovendo desequilíbrio na homeostase redox por meio da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio e comprometimento das defesas antioxidantes (Ali *et al.*, 2020; Santana *et al.*, 2022; Sule; Condon; Gomes, 2022).

A atividade enzimática observada demonstra um desequilíbrio entre as etapas do sistema antioxidante hepático. Houve aumento significativo da SOD em C15e, B15e, C30 e B30; contudo, as enzimas CAT e GPx não acompanharam essa elevação, permanecendo estáveis ou com aumentos discretos. Esse padrão caracteriza um cenário de acúmulo de peróxido de hidrogênio, uma vez que a desproporção entre a dismutação do radical superóxido e sua conversão subsequente em água intensifica o estresse oxidativo.

Consequentemente, os grupos B15e, C30 e B30 apresentaram aumento concomitante da SOD e da LPO, indicando incapacidade dos mecanismos antioxidantes de segunda etapa em neutralizar os peróxidos formados.

A elevação da peroxidação lipídica aos 30 dias de experimento nos grupos não expostos pode ter sido causada por fatores como indução adaptativa pelo clorpirifós nos grupos expostos, efeito temporal/operacional independente da dieta e erros metodológicos (Orji *et al.*, 2025). A literatura demonstra que exposições a xenobióticos ocasionam acúmulo de ERO e redução da capacidade antioxidante endógena, tornando a célula vulnerável ao dano oxidativo (Ghosh *et al.*, 2025; Oruc, 2012), mas no caso analisado não havia estressor.

Curiosamente, aos 15 dias, observou-se maior concentração de MDA nos grupos suplementados com β -glucano, independentemente da exposição, sugerindo possível resposta metabólica inicial ao aditivo. Estudos recentes indicam que o β -glucano pode atuar como estimulador metabólico hepático nas fases iniciais de suplementação, elevando temporariamente o consumo de oxigênio e a produção secundária de espécies reativas (Fath El-Bab *et al.*, 2022; Petit *et al.*, 2022).

Os resultados demonstraram que, embora houvesse aumento na expressão gênica da SOD, CAT e GPx nos grupos expostos, especialmente aos 15 dias, as atividades enzimáticas não acompanharam essa elevação, sobretudo após 30 dias. Esse descompasso entre expressão e atividade indica que o aumento transcricional

não foi suficiente para evitar o estresse oxidativo característico de estressores químicos (Santana *et al.*, 2022).

A redução da atividade da SOD, observada nos grupos expostos aos 30 dias, sugere esgotamento da capacidade antioxidante frente à exposição, comportamento compatível com estudos recentes em tilápias submetidas à contaminação ambiental (Ghosh *et al.*, 2025). De modo semelhante, a atividade da GPx nos grupos não expostos aos 15 dias, indicando consumo acelerado da glutathione reduzida, o que compromete a neutralização de peróxidos lipídicos (Matos, 2022; Pérez-Jiménez *et al.*, 2009).

A dissociação entre transcrição e atividade enzimática, frequentemente relatada em organismos expostos a praguicidas, indica que a modulação antioxidante foi insuficiente para prevenir o dano oxidativo, resultando nos padrões elevados de LPO observados. Mas, não é possível afirmar que foi ineficácia do β -glucano, uma vez que fatores fisiológicos dos animais e até mesmo possíveis erros nas análises possam ter contribuído para o resultado.

A suplementação com β -glucano apresentou efeito protetor mais evidente nas vias imunológicas e de biotransformação do que na redução direta da peroxidação lipídica. Observou-se redução significativa da expressão de TNF e estabilização da IL-10 nos grupos suplementados, indicando contenção do processo inflamatório induzido pelo tóxico.

O TNF é uma citocina central na resposta inflamatória e sua elevação está associada a dano celular, apoptose e necrose hepática (LI *et al.*, 2021). A atenuação da expressão desse gene nos animais tratados com β -glucano é consistente com sua ação anti-inflamatória descrita na literatura (Dalmo; Bøgwald, 2008; Zhong *et al.*, 2023).

A IL-10 atua na modulação negativa da inflamação e na promoção da homeostase imune. Sua elevação nos grupos controle expostos reflete tentativa do organismo de regular o processo inflamatório instaurado. Entretanto, nos animais suplementados, observou-se resposta mais equilibrada, sugerindo maior eficácia do sistema regulatório (Wu *et al.*, 2021).

Estudos recentes demonstram que o β -glucano regula a resposta imune por meio da ativação de receptores como TLR, Dectin-1 e CR3, ativando vias intracelulares como MYD88 e NF- κ B, culminando na modulação da expressão de

citocinas pró e anti-inflamatórias (De Assis Beneti *et al.*, 2023; Fierro-Castro *et al.*, 2024).

O citocromo P450 é fundamental na bioativação de praguicidas, convertendo o clorpirifós em metabólitos mais tóxicos (Katagi, 2020). A expressão do gene CYP nos grupos controle expostos aos 15 e 30 dias de tratamento confirmou ativação do sistema microssomal hepático em resposta ao clorpirifós, o que também foi observado em B30e. Para entender este comportamento é necessário realizar outras análises como avaliação de metabólitos do clorpirifós e a mensuração da depleção de cofatores essenciais para GPx.

A ausência de aumento expressivo da expressão do CYP nos grupos suplementados (B15, B15e e B30) indica possível contenção da bioativação do tóxico, reduzindo sua toxicidade sistêmica. Paralelamente, o comportamento da GST sugere manutenção da capacidade de conjugação e eliminação, fortalecendo os mecanismos de detoxificação (Gonçalves *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2022).

Esse perfil demonstra que o β -glucano atua não apenas como imunomodulador, mas também como agente funcional que estabiliza o metabolismo hepático frente a xenobióticos.

A elevação da expressão de HSP70 nos grupos controle expostos aos 30 dias reflete acúmulo de proteínas desnaturadas e ativação de mecanismos de sobrevivência celular. Essa proteína é considerada biomarcador precoce de estresse químico e proteotóxico (Varó, R. Serrano, E. Pitarco, 2002).

A redução da expressão de HSP70 nos grupos suplementados indica menor grau de estresse celular, sugerindo proteção estrutural conferida pelo β -glucano, resultado compatível com estudos recentes em peixes submetidos a estressores ambientais (Fierro-Castro *et al.*, 2024).

A suplementação com β -glucano demonstrou exercer efeito modulador principalmente sobre os parâmetros imunológicos e de biotransformação, reduzindo a ativação de vias inflamatórias e atenuando a expressão de genes relacionados à bioativação do tóxico. Esses achados indicam, que para este estudo, o composto atua de forma mais pronunciada como imunomodulador e regulador metabólico do que como agente antioxidante, visto que os efeitos sobre a peroxidação lipídica foram limitados frente à intensidade da agressão química imposta.

Dessa forma, os resultados obtidos reforçam o potencial do β -glucano como aditivo funcional promissor na aquicultura, especialmente em cenários caracterizados por risco de contaminação ambiental. No entanto, evidenciam também que sua eficácia é parcial e dependente do contexto fisiológico, sugerindo que estratégias combinadas de manejo nutricional e monitoramento ambiental são essenciais para mitigar os efeitos deletérios de contaminantes químicos em sistemas de produção aquícola.

6 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o clorpirifós provoca desequilíbrio redox, ativação inflamatória e alterações metabólicas em tilápias-do-Nilo, evidenciando seu alto potencial tóxico. A elevação da lipoperoxidação e as mudanças na expressão de genes antioxidantes e imunológicos confirmam dano oxidativo. A suplementação com β -glucano modulou principalmente parâmetros imunológicos e de biotransformação, reduzindo vias inflamatórias. Esses efeitos variaram conforme o tempo e os biomarcadores avaliados, mostrando que a resposta depende do contexto fisiológico. Assim, o β -glucano apresenta potencial como aditivo funcional, porém com eficácia parcial, reforçando a necessidade de integrar manejo nutricional e monitoramento ambiental na aquicultura.

REFERÊNCIAS

AEBI, Hugo. Catalase in vitro. *In: Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods in Enzymology***. [S.l.]: Academic Press, 1984. v. 105 p. 121–126.

ALI, Mehtabidah; MAJID, Muhammad; HUSSAIN, Ikram; KALI, Sundas; NAZ, Tayyaba; NIAZI, Muhammad B.K; KHAN, Muhammad R. A, ZAFAR, Mazhar I. Chlorpyrifos mediated oxidative damage and histopathological alterations in freshwater fish *Oncorhynchus mykiss* in Northern Pakistan. **Aquaculture**, v. 51, n. 11, p. 4583–4594, 6 ago. 2020.

ATSDR. **Toxicological profile for chlorpyrifos**. Agency for Toxic Substances and Disease Registry set. 1997. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp84.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2025

BARRETO, Maurílio Kaique; OLIVEIRA, Camila Tâmires Alves; HENRY-SILVA, Gustavo Gonzaga. Greenhouse gas emission flux (CO₂, CH₄, N₂O) from marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) monoculture cultures in the Brazilian semi-arid region. **Aquaculture**, v. 582, p. 740536, mar. 2024.

BOLS, Niels C; BRUBACHER, John L; GANASSIN, Rosemarie C; LEE, Lucila E J. Developmental and Comparative Immunology. **Ecotoxicology and innate immunity in fish**, v. 25, p. 853–873, 2021.

BUTT, Usman Dawood; LIN, Na; AKHTER, Najeeb; SIDDIQUI, Tooba; LI, Sihui; WU, Bin. Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 114, p. 263–281, jul. 2021.

CARLI, Bruno Paes de. **Fosfolipase A2 de zebrafish como biomarcador de contaminação aquática**. São Vicente/SP: Universidade Estadual Paulista, 2023. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/e447e18d-94a5-480b-9120-22a4a6072dd7/content>. Acesso em: 3 mar. 2025.

CASAS SOLIS, J; SANTARE, A; PÉREZ, MI Girón; OROZCO, R. Reynoso; ZAITSEVA, G. Um estudo comparativo da atividade fagocítica e da resposta linfoproliferativa em cinco variedades de tilápia *Oreochromis spp.* **Journal of fish biology**, v. 71, n. 5, p. 1541–1545, 22 out. 2007.

CRAWFORD, Amanda; FASSET, Robert G; GERAGTHY, Dominic P; KUNDE, DALE A; BALL, Madeleine J; ROBERTSON, Iain K; COOMBES, Jeef S. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. **Gene**, v. 501, n. 2, p. 89–103, jun. 2012.

DALMO, Roy A.; BØGWALD, Jarl. β -glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 4, p. 384–396, out. 2008.

DAWOOD, Mahmoud A. O; ABDEL-RAZIK, Nagma I.; GEWAILY, Mahmoud S.; SEWLIAM, Hani; PARAY, Bilal Ahamad; SOLIMAN, Ali A.; ABDELHIEE, Ehab Y.; ABOUDAKR, Mohamed; VAN DOAN, Hien; EL-SABAGH, Mabrouk; EL BASUINI, Mohammed F. β -Glucan improved the immunity, hepato-renal, and histopathology

disorders induced by chlorpyrifos in Nile tilapia. **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 100549, nov. 2020.

DE ASSIS BENETI, Simone Andrea, Dos Reis, Ingrid Camargo; FIERRO-CASTRO, Camino; SCHLICHTING, Basia; POLYCARPO, Gustavo; MIASAKI, CELSO; Biller, Jaqueline. Stress-associated β -glucan administration stimulates the TLR – MYD88 – NFKB1 signaling pathway in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 142, p. 109089, nov. 2023.

DÍAZ-RESENDIZ, K. JG; GIRÓN-PÉREZ, M. I. Efecto de clorpirifos sobre la respuesta inmune de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). **Revista Bio Ciencias**, v. 3, n. 1, 11 jul. 2014.

EL-MURR, Abd Elhakeem I; ABD EL HAKIM, Yasser; NEAMAT-ALLAH, AHMED N.F; BAESHEN, Mohammed; ALI, HAYTHAM A. Immune-protective, antioxidant and relative genes expression impacts of β -glucan against fipronil toxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 94, p. 427–433, nov. 2019.

FATH EL-BAB, Ahmed F; MAJRASHI, Kamlah A; SHEIKH, Huda M; SHAFI, Manal E; EL-RATEL, Ibrahim T; NEAMAT-ALLAH, Ahmed N.F; EL-RAGHI, Ali A; ELAZEM, Amar Y Abd; ABD-ELGAHANY, Mohamed F; ABDELNOUR, Sameh A; ABDUH, Maisa S; JAREMKO, Maruysz; NAIEL, Mohammed A. E. Dietary supplementation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with β -glucan and/or *Bacillus coagulans*: Synergistic impacts on performance, immune responses, redox status and expression of some related genes. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 1011715, 23 set. 2022.

FIERRO-CASTRO, Camino; TORT, Luís; MINGATTO, Fábio Erminio; Biller, Jaqueline Dalbello. Assessing the effect of β -glucan diets on innate immune response of tilapia macrophages against trichlorfon exposure: an in vitro study. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 527–541, abr. 2024.

GHOSH, Debkanta; Saha, Samir Kumar; KAVIRAJ, Anilava; SAHA, Subrata. Activity pattern of antioxidant enzymes in relation to the time of exposure of hexavalent chromium to Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology**, v. 34, n. 2, p. 266–279, mar. 2025.

GONÇALVES, Antonio Jose; MONTE, Osmar; MORARI, Eliane Cristina; WARD, Laura Sterian; NAKASAKO, Diana Shimoda, NIETO, Juliana; NAKAI, Marianne Yumi. Sistema Glutation-S-Transferase como fator prognóstico no carcinoma papilífero da tireoide. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 3, p. 279–282, 2009.

GUIMARÃES, Matheus Gardim. **Efeitos de Quillaja saponaria, Yucca schidigera e Saccharomyces cerevisiae no desempenho produtivo e saúde de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes tipos de estresse**. 2024. 137 f. Tese (Doutor em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu, 2024. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/5244fc7b-bb54-47af-a045-11bc485430da/content>. Acesso em: 15 out. 2025.

JEFRFREYS, DW Verner; WALLIS, TJ; CEJAS, Eu Cano; RYDER, D; HAYDON, DJ; DOMAZORO, JF; CAMPO, TR; ADJEI-BOTENG, D; MADEIRA, G; FEIJÃO, T; FEIST, TW. A sequência multilocus tipo 261 do *Streptococcus agalactiae* está associada à mortalidade na emergente indústria de tilápia em Gana. **Fish Diseases**, v. 41, n. 1, p. 175–179, 16 jul. 2017.

JIN, Yiming; LI, Pingli; WANG, Fengshan. β -glucans as potential immunoadjuvants: a review on the adjuvanticity, structure-activity relationship and receptor recognition properties. **Vaccine**, v. 36, n. 35, p. 5235–5244, ago. 2018.

KATAGI, Toshiyuki. *In vitro* metabolism of pesticides and industrial chemicals in fish. **Journal of Pesticide Science**, v. 45, n. 1, p. 1–15, 20 fev. 2020.

LI, Kang; QIU, Hong; YAN, Jie; SHEN, Xiaotong; WEI, Xiumei; DUAN, Ming; YANG, Jialong. The involvement of TNF- α and TNF- β as proinflammatory cytokines in lymphocyte-mediated adaptive immunity of Nile tilapia by initiating apoptosis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 115, p. 103884, fev. 2021.

LOMBARDI, J. V. **Toxicologia na Aquicultura**. [S.l.]: Instituto de Pesca, 2008.

MARQUES, Márjori Brenda Leite; AMÉRICO-PINHEIRO, Juliana Heloisa Pinê. Ocorrência de clorpirifós em ambientes aquáticos e seus efeitos ecotoxicológicos em bioindicadores. **Revista Nacional de Gerenciamento de Cidades**, v. 8, n. 65, 26 dez. 2020.

MATOS, Alaide Cristina de Bem. **Avaliação de biomarcadores bioquímicos e histológicos em tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas a concentrações subletais do inseticida Zeus®**. [S.l.]: Lages, SC, 2022.

MAZMANCI, Birgül; ÇAVAŞ, Tolga. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and gill tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following in vivo exposure to domoic acid. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 734–738, abr. 2010.

MEENA, D. K; PRNOB, Das; KUMAR, Shailesh; MANDAL, S.C; PRUSTY, A.K; SINGH, S. K; AKHTAR, M. S; BEHERA, B. K; KUMAR, Kundan; PAL, A. K; MUKHERJEE, S. C. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 431–457, jun. 2013.

ORJI, Ejike Celestine; OGANA, Joy; OGECHUKWU, Frances; EZENWELU, Chijioke. Oxidative Stress Markers (Malondialdehyde, Catalase, Superoxide Dismutase, Glutathione-Peroxidase, and Glutathione Reductase) and Metallothionein Activities of *Papryrocarpus Afer*. **International Journal of Research and Innovation in Applied Science**, v. 10, 29 maio 2025.

ORUC, Elif. Oxidative Stress Responses and Recovery Patterns in the Liver of *Oreochromis niloticus* Exposed to Chlorpyrifos-Ethyl. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, n. 5, p. 678–684, maio 2012.

PANIS, Carolina; CANDIOTTO, Luciano Zanetti Pessôa; GABOARDI, Shaiane Carla. Overview of the pesticide contamination provided by the last Brazilian water quality surveillance information system for human consumption (SISÁGUA 2022) report. **Science of The Total Environment**, v. 951, p. 175583, nov. 2024.

PÉREZ-JIMÉNEZ, Amalia; HIDALGO, M. CARMEN; MORALES, AMALIA E; ARIZCUN, Marta; ABELLÁN, Emilia; CARDENETE, Gabriel . Antioxidant enzymatic defenses and oxidative damage in Dentex dentex fed on different dietary macronutrient levels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 150, n. 4, p. 537–545, nov. 2009.

PETIT, Jules; DE BRUIJIN, Irene; GOLDMAN, MARK R. G; VAN DEN BRINK, Erik; PELLIKAAN, Wilbert F; FORLENZA, Maria; WIEGERTJES, Geert F. β -Glucan-Induced Immuno-Modulation: A Role for the Intestinal Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Common Carp. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 761820, 6 jan. 2022.

QUISPE, Carlos Humberto Casanova. **Beta-glucano influência a sobrevivência de Tilápia-do-nilo após infecção por Francisella orientalis**. Jaboticabal: [s.n.], 2022.

SANTANA, Manuela S. DOMINGUES DE MELO, Gabriel; SANDRINI-NETO, Leonardo; DI DOMENICO, Maikon; PRODOCIMO, Maritana Mela. A meta-analytic review of fish antioxidant defense and biotransformation systems following pesticide exposure. **Chemosphere**, v. 291, p. 132730, mar. 2022.

SATHYAMOORTHY, Akila; CHAURASIA, Mukesh Kumar; ARASU, Mariadhas Valan; AL-DHABI, Naif Abdullah; HARIKRISHNAN, Ramasamy; AROCKIARAJ, Jesu. Differences in structure and changes in gene regulation of murrel molecular chaperone HSP family during epizootic ulcerative syndrome (EUS) infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 60, p. 129–140, jan. 2017.

SCHENKMAN, John B.; JANSSON, Ingela. The many roles of cytochrome b5. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 97, n. 2, p. 139–152, fev. 2003.

SULE, Rasheed O.; CONDON, Liam; GOMES, Aldrin V. A common feature of pesticides: oxidative stress:the role of oxidative stress in pesticide-induced toxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, n. 1, p. 5563759, jan. 2022.

VAN DOAN, Hien; SOLTANI, Mehdi; LEITÃO, Alexandra; SHAFIEI, Shafigh; ASADI, Sepideh; LYMBERY, Alan J; RINGO, Einar. Streptococcosis a re-emerging disease in aquaculture: significance and phytotherapy. **Animals**, v. 12, n. 18, p. 2443, 16 set. 2022.

VARÓ, R. SERRANO, E. PITARC, I. Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain: study of protein HSP70 as biomarker of sublethal stress in fish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 229–235, 1 fev. 2002.

WEI, Guangben; TAN, Huiming; MA, Shaohong; SUN, GUORONG; ZHANG, Yilin; WU, Yuanzhi; CAI, Shuanghu; HUANG, Yucong; JIAN, JICHANG. Protective effects of β -glucan as adjuvant combined inactivated *Vibrio harveyi* vaccine in pearl gentian grouper. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 106, p. 1025–1030, nov. 2020.

WU, Siwei; DUAN, Chenxi; KONG, Linhe; TU, Xiao; WANG, Lifei; GUO, Zheng; Ye, Jianmin.. Interleukin-10 (IL-10) participates in host defense against bacterial pathogens and promotes IgM antibody production in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 531, p. 735829, jan. 2021.

ZHONG, Xuemei; WANG, Guoqing; LI, Fu; FANG, Sixian; ZHOU, Siai; ISHIWATA, Alexander G; SHKURNIKOV, Maxim; CAI, Hui; DING, FEIQING.

Immunomodulatory Effect and Biological Significance of β -Glucans.

Pharmaceutics, v. 15, n. 6, p. 1615, 29 maio 2023.