

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Natália Portruneli

Efeito da exposição aguda do inseticida Fipronil e do herbicida 2,4-D e
mistura de ambos em curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Teleósteo,
Prochilodontidae).

SÃO CARLOS – SP

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Natália Portruneli

Efeito da exposição aguda do inseticida Fipronil e do herbicida 2,4-D e
mistura de ambos em curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Teleósteo,
Prochilodontidae).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, do
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde –
Universidade Federal de São Carlos, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de Mestra
em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Dra. Marisa Narciso Fernandes

Co-orientadora: Dra. Iara da Costa Souza

SÃO CARLOS – SP

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Natália Portruneli, realizada em 11/09/2020.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes (UFSCar)

Profa. Dra. Juliane Silberschmidt Freitas (UEMG)

Prof. Dr. Marcelo Gustavo Paulino (UFTO)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes, pelos conhecimentos passados, orientação, confiança, pela incrível oportunidade que me proporcionou muito crescimento profissional e, principalmente por acreditar em mim e me ajudar mesmo quando eu achava que não iria conseguir!

Ao programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) da Universidade Federal de São Carlos pelo curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo, que tornou possível a realização do mestrado.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), por todo o suporte.

À Dr. Iara da Costa Souza, pela co-orientação.

Aos técnicos do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA) que me auxiliaram na realização das fotomicrografias eletrônicas de varredura e utilização do microscópio eletrônico de varredura.

À Suely responsável pela Piscicultura Projeto Peixes, de Sales de Oliveira, SP, Brasil, que doou todos os modelos experimentais utilizados no presente trabalho.

À banca examinadora: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes, Profa. Dra. Juliane Silberschmidt Freitas e Prof. Dr. Marcelo Gustavo Paulino

Ao Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, e toda equipe, pela possibilidade de participação do projeto, e ao projeto Fapesp (2015/18790-3) pela concessão dos materiais utilizados nas análises químicas.

À Prof. Dra. Juliane Silberschmidt Freitas novamente, pelo incentivo na área da ecotoxicologia e por ser um exemplo de profissional

Ao Prof. Dr. Daniel Alberto Wunderlin e todos os químicos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos Córdoba (ICYTAC) por conceder a maravilhosa oportunidade de trabalhar e conhecer um pouco das ciências químicas

À Prof. Dra. Rocío Inés Bonansea pela amizade e por toda a ajuda para as análises químicas, e a todos do Departamento de Química Orgânica, Faculdade de Ciências Químicas, que me auxiliaram.

À minha família que sempre me apoiou com os estudos, e principalmente, ao meu pai que foi insistente em me levar para São Carlos no dia da prova de seleção do mestrado, mesmo eu estando pós operada.

Ao meu namorado, Jonatan, por sempre me apoiar e me buscar no laboratório todas as vezes que eu ficava até tarde.

Aos meus queridos amigos, Natália, Will e Fabrício, pela amizade excepcional durante todo o mestrado.

À todos do Laboratório LBZC que auxiliaram de alguma maneira no meu crescimento profissional.

Ao grupo da carona, Wagner, Daniel e Fabiano, que proporcionaram todas as minhas idas para São Carlos e fizeram possível a conclusão desse trabalho

Aos meus queridos amigos Rafael e Renata que mesmo estando a 3000 km de distância, foram extremamente presentes e preocupados durante todo o período do mestrado, me acolhendo como um membro da família.

Aos meus queridos amigos da graduação, Rodolfo, Marina, José Augusto e Ana Carolina por serem extremamente presentes e pela amizade. Ao meu amigo Rodolfo em especial, por me incentivar a participar da seleção de mestrado e por sempre acreditar em mim.

À todos que de alguma maneira auxiliaram a conclusão do presente trabalho e que não foram mencionados. Obrigada a todos!

“Uma sociedade se define não só pelo que cria, mas pelo que se nega a destruir”.

(John C. Sawhill)

RESUMO

O herbicida 2,4-D e o inseticida fipronil são agrotóxicos frequentemente detectados em ecossistemas aquáticos, ameaçando assim a vida selvagem e a segurança sanitária. O objetivo do presente estudo foi investigar a toxicidade do 2,4-D ($447 \mu\text{g i.a L}^{-1}$) e do fipronil ($63,49 \mu\text{g i.a L}^{-1}$), isolados e em mistura no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* em um tempo de exposição de 96 h em condições laboratoriais. Após a exposição foi determinada a bioconcentração no organismo, as atividades da catalase (CAT), glutathione s-transferase (GST) e o nível de peroxidação lipídica (LPO), e as alterações na superfície do epitélio branquial. O fator de bioconcentração foi calculado em $0,17 \text{ kg}^{-1} \text{ L}$ para o 2,4 D isolado e $12,4 \text{ kg}^{-1} \text{ L}$ para o fipronil isolado. Em animais expostos a mistura dos agrotóxicos, foi observado que apenas o fipronil bioconcentrou e o fator de bioconcentração calculado foi $10,8 \text{ kg}^{-1} \text{ L}$. Nos peixes expostos ao 2,4-D isolado ocorreu aumento das atividades enzimáticas da CAT e GST e o aumento de LPO indicou estresse oxidativo. Nos peixes expostos ao fipronil isolado houve aumento da atividade da GST. Não houve alteração na atividade enzimática da CAT e GST nos animais expostos a mistura dos agrotóxicos. Nas brânquias, ocorreram alterações histopatológicas mais acentuadas em peixes expostos ao fipronil e a mistura dos agrotóxicos, sendo as mais frequentes hipertrofia, hiperplasia, descolamento epitelial e congestão vascular. As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou um aumento na densidade de células-cloreto (CC) e na morfologia das células pavimentosas e CCs nos peixes do grupo exposto ao fipronil isolado. Os resultados mostraram que a exposição aguda ao 2,4-D e fipronil, isolados causam alterações bioquímicas relacionadas as enzimas antioxidantes e aumento no IAH nas brânquias; a exposição ao fipronil também alterou a densidade de CC nas brânquias. A mistura dos dois agrotóxicos apresentou efeitos antagônicos.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar, Poluição, Peixes, Brânquias, Histopatologias.

ABSTRACT

The herbicide 2,4-D and the insecticide fipronil are pesticides frequently detected in aquatic ecosystems, thus threatening wildlife and health security. The aim of the present study was to investigate the toxicity of 2,4-D ($447 \mu\text{g ia L}^{-1}$) and fipronil ($63.49 \mu\text{g ia L}^{-1}$), isolated and mixed in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* in a time of 96 h exposure under laboratory conditions. After exposure, bioconcentration in the organism, the activities of catalase (CAT), glutathione s-transferase (GST) and the level of lipid peroxidation (LPO), and changes in the surface of the branchial epithelium were determined. The bioconcentration factor was calculated at $0.17 \text{ kg}^{-1} \text{ L}$ for 2.4 D isolated and $12.4 \text{ kg}^{-1} \text{ L}$ for fipronil alone. In animals exposed to the mixture of pesticides, only fipronil bioconcentrated and the bioconcentration factor was $10.8 \text{ kg}^{-1} \text{ L}$. In fish exposed to 2,4-D alone, there was an increase in the enzymatic activities of CAT and GST and LPO indicating oxidative stress. In fish exposed to fipronil alone, only the GST activity increased. No change occurred in the activity of CAT and GST in animals exposed to the mixture of pesticides. In the gills, the histopathological changes occurred more intensity in fish exposed to fipronil and the mixture of pesticides. The most frequent being hypertrophy, hyperplasia, epithelial detachment, and vascular congestion. Scanning electron microscopy (SEM) analyzes showed an increase in the density of cells-chloride (CC) and in the morphology of the pavement cells and CCs in fish in the group exposed to fipronil. The results showed that acute exposure to 2,4-D and fipronil induce biochemical changes in the activity of antioxidant enzymes as well as in the HAI. The exposure to fipronil increased CC density and the morphology of CC and pavement cells in the gills. The mixture of the two pesticides had antagonistic effects.

Keywords: Sugarcane, Pollution, Histopathology, Synergism, Antagonism.

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** Principais histopatologias branquiais esquematizadas por Mallat (1985) e modificada por Machado (1999). A: lamela normal apresentando, lâmina basal (lb), célula mucosa (mu), célula-cloreto (cc), célula pilar (pi), célula epitelial da lamela (ce), seio venoso da lamela (svl), canal sanguíneo marginal (csm). B - F: lamelas apresentando distintas alterações descritas na figura.....24
- Fig. 2** Alevino de *Prochilodus lineatus* (Foto: Natália Portruneli).....25
- Fig. 3** Mapa da distribuição de *Prochilodus lineatus* e outras espécies do gênero *Prochilodus* por toda a Bacia do Prata (ANA, 2010).....26
- Fig. 4** Relação dose/resposta de cloreto de potássio (KCl) a uma população de *P. lineatus* durante 48 horas de exposição.....29
- Fig. 5** Brânquias de *P. lineatus* expostos, em mesocosmo e laboratório, ao 2,4-D (D), fipronil (F) e 2,4-D + fipronil (D + F) por 96 horas. A: Atividade da enzima catalase (CAT). B: Atividade da enzima glutationa s-transferase (GST). C: Concentração de malondialdeído (MDA). * Indica diferença significativa de $p \leq 0,05$ em relação ao controle. As barras representam a média e as linhas o erro padrão.....42
- Fig. 6** Fotomicrografia eletrônica de varredura mostrando estruturas brânquias de *P. lineatus* dos grupos C. A: filamentos (F), lamelas (L), região do septo branquial (*). B: região entre as lamelas onde ocorre o fluxo de água e trocas gasosas (x). C: células pavimentosas (CPV) e células-cloreto (setas pretas). D: definição das microdobras das células pavimentosas. E: tipos de CC: CC1 (seta branca) apresentam membrana apical côncava e aspecto semelhante a esponja; CC2 (seta preta) apresentam contornos sem um padrão definido, contendo microvilosidades. Barra de escala em μm45
- Fig. 7** Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície epitelial da região central do filamento branquial de *P. lineatus* expostos por 96 horas. A: grupo C. B: grupo D. C: grupo F. D: grupo D + F. E: CPVs (seta branca) e CCs (seta preta) hipertrofiadas. As setas pretas indicam a definição das microdobras das CPV nos três tratamentos em comparação com o grupo controle. Barra de escala em μm46
- Fig. 8** Brânquias de *P. lineatus* do grupo controle (C) e expostos ao 2,4-D (D), fipronil (F) e 2,4-D + fipronil (D + F) durante 96 horas. A. Densidade de células-cloreto (CC), B. Área fracional de células-cloreto (AFCC). * Indica diferença significativa em relação aos grupos Controle ($p \leq 0,05$), utilizando ANOVA. As barras representam a média e as linhas o erro padrão.....47

Fig. 9 Análises histopatológicas de brânquias de *P. lineatus* expostos aos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, por 96 horas. A: estruturas branquiais normais do grupo C, lamela (L), filamento (F) e células-pilares (CP). B: hiperplasia (*) e descolamento epitelial (seta) do grupo D. C: hipertrofia (*) e proliferação de células-cloreto (setas) do grupo D. D: hiperplasia (*) do grupo D. E: fusão lamelar parcial (*) e necrose lamelar (seta) do grupo D. F: fusão lamelar parcial (*) e descolamento epitelial (setas) do grupo F. G: aneurismas (*) e fusão lamelar total (setas) do grupo F. H: tumor (*) do grupo F. I: fusão lamelar total (setas) do grupo F. J: aneurisma (*) e congestão vascular (setas) do grupo D + F. K: dilatação do sistema de células pilares (seta) do grupo D + F. L: tumor (*) do grupo D + F. Barra de escala de 20µm. Amostras coradas com azul de toluidina.....50

Fig. 10 Brânquias de *P. lineatus* do grupo controle (C) e expostos ao 2,4-D (D), fipronil (F) e 2,4-D + fipronil (D + F) durante 96 horas. A: Médias dos valores do índice de alterações histopatológicas (IAH). B: frequência de histopatologias por estágio I, II e III. * Indica diferença significativa em relação aos grupos Controle ($p \leq 0,05$). As barras representam a média e as linhas o erro padrão.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Recuperação (%) de cada método SPE testados.....	34
Tabela 2. Método 3º SPE em meio ácido.....	35
Tabela 3. Condições do UHPLC-MS/MS para a quantificação do 2,4-D e do fipronil em amostras de <i>P. lineatus</i>	36
Tabela 4. Concentração de 2,4-D e fipronil (ng. g ⁻¹ massa seca), em <i>P. lineatus</i> expostos em laboratório, por 96 horas, ao 2,4 D e Fipronil. Valores médios ± erro padrão. < LOD (abaixo do limite de detecção) e BCF (Fator de Bioacumulação). * Indica diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).....	40
Tabela 5. Resultados totais dos biomarcadores bioquímicos mensurados via atividade enzimática da CAT e GST, nível de LPO, e cálculos de taxa de sinergismo/antagonismo. * Indica diferença significativa (p ≤ 0,05).....	43
Tabela 6. Frequência (%) de alterações histopatológicas em epitélio branquial de <i>P. lineatus</i> expostos aos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, por 96 horas de exposição.....	49
Tabela 7. Resultados totais dos biomarcadores morfológicos mensurados via MEV, IAH e cálculos de taxa de sinergismo/antagonismo. * Indica diferença significativa (p ≤ 0,05).....	52

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACN = acetonitrila

AFCC = área fracional de células-cloreto

AMPK = proteína quinase ativada por AMP

BCF = fator de bioacumulação

BSA = albumina bovina

CAT = catalase

CC = célula-cloreto

CDNB = 1-cloro-2-4-dinitrobenzeno

CPV = células pavimentosas

DA = defesa antioxidante

DCM = diclorometano

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EO = efeito observado

EP = efeito previsto

ESI = ionização por electrospray

GABA = ácido γ -aminobutírico

GPx = glutationa peroxidase

Grupo C = grupo controle

Grupo D = grupo exposto ao 2,4-D

Grupo D + F = grupo exposto ao 2,4-D + fipronil

Grupo F = grupo exposto ao fipronil

GSH = dissulfeto de glutationa

GST = glutationa s-transferase

HMDS = 1,1,1,3,3,3-hexadometildisilazano

H₂O = água

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

IAH = índice de alterações histopatológicas

KCl = cloreto de potássio

LOD = limite de detecção

LOQ = limite de quantificação

LPO = peroxidação lipídica

MDA = malondialdeído

MeOH = metanol

MEV = microscopia eletrônica de varredura

NaCl = cloreto de sódio

OH = hidroxil

O₂ = oxigênio

PMSF = fluoreto de fenilmetilsulfonil

PVDF = fluoreto de polivinilideno

SOD = superóxido dismutase

SPE = extração de fase sólida

UHPLC = cromatografia líquida de ultra-alta eficiência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Recursos hídricos e poluição.....	15
1.2. Efeitos dos agrotóxicos da cana-de-açúcar nos ecossistemas aquáticos	15
1.3. Peixes como indicadores da qualidade da água via biomarcadores brânquias.	21
2. HIPÓTESES.....	26
3. OBJETIVO	27
3.1. Objetivo geral.....	27
3.2. Objetivos específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Animais	27
4.2. Delineamento experimental	28
4.3. Análises químicas e bioconcentração.....	30
4.3.1. Quantificação do 2,4-D e fipronil em peixe em sistema cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC).....	30
4.3.2. Extração em fase sólida (SPE)	31
4.3.3. Análises em UHPLC.	35
4.3.4. Fator de bioconcentração	36
4.4. Análises Bioquímicas.....	36
4.5. Análises Morfológicas.....	37
4.5.1. Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
4.5.2. Análises histopatológicas.....	38
4.6. Efeito sinérgico e antagônico do 2,4-D e fipronil em mistura.....	39
4.7. Análises estatísticas	39

5. RESULTADOS.....	40
5.1. Bioconcentração	40
5.2. Análises bioquímicas	41
5.3. Morfologia branquial	43
5.3.1. Superfície epitelial das brânquias	43
5.3.2. Histopatologias	48
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Recursos hídricos e poluição

A ecotoxicologia aquática, fornece recursos humanos capazes de proporcionar diagnósticos e prognósticos via o estudo da qualidade dos ecossistemas aquáticos, visando a sustentabilidade e proteção dos recursos hídricos, garantindo a preservação da biodiversidade e proporcionando qualidade de vida para a sociedade (CARPENTER, 1983). Os ecossistemas aquáticos continentais se ramificam por todo o continente e são drenados para um ponto de captação do escoamento que alimenta um sistema aquático. As bacias hidrográficas são áreas de drenagem, fato que torna os ecossistemas aquáticos vulneráveis a qualquer tipo de contaminação proveniente do uso e ocupação do solo do continente (CARSON, 1962).

O Brasil comporta aproximadamente 40.000 km³ de água, o que é proporcional ao escoamento mundial anual, sendo que o maior fornecimento de água é designado para a agricultura para fins de irrigação. Os sistemas de irrigação retiram grandes volumes de água, em bom estado, dos ecossistemas aquáticos naturais e a escassez de água quando ocorre, está associada a poluição, geralmente causada por produtos agrícolas utilizados nas plantações irrigadas (ANA, 2020).

1.2. Efeitos dos agrotóxicos da cana-de-açúcar nos ecossistemas aquáticos

O clima tropical brasileiro torna a agricultura um habitat favorável para organismos considerados pragas em plantações, resultando no aumento da demanda por agrotóxicos e, conseqüentemente, na liberação de novas formulações químicas para o controle de pragas (LEWIS et al., 2016). No âmbito econômico, a liberação de novas formulações de agrotóxicos favorece diversos mercados, entretanto, no âmbito ecológico, intensifica e diversifica a presença desses contaminantes em ambientes não alvos. No Brasil, o registro de agrotóxicos é antecedido da autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e, o MAPA é o responsável pelo fornecimento dos registros

definitivos, conforme o Decreto nº 4.074/2002, com validade de registro por prazo indeterminado (ANVISA, 2020).

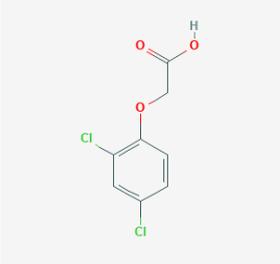
Segundo o Instituto de Economia Agrícola (IEA), em um contexto mundial, o Brasil é classificado como o maior produtor de cana-de-açúcar e açúcar e, segundo maior produtor de etanol, estando dentre os países que mais exportam tais produtos (ANGELO et al., 2020). O sudeste brasileiro é a região que concentra as maiores plantações de cana-de-açúcar, ocupando 64% das áreas agrícolas nacionais (IBGE, 2018). No âmbito nacional, o estado de São Paulo concentra 42,29% das plantações de cana-de-açúcar nacionais (MAPA), produzindo o equivalente a 16,4 bilhões de litros de etanol e 18,8 milhões toneladas de açúcar somente entre os anos de 2019 a 2020 (CONAB). A cana-de-açúcar fornece matéria prima para a produção do açúcar, bicombustível e bioenergia (RODRIGUES, 2010) entretanto, utiliza 112 ingredientes ativos e 603 formulações de agrotóxicos registradas, sendo a segunda cultura que mais se utiliza agrotóxicos no país, seguido da soja (AGROFIT, 2020). A contaminação dos ecossistemas aquáticos pelos agrotóxicos usados na cana-de-açúcar é uma consequência das aplicações frequentes que pode ameaçar a vida de diversas espécies, incluindo os peixes, assim como a segurança alimentar de populações humanas consumidoras de peixes (CASTILLO et al., 1997).

A contaminação dos ecossistemas aquáticos por agrotóxicos ocorre principalmente durante o período chuvoso devido ao processo de lixiviação (CARSON, 1962). O manejo químico em plantações de cana-de-açúcar é mais eficiente durante o período chuvoso, o que potencializa o processo de contaminação dos ecossistemas aquáticos próximos a essas plantações (AZANIA et al., 2010). Entretanto, nos períodos de seca, as pulverizações também ocorrem e os contaminantes permanecem no solo até o período chuvoso (MILETTE, 1991). A cana-de-açúcar por necessitar de grandes volumes de água para a irrigação, geralmente são plantadas próximas a água, podendo substituir parcialmente ou totalmente a mata ripária (FERREIRA et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2015), no qual facilita a formação de lagoas efêmeras e áreas alagadas nas regiões de plantações durante períodos chuvosos (FREITAS et al., 2019).

O relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo, realizado anualmente pela CETESB (2018), avalia a presença de diversos princípios ativos dos agrotóxicos mais comercializados e utilizados em águas de sistemas hídricos pertencentes às bacias do estado de São Paulo afetadas pelo uso agrícola do solo. As avaliações demonstraram a presença de agroquímicos nas águas, ocorrendo maiores

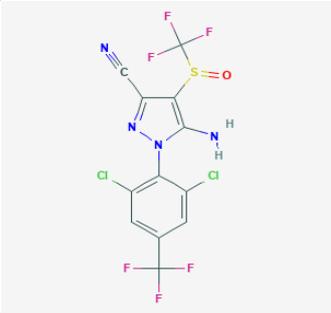
concentrações e variedade de moléculas em águas próximas a plantações de cana-de-açúcar. Dentre essas moléculas, o herbicida 2,4-D, seletivo para o controle de folhas largas, e inseticida fipronil, um cupinicida, são amplamente utilizados na cana-de-açúcar, estavam dentre os mais encontrados. O 2,4-D já foi detectado em águas (143,1 a 366,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$) apresentando valores acima de critérios nacionais e internacionais para proteção da vida aquática (CETESB, 2017) e o fipronil já foi detectado em águas (2,4 a 465 $\mu\text{g.L}^{-1}$) em concentrações que excedem o valor de ecotoxicidade crônica para peixes de até 2,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil, estabelecido pela *United States Environmental Protection Agency* (USEPA, 2018).

O 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Quadro 1) é um herbicida que pertence à família dos ácidos fenoxi-carboxílicos e interfere nos processos de crescimento de plantas de folhas largas via ação semelhante as auxinas. Os herbicidas a base de 2,4-D são os mais utilizados no mundo, são aplicados principalmente em cultura de cereais, trigo, milho, aveia, centeio e cana-de-açúcar e, tem sido aplicado diretamente na água no controle de plantas aquáticas (WALTERS, 2011). A decomposição do 2,4-D ocorre por fotólise e por ação microbiana, em condições anaeróbicas a meia-vida é de aproximadamente 312 dias; em condições aeróbicas é de aproximadamente 15 dias (WALTERS, 2011). Em águas profundas ou com grande quantidade de matéria orgânica, a fotodegradação é mais lenta, portanto, pode permanecer por mais tempo no ambiente (GHASSEMI et al., 1981).

2,4-D		
Estrutura:		<i>PubChem, 2019.</i>
Segurança Química:	 Corrosive Irritant	<i>PubChem, 2019.</i>
Grupo Químico:	Ácidos Fenoxiacéticos	<i>PubChem, 2019.</i>
Classe:	Herbicida	<i>PubChem, 2019.</i>
Nome Químico (IUPAC):	Ácido 2- (2,4-diclorofenoxi) acético	<i>PubChem, 2019.</i>
Fórmula Molecular:	$\text{Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{COOH}$	<i>PubChem, 2019.</i>
Número de Registro CAS:	94-75-7	<i>Chemical Abstracts Service.</i>
Massa Molar:	219.969399 g/mol	<i>PubChem, 2019.</i>
Área de Superfície Polar:	46.5 Å ²	<i>PubChem, 2019.</i>
Ponto de Ebulição:	Se decompõe durante o aquecimento à pressão normal. Quando aquecido até a decomposição, libera fumaça tóxica de cloretos.	<i>National Toxicology Program, 1992.</i>
Ponto de Fusão:	138 °C	<i>O'Neil, 2013.</i>
Solubilidade em água:	677 ppm à 25 °C	<i>Yalkowsky, 2010.</i>
Solubilidade em solventes orgânicos:	67,3 acetona (g/400 mL) à 25 °C; 0,16 tetracloreto de carbono; 0,08 óleo diesel e querosene, 10,3 etanol (50%), 100 álcool etílico (95%), 27 éter etílico, 25 metil isobutil cetona, 0,52 orto-diclorobenzeno, 0,058 tolueno (g/100 mL) à 25 °C; 0,94 benzeno, 0,63 dissulfeto de carbono (g/100 mL) à 28-29 °C; 78,5 dioxano, 24,8 isopropanol (g/100 mL) à 31 °C.	<i>Ahrens, 1994.</i>
Densidade:	1.42 g/cm ³ à 25 °C	<i>Verschueren, 2001.</i>
Pressão de vapor:	1.86X10 ⁻² mPa à 25 °C	<i>MacBean C, 2010.</i>
Log Kow:	2.18	<i>Hansch, 1995.</i>
Nome Comercial usada no presente trabalho:	DMA® 806 BR	
Número de Registro MAPA:	3009	<i>Bula_DMA 806</i>
Classe Toxicológica:	Classificação I - Extremamente Tóxico	<i>BR_AGROFIT_2017.11.14.</i>
Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental:	Classificação III - Produto perigoso ao meio ambiente	

Quadro 1. Ficha química do químico 2,4-D.

O fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)-fenil]-4-(trifluorometilsulfinil)-pirazol-3-carbonitrila) (Quadro 2) é um inseticida neurotóxico cuja ação ocorre por competição com o ácido γ -aminobutírico (GABA) pelos locais de ligação dos receptores GABA-a, via bloqueio dos canais de cloro, e apesar de possuir baixa toxicidade para mamíferos, apresenta alta toxicidade para peixes (ZHANG et al, 2018). O fipronil pertence ao grupo químico dos fenilpirazóis que apresenta amplo uso veterinário, no controle de ectoparasitas (CID, 2012), e na agricultura, no tratamento de sementes, substituindo atualmente os pesticidas pertencentes a classe dos piretróides, organofosforados e carbamatos, aos quais alguns insetos adquiriram resistência (BAIRD et al., 2013). A degradação do fipronil ocorre por hidrólise, fotólise, oxidação e redução resultando em subprodutos ativos como o fipronil sulfona, fipronil dessulfinil e fipronil sulfeto; a meia-vida média é de aproximadamente 15 dias, porém pode variar de acordo com as características do ambiente, variando de 4,6 a 200 dias (HU et al., 2019).

FIPRONIL		
Estrutura:		<i>PubChem, 2019</i>
Segurança Química:	 <small>Acute Toxic Health Hazard Environmental Hazard</small>	<i>PubChem, 2019</i>
Grupo Químico:	Fenilpirazóis	<i>PubChem, 2019</i>
Classe:	Inseticida	<i>PubChem, 2019</i>
Nome Químico (IUPAC):	5-amino-1- [2,6-dicloro-4- (trifluorometil) fenil] -4- (trifluorometilsulfinil) pirazol-3-carbonitrila.	<i>PubChem, 2019</i>
Fórmula Molecular:	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	<i>PubChem, 2019</i>
Número de Registro CAS (CASRN):	120068-37-3	<i>Chemical Abstracts Service.</i>
Massa Molar:	435.938706 g/mol	<i>PubChem, 2019</i>
Área de Superfície Polar:	104 Å ²	<i>PubChem, 2019</i>
Ponto de Ebulição:	Indeterminado	<i>PubChem, 2019</i>
Ponto de Fusão:	200-201 °C	<i>MacBean C, 2010.</i>
Solubilidade em água:	1.9 ppm (pH 5), 2.4 ppm (pH 9), 1.9 ppm pH neutro tudo à 20 °C	<i>MacBean C, 2010.</i>
Solubilidade em solventes orgânicos:	545,9 acetona, 22,3 diclorometano, 0,028 hexano, 3 tolueno (g/L) à 20 °C.	<i>MacBean C, 2010.</i>
Densidade:	1.477-1.626 g/cm ³ à 20 °C	<i>MacBean C, 2010.</i>
Pressão de vapor:	2.78X10 ⁻⁹ mm Hg à 25 °C	<i>MacBean C, 2010.</i>
Log Kow:	4.0	<i>MacBean C, 2010.</i>
Nome Comercial usado no presente trabalho:	Regent® 800 WG	
Número de Registro MAPA:	5894	<i>Bula_REGENT 800 WG_BASF_rev 00_24.08.2017.</i>
Classe Toxicológica:	Classificação I - Extremamente Tóxico	
Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental:	Classificação II - Produto muito perigoso ao meio ambiente	

Quadro 2. Ficha química do químico fipronil.

Apesar dos dois agrotóxicos apresentarem tempo meia-vida relativamente curta, a frequência com que estes são utilizados permitem a permanência constante dessas moléculas nos ecossistemas naturais. Estudos comprovam que o 2,4-D e o fipronil podem afetar a biota (PRIMEL et al., 2005; TREVISAN E MOSCHINI, 2018). Neskovid et al. (1994) observou que *Cyprinus carpio* expostas ao 2,4-D por 24 à 96 horas, apresentaram disfunções enzimáticas como aumento na atividade da glutamato oxaloacetato transaminase e diminuição da fosfatase alcalina, além de causar alterações morfológicas nas brânquias, fígado e rins, enquanto Clasen et al. (2012) observou para a mesma espécie (*C. carpio*) expostas ao fipronil por 7, 30 e 90 dias, alterações nos parâmetros bioquímicos em fígado, músculo e cérebro, e a bioconcentração do 2,4-D já foi reportada em peixes (BARBIERI et al., 2019). A capacidade dos animais aquáticos em bioconcentrar o fipronil também foi relatada em caranguejos, camarões, peixes e mariscos (ZHANG et al., 2018). Segundo Aronzon (2010), as formas comerciais podem ser até dez vezes mais tóxicas que o ingrediente ativo por conter aditivos que aumentam a persistência e absorção do princípio ativo pela membrana celular (GHASSEMI et al., 1981).

1.3. Peixes como indicadores da qualidade da água via biomarcadores brânquias.

Os peixes compreendem o maior grupo dentre os vertebrados e, possuem inúmeras adaptações morfo-funcionais que garantiu o sucesso evolutivo na ocupação diversos tipos de ecossistemas aquáticos há milhares de anos em diferentes condições da água (LINNAEUS, 1758). Os peixes possuem ampla distribuição geográfica, grande diversidade ecológica, e podem ocupar diversas posições na cadeia alimentar (LIMA et al., 2018). Seguindo o mesmo contexto evolutivo, o sistema respiratório dos peixes, sofreu adaptações morfológicas específicas e eficientes na absorção de O₂ adequadas a cada tipo de ambiente que foram povoando (MALLATT, 1985).

As brânquias são órgãos vitais e multifuncionais e extremamente adaptados as adversidades do meio aquático, porém, possuem alta sensibilidade quando expostas a mudanças abruptas, geralmente relacionadas a atividades antropogênicas (MALLATT, 1985).

Em peixes, as brânquias são órgãos vitais responsáveis pelas trocas gasosas, osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e eliminação de compostos nitrogenados. Os peixes são afetados por agrotóxicos, principalmente devido a absorção branquial, no qual a brânquia se torna uma fácil via de entrada devido ao processo respiratório que permite o contato direto do órgão com a água, além da alta vascularização do tecido somado com tênues camadas entre a água e o sangue que facilitam a entrada de substâncias tóxicas (LI et al., 2018), como o 2,4-D e o fipronil, para corrente sanguínea. Essas substâncias, uma vez absorvidas, podem estimular mecanismos a fim de minimizar a absorção das toxinas, tais como alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas do tecido (MALLATT, 1985). A nível celular, a absorção dessas substâncias é capaz de desencadear reações de metabolização que podem produzir espécies reativas do oxigênio, nas quais precisam ser neutralizadas pelo sistema de DA para evitar a ocorrência de estresse oxidativo. Na ocorrência de contaminações agudas ou crônicas dos ecossistemas aquáticos, essas alterações fisiológicas, podem ser letais ou resultar em condições patológicas crônicas, o que caracteriza as brânquias como órgão alvo bem apropriado em investigações no âmbito da ecotoxicologia aquática e toxicologia ambiental.

Agrotóxicos como o 2,4-D e o fipronil, podem permanecer por pouco tempo no ambiente dependendo das condições em que este se encontra, o que geralmente não causam mortalidade nas populações de peixes, entretanto pode fazer com que a periculosidade desses agrotóxicos não seja evidenciada como na contaminação por compostos que resultam em mortalidade em massa. A camuflagem da periculosidade dos agrotóxicos deve ser considerada em avaliações da qualidade da água, pois exposições subletais podem afetar silenciosamente inúmeros processos fisiológicos dos peixes, assim como de todos os organismos que dependem do mesmo recurso hídrico para a subexistência (LINS et al., 2010).

Biomarcadores morfológicos e bioquímicos indicam o mecanismo de ação desses contaminantes quando estes agem de maneira subletal e são importantes na avaliação da higidez do órgão. Dentre os biomarcadores bioquímicos, estão os componentes pertencentes ao sistema de defesa antioxidante (DA), que podem possuir sistema enzimático, tais como: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), ou não enzimático, tais como, o dissulfeto de glutathione reduzida (GSH) e determinadas vitaminas (A, C e E). Os componentes do sistema de defesa antioxidante (DA) estão presentes no organismo

de todos os seres vivos com a finalidade neutralizar espécies reativas de oxigênio (ERO) quando presentes em excesso nos tecidos ou órgãos. As EROs são subprodutos da molécula de oxigênio (O_2) provenientes de sua redução, extremamente bioreativos a qualquer componente celular, podendo causar condições patológicas que vão desde alterações bioquímicas leves do sistema DA a ocorrência de lesões celulares graves como a peroxidação lipídica (LPO) (BARREIROS et al., 2006).

Os biomarcadores morfológicos, são utilizados na avaliação da integridade estrutural de um determinado órgão alvo a nível tecidual e celular. A observação de alterações da morfologia normal que indicam um contato do órgão com agentes estressores (PAULINO et al, 2012b). Em brânquias, as alterações morfológicas podem ser classificadas em distúrbios circulatórios, lesões regressivas ou irreversíveis no epitélio ou no tecido de suporte, inflamações e tumores (POLEKSIC E MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994), assim como avaliações da superfície celular e densidade de células-cloreto presente nas brânquias (MORON et al., 2003). O esquema abaixo (Fig. 1), elaborado por Mallat (1985) com modificações por Machado (1999), apresenta as principais histopatologias branquiais observadas:

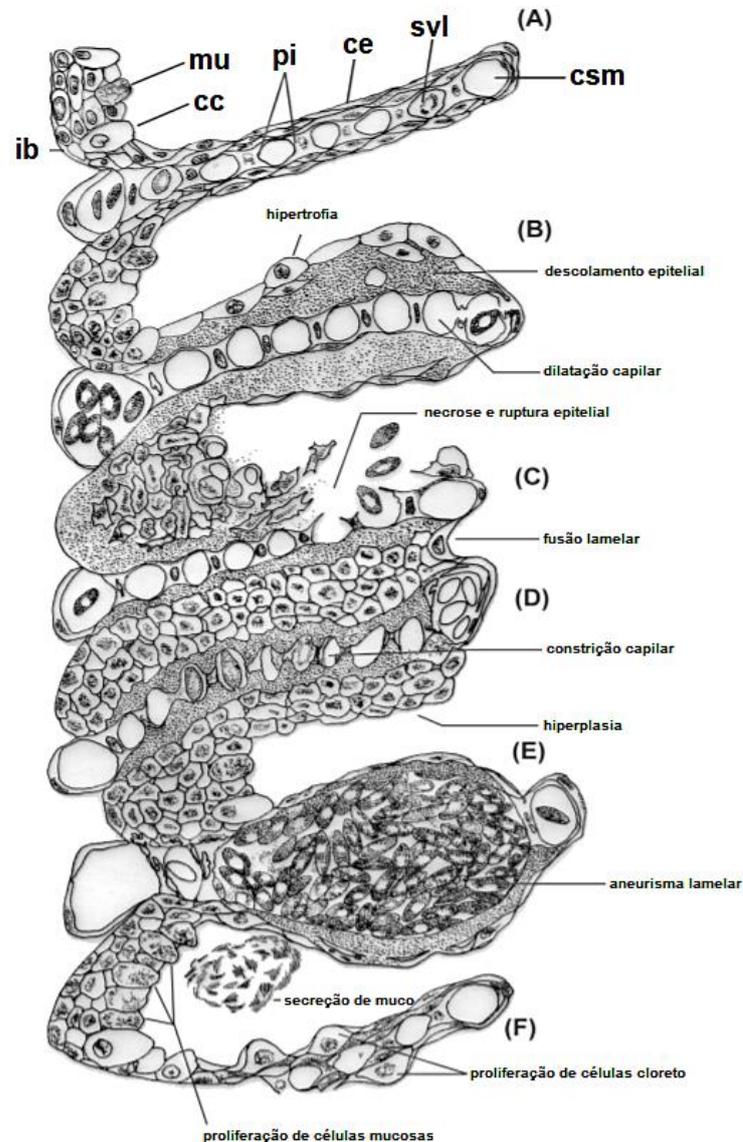


Fig. 1 Principais histopatologias branquiais esquematizadas por Mallat (1985) e modificada por Machado (1999). A: lamela normal apresentando, lâmina basal (lb), célula mucosa (mu), célula-cloreto (cc), célula pilar (pi), célula epitelial da lamela (ce), sistema de circulação na lamela (svl), canal sanguíneo marginal (csm). B - F: lamelas apresentando distintas alterações descritas na figura.

Entretanto, a água não é a única via de contaminação dos peixes, pois diversos agrotóxicos apresentam em suas composições moléculas capazes de agregar ao sedimento de ecossistemas aquáticos (FURIHATA et al., 2019) podendo afetar principalmente peixes de hábitos detritívoros como a espécie nativa na região sudeste do Brasil *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836), conhecida popularmente como curimbatá ou curimba (Fig. 2). A espécie *P. lineatus* habita as bacias hidrográficas do

estado de São Paulo, o que expõem a espécie as contaminações geradas pelo elevado uso de agrotóxicos em culturas de cana-de-açúcar.



Fig. 2 Alevino de *Prochilodus lineatus* (Foto: Natália Portruneli).

Valenciennes (1837) descreveu a classificação taxonômica de *P. lineatus* da seguinte maneira:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Prochilodontidae

Gênero: *Prochilodus*

Espécie: *Prochilodus lineatus*

A espécie *P. lineatus* (Teleósteo, Prochilodontidae) é um excelente modelo experimental por apresentar alta importância econômica por toda a Bacia do Prata (3.100,00 Km²), no qual ocupa parte de países da América do Sul como: Brasil (1.415.000 Km²), Paraguai (410.000 Km²), Bolívia (205.000 Km²), Uruguai (215.000 Km²) e Argentina (85.000 Km²) (CIC Cuenca Del Plata, 2016), migrando durante o período reprodutivo, o que faz com que enfrente diferentes condições ambientais (Fig. 3) (SIMONATO et al., 2006).



Fig. 3 Mapa da distribuição de *Prochilodus lineatus* e outras espécies do gênero *Prochilodus* por toda a Bacia do Prata (ANA, 2010).

Em função da grande importância econômica da espécie, a absorção de moléculas como o 2,4-D e o fipronil por *P. lineatus* é preocupante, pois a ocorrência de bioconcentração poderia acarretar a contaminação da carne para consumo humano. Portanto, o Brasil apresenta inúmeras vantagens quanto a disponibilidade de água, clima e biodiversidade, o que reforça a ideia da importância de preservar os recursos hídricos nacionais, com a finalidade de evitar o esgotamento, de modo que a exploração seja sempre possível de maneira sustentável.

2. HIPÓTESES

- (1) Os agrotóxicos 2,4-D e fipronil isolados ou em mistura bioconcentram em peixes após exposição aguda.
- (2) Os agrotóxicos 2,4-D e fipronil isolados ou em mistura causam alterações no sistema antioxidante e histopatológicas nas brânquias de peixes.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar a bioacumulação no corpo de peixes expostos as formulações comerciais do 24-D e do fipronil, isolados e em mistura. Além disso, o estudo avaliou as alterações da atividade enzimática da CAT e GST e peroxidação lipídica (LPO) e a ocorrência de alterações na morfologia branquial e células de cloreto, após a 96 horas de exposição as formulações comerciais do 24-D e do fipronil, isolados e em mistura, nas concentrações recomendadas pelo fabricante para a aplicação contra pragas da cana-de-açúcar, em *P. lineatus* (Teleósteo, Prochilodontidae).

3.2. Objetivos específicos

- I. Adaptar metodologias analíticas para desenvolver um método capaz de detectar e quantificar o 2,4-D e o fipronil em tecido de peixes.
- II. Avaliar a bioconcentração do 2,4-D e fipronil em *P. lineatus* inteiros.
- III. Avaliar biomarcadores bioquímicos através da avaliação da atividade enzimática de duas importantes enzimas do sistema antioxidante, CAT e GST, bem como a concentração do biomarcador de estresse oxidativo, LPO, nas branquias.
- IV. Avaliar, utilizando microscopia eletrônica avaliar alterações quanto a densidade e área fracional das CCs, assim como danos na superfície do tecido branquial após exposição aos agrotóxicos, isolados e em mistura.
- V. Avaliar danos no tecido branquial via biomarcadores morfológicos, através de análises histológicas quanto a presença de histopatologias branquiais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR, nº 9962180219). Os alevinos

de *P. lineatus* (peso corpóreo = $4,56 \pm 2,19$ g; comprimento = $7,1 \pm 1,15$ cm) foram doados pela Piscicultura Projeto Peixes registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, nº 000332;SP), Sales de Oliveira, SP, Brasil. A aclimação foi feita em caixas d'água (500 L) providos com água livre de cloro, aeração constante, temperatura a 24 ± 1 °C e fotoperíodo de 12D:12N de acordo com as recomendações da ABNT (2016). As características físicas e químicas da água durante aclimação foram: oxigênio dissolvido ($7,9 \pm 0,15$ mg. L⁻¹), pH ($6,0 \pm 0,4$) e condutividade ($27,1 \pm 5,5$ µS. cm⁻¹), as quais foram medidas diariamente. Os peixes foram alimentados com ração comercial para peixes (40% proteína, FRI-ACQUA 40, Fri-Ribe Rações, SP, Brasil).

4.2. Delineamento experimental

O controle de sensibilidade dos animais foi feito com a finalidade de avaliar a higidez dos modelos biológicos, utilizando o teste de toxicidade aguda (48 h) com cloreto de potássio (KCl) como substância de referência (ABNT, 2016) nas concentrações de 0, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 e 1200 mg L⁻¹. Os testes foram realizados em triplicata, em aquários (40 L, n = 5 em cada aquário) e a densidade de espécimes foi calculado em 1 g/L. As características físico-químicas da água foram: oxigênio dissolvido $7,78 \pm 0,05$ mg. L⁻¹, pH $7,65 \pm 0,07$, condutividade $83,94 \pm 0,29$ µS. cm⁻¹, temperatura $23,71 \pm 0,95$ °C. A alimentação dos peixes foi suspensa durante o período experimental. A CL₅₀ (48 h) estimada para o teste de sensibilidade com KCl foi de $9,46.10^2 \pm 0,15$ mg. L⁻¹ (Fig. 4), cujo valor foi similar ao determinado para a mesma espécie por Carmo (2015), valor no qual se aproxima dos valores encontrados na literatura para as espécies padronizadas *Danio rerio* (CRUZ et al., 2016; HIGASHI, 2016) e *Pimephales promelas* (SIGMA-ALDRICH, 2011).

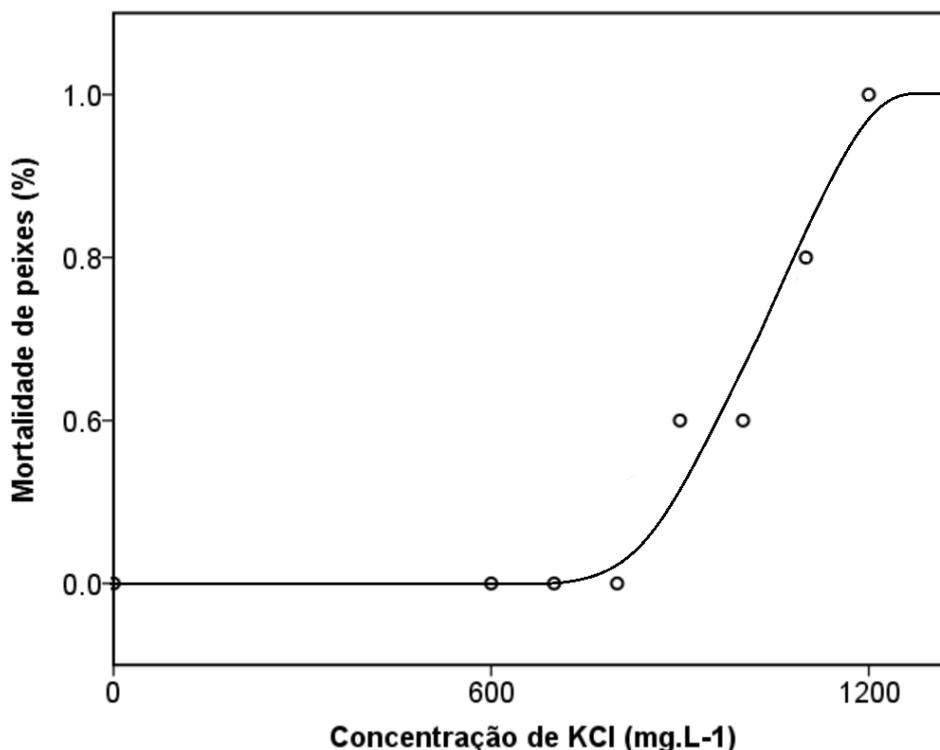


Fig. 4 Relação dose/resposta de cloreto de potássio (KCl) a uma população de *P. lineatus* durante 48 horas de exposição.

Posteriormente, os peixes foram separados aleatoriamente em quatro grupos: Controle (C), Fipronil (F), 2,4-D (D) e mistura 2,4-D + Fipronil (D + F). Os experimentos foram efetuados, em laboratório, em triplicata, em aquários de vidro (40 L, n = 10 em cada aquário), com condições controladas e aeração constante. As características físico-químicas da água foram: oxigênio dissolvido $7,3 \pm 0,5$ mg. L⁻¹, pH $7,3 \pm 0,2$, condutividade $80,3 \pm 9,6$ μ S. cm⁻¹, temperatura $25,5 \pm 0,5$ °C.

Os peixes foram colocados nos aquários e, após 24 h, foi feita a contaminação da água, com exceção do grupo C. Os agrotóxicos foram utilizados na fórmula comercial: 2,4-D (DMA 806 BR, Dow AgroSciences Industrial Ltda.) e fipronil (Regente 800 WG, BASF S.A.). As concentrações de exposição isoladas e em mistura 2,4-D + fipronil foram aquelas indicadas pelas formulações comerciais para aplicações em culturas de cana-de-açúcar em condições de pré-emergências, considerando 3,5 L/ha de calda para o DMA 806 BR e 500 g/ha diluído em água para o Regente 800 WG. As concentrações de exposição utilizadas em cada grupo contaminado foi: 447 μ g i.a L⁻¹ de 2,4-D para o grupo D, 63,49 μ g

i.a L⁻¹ de fipronil para o grupo F e 447 µg i.a L⁻¹ de 2,4-D + 63,49 µg i.a L⁻¹ de fipronil para o grupo D + F. Os contaminantes foram aplicados direto na água (40 L). No grupo D + F, a aplicação do 2,4-D e do fipronil foi realizada simultaneamente e anteriormente preparadas em soluções estoque para a diluição dos compostos.

Após 96 h de exposição, os peixes foram mortos com concentração letal de solução de benzocaína (0,4 g L⁻¹). Peixes inteiros (n = 3 por aquário) de cada grupo foram liofilizados e utilizados para determinar a bioconcentração dos agrotóxicos utilizados neste estudo. As brânquias dos peixes foram removidas, lavadas em salina (0,9 % NaCl) e amostradas. Amostras de brânquias para análises bioquímicas (n = 4 por aquário) foram imediatamente colocadas no nitrogênio líquido (N₂) e mantidas no congelador -80 °C e, as amostras de brânquias para análises de microscopia eletrônica de varredura e para análises histológicas (n = 3 por aquário) foram fixadas em uma solução de glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4).

4.3. Análises químicas e bioconcentração

4.3.1. Quantificação do 2,4-D e fipronil em peixe em sistema cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC)

Os padrões de referência utilizados (≥ 98 % de pureza) do 2,4-D (CAS 94-75-7) e fipronil (CAS 120068-37-3) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. As soluções estoques, para o 2,4-D e fipronil, foram feitas com os padrões de referência preparadas em metanol (MeOH) nas concentrações de 10, 100 e 1000 mg. L⁻¹ e mantidas à -20 °C. As soluções trabalho para determinação da curva de calibração foram feitas utilizando a mistura das soluções estoques de 2,4-D e fipronil diluídas em H₂O:acetonitrila (ACN) (70:30). A curva de calibração utilizada para o 2,4-D foi de valores entre 0,2 a 5000 µg .L⁻¹ (LOD 2,9 e LOQ 9,5 µg .L⁻¹) e para o fipronil foi entre 2 a 50 µg .L⁻¹ (LOD 0,02 e LOQ 0,07 µg .L⁻¹) para concentrações mais baixas e de valores entre 100 a 1000 µg .L⁻¹ (LOD 0,07 e LOQ 0,24 µg .L⁻¹) para concentrações mais altas. A filtragem das amostras foi realizada com filtro de PVDF (0,22 µm). A evaporação foi realizada com compressor de ar modelo LC-828 Lusqtoff com corrente de nitrogênio.

4.3.2. Extração em fase sólida (SPE)

Anteriormente aos testes metodológicos, foi adicionado 1 µg de 2,4-D e 0,5 µg de fipronil em 0,5 g de amostras descontaminadas de *P. lineatus* inteiro liofilizadas e maceradas, com exceção dos grupos C. As amostras foram incubadas no escuro por uma hora para a absorção dos analitos pela amostra biológica.

Para a obtenção de uma metodologia capaz de determinar o 2,4-D e fipronil em tecido de *P. lineatus*, foi necessário testar sete metodologias de SPE baseadas nas descrições efetuadas por Zhang et al. (2018), Álvarez-Muñoz et al. (2014, 2015), Serra-Compte et al. (2019) e Kock-schulmeyer et al. (2013), com adaptações, no qual o método que apresentou melhores resultados de recuperação foi utilizado.

Método 1^o: extração ultrassônica com solvente ACN seguido de SPE com cartuchos (200 mg, 6cc, OASIS PRIME HLB, Waters, MA, U.S.A.) seguindo a metodologia de Zhang et al. (2018), com modificações. ACN (4 mL) foi adicionado as amostras secas (0,5 g) que foram agitadas em vortex (10 min, x3), colocadas em banho ultrassônico (5 min, x3) e centrifugadas (1372 g, 20 min), todo o processo foi realizado duas vezes e os sobrenadantes coletados. Os sobrenadantes foram diluídos até volume final de 10 mL com ACN. As amostras foram passadas diretamente pelos cartuchos, coletadas, evaporadas até 3 mL e filtradas. Parte do filtrado (1 mL) foi transferido para um vial de vidro âmbar antes da injeção no sistema UHPLC-MS/MS. O pH não foi ajustado para este método.

Método 2^o: extração ultrassônica com solvente H₂O:ACN (3:1) seguido de SPE (pH 7) utilizando cartuchos (200 mg, 6cc, OASIS HLB, Waters, MA, U.S.A.) seguindo a metodologia de Álvarez-Muñoz et al. (2014, 2015) e Serra-Compte et al. (2019) com modificações. Foi adicionado 5 mL de H₂O:ACN (1:3) as amostras secas (0,5 g), agitadas em vortex (10 min, x3), colocadas em banho ultrassônico (5 min, x3) e centrifugadas (1372 g, 20 min), todo o processo foi realizado duas vezes e os sobrenadantes coletados. Os sobrenadantes foram adicionados em uma solução de 240 µL de EDTA (0,01 M, pH 7) mais 200 mL de H₂O Milli-Q (pH 7) (amostra). A SPE foi realizada condicionando os cartuchos com 5 mL de MeOH e 5 mL de H₂O HPLC (pH 7), seguido da passagem das amostras. Os cartuchos foram lavados com 5 mL de H₂O HPLC (pH 7) e secos totalmente. As amostras foram eluídas em

6 mL de MeOH, evaporadas totalmente e reconstituídas em 1 mL de MeOH:H₂O (1:1) em vial de vidro âmbar para a injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

Método 3º: extração ultrassônica com solvente H₂O:ACN (3:1) seguido de SPE (pH 2,5) com cartuchos (200 mg, 6cc, OASIS HLB, Waters, MA, U.S.A.) seguindo a metodologia de Álvarez-Muñoz et al. (2014, 2015) e Serra-compte et al. (2019), com modificações. Foi adicionado 5 mL de H₂O:ACN (1:3) as amostras secas (0,5 g), agitadas em vortex (10 min, x3), colocadas em banho ultrassônico (5 min, x3) e centrifugadas (1372 g, 20 min), todo o processo foi realizado duas vezes e os sobrenadantes coletados. Os sobrenadantes foram adicionados em uma solução de 240 µL de EDTA (0,01 M, pH 2,5) mais 200 mL de H₂O Milli-Q (pH 2,5) (amostra). A SPE foi realizada condicionando os cartuchos com 5 mL de MeOH e 5 mL de H₂O HPLC (pH 2,5), seguido da passagem das amostras. Os cartuchos foram lavados com 5 mL de H₂O HPLC (pH 2,5) e secos totalmente. As amostras foram eluídas em 6 mL de MeOH, evaporadas totalmente e reconstituídas em 1 mL de MeOH:H₂O (1:1) em vial de vidro âmbar antes para injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

Método 4º: extração ultrassônica com solvente MeOH: diclorometano (DCM) (1:1) seguido de SPE (pH 7) com cartuchos (200 mg, 6cc, OASIS HLB, Waters, MA, U.S.A.) seguindo a metodologia de Kock-schulmeyer et al. (2013), com modificações. Foi adicionado 5 mL de MeOH: DCM (1:1) nas amostras secas (0,5 g), agitadas em vortex (10 min, x3), colocadas em banho ultrassônico (5 min, x3) e centrifugadas (1372 g, 20 min), todo o processo foi realizado duas vezes e os sobrenadantes coletados. Os sobrenadantes foram adicionados em uma solução de 240 µL de EDTA (0,01 M, pH 7) mais 200 mL de H₂O Milli-Q (pH 7) (amostra). A SPE foi realizada condicionando os cartuchos com 5 mL de MeOH:DCM (1:1) e 5 mL de H₂O HPLC (pH 7), seguido da passagem das amostras nos cartuchos. Os cartuchos foram lavados com 5 mL de H₂O HPLC (pH 7) e secos totalmente. Foi realizada a eluição em 6 mL de MeOH:DCM (1:1) e coletada as amostras. As amostras foram evaporadas totalmente e reconstituídas em 1 mL de MeOH:H₂O (1:1) em vial de vidro âmbar para a injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

Método 5º: extração ultrassônica com solvente MeOH: DCM (1:1) seguido de SPE (pH 2,5) com cartuchos (200 mg, 6cc, OASIS HLB, Waters, MA, U.S.A.) seguindo a metodologia de Kock-schulmeyer et al. (2013), com modificações. Foi adicionado 5 mL MeOH: DCM (1:1) nas amostras secas (0,5 g), agitadas em vortex (10 min, x3), colocadas em banho ultrassônico (5 min, x3) e centrifugadas (1372 g, 20 min), todo

o processo foi realizado duas vezes e os sobrenadantes coletados. Os sobrenadantes foram adicionados em uma solução de 240 μ L de EDTA (0,01 M, pH 2,5) mais 200 mL de H₂O Milli-Q (pH 2,5) (amostra). A SPE foi realizada condicionando os cartuchos com 5 mL de MeOH:DCM (1:1) e 5 mL de H₂O HPLC (pH 2,5), seguido da passagem das amostras nos cartuchos. Os cartuchos foram lavados com 5 mL de H₂O HPLC (pH 2,5) e secos totalmente. Foi realizada a eluição em 6 mL de MeOH:DCM (1:1) e coletada as amostras. As amostras foram evaporadas totalmente e reconstituídas em 1 mL de MeOH:H₂O (1:1) em vial de vidro âmbar para a injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

Método 6º: extração ultrassônica com solvente H₂O:ACN (3:1) + MeOH:DCM (1:1) seguido de SPE (pH 7) com cartuchos (200 mg, 6cc, OASIS HLB, Waters, MA, U.S.A.) seguindo a metodologia de Serra-compte et al. (2019) e Kock-schulmeyer et al. (2013), com modificações. Foi adicionado 5 mL de H₂O:ACN (1:3) nas amostras secas (0,5 g), agitadas em vortex (10 min, x3), colocadas em banho ultrassônico (5 min, x3) e centrifugadas (1372 g, 20 min). Os sobrenadantes foram coletados e foi adicionado 5 mL de MeOH:DCM (1:1) no precipitado, que passou pelas mesmas etapas anteriores do vortex, banho ultrassônico e centrifuga. Os sobrenadantes foram adicionados em uma solução de 240 μ L de EDTA (0,01 M, pH 7) mais 200 mL de H₂O Milli-Q (pH 7) (amostra). A SPE foi realizada condicionando os cartuchos com 5 mL de MeOH e 5 mL de H₂O HPLC (pH 7), seguido da passagem das amostras nos cartuchos. Os cartuchos foram lavados com 5 mL de H₂O HPLC (pH 7) e secos totalmente. As amostras foram eluídas em 6 mL de MeOH, evaporadas totalmente e reconstituídas em 1 mL de MeOH em vial de vidro âmbar para a injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

Método 7º: extração ultrassônica com solvente H₂O:ACN (3:1) + Meoh:DCM (1:1) seguido de SPE (pH 2,5) com cartuchos (200 mg, 6cc, OASIS HLB, Waters, MA, U.S.A.) seguindo a metodologia de Serra-compte et al. (2019) e Kock-schulmeyer et al. (2013), com modificações. Foi adicionado 5 mL de H₂O:ACN (1:3) nas amostras secas (0,5 g), agitadas em vortex (10 min, x3), colocadas em banho ultrassônico (5 min, x3) e centrifugadas (1372 g, 20 min). Os sobrenadantes foram coletados e foi adicionado 5 mL de MeOH:DCM (1:1) no precipitado, que passou pelas mesmas etapas anteriores do vortex, banho ultrassônico e centrifuga. Os sobrenadantes foram adicionados em uma solução de 240 μ L de EDTA (0,01 M, pH 2,5) mais 200 mL de H₂O Milli-Q (pH 2,5) (amostra). A SPE foi realizada

condicionando os cartuchos com 5 mL de MeOH e 5 mL de H₂O HPLC (pH 2,5), seguido da passagem das amostras nos cartuchos. Os cartuchos foram lavados com 5 mL de H₂O HPLC (pH 2,5) e secos totalmente. As amostras foram eluídas em 6 mL de MeOH, evaporadas totalmente e reconstituídas em 1 mL de MeOH em vial de vidro âmbar para a injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

Foi estimado uma acumulação de $\geq 50\%$ da concentração agregada inicialmente de 2,4-D e fipronil nas amostras de *P. lineatus* liofilizadas (Zhang et al., 2018). Após os testes prévios para obtenção da melhor extração de ambos os analitos (Tabela 1), a SPE foi realizada utilizando o método 3^o.

Analito	Método	Concentração injetada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração esperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Tempo de retenção (min)	Concentração acumulada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
2,4-D	1 ^o				nq	0
	2 ^o				0,34	34
	3 ^o				0,90	90
	4 ^o	1	0,25	2,88	0,06	6
	5 ^o				0,72	72
	6 ^o				0,02	2
	7 ^o				1,44	144
Fipronil	1 ^o				0,21	42
	2 ^o				0,21	43
	3 ^o				0,24	49
	4 ^o	0,5	0,5	4	0,10	21
	5 ^o				0,17	34
	6 ^o				0,24	49
	7 ^o				0,20	40

Tabela 1. Recuperação (%) de cada método SPE testados.

As recuperações para o método 3^o, expressas em média \pm erro padrão, foram de 90% \pm 4,02 para o 2,4-D e de 49% \pm 0,22 para o fipronil. As amostras foram preparadas com *P. lineatus* inteiros liofilizados e macerados dos grupos C, D, F e D+F, pesadas (0,5 g), e submetidas a extração ultrassônica com solvente H₂O:ACN (3:1) seguido de SPE em meio acidificado (pH 2,5) e, analisado em UHPLC, seguindo as metodologias desenvolvidas por Álvarez-Muñoz et al. (2014, 2015) e Serra-Compte et al. (2019) com modificações (Tabela 2).

Método 3º SPE (pH 2,5)
0,5 g de <i>P. lineatus</i> liofilizado
+
5 ml ACN:H₂O (3:1)
Vortex, 10 min, x3
Banho ultrassônico, 5 min, x3
Centrifuga 1372 g, 20 min
↓
Separar o sobrenadante 1 e precipitado 1
Precipitado 1
+
5 ml ACN:H₂O (3:1)
Vortex, 10 min, x3
Banho ultrassônico, 5 min, x3
Centrifuga 1372 g, 20 min
↓
Separar o sobrenadante 2 e descartar precipitado 2
Sobrenadante 1 + sobrenadante 2
+
240 µl EDTA (0,01 M, pH 2,5)
+
200 ml H ₂ O Milli-Q, pH 2,5
Condicionar cartuchos: 5 mL de MeOH + 5 H ₂ O, pH 2,5
SPE: Oasis HLB (200 mg, 6 cc)
Lavar cartuchos: 5 ml H ₂ O HPLC, pH 2,5
Eluir: 6 ml MeOH
Evaporar totalmente
Reconstituir em 1 mL de MeOH
↓
Filtrar
UHPLC-MS/MS

Tabela 2. Método 3º SPE em meio ácido.

4.3.3. Análises em UHPLC.

A quantificação do 2,4-D e do fipronil em *P. lineatus*, foi feita em sistema UHPLC Acquity H-Class (Waters, Elstree, UK) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadruplo Xevo TQ-S micro (Waters, Manchester, UK) com uma fonte de ionização por electrospray (ESI). As colunas e pré-colunas utilizadas foram do tipo ZORBAX Eclipse Plus C18 600 bar 3x50 mm, 1.8 µm (Agilent

Technologies). A pressão de leitura foi de 226 ± 1 bar, a temperatura da coluna de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e volume de injeção de $10 \text{ }\mu\text{L}$. As condições de separação e solventes da fase móvel foram as mesmas utilizadas na metodologia de Álvarez-Muñoz et al. (2014). As condições dos analitos necessárias para a quantificação dos compostos estão expressas na tabela abaixo (Tabela 3). Os valores de LOD e LOQ em ng. g^{-1} de massa seca foram de 0,191 e 0,638 para o 2,4-D e de 0,022 e 0,073 para o fipronil, respectivamente. Para as amostras de brancos foram utilizados MeOH e ACN:H₂O (1:1). Os valores quantificados dos analitos foram calculados utilizando o software MassLynx™.

Analito	Massa (<i>m/z</i>)	Tempo de retenção (min)	Modo de Ionização	Voltagem (V)	Energia de Colisão (Ev)
2,4-D	218,9 > 124,9	$1,8 \pm 0,4$	ES-	44	24
Fipronil	434,8 > 329,9	$4,02 \pm 0,2$	ES-	50	28

Tabela 3. Condições do UHPLC-MS/MS para a quantificação do 2,4-D e do fipronil em amostras de *P. lineatus*.

4.3.4. Fator de bioconcentração

O fator de bioconcentração (BCF, kg L^{-1}) foi calculado através da concentração dos analitos nas amostras líquidas de *P. lineatus* (mg. kg^{-1}) em razão da concentração dos analitos presente na água de exposição (mg. L^{-1}) utilizando a equação abaixo (Opperhuizen, 1991):

$$BCF = \frac{\text{Concentração na amostra de peixe}}{\text{Concentração nominal na água}}$$

4.4. Análises Bioquímicas

O peso das amostras de tecido branquial dos *P. lineatus*, expressos em média \pm erro padrão, foi de $0,175 \pm 0,125$ g. A conservação das amostras foi feita com uma solução de tampão fosfato (0,1 M; pH 7,8), com fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF; 0,001M). As amostras com conservante foram

homogeneizadas, centrifugadas (20 min, 14.000 g, 4 °C) e o sobrenadante foi coletado para as análises bioquímicas: determinação da concentração de proteínas, atividades enzimáticas (CAT e GST), e avaliação de ocorrência de LPO. O método de Bradford (1976), adaptado por Kruger (1994) foi utilizada na quantificação da concentração de proteínas totais, expressas em mg. mL⁻¹, utilizando como padrão albumina bovina (BSA) e leitura de absorbância a $\lambda = 595$ nm. O método descrito por Beutler (1975) foi usado para a mensuração da atividade enzimática da CAT, expresso em U mg proteína⁻¹, via o decaimento da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e leitura em cinética a $\lambda = 240$ nm, durante 2 min e intervalos de 15 s entre as leituras. O método descrito por Habig e Jakobi (1981) foi usado para a mensuração da atividade da GST, expresso em U mg proteína⁻¹, utilizando 1-cloro-2-4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato, e leitura em cinética a $\lambda = 340$ nm, durante 4 min e intervalos 30 s entre as leituras. O método TBars descrito por Satoh (1978) adaptado por Wilhelm Filho et al. (2005), foi usado na avaliação de LPO via a quantificação de malondialdeído (MDA, nmol MDA mg proteína⁻¹), expressa em equivalentes de MDA, e leitura de absorbância a $\lambda = 530$ nm. Todas leituras foram realizadas na leitora de microplaca modelo Spectramax Plus 384 (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA, USA).

4.5. Análises Morfológicas

4.5.1. Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras de brânquias foram retiradas do fixador e lavadas com tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,4) para a remoção do excesso de fixador. Posteriormente, foi feita a desidratação com soluções de etanol em água destilada, em concentrações crescentes até etanol puro (70, 95, 100 I, 100 II, 100 III %), mantendo as amostras por um tempo de 10 min em cada solução. Em seguida, as amostras foram banhadas em 1,1,1,3,3,3-hexadimetildisilazano (HMDS) por 30 segundos (2x) e secas em temperatura ambiente. Posteriormente foram coladas em discos de metal com cola de prata e cobertas com uma camada de ouro (99%, Evonik Degussa) utilizando um Sputtering FCD 004 BAUSER, a vácuo. Imagens digitais dos filamentos branquiais (5-10/animal) foram obtidas aleatoriamente em

microscópio eletrônico de varredura (MEV-FEG *Philips* modelo XL-30 FEG). As imagens foram analisadas com o software Image-Pro Plus 6.0 para a determinação da área fracional das células-cloreto (AFCC) e de densidade das mesmas por mm² de filamento de acordo com Bindon et al (1994) e Moron et al (2003), utilizando as seguintes equações:

$$AFCC = \frac{\Sigma \text{ área de todas as CCs}}{\text{Área epitelial total da fotografia}}$$

$$Densidade = \frac{AFCC}{\text{Média das áreas de todas as CCs}}$$

4.5.2. Análises histopatológicas

As amostras de brânquias foram retiradas do fixador e lavadas com tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,4) para a remoção do excesso de fixador. Foi realizada a bateria de desidratação com soluções de etanol em água destilada (70, 80, 90, 95%) e mantidas por 1 hora em cada solução. Posteriormente foi feita a inclusão com o kit de historesina (Leica, Alemanha): os tecidos desidratados foram tratados com etanol (95%) + Resina histológica pura + Ativador por um período de 4 horas e, após, para uma solução de Resina histológica pura + Endurecedor onde permaneceu “over night”. As amostras foram secas na estufa (36 °C).

Os cortes histológicos de 4-3 µm foram realizados no micrótomo automático (MICRON HM 360) com o auxílio de navalhas de vidro confeccionadas momento antes de seu uso. As lâminas foram coradas com azul de toluidina e analisadas usando imagens obtidas em microscópio Olympus BX51 (Olympus, Dinamarca) com interface em uma câmera e ao software Motic Image Plus 2.0 (Hong Kong, China). As análises histopatológicas foram feitas segundo Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994), modificado por Cerqueira e Fernandes (2002).

As histopatologias são classificadas em estágios de acordo com as características e os valores dados pelo Índice de Alteração Histopatológico (IAH) indicam o grau de severidade: estágio I em casos de lesões sempre locais com caráter sempre reversível e não prejudiciais para o funcionamento do órgão; estágio II em casos de lesões geralmente locais com caráter geralmente reversível e que

podem ser prejudiciais para o funcionamento do órgão; estágio III em casos de lesões geralmente irreversíveis que prejudicam o funcionamento do órgão.

O IAH foi calculado pela soma dos pesos dos distintos estágios segundo a equação proposta por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994):

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

Os valores de IAH são classificados quanto a severidade dos danos: danos não significativos (≤ 10); danos leves a moderados (> 10 a < 21); danos moderados a graves (> 21 a < 50); danos graves (> 50 a < 100) e danos irreversíveis (> 100).

4.6. Efeito sinérgico e antagônico do 2,4-D e fipronil em mistura

Foi realizado a avaliação de sinergismo e antagonismo segundo a metodologia desenvolvida por Gottardi et al. (2017), no qual, foi calculado primeiramente o efeito previsto e posteriormente o efeito observado, onde C, D, F e D + F, correspondem aos grupos de *P. lineatus* do presente trabalho.

$$\text{Efeito previsto} = \frac{D}{C} * \frac{F}{C} \qquad \text{Efeito observado} = \frac{D + F}{C}$$

Segundo Gottardi et al. (2017), a probabilidade de um organismo sobreviver a uma mistura de compostos pode ser calculada multiplicando-se as probabilidades de sobreviver a compostos únicos, valendo o mesmo raciocínio quando avaliado efeitos subletais. Quando o valor do efeito observado (EO) é maior ou menor que o valor do efeito previsto (EP), indica a ocorrência de efeitos sinérgicos ou antagônico: $EO > EP =$ sinergismo; $EO < EP =$ antagonismo.

4.7. Análises estatísticas

Foi realizado teste de normalidade Kolmogorov-Smiirnov e o teste de homogeneidade de variâncias de Levene. Para detectar se houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos, foi realizado a análise de variância ANOVA e o teste Tukey-Kramer em dados paramétricos (bioquímicos, MEV e

bioconcentração), e Teste Kruskal Wallis em dados não paramétricos (histopatológicos). Comparações Múltiplas com intervalo de confiança de 95% aplicado nos valores. As análises foram feitas utilizando o programa estatístico IBM SPSS Statistics 22.

5. RESULTADOS

5.1. Bioconcentração

O 2,4-D e o fipronil foram quantificados nas amostras de *P. lineatus* inteiros (Tabela 4). A concentração de 2,4-D, em *P. lineatus* do grupo D, foi de 77.4 ± 22.6 ng. g⁻¹ massa seca, mas esse analito não foi quantificado nos peixes do grupo D + F. O fipronil foi quantificado no grupo F, em 789.3 ± 178.3 ng. g⁻¹ massa seca e no grupo D + F, em 683.1 ± 73 ng. g⁻¹ massa seca. A bioconcentração do fipronil no grupo F foi 13% superior que no grupo D + F. Desta forma, os agrotóxicos isolados (grupo D e grupo F) bioconcentraram mais em *P. lineatus* do que quando em mistura (grupo D + F).

O fator de bioacumulação (BCF), expresso em kg. L⁻¹ (peso úmido), foi calculado com a finalidade de comparar as concentrações presentes na amostras de *P. lineatus* inteiros com as concentrações nominais dos agrotóxicos incluídas na água experimental. Os peixes do grupo F e do grupo D + F, obtiveram valores de BCF do fipronil acima de 10% ($p < 0,05$).

Grupo	Média (ng. g ⁻¹ massa seca)		BCF (kg. L ⁻¹)	
	2,4-D	Fipronil	2,4-D	Fipronil
C	< LOD	< LOD	0	0
D	$77,4 \pm 22,6$	< LOD	0,17	0
F	< LOD	$789,3 \pm 178,3$	0	12,4
M	< LOD	$683,1 \pm 73$	0	10,8

Tabela 4. Concentração de 2,4-D e fipronil (ng. g⁻¹ massa seca), em *P. lineatus* expostos em laboratório, por 96 horas, ao 2,4 D e Fipronil. Valores médios ± erro padrão. < LOD (abaixo do limite de detecção) e BCF (Fator de Bioacumulação). * Indica diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

5.2. Análises bioquímicas

Nas brânquias de *P. lineatus* do grupo D, a atividade enzimática da CAT aumentou 95% ($3,79 \pm 0,77$; p = 0,023) comparado com a atividade da mesma enzima no grupo C ($1,92 \pm 0,19$) (Fig. 5A). A atividade enzimática da GST aumentou 76% ($30,15 \pm 4,22$; p = 0,030) comparado com a atividade para a mesma enzima no grupo C ($16,62 \pm 2,08$) (Fig. 5B). Nos peixes do grupo D ocorreu aumento nos níveis de peroxidação lipídica (LPO) no qual valores foi 96% ($19,94 \pm 3,03$; p = 0,006) superior em relação aos valores medidos no grupo C ($10,18 \pm 2,05$) (Fig. 5C).

Nas brânquias de *P. lineatus* do grupo F, a atividade enzimática da GST aumentou 88% ($31,54 \pm 2,36$, p = 0,009) comparado com a atividade para a mesma enzima no grupo C ($16,62 \pm 2,08$) (Fig. 5B). Nos peixes do grupo F não ocorreu alterações significativas na atividade da enzima CAT e não ocorreu aumento nos níveis de LPO (Fig. 5C).

Nas brânquias de *P. lineatus* do grupo D + F, não ocorreram alterações na atividade enzimática da CAT e GST, e não ocorreu aumento nos níveis de LPO. Ocorreu antagonismo de mistura em todas as análises bioquímicas (CAT; GST e LPO) realizadas no presente trabalho, à medida que o valor do efeito observado (0,58; 1,21 e 0,96) foi inferior ao valor do efeito previsto (1,76; 3,44 e 2,44) (Tabela 5).

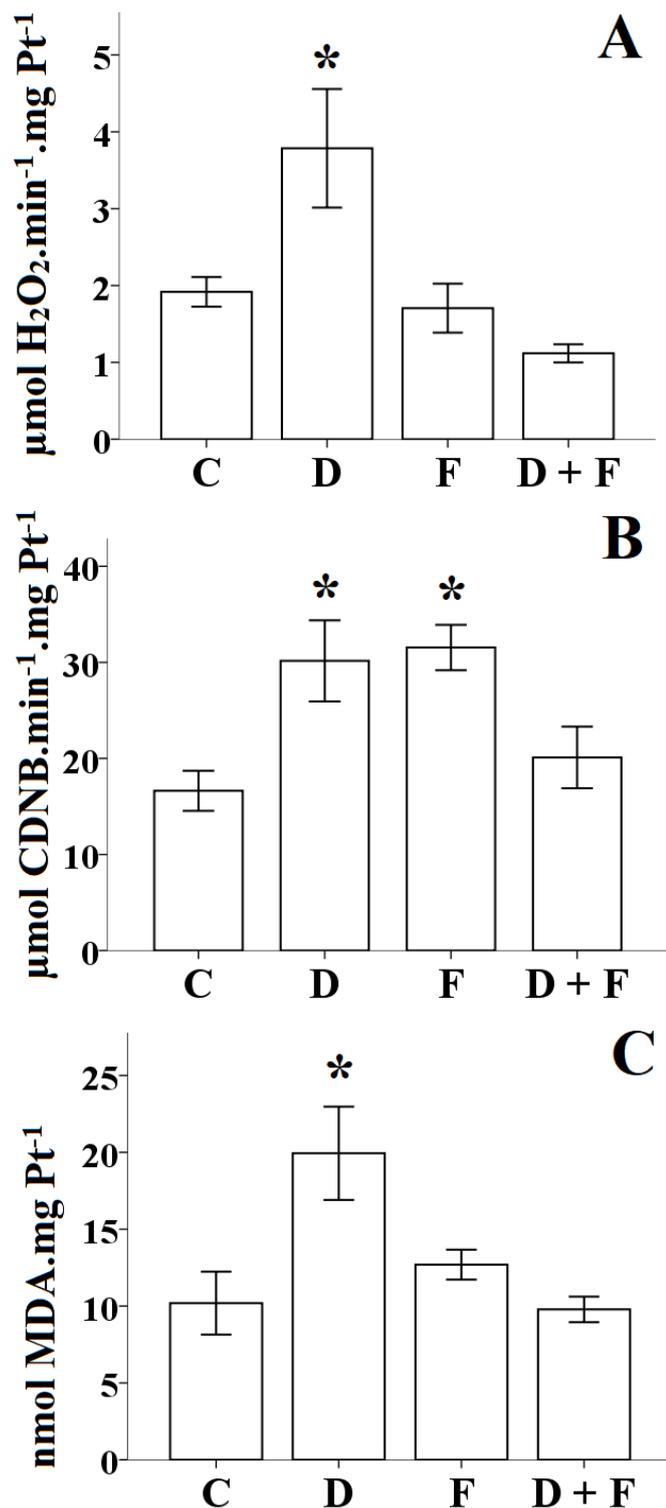


Fig. 5 Brânquias de *P. lineatus* expostos, em mesocosmo e laboratório, ao 2,4-D (D), fipronil (F) e 2,4-D + fipronil (D + F) por 96 horas. A: Atividade da enzima catalase (CAT). B: Atividade da enzima glutathione s-transferase (GST). C: Concentração de malondialdeído (MDA). * Indica diferença significativa de $p \leq 0,05$ em relação ao controle. As barras representam a média e as linhas o erro padrão.

Grupo	Biomarcadores bioquímicos								
	Catalase			GST			LPO		
	Média ± Erro padrão	p	Símbolos	Média ± Erro padrão	p	Símbolos	Média ± Erro padrão	p	Símbolos
C	1,92 ± 0,19	–	–	16,62 ± 2,08	–	–	10,18 ± 2,05	–	–
D	3,79 ± 0,77*	0,023*	↑*	30,15 ± 4,22*	0,03*	↑*	19,94 ± 3,03*	0,006*	↑*
F	1,71 ± 0,31	0,985	↓	31,54 ± 2,36*	0,009*	↑*	12,69 ± 0,97	0,792	↑
D + F	1,12 ± 0,11	0,555	↓	20,10 ± 3,21	0,87	↑	9,78 ± 0,83	0,999	↓
Efeito previsto	1,76	–	–	3,44	–	–	2,44	–	–
Efeito observado	0,58	–	–	1,21	–	–	0,96	–	–
Taxa de sinergismo (S) ou antagonismo (A)	3,01	–	A	2,85	–	A	2,54	–	A

Tabela 5. Resultados totais dos biomarcadores bioquímicos mensurados via atividade enzimática da CAT e GST, nível de LPO, e cálculos de taxa de sinergismo/antagonismo. * Indica diferença significativa ($p \leq 0,05$).

5.3. Morfologia branquial

5.3.1. Superfície epitelial das brânquias

As brânquias são constituídas pelos arcos branquiais, filamentos e lamelas que são as regiões de trocas gasosas (Fig. 6A, B; Fig. 7A). O epitélio das brânquias que reveste os arcos branquiais, rastros e filamentos é constituído por células pavimentosas (CPVs), células mucosas (CM) e células-cloreto (CC). O epitélio que recobre as lamelas é o epitélio respiratório e é constituído principalmente por CPVs e CCs. As CPV do epitélio do filamento são geralmente caracterizadas por apresentar muitas microdobras, geralmente bem definidas, na superfície apical (em contato com a água) da membrana celular (Fig. 6C, D; Fig. 7B). As CPV que compõem o epitélio lamelar apresentam poucas microdobras, pouco definidas, ou ausência delas (Fig. 6C; Fig. 7B). A presença de microdobras nas células pavimentosas diminui quanto mais próximas as lamelas (Fig. 6D; Fig. 7B). As microdobras das CPVs branquiais, localizada na região central do

filamento, de *P. lineatus* dos grupos D, F e D + F (Fig. 7B, C, D) apresentaram maior definição em comparação com o grupo C (Fig. 7A).

Em *P. lineatus* foram identificados dois tipos de CC: o primeiro tipo (CC1) apresentam membrana apical côncava e aspecto semelhante a esponja e, o segundo tipo (CC2) apresentam contornos sem um padrão definido, contendo microvilosidades (Fig. 6). O grupo F apresentou um aumento ($23386,80 \pm 3164,23$; $p = 0,018$) no número de CC (densidade mm^2) com relação ao grupo C (7275,60) (Fig. 8A). A AFCC não apresentou alterações significativas em nenhum dos grupos contaminados (D, F e D + F) (Fig. 8B). As análises de MEV indicaram a ocorrência de antagonismo de mistura no grupo D + F quanto a densidade mm^2 de CC, pois o valor do efeito observado (2,13) foi inferior ao valor do efeito previsto (2,83) (Tabela 7). Nos peixes dos grupos F e D + F foi observado a ocorrência de hipertrofia das CPVs e CCs do filamento e lamelas branquiais (Fig. 7).

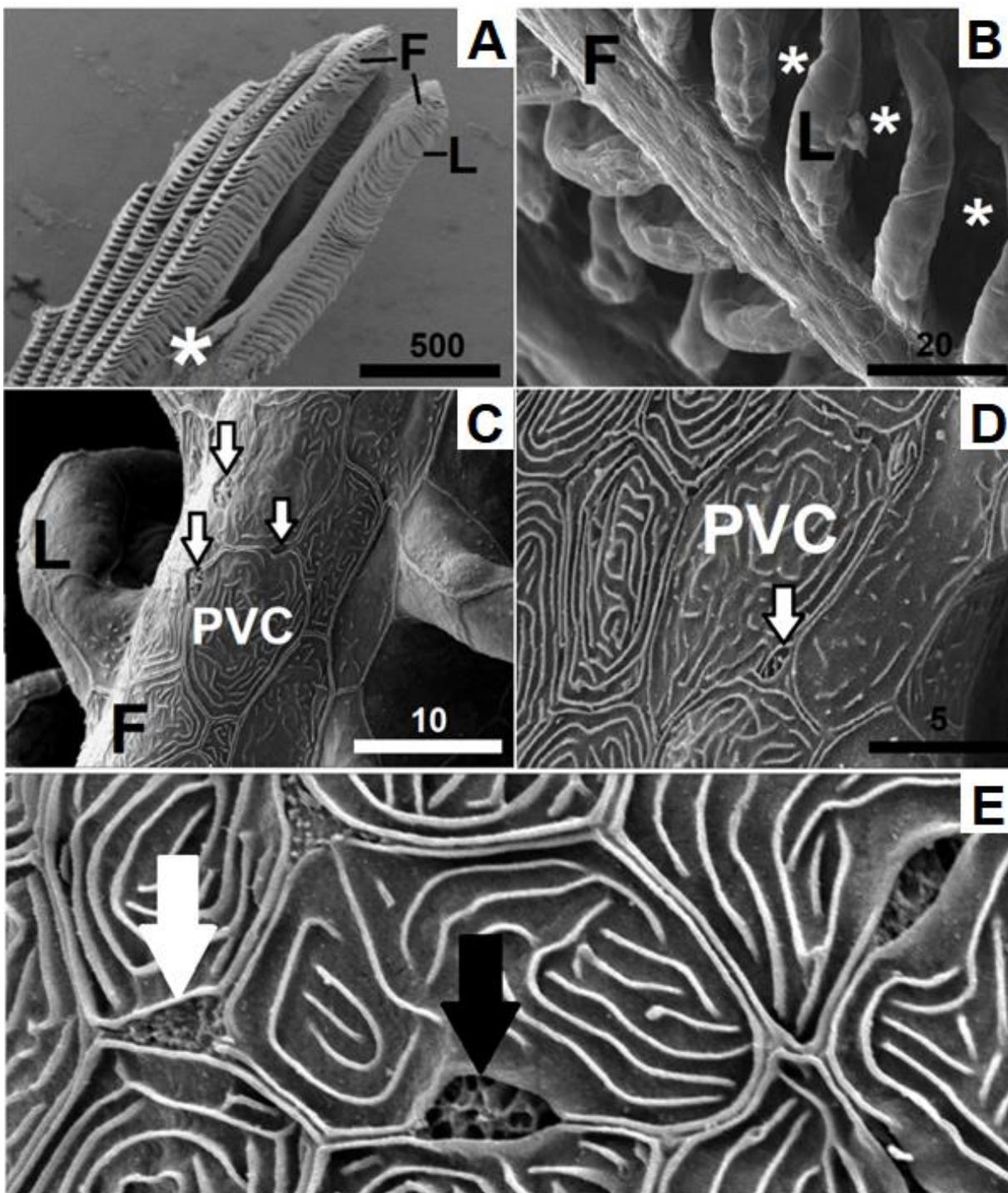


Fig. 6 Fotomicrografia eletrônica de varredura mostrando estruturas brânquias de *P. lineatus* dos grupos C. A: filamentos (F), lamelas (L), região do septo branquial (*). B: região entre as lamelas onde ocorre o fluxo de água e trocas gasosas (x). C: células pavimentosas (CPV) e células-cloreto (setas pretas). D: definição das microdobras das células pavimentosas. E: tipos de CC: CC1 (seta branca) apresentam membrana apical com microvilosidades; CC2 (seta preta) apresentam aspecto semelhante a esponja. Barra de escala em μm .

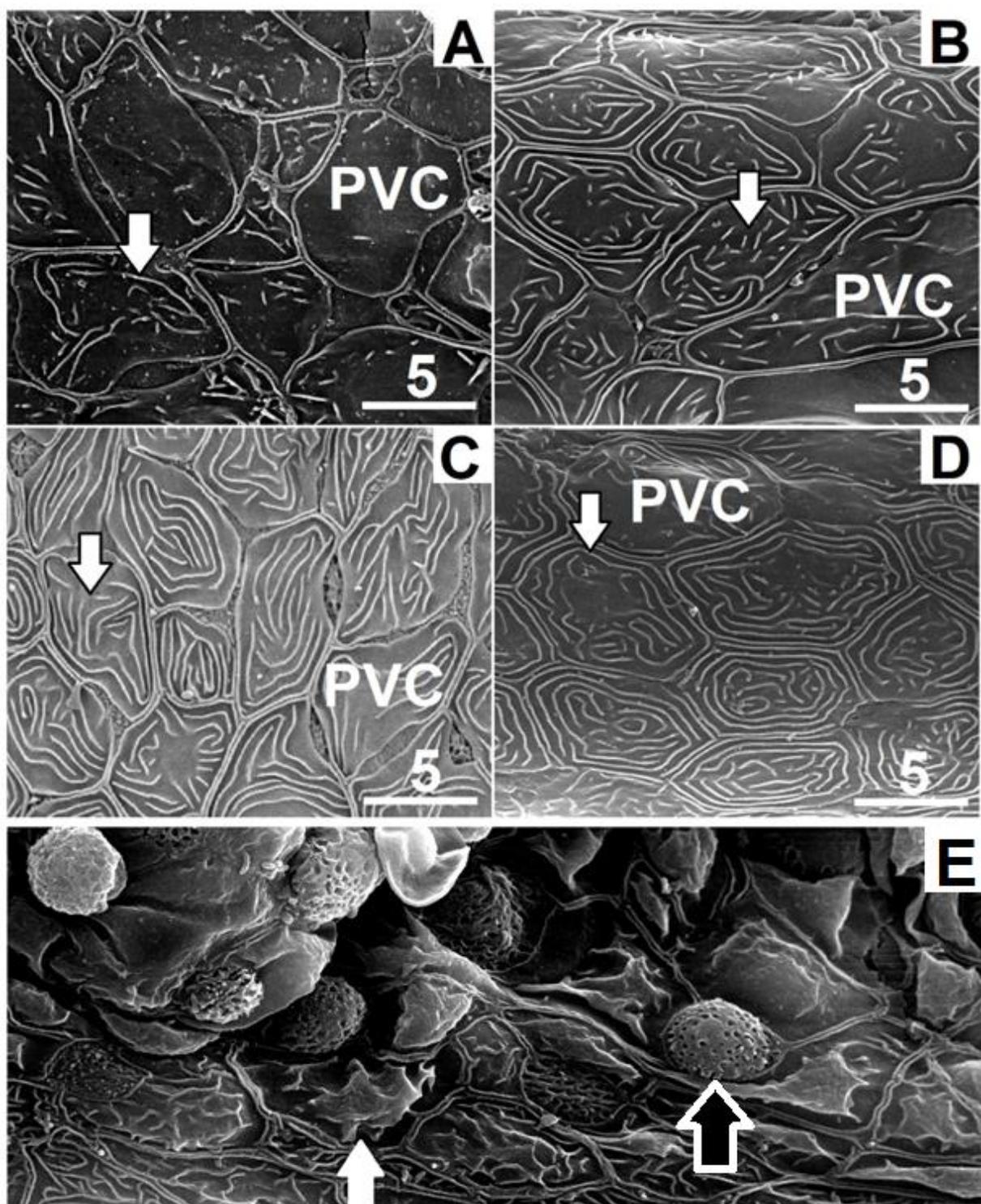


Fig. 7 Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície epitelial da região central do filamento branquial de *P. lineatus* expostos por 96 horas. **A:** grupo C. **B:** grupo D. **C:** grupo F. **D:** grupo D + F. As setas indicam microdobras das CPV nos três tratamentos em comparação com o grupo controle **E:** CPVs (seta branca) e CCs (seta preta) hipertrofiadas. As setas pretas indicam a definição das microdobras das CPV nos três tratamentos em comparação com o grupo controle. Barra de escala em μm .

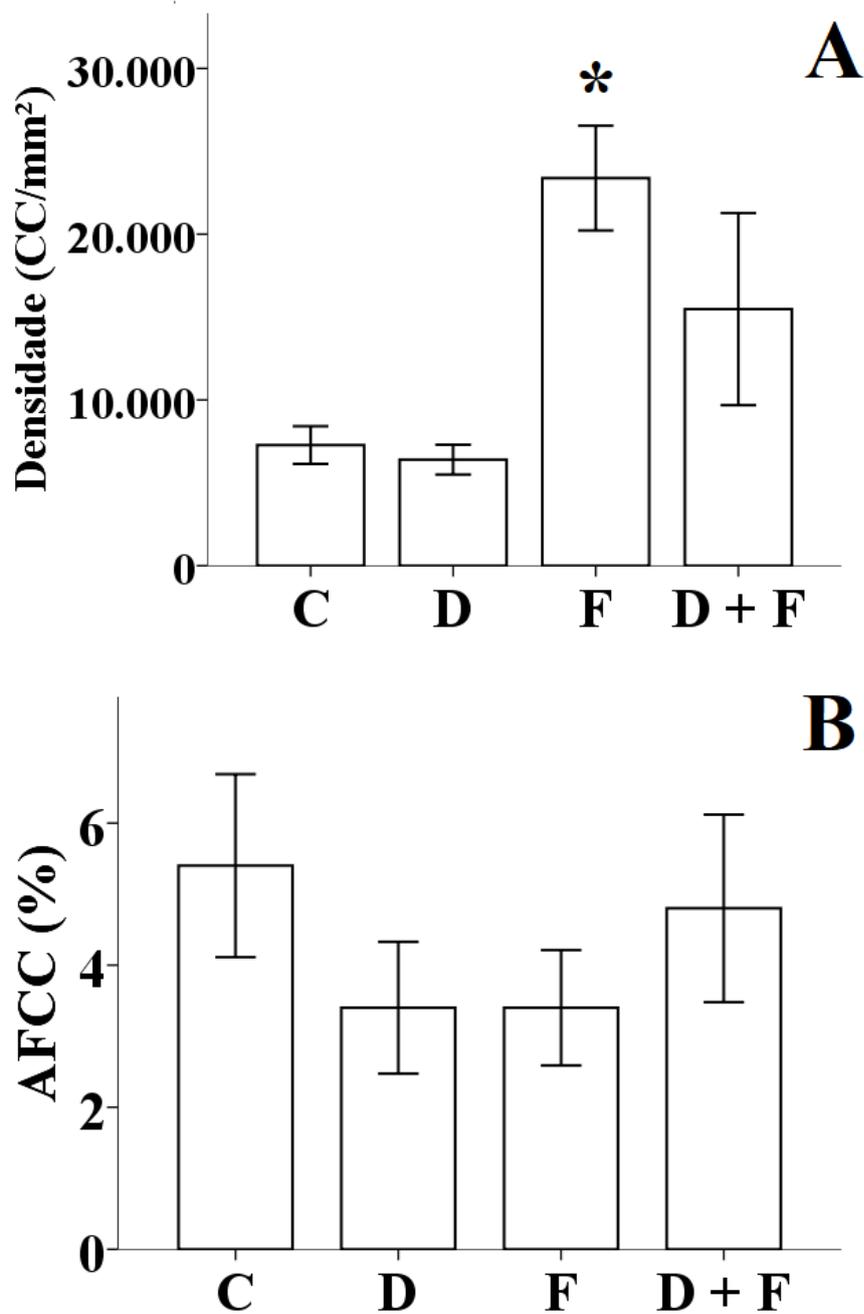


Fig. 8 Brânquias de *P. lineatus* do grupo controle (C) e expostos ao 2,4-D (D), fipronil (F) e 2,4-D + fipronil (D + F) durante 96 horas. A. Densidade de células-cloreto (CC), B. Área fracional de células-cloreto (AFCC). * Indica diferença significativa em relação aos grupos Controle ($p \leq 0,05$), utilizando ANOVA. As barras representam a média e as linhas o erro padrão.

5.3.2. Histopatologias

O epitélio branquial é estratificado possuindo 3 a 6-7 camadas de células sendo a mais externa constituída por células pavimentosas (CPV) e células cloreto (CC) distribuídas entre as CPV como descrito acima. O epitélio lamelar apresenta uma camada externa constituída por CPVs, com funcionalidade de revestimento que está em constante contato com o meio externo e uma camada interna constituída por células indiferenciadas. As células pilares (CPs) possuem uma morfologia específica com núcleo central e expansões citoplasmáticas, cujo contato entre as expansões de células adjacentes formam espaços extracelulares que funcionam como canais para a passagem do sangue possibilitando as trocas gasosas por difusão (Fig. 9A).

A exposição por 96 horas aos agrotóxicos causou alterações histopatológicas no tecido branquial de *P. lineatus* (Fig. 9, B-L) dos grupos D, F e D + F. Foi observado um aumento na frequência das histopatologias de estágio I nos grupos D, F e D + F comparados com o grupo C. As alterações histopatológicas de estágio I como hipertrofia (Fig. 9C), hiperplasia (Fig. 9D), congestão vascular (Fig. 9G), descolamento epitelial (Fig. 9B, E) e proliferação de células-cloreto (Fig. 9C) foram maior frequentes, enquanto dilatação do sistema de células pilares (Fig. 9K), edema e fusão parcial (Fig. 9E, I), foram menor frequentes. Dentre as alterações histopatológicas classificadas no estágio II, a ocorrência de aneurisma (Fig. 9F, G) foi observado com maior frequência nos grupos F e D + F. Alterações histopatológicas de estágio II que ocorreram com menor frequência foram fusão total (Fig. 9J) nos grupos D, F e D + F, e ruptura epitelial no grupo D. As alterações histopatológicas classificadas no estágio III ocorreram em menor frequência, e foram: necrose (Fig. 9I) no grupo D e tumor (Fig. 9H, L) nos grupos F e F + D. Todas as histopatologias encontradas em cada grupo e a frequência (%) estão expressas na Tabela 6.

Os valores de IAH total foram de $0,38 \pm 0,06$ para o grupo C, de $3,32 \pm 0,22$ para o grupo D, de $10,36 \pm 1,8$ para o grupo F e de $10,45 \pm 2$ para o grupo D + F, sendo significativo nos grupos F ($p = 3,2 \cdot 10^{-5}$) e D + F ($p = 5,2 \cdot 10^{-5}$) (Fig. 10A). Entretanto, a distribuição das lesões de estágio I, estágio II e estágio III foram distintas (Fig. 10B), indicando que, embora alterações histopatológicas tenham

ocorrido, as lesões que ocorreram com maior frequência não interferiram no funcionamento normal das brânquias dos *P. lineatus* ou, quando interferiram, foi de maneira leve, reversível e pontual. Foi observado antagonismo de mistura no grupo D + F, pois o valor do efeito observado (27,47) foi inferior ao valor do efeito previsto (238,19). (Tabela 7).

Alterações histopatológicas	Estágio	C	D	F	D + F
<i>Hipertrofia</i>		22	94	80	70
<i>Hiperplasia</i>		8	59	89	90
<i>Congestão vascular</i>		8	33	43	45
<i>Dilatação do canal marginal</i>		0	0	1	1
<i>Descolamento epitelial</i>	I	0	51	42	12
<i>Proliferação de células-cloreto</i>		1	41	27	3
<i>Dilatação do sistema de células pilares</i>		0	5	4	11
<i>Edema</i>		0	9	0	0
<i>Fusão parcial</i>		0	2	5	2
<i>Fusão total</i>		0	1	3	1
<i>Ruptura epitelial</i>	II	0	2	0	0
<i>Aneurisma</i>		0	0	19	24
<i>Necrose</i>	III	0	2	0	0
<i>Tumor</i>		0	0	5	5

Tabela 6. Frequência (%) de alterações histopatológicas em epitélio branquial de *P. lineatus* expostos aos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, por 96 horas de exposição.

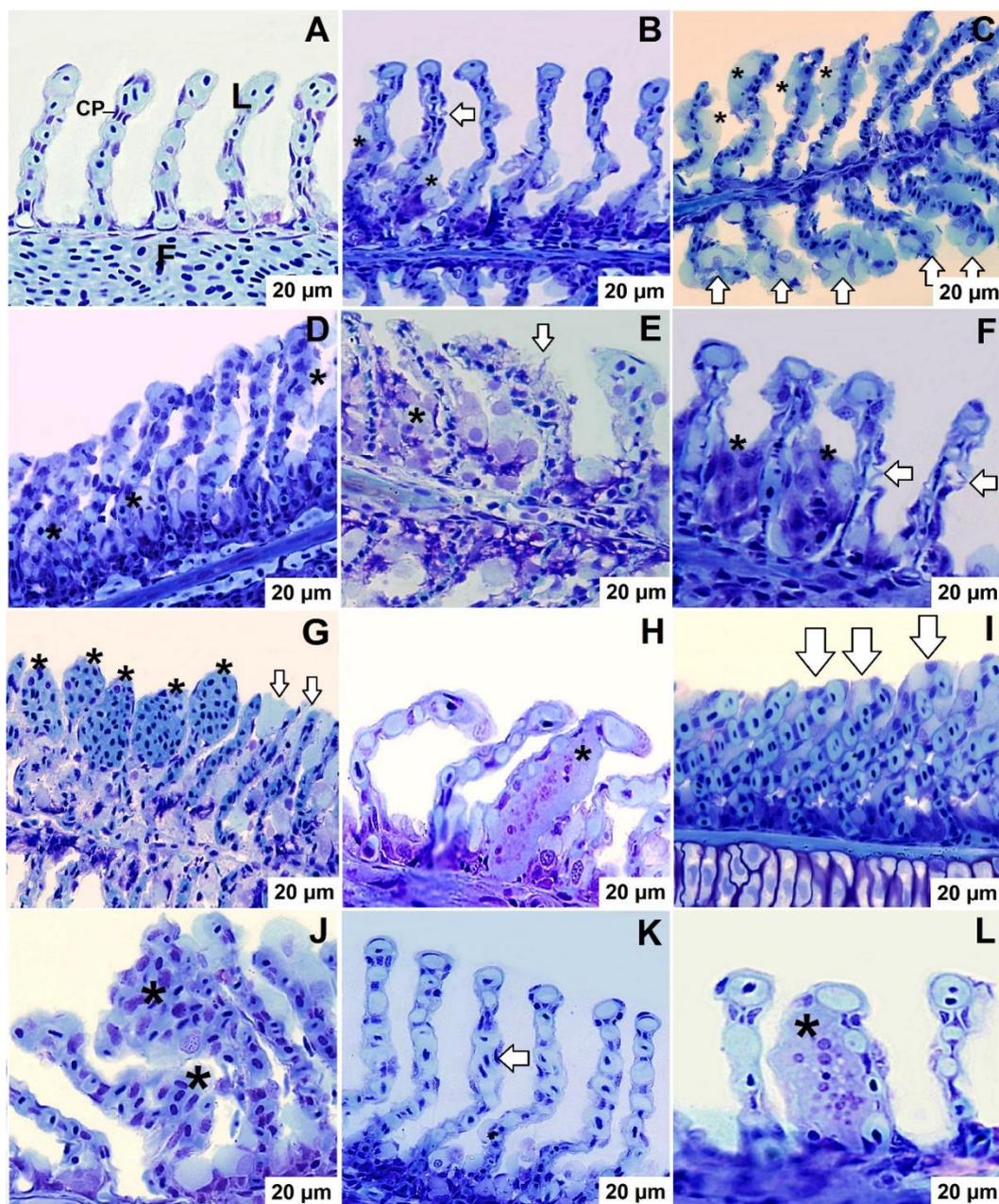


Fig. 9 Análises histopatológicas de brânquias de *P. lineatus* expostos aos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, por 96 horas. A: estruturas branquiais normais do grupo C, lamela (L), filamento (F) e células-pilares (CP). B: hiperplasia (*) e descolamento epitelial (seta) do grupo D. C: hipertrofia (*) e proliferação de células-cloreto (setas) do grupo D. D: hiperplasia (*) do grupo D. E: fusão lamelar parcial (*) e necrose lamelar (seta) do grupo D. F: fusão lamelar parcial (*) e descolamento epitelial (setas) do grupo F. G: aneurismas (*) e fusão lamelar total (setas) do grupo F. H: tumor (*) do grupo F. I: fusão lamelar total (setas) do grupo F. J: aneurisma (*) e congestão vascular (setas) do grupo D + F. K: dilatação do sistema de células pilares (seta) do grupo D + F. L: tumor (*) do grupo D + F. Barra de escala de 20µm. Amostras coradas com azul de toluidina.

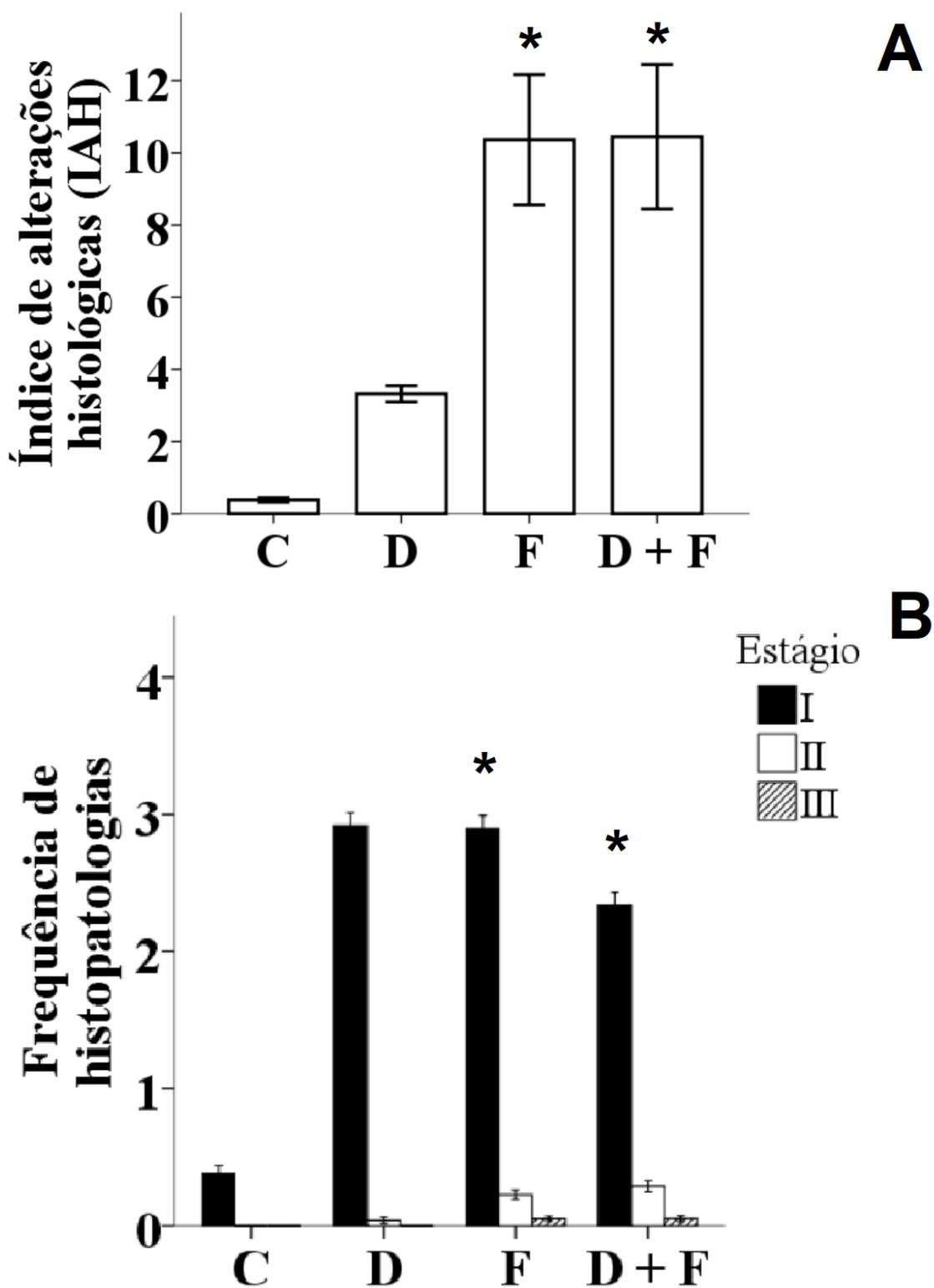


Fig. 10 Brânquias de *P. lineatus* do grupo controle (C) e expostos ao 2,4-D (D), fipronil (F) e 2,4-D + fipronil (D + F) durante 96 horas. A: Médias dos valores do índice de alterações histopatológicas (IAH). B: frequência de histopatologias por estágio I, II e III. * Indica diferença significativa em relação aos grupos Controle ($p \leq 0,05$). As barras representam a média e as linhas o erro padrão.

Grupo	Biomarcadores morfológicos								
	AFCC			Densidade			IAH		
	Média ± Erro padrão	p	Símbolos	Média ± Erro padrão	p	Símbolos	Média ± Erro padrão	p	Símbolos
C	5,4 ± 1,28	–	–	7275,60 ± 1137,95	–	–	0,38 ± 0,06	–	–
D	3,40 ± 0,92	0,591	↓	6398,60 ± 899,91*	0,998*	↓*	3,32 ± 0,22	0,568	↑
F	3,40 ± 0,81	0,591	↓	23386,80 ± 3164,23	0,018	↑	10,36 ± 1,80*	3,2.10 ⁻⁵ *	↑*
D + F	4,80 ± 1,31	0,98	↓	15484,0 ± 5796,47	0,348	↑	10,44 ± 2,00*	5,2.10 ⁻⁵ *	↑*
Efeito previsto	0,40	–	–	2,83	–	–	238,19	–	–
Efeito observado	0,89	–	–	2,13	–	–	27,47	–	–
Taxa de sinergismo (S) ou antagonismo (A)	0,45	–	A	1,33	–	A	8,67	–	A

Tabela 7. Resultados totais dos biomarcadores morfológicos mensurados via MEV, IAH e cálculos de taxa de sinergismo/antagonismo. * Indica diferença significativa ($p \leq 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou os efeitos dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura em relação ao potencial de bioconcentração no animal e em biomarcadores bioquímicos e morfológicos em *P. lineatus* utilizando brânquias como órgão alvo. Os dados obtidos mostraram que o contato dos agrotóxicos presentes na água com o epitélio branquial pode ter causado alterações na morfologia branquial e pode estar relacionada a tentativa do organismo em minimizar a absorção dessas moléculas pelas brânquias reduzindo a transferência para a corrente sanguínea. A absorção dessas moléculas tóxicas foi seguida de alterações no sistema DA e de biotransformação de fase II resultando em estresse oxidativo nos animais expostos ao 2,4 D e bioconcentração de ambos os agrotóxicos nos animais.

A quantificação do fipronil nos peixes inteiros indicou o potencial acumulativo dessa molécula em *P. lineatus*. Os agrotóxicos bioconcentraram mais nos tecidos quando expostos isolados do que quando juntos (2,4-D + fipronil). A diferença nos valores de bioconcentração do 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, pode ser devido a diferentes características das moléculas orgânicas, que podem interferir na absorção e acumulação dos químicos em tecidos biológicos. A bioconcentração de alguns químicos pode ser facilitada dependendo da solubilidade da molécula em lipídios. As baixas concentrações do 2,4-D quantificadas podem estar relacionadas a alta solubilidade do químico em água no qual pode facilitar a sua metabolização ou excreção. Segundo Ghassemi et al. (1981) o herbicida 2,4-D pode bioacumular em peixes, porém possui fácil metabolização. Carpenter e Eaton (1983) mostrou que $72 \pm 4\%$ da eliminação do 2,4-D em trutas ocorre através da urina e Knopp e Schiller (1992) descreveu a fácil absorção do herbicida 2,4-D em ratos via ingestão oral, seguido de uma fácil eliminação de aproximadamente 92% pela urina e de 3 a 4% pelas fezes, considerando uma biodisponibilidade do químico de cerca de 100%. A hipótese é que parte do 2,4-D absorvido por *P. lineatus* pode ter sido metabolizada e/ou eliminada pelo sistema excretor e não bioconcentrando no organismo.

As concentrações de fipronil em *P. lineatus* pode estar relacionado a estrutura molecular do fipronil, no qual o grupamento constituído por um átomo de carbono ligado à três átomos de flúor (CF₃) no posicionamento 4-(tri-fluor-metil-sulfinil-pirazol), favorece a dissolução do fipronil em matrizes orgânicas (lipídios, óleos e solventes orgânicos). Zhang et al (2018) comprovaram o potencial bioacumulativo do fipronil e de seus metabólitos em animais aquáticos, incluindo peixes da espécie *Pampus argenteus*, *Pseudosciaena crocea* e *Larimichthys polyactis*. A eliminação do contaminante variou para cada espécie, tempo de exposição e dose de exposição. Konwick et al., (2006) relatou que a biotransformação do fipronil em truta-arco-íris foi responsável por eliminar 88% do composto, enquanto Li, (2018), relatou uma eliminação de 31% do fipronil em tilápias, indicando que o fipronil pode apresentar efeitos de absorção, acumulação e eliminação distintos para cada espécie. Conforme Holder et al. (2018) descreveu em abelhas, o fipronil ministrado em doses baixas não é letal, porém quando aplicado frequentemente, pode bioconcentrar nos animais até uma dose letal.

O fígado realiza a metabolização do fipronil podendo ocorrer a recirculação entero-hepática, presumindo uma maior permanência do fipronil e seus metabólitos no organismo do que o 2,4-D (PASTORE, 2018). Segundo Konwick et al. (2006) o fipronil apresentou rápida biotransformação para fipronil sulfona em truta arco-íris, assim como maior persistência do metabólito com meia vida de 0,6 dias para o fipronil e 2 dias para o fipronil sulfona. O processo de oxidação do fipronil resulta em fipronil sulfona (BAIRD et al., 2012) e, considerando que 2,4-D é capaz de produzir um excesso de EROs, a diferença nos valores de bioconcentração do fipronil entre os *P. lineatus* do grupo F e os do grupo D + F, pode estar relacionado com uma biotransformação mais rápida do fipronil para fipronil sulfona quando na presença do 2,4-D o que pode ter resultado em menor bioconcentração do fipronil nos peixes do grupo D + F. Entretanto, para a comprovação desta hipótese, é necessário a mensuração dos subprodutos do fipronil nos tecidos.

Sun et al (2016) sugeriram que o fipronil favoreceu o aumento da adipogênese em modelo celular 3T3-L1, via alterações na proteína quinase ativada por AMP (AMPK). A AMPK opera na regulação do metabolismo lipídico através da inibição da adipogênese e síntese de ácidos graxos (DAVAL et al., 2005); durante a atuação do fipronil, ocorre o aumento dos níveis de cálcio intracelular, através do

aumento da permeabilidade da membrana plasmática, prejudicando a ativação da AMPK (TRUMP E BEREZESKY, 1992). Yan et al (2016) sugeriram hepatotoxicidade do fipronil em *Danio rerio* devido variações no conteúdo de ácido graxos saturados e no processo de síntese primária de ácido biliares. A não detecção do 2,4-D e menor bioconcentração do fipronil na exposição ao 2,4-D + fipronil, observados em *P. lineatus*, também pode estar relacionado com alterações no metabolismo lipídico, uma vez que o fipronil é solubilizado em lipídios sendo bioconcentrado no tecido adiposo (SUN et al., 2016) e o 2,4-D atua na formação excessiva de EROs, responsáveis pela degradação de lipídios se não forem neutralizados pelo sistema DA. Michel et al., (2016) relacionaram, em seu estudo com enguias, o fígado e músculo como principais órgãos de armazenagem do fipronil, devido a apresentarem maior conteúdo lipídico. Freitas et al. (2019), observou que apesar do aumento de conteúdo lipídico hepático totais de girinos expostos ao 2,4-D, algumas classes lipídicas como ácidos graxos livres e triglicerídeos foram reduzidas, tornando esta hipótese incerta quanto a real causa da não detecção do 2,4-D e menor bioconcentração fipronil em *P. lineatus* quando expostos ao 2,4-D + fipronil.

O principal mecanismo de ação do fipronil é a competição com o ácido γ -aminobutírico (GABA) pelos locais de ligação dos receptores GABA-a, por conseguinte, atua como um disruptor na transmissão normal do impulso nervoso via bloqueio dos canais de cloro (GUNASEKARA E TROUNG, 2007). Os metabólitos provenientes do fipronil (fipronil sulfona e o fipronil dessulfínil) se conectam de 6 a 15 vezes mais aos receptores GABA no cérebro humano do que o fipronil (PASTORE, 2018), e notoriamente, os metabólitos da molécula original podem apresentar efeito neurotóxico não somente em humanos como na maioria dos vertebrados. A hiperexcitação do sistema nervoso causada pela toxicidade da molécula de fipronil, pode resultar no aumento da ventilação branquial, e como consequência, uma maior absorção dos compostos via branquial por *P. lineatus* quando na presença do fipronil na água. Segundo Li (2018) a absorção e eliminação do fipronil em tilápias se deu principalmente através das brânquias, onde foi calculado a taxa de absorção e eliminação via epitélio branquial e sangue, de 58 e 52 ng. h⁻¹, sendo diretamente proporcional a presença do fipronil no meio com o aumento da taxa respiratória. Além disso, a recirculação do fipronil pode ocorrer através das brânquias, similarmente como ocorre na recirculação entero-

hepática (LI, 2018). Entretanto, Freitas et al. (2019), observou, em girinos, a diminuição da taxa de respiração e a velocidade da natação após a exposição crônica ao 2,4-D, o que sugere que o fato do grupo D + F apresentar valores de bioconcentração do 2,4-D e fipronil inferiores aos grupo D e F, pode estar relacionado com interferências na taxa respiratória causadas pelos compostos juntos. No entanto, foi observado o aumento da atividade enzimática da GST em peixes expostos ao 2,4-D e ao fipronil de modo isolado, o que indica a ocorrência de um aumento na taxa de eliminação das moléculas devido a uma anterior biodisponibilidade dessas moléculas no meio aquático e absorção pelos animais. Porém no grupo D + F, onde foram encontradas menores concentrações dos agrotóxicos, não ocorreu alterações na atividade enzimática da GST, sugerindo que pode ter ocorrido interferências químicas no ambiente aquático, devido a presença dos dois agrotóxicos juntos, que possivelmente diminuiu a biodisponibilidade das moléculas.

Os efeitos tóxicos consequentes da absorção do 2,4-D por *P. lineatus* induziu à danos celulares e sugere a indução ao estresse oxidativo. Estresse oxidativo ocorre quando a produção de EROs excede a capacidade de neutralização pelo sistema DA. A CAT realiza a catalisação do H_2O_2 presente em excesso no meio intracelular e gerando H_2O e O_2 como produtos da reação. O H_2O_2 é uma molécula essencial para processos fisiológicos, porém em excesso é responsável pela inativação de enzimas, oxidação do piruvato, α -cetogluturato, DNA e lipídeos, e degradação da hemoglobina, mioglobina e citocromo c. A degradação rápida do H_2O_2 feita pela CAT é essencial para evitar a formação de radical hidroxil (OH), radical livre mais bioreativo que os outros e produto da interação do H_2O_2 com metais de transição (VIZZOTTO, 2017). Portanto, o aumento significativo da atividade da CAT no grupo D, indica uma resposta do sistema de DA induzido por uma possível produção em excesso de H_2O_2 durante a exposição desses animais ao herbicida em forma isolada, que estimulou o aumento da atividade da CAT a fim de decompor o H_2O_2 . Oruc et al (2004) também observou um aumento na atividade da CAT em rim de *Cyprinus carpio* e *Oreochromis niloticus* expostos ao 2,4-D. Concentrações exageradamente altas de H_2O_2 no meio intracelular pode resultar na inibição da CAT, geralmente associada a ligação de íons metálicos a função tiol (-SH) da catalase (WILHELM FILHO, 1996). O H_2O_2 pode ser transformado em OH, que causa danos mais severos em biomoléculas variadas

se não forem neutralizados rapidamente por outras enzimas antioxidantes como a GPx e GST (HUBATSCH et al., 1998). O decréscimo da atividade da CAT foi observado para mamíferos (rato) expostos ao 2,4-D por Shafeeq e Mahboob (2019).

A GST é uma enzima de biotransformação de fase II que age conjugando substratos de caráter eletrofílicos e hidrofóbicos com a GSH, gerando conjugados solúveis em água com a finalidade de diminuir a toxicidade de compostos e facilitar a eliminação destes pelo sistema excretor (PAULINO et al., 2012b). O aumento da atividade da GST em brânquias verificado nos grupos D e F, sugere a tentativa da GST de desintoxicação do organismo, conjugando os agrotóxicos a GSH para facilitar a excreção.

Oruc et al (2004) observou um aumento na atividade enzimática da GST em *Cyprinus carpio* e *Oreochromis niloticus* expostos ao 2,4-D em rim, mas não em brânquias e cérebro, porém na mistura do herbicida 2,4-D e o inseticida Azinphos-methyl ocorreu um aumento significativo nos valores de GST para ambas as espécies principalmente no rim. Outros autores observaram resultados semelhantes ao obtido no presente trabalho para a GST, como Piner e Uner (2012) em *Oreochromis niloticus* para o lambda-Cyhalothrin, Dinu et al. (2010) em *Carassius auratus* para o inseticida Deltametrina, Ensibi et al. (2014) em *Cyprinus carpio* para o Carbofurano e Deltametrina, e Sanchez et al. (2006) em *Gasterosteus aculeatus* para o herbicida Diquat.

O acréscimo significativo nas concentrações de MDA em brânquias de *P. lineatus* do grupo D, indica que o sistema de DA não foi eficaz na neutralização das EROs e resultou na peroxidação lipídica nas membranas celulares, sugerindo que o 2,4-D é um potencial indutor do estresse oxidativo em brânquias de *P. lineatus*. em fígado de *P. lineatus* expostos a atrazina por Santos (2010) e expostos ao I-cyhalothrin por Vieira e Martinez (2018). As concentrações de MDA não aumentaram nos grupos F e D + F, evidenciando que o 2,4-D isolado promoveu estresse oxidativo em comparação com o fipronil, e a ocorrência de antagonismo de mistura. Os dois agroquímicos apresentam toxicidade relacionada a vias de ação e metabolização distintas em *P. lineatus*. O fato de o fipronil ser metabolizado via citocromo P450 (DE MORAIS et al., 2016), pode ser o motivo da não alteração das análises enzimáticas, realizadas no presente trabalho, com relação ao grupo C.

As análises histopatológicas indicaram que a exposição aguda dos *P. lineatus* aos agrotóxicos resultou em alterações morfológicas no tecido branquial, na qual foram mais intensas nos grupos F e D + F que o grupo D, indicando um estímulo de defesa maior do epitélio branquial quando em contato com moléculas de fipronil. Algumas alterações estruturais do epitélio branquial indicam mecanismos de defesa do animal para impedir a absorção de moléculas tóxicas ou compensar disfunções, como a hipertrofia, hiperplasia e descolamento epitelial. A proliferação celular se inicia com uma hiperplasia podendo se desenvolver para uma fusão lamelar parcial ou total. Essas alterações celulares resultam no aumento da barreira água e sangue a fim de dificultar a absorção de compostos tóxicos (MALLATT, 1985), porém prejudicam as trocas gasosas pelo epitélio lamelar. O impedimento da difusão do O₂ presente na água para o sangue através do epitélio lamelar, pode resultar no aumento do fluxo sanguíneo como mecanismo compensatório e etapa do processo de desintoxicação (OLIVEIRA et al., 2018). O aumento do fluxo sanguíneo pontual no epitélio branquial resulta em congestão vascular, aneurisma e hemorragia, podendo levar ao desenvolvimento de condições patológicas graves, alterações na homeostase e até mesmo necrose tecidual (RORIZ et al., 2015). A incidência de alterações vasculares no grupo F, reforça a hipótese de que a hiperexcitação do sistema nervoso causada pelo fipronil no organismo, pode ter resultado em uma maior absorção dos compostos e conseqüente bioconcentração superior do fipronil (grupo F e grupo D + F) do que do 2,4-D, principalmente isolado. O epitélio branquial possui uma alta capacidade regenerativa quando não mais exposto aos compostos tóxicos, e mesmo na presença de lesões severas, podem se regenerar totalmente. Segundo Hawkins et al (1984) as alterações branquiais deixam os peixes mais vulneráveis a infecções secundárias que podem ser letais.

A ocorrência de tumores nos grupos F e D+F, e a não ocorrência no grupo D, induz a pensar que a presença do fipronil na água tenha estimulado o aparecimento dessas histopatologias. Segundo Britelli (1985), o aparecimento de tumores branquiais se deve a fatores estressantes constantes, como químicos com potencial carcinogênicos presentes na água ou inflamações crônicas. Os tumores são caracterizados como condições patológicas muito raras em peixes quando comparados com tumores em mamíferos, entretanto, considerando que as brânquias são órgão que estão em constantemente em contato com o meio

externo, expostas a vários contaminantes e agentes infecciosos, e por apresentar uma grande área de superfície, faz com que estas sejam órgãos mais vulneráveis (VERGNEAU-GROSSET et al., 2017). A genotoxicidade pode conduzir a formação de tumores, diversos estudos indicam o potencial genotóxico da molécula de fipronil em invertebrados (DE MORAIS et al., 2016) e vertebrados. De Oliveira (2012), observou que 50 mg / kg de fipronil, resultou em danos no DNA após 24 horas de exposição em camundongos. Em peixes, Ghisi et al. (2011), observou danos ao DNA dos eritrócitos em *Rhamdia quelen* após a exposição de 60 dias ao fipronil nas concentrações de 0,10 e 0,23 $\mu\text{g. L}^{-1}$, porém, considerando que no presente trabalho a concentração de exposição foi maior e de forma aguda, os resultados podem ser distintos. Çelik et al. (2014) investigou, *in vitro*, a ocorrência de danos ao DNA de linfócitos do sangue periférico humano após a exposição ao fipronil. A genotoxicidade do fipronil somado com a comprovação do potencial de bioconcentração da molécula em peixe, se torna um fato preocupante tanto no âmbito sanitário, devido ao alto consumo de peixes por humanos, quanto no âmbito ecológico, considerando que os peixes são a base da cadeia alimentar de diversos animais selvagens.

As análises morfológicas, indicaram que o 2,4-D, fipronil e 2,4-D + fipronil causaram alterações estruturais no epitélio branquial do filamento de *P. lineatus*, resultando em um aumento da definição nos padrões das microdobras das CPVs da superfície do epitélio branquial. Esse fato, observado também por Paulino et al (2012a), o que pode indicar uma possível resposta do animal ao agente estressor para aumentar a retenção de muco e conseqüente fornecer uma maior proteção mecânica (YASHPAL et al. 2006). Da mesma forma que os agrotóxicos causaram danos no epitélio do filamento, também podem causar o mesmo no epitélio lamelar.

Nos peixes dulcícolas geralmente as CCs são ricas em mitocôndrias e podem apresentar grande área de superfície quando necessário para a manutenção iônica, estão localizadas em regiões branquiais como epitélio do filamento, base aferente e eferente das lamelas e na região interlamelar. As CCs participam da osmorregulação via absorção de Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} . As CPV auxiliam as CCs na regulação iônica absorvendo Na^+ e no equilíbrio ácido-base excretando de H^+ , via trocador Na^+/H^+ (HIROSE et al., 2003). Portanto, a AFCC e densidade das CCs

estão diretamente relacionadas com a concentração iônica da água (FERNANDES E PERNA-MARTINS, 2002; MORON et al., 2003).

O aumento da densidade de CCs está relacionado as CCs em contato com a água (MORON et al., 2003), sendo recíproco com a diminuição. O aumento significativo na densidade de CCs em *P. lineatus* do grupo F, pode referir a um mecanismo compensatório das brânquias para garantir a eficiência osmorregulatória dos *P. lineatus* em decorrência das possíveis alterações iônicas causadas pela contaminação da água por fipronil, que resultou no desbalanço iônico dos animais e o mesmo foi observado por Paulino et al, 2012a para Atrazina utilizando a mesma espécie. Os peixes do grupo D, apesar de não apresentarem alterações do número de CCs em contato com a água no filamento branquial observados nas análises de MEV, estes apresentaram um aumento do número de CCs nas lamelas branquiais, indicando que possivelmente ocorreu alterações iônicas na presença do 2,4-D na água.

De modo geral, ocorreu a bioconcentração dos compostos estudados e alterações morfológicas leve a graves no epitélio branquial, ocorreram em grupos expostos ao 2,4-D e ao fipronil, isolados e em mistura, confirmando a hipótese inicial. O aumento da atividade enzimática da CAT e GST e danos celulares nos tecidos foram observados apenas em peixes exposto ao 2,4-D de forma isolada, enquanto apenas a atividade enzimática da GST foi alterada na exposição ao fipronil isolado e não ocorreu alterações em nenhum biomarcador bioquímico avaliado nos peixes expostos ao 2,4-D + fipronil. A mistura dos dois agrotóxicos causaram efeitos menos danoso aos animais do que quando na forma isolada, sendo contrária a hipótese inicial.

7. CONCLUSÃO

A exposição aguda (96 horas) de *P. lineatus*, ao 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, bioconcentraram nos peixes e causaram alterações bioquímicas e morfológicas em tecido branquial. O aumento da atividade enzimática da CAT e GST no grupo D indicou que o 2,4-D é uma molécula capaz de produzir ERO's e causar danos celulares, sendo um potencial indutor do estresse oxidativo. O aumento da atividade enzimática da GST nos grupos D e F mostrou que os

agrotóxicos foram metabolizados e possivelmente excretados. O contato dos agrotóxicos com o epitélio branquial estimulou mecanismos de defesa que promoveu alterações no fluxo sanguíneo e estruturais no epitélio branquial. As alterações morfológicas nos padrões celulares do epitélio branquial e na relação de densidade de CCs, pode ter ocorrido devido à perda ou ganho de íons resultando em alterações morfológicas para a manutenção do equilíbrio iônico do animal. Os *P. lineatus* expostos ao 2,4-D + fipronil, apresentaram danos menores ao organismo em comparação com os animais expostos aos 2,4-D e fipronil de forma isolada, no entanto, foi observado alterações morfológicas significativas no epitélio branquial.

Considerando que essas concentrações indicadas pelos fabricantes estejam sendo aplicadas de maneira correta, é esperado que com a frequente aplicação do 2,4-D e fipronil em plantações de cana-de-açúcar, ocorra um aumento das concentrações no ambiente, o que implicaria em exposições frequentes dos peixes pertencentes a esses compostos, que podem resultar em danos como os observados no presente trabalho. Diante desse cenário, é extremamente urgente que ocorra mudanças de percepção da sociedade como um todo sobre a importância da proteção dos ecossistemas aquáticos para a sobrevivência das espécies, e a liberação de fomentos governamentais que viabilizem medidas de proteção e uso sustentável dos recursos hídricos, concomitantemente o estímulo a pesquisa brasileira no âmbito ecológico que possam utilizar espécies nativas, gerando materiais e desenvolvendo técnicas de monitoramentos ambientais mais adequados ao clima neotropical brasileiro, pois sem a preservação dos recursos hídricos não há desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 15088: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. São Paulo, 2016.

AHRENS, W. H. Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America. 7th ed. Champaign, IL: Weed Science Society of America, p. 79. 1994.

ÁLVAREZ-MUÑOZ, D.; AL-SALHI, R.; ABDUL-SADA, A.; GONZÁLEZ-MAZO, E.; HILL, E.M. Global metabolite profiling reveals transformation pathways and novel metabolomic responses in *Solea senegalensis* after exposure to a non-ionic surfactant. *Environ. Sci. Technol.* v. 48, p. 5203–5210, 2014.

ÁLVAREZ-MUÑOZ, D., HUERTA, B., FERNANDEZ-TEJEDOR, M., RODRÍGUEZ-MOZAZ, S., BARCELÓ, D. Multi-residue method for the analysis of pharmaceuticals and some of their metabolites in bivalves. *Talanta* v. 136, p. 174–182, 2015.

Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico – ANA. (2020) Panorama das águas. Águas no mundo. Brasília, ANA, 2020. Disponível em: <https://www.ana.gov.br/panorama-das-aguas/agua-no-mundo>. Acesso em: 05 fev. 2020.

ANGELO, J.A.; OLIVEIRA, M. D.M.; GHOBIL, C. N.; Balança Comercial dos Agronegócios Paulista e Brasileiro de 2019. Análises e Indicadores do Agronegócio, São Paulo, v. 15, n. 1, jan. 2020. Disponível em: <http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=14751>. Acesso em: 6 fev. 2020.

ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia: Registros e autorização. Citação e referências a documentos eletrônicos. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/>> Acesso em: 22 Jun. 2020.

ARONZON, C. M.; SANDOVAL, M. T.; HERKOVITS, J.; PÉREZ-COLL, C. S. Stage-dependent toxicity of 2,4-Ddichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. *Wiley Periodicals. Environmental Toxicology*, v. 26, n. 4, p. 373-381, 2010.

AZANIA, C. A. M.; SCHIAVETTO, A. R.; ZERA, F. S.; LORENZATO, M.; AZANIA, A. A. M.; BORGES, A. Evaluation of herbicides applied on sugar cane during rainy season in Brazil. *R. Bras. Herb.*, v.9, n.1, p.9-16, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v.29, n. 1, p.113–123, 2006.

BAIRD S.; GARRISON A.; JONES J.; AVANTS J.; BRINGOLF R.; BLACK M. Enantioselective toxicity and bioaccumulation of fipronil in fathead minnows (*Pimephales promelas*) following water and sediment exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 32, n. 1, p. 222–227, 2012.

BEUTLER E. *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods*. Grune & Stratton, New York, USA., p.112-114, 1975.

BINDON, S. D.; FENWICK, J. C.; PERRY, S. F. Branchial chloride cell proliferation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: implications for gas transfer. *Canadian Journal of Zoology*, v.72, n.8, p.1395–1402, 1994.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. A. *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 195 p. 2007

BRADFORD M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.

BRITTELLI, M. R., CHEN, H. H. C.; MUSKA, C. F. Induction of N branchial (gill) neoplasms in the medaka fish (*Oryzias latipes*) by -methyl- '-nitro- -nitrosoguanidine. *Cancer Res.* v.45, p.3209- 3321, 1985.

CARPENTER, J.; ODUM, W. E. E MILLS, A. Leaf litter decomposition in a reservoir affected by acid mine drainage. *Oikos*, v.41, p.165-172, 1983.

CARPENTER, L. A.; EATON, D. L. The disposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.12, n.2, p. 169–173, 1983.

CARSON, R. Silent Spring. *In*: Carson, R. Rivers of death. Fortieth anniversary edition. Boston, New York, EUA, 1962. Cap. 9, p. 128-153

CASTILLO, L. E.; DE LA CRUZ, E.; RUEPERT, C. Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of Central America. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.16, n.1, p.41–51, 1997.

ÇELIK, A.; EKINCI, S. Y.; GÜLER, G.; YILDIRIM, S. In Vitro genotoxicity of fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test, and comet assay. *DNA and Cell Biology*, v.33, n.3, p.148–154, 2014.

CETESB (São Paulo). Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2017 [recurso eletrônico] / CETESB ; Coordenação geral Maria Helena R.B. Martins ; Coordenação técnica Nelson Menegon Jr., Marta Condé Lamparelli, Fábio Netto Moreno ; Coordenação cartográfica Carmen Lúcia V. Midaglia ; Equipe técnica Cláudio Roberto Palombo ... [et al.] ; Colaboradores Gisela de Assis Martini ... [et al.]. 96-97 p, 2018.

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. (2002). Recuperação de tecido branquial após exposição ao cobre e respostas a parâmetros sanguíneos em peixes tropicais *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.52, n.2, p.83–91, 2002.

CLASEN, B.; LORO, V. L.; CATTANEO, R.; MORAES, B.; LÓPES, T.; DE AVILA, L. A.; ... BALDISSEROTTO, B. Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: Implications for rice–fish cultivation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.77, p.45–51, 2012.

Comitê Internacional de Coordenação dos Países da Bacia do Prata – CIC Cuenca del Plata (2016). Uma bacia, cinco países, adaptado de UNEP – GEF 2003. Disponível em: <https://cicplata.org/es/una-cuenca-cinco-paises/#>. Acesso em: 20 ago 2020.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Série Histórica das Safras. Brasília, Cana-de-Açúcar – Indústria, 19 dez. 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>. Acesso em: 05 fev. 2020.

COSTA, C. R.; OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.

CRUZ, C.; CARRASCHI, S. P.; SHIOGIRI, N. S.; SILVA, A. F.; PITELLI, R. A.; MACHADO, M. R. F. Sensitivity, ecotoxicity and histopathological effects on neotropical fish exposed to glyphosate alone and associated to surfactant. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, v.8, n.3, p.25–33, 2016.

DE MORAIS, C. R.; BONETTI, A. M.; CARVALHO, S. M.; DE REZENDE, A. A. A.; ARAUJO, G. R.; SPANÓ, M. A. Assessment of the mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of fipronil insecticide in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, v.165, p.342–351, 2016.

DAVAL, M.; DIOT-DUPUY, F.; BAZIN, R.; HAINAULT, I.; VIOLLET, B.; VAULONT, S.; FOUFELLE, F. Anti-lipolytic action of amp-activated protein kinase in rodent adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v.280, n.26, p.25250–25257, 2005.

DE OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MATHIAS, M. I. C. Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v.64, n.6, p.569–573, 2012.

DINU, D.; MARINESCU, D.; MUNTEANU, M. C.; STAICU, A. C.; COSTACHE, M.; DINISCHIOTU, A. Modulatory effects of deltamethrin on antioxidant defense mechanisms and lipid peroxidation in *Carassius auratus* gibelio liver and intestine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.58, n.3, p.757–764, 2009.

DOS SANTOS, F. B.; FERREIRA, F. C.; ESTEVES, K. E. Assessing the importance of the riparian zone for stream fish communities in a sugarcane

dominated landscape (Piracicaba River Basin, Southeast Brazil). *Environmental Biology of Fishes*, v.98, n.8, p.1895–1912, 2015.

ENSIBI, C.; HERNÁNDEZ-MORENO, D.; MÍGUEZ SANTIYÁN, M. P.; DALY YAHYA, M. N.; RODRÍGUEZ, F. S.; PÉREZ-LÓPEZ, M. Effects of carbofuran and deltamethrin on acetylcholinesterase activity in brain and muscle of the common carp. *Environmental Toxicology*, v.29, n.4, p.386–393, 2012.

FERREIRA, A.; CYRINO, J. E. P.; DUARTE-NETO, P. J.; MARTINELLI, L. A. Permeability of riparian forest strips in agricultural, small subtropical watersheds in south-eastern Brazil. *Marine and Freshwater Research*, v.63, n.12, p.1272, 2012.

FERNANDES, M. N.; PERNA-MARTINS, S. A. Chloride cell responses to long-term exposure to distilled and hard water in the gill of the armored catfish, *Hypostomus tietensis* (Loricariidae). *Acta Zoologica*, v.83, n.4, p.321–328, 2002.

FREITAS, J. S., GIROTTO, L., GOULART, B. V., ALHO, L. DE O. G., GEBARA, R. C., MONTAGNER, C. C., ESPÍNDOLA, E. L. G. Effects of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109446, 2019.

FURIHATA, S.; KASAI, A.; HIDAKA, K.; IKEGAMI, M.; OHNISHI, H.; GOKA, K. Riscos ecológicos de contaminação por inseticida na água e sedimentos em torno dos arrozais irrigados fora da fazenda. *Poluição ambiental*, 2019.

GHASSEMI M.; FARGO, L.; PAINTER, P.; QUINLIVAN, S.; SCOFIELD, R.; TAKATA, A. Environmental Fates and Impacts of Major Forest Use Pesticides. P. A-101-148. U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances. Washington D.C., 1981.

VERGNEAU-GROSSET, C.; NADEAU, M. E.; GROFF, J. M. Fish oncology: diseases, diagnostics, and therapeutics. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* v.20, p.21 – 56, 2017.

GHISI, N. D. E. C.; RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; DE ALMEIDA, M. I. M.; RIBEIRO, C. A. DE O.; CESTARI, M. M. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. *Environmental Monitoring and Assessment*, v.180, n.1-4, p.589–599, 2010.

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

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

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol*, v.77, p.398–405, 1981.

HANSCH, C.; LEO, A.; HOEKMAN, D. Exploring QSAR Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Washington, DC: American Chemical Society, p. 37. 1995.

HAWKINS, W. E.; OVERSTREET, R. M.; PROVANCHA, M. J. 1984. Effects of space shuttle exhaust plumes on gills of some estuarine fishes: A light and electron microscopic study. *Gulf Research Reports*, v.7, p.297- 309, 1984.

HIGASHI, E. S. Bioensaios de toxicidade da água do efluente de biofiltros em areia como ferramenta de avaliação da qualidade da água. Dissertação (Mestrado em Eng. Hidráulica e saneamento). PPG-SHS- EESC/USP. São Carlos, SP, 2016.

HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; TAKEI, Y. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v.136, n.4, p. 593–620, 2003.

HOLDER, P. J.; JONES, A.; TYLER, C. R.; CRESSWELL, J. E. Fipronil pesticide as a suspect in historical mass mortalities of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, v.115, p.13033-13038, 2018.

HUBATSCH, I.; RIDDERSTRÖM, M.; MANNERVIK, B. Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochem. J.* v.330, n.1, p.175 - 179, 1998.

HU, X.; JIANG, H.; ZHANG, Y.; HUANG, F.; JIANG, M. Effect of fipronil on biogas production performance during anaerobic digestion of chicken manure and corn straw. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, p.1–10, 2019.

IBGE (2018) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588#resultado>> Acessado em: 07/06/2020.

KOCK-SCHULMEYER, M.; OLMOS, M.; DE ALDA, M. L.; BARCELÓ, D., Development of a multiresidue method for analysis of pesticides in sediments based on isotope dilution and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. v.1305, p.176-187, 2013.

KONWICK, B. J.; GARRISON, A. W.; BLACK, M. C.; AVANTS, J. K.; FISK, A. T. Bioaccumulation, biotransformation, and metabolite formation of fipronil and chiral legacy pesticides in rainbow trout. *Environ. Sci. Technol.* v.40, n.9, p.2930-2936, 2006.

KNOPP, D.; SCHILLER, F. Oral and dermal application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid sodium and dimethylamine salts to male rats: Investigations on absorption and excretion as well as induction of hepatic mixed-function oxidase activities. *Archives of Toxicology*, v.66, n.3, p.170–174, 1992.

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

LEWIS, S. E.; SILBURN, D. M.; KOOKANA, R. S.; SHAW, M. Pesticide Behavior, Fate, and Effects in the Tropics: An Overview of the Current State of Knowledge. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.64, n.20, p.3917–3924, 2016.

LIMA, F.; DEL CARMEN, B.; DÍAZ, A.; PINHEIRO, C.J.; GUIMARÃES, A. G. C. Morfologia das brânquias de *Steindachnerina brevipinna* (Eigenmann & Eigenmann, 1889) (Characiformes, Curimatidae). *Biotemas*. 22, 2011.

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

LINNAEUS, C. *Systema Naturae per Regna Tria Naturae secundum Classes, Ordinus, Genera, Species cum Characteribus, DiVerentiis Synonymis, Locis*. 10th edn., Vol. 1. Holmiae Salvii, 1758.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Use of fish as biomarkers for monitoring aquatic environment. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient., Curitiba*, v.8, n.4, p.469-484, 2010.

MacBean, C. *e-Pesticide Manual*. 15th ed., ver. 5.1, Alton, UK; British Crop Protection Council. Fipronil (120068-37-3)(2008-2010).

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants : a statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 42, p. 630-648, 1985.

MICHEL, N.; FREESE, M.; BRINKMANN, M.; POHLMANN, J. D.; HOLLERT, H.; KAMMANN, U.; HANEL, R. Fipronil and two of its transformation products in water and European eel from the river Elbe. *Science of The Total Environment*, v.568, p.171–179, 2016.

MILETTE, E. D. Industrial wastewater monitoring at a cane sugar factory. *Industry and environment. United Nations Environmental Programme (UNEP)*, v.1, p.30–34, 1991.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Sistema de Acompanhamento da Produção Canavieira - SAPCANA. Brasília: MAPA, 2020. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia>. Acesso em: 05 fev. 2020.

MORON, S. E.; OBA, E. T.; ANDRADE, C. A.; FERNANDES, M. N. Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the Erythrinids *Hoplias malabaricus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus*. *J. Exp. Zool.*, v. 298, p.93-104, 2003.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health (NTP). National Toxicology Program Chemical Repository Database. Research Triangle Park, North Carolina. 1992.

NESKOVID, N.; KARAN, V.; ELEZOVIC, I.; POLEKSIC, V.; BUDIMIR, M. Toxic effects of 2,4-D herbicide on fish. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v.29, n.2, p.265–279, 1994.

OLIVEIRA, S. E.; COSTA, P. M.; NASCIMENTO, S. B.; CASTRO, W. V.; RIBEIRO, R. I. M. DE A.; SANTOS, H. B.; THOMÉ, R. G. Atrazine promotes immunomodulation by melanomacrophage centre alterations in spleen and vascular disorders in gills from *Oreochromis niloticus*. *Aquatic Toxicology*, v.202, p.57–64, 2018.

OPPERHUIZEN, A. Bioconcentration and bioaccumulation: is a distinction necessary. In: Naget, R., R., Loskill, R. (Eds.), *Bioaccumulation in Aquatic Systems*. VCH Publishers, Weinheim, p.67–80, 1991.

ORUC, E. O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v.137, p.43-51, 2004.

O'NEIL, M. J. (ed). The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, p. 502. 2003

PASTORE, V. A. A. Desenvolvimento e validação de método de ensaio quantitativo e confirmatório por UHPLC/MS-MS para determinação de resíduos de avermectinas, monensina e fipronil em fígado bovino e de aves. Dissertação. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2018.

PAULINO, M. G.; SAKURAGUI, M. M.; FERNANDES, M. N. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. Chemosphere, v.86, p.1–7, 2012a.

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

PINER, P.; UNER, N. Oxidative and apoptotic effects of lambda-cyhalothrin modulated by piperonyl butoxide in the liver of *Oreochromis niloticus*. Environ. Toxicol, v.29, n.11, p.1275-1282, 2012.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Muller, R., Lloyd, R. (Eds.), Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish, 30. Fishing News Books, Oxford, p. 339–352, 1994.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MACHADO, S. D. O.; MARCHEZAN, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Predição teórica e monitoramento. Quim. Nova 28, p.605–609, 2005.

RORIZ, B. C.; SANTUCI, M. A.; GARCIA, R. G.; MARIANO, W. S. Hipóxia e exposição ao ar como agentes estressores. In: Tavares-Dias, M. & Mariano, W. S.

(Org). Aquicultura no Brasil: novas perspectivas. São Carlos, Editora Pedro & João, 2015.

SANCHEZ, W.; PALLUEL, O.; LAGADIC, L.; AIT-AISSA, S.; PROCHER, J. M. Biochemical effects of nonylphenol polyethoxylate adjuvante, Diquat herbicide and their mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Mar. Environ. Res.* 62, S29-S33, 2006.

SANTOS, T. G. Biomarcadores bioquímicos e genéticos para a detecção dos efeitos do herbicida atrazina no peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

SATOH, K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin.Chim. Acta.*, v.90, p.37-43, 1978.

SERRA-COMPTE, A.; ÁLVAREZ-MUÑOZ, D.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S. (2017) Multi-residue method for the determination of antibiotics and some of their metabolites in seafood. *Food and Chemical Toxicology.* v.104, p.3-13, 2017.

SIGMA-ALDRICH. Ficha de dados de segurança, de acordo com o regulamento (CE) no 1907/2006, versão 4.1, Cloreto de potássio, 2011.

SIMONATO, J. D. Efeitos da exposição à fração solúvel da gasolina em parâmetros bioquímicos e fisiológicos de *Prochilodus lineatus*. Universidade Federal de São Carlos. Programa interinstitucional de pós-graduação em Ciências Fisiológicas – UFSCar/Unesp. São Carlos, 2010.

SUN Q, Q. I. W.; YANG, J. J.; YOON, K. S.; CLARK, J. M.; PARK, Y. Fipronil promotes adipogenesis via AMPK α -mediated pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Food and Chemical Toxicology*, v.92, p.217–223, 2016.

SHAFEEQ, S.; MAHBOOB, T. Magnesium supplementation ameliorates toxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rat model. *Human & Experimental Toxicology*, 096032711987442, 2019.

TAVARES, D.; PAULINO, M. G.; TEREZAN, A. P.; BATISTA FERNANDES, J.; GIANI, A.; FERNANDES, M. N. Osmoregulatory disturbance in Neotropical fish exposed to the crude extracts of the cyanobacterium, *Radiocystis fernandoi*. *Aquatic Toxicology*, 216, 105315, 2019.

TREVISAN, D.; MOSCHINI, L. Análise da Conectividade dos Fragmentos na Bacia Hidrográfica do Tietê-Jacaré. *Rev. Gestão Água da América Lat*, v.15, p.6–6, 2018.

TRUMP, B. F.; BEREZESKY, I. K.; CHANG, S. H.; PHELPS, P. C. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol*, v.25, p.82-88, 1997.

UNITED STATES. (2018) Environmental Protection Agency (USEPA). Aquatic Life Benchmarks and Ecological Risk Assessments for Registered Pesticides. Office of Pesticide Programs. Disponível em: < <https://nepis.epa.gov/> > . Acesso em: abr. 2020.

VERSCHUEREN, K. Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals. Volumes 1-2. 4th ed. John Wiley & Sons. New York, NY, p. V1: 779. 2001

VIEIRA, C. E. D.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. The pyrethroid λ -cyhalothrin induces biochemical, genotoxic, and physiological alterations in the teleost *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, v.210, p.958–967, 2018.

VIZZOTTO, E. Radicais livres e mecanismos de proteção antioxidante. Disciplina de Fundamentos Bioquímicos dos Transtornos Metabólicos, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 10p, 2017.

WALTERS, J. Environmental Fate of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. Environmental Monitoring and Pest Management, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA, USA, 2011. <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/24-d.pdf>.

WILHELM FILHO, D. W. Fish antioxidant defenses—a comparative approach. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.29, p.1735–1742, 1996.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; ZANIBONI-FILHO, E.; PEDROSA, R. C. Efeito de diferentes tensões de oxigênio no ganho de peso, conversão alimentar e status antioxidante em piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*, v.244, n.1-4, p.349-357, 2005.

YALKOWSKY, S. H.; HE, YAN; JAIN, P. Handbook of Aqueous Solubility Data Second Edition. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 453. 2010.

YAN, L.; GONG, C.; ZHANG, X.; ZHANG, Q.; ZHAO, M.; WANG, C. Perturbation of metabonome of embryo/larvae zebrafish after exposure to fipronil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.48, p.39–45, 2016.

YASHPAL, M.; KUMARA, U.; MITTAL, S.; MITTAL, A. K. Surface architecture of the mouth cavity of a carnivorous fish *Rita rita* (Siluriformes, Bagridae). *Belgian Journal of Zoology*, v.136, n.2, p. 155-162, 2006.

ZHANG, Y.; ZHAO, Y. G.; CHENG, H. L.; MUHAMMAD, N.; CHEN, W. S.; ZENG, X. Q.; ZHU, Y. Fast determination of fipronil and its metabolites in seafood using PRiME pass-through cleanup followed by isotope dilution UHPLC-MS/MS. *Anal Methods*, v.10, p.1673–1679, 2018.