



30 UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
31 CAMPUS SÃO CARLOS PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE  
32 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCar-UNESP  
33

34  
35  
36  
37 **Exposição da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) ao triclorfon e a**  
38 **hipercarbia, isolados ou associados**

39  
40  
41 **ISRAEL LUZ CARDOSO**  
42  
43

44 Tese de Doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional  
45 de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas associação ampla  
46 UFSCAR/UNESP, para obtenção do título de Doutor em  
47 Ciências, área de concentração em Ciências Fisiológicas.

48 **Orientador:** Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin

49 **Co-orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Fernanda Garcia Sampaio

50  
51  
52  
53  
54  
55  
56 São Carlos – SP  
57 Abril, 2021  
58



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Israel Luz Cardoso, realizada em 30/04/2021.

### Comissão Julgadora:

  
Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin (UFSCar)

Prof. Dr. Cleo Alcântara Costa Leite (UFSCar)

Profa. Dra. Marcia Mayumi Ishikawa (EMBRAPA)

Profa. Dra. Cristiane Fatima Meldau de Campos Amaral (UEMS)

Prof. Dr. Claudio Martin Jonsson (EMBRAPA)

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 Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

Porquanto, melhor é a sabedoria do que as mais finas joias, e

80

de tudo o que se possa ambicionar, absolutamente nada se

81

compara a ela!

82

83

Provérbios 8:12

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

### **Gratidão ao Eterno Deus**

98

Eu agradeço a Deus, por sempre estar comigo nessa jornada. Em meio de muitas intempéries que passei em cada etapa dessa caminhada, Deus esteve comigo em todos os momentos, por isso não me abalei diante das adversidades. Assim, eu posso dizer: "Até aqui me ajudou o Senhor" (1 Samuel 7:12).

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

## 109 **Agradecimentos**

110 Em especial:

111       Aos meus pais, familiares e amigos que acompanharam de perto o meu progresso  
112 durante o desenvolvimento do doutorado. A todos eles eu deixo aqui o meu muito obrigado.

113

114       Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin, pela oportunidade de trabalhar  
115 em sua equipe. Durante esse período de aprendizagem seus ensinamentos contribuíram para o  
116 meu desenvolvimento profissional e pessoal. Obrigado pela confiança depositada, orientação,  
117 compreensão e paciência.

118

119       À minha Co-orientadora, Dra. Fernanda Garcia Sampaio, por abraçar a proposta feita  
120 pelo Dr. Francisco Tadeu Rantin de orientação do meu projeto na Embrapa Meio Ambiente. As  
121 suas orientações foram fundamentais para a realização desse trabalho. Obrigado pelos  
122 ensinamentos, conhecimentos compartilhados e amizade construída.

123

124       Aos meus supervisores na Embrapa, Márcia Mayumi Ishikawa e Cláudio Martin  
125 Jonsson, pelo suporte técnico para o desenvolvimento desta pesquisa. A vivência no grupo de  
126 pesquisa liderado por vocês foi, de forma ímpar, essencial para o meu crescimento profissional  
127 e científico.

128       Ao professor Dr. Cléo Leite, por permitir participar do seu grupo de pesquisa. As  
129 reuniões de terças feiras ou as conversas nos corredores e laboratórios foram importantes para  
130 o meu desenvolvimento senso crítico dentro da ciência.

131

132       Aos analistas e técnicos, Ana Lúcia Marigo, Henrique Vallin, Gabriel Mascarin, Gino  
133 Zambão e Marisa Pereira Carvalho pela amizade, parceria e apoio técnico.

134 Às amigas de doutorado, Michelly Pereira Soares e Carol De Ângelis, pelas conversas,  
135 sugestões e apoio técnico indispensáveis para o desenvolvimento desta pesquisa. Acima de  
136 tudo, pela amizade que criamos que permitiu um ambiente descontraído e alegre em todo tempo.

137 Aos amigos da Embrapa, Giovanni Ferri, Victor Rossi, Juliana Gill, pelo auxílio nas  
138 coletas e análises dos dados, incentivos, apoio moral e momentos de descontração.

139

140 Agradeço

141 A piscicultura Polettine, por ser nossa parceira de pesquisa e pelos peixes doados para  
142 uso nos experimentos.

143 À instituição de pesquisa Embrapa Meio Ambiente, que disponibilizou a sua  
144 infraestrutura, laboratórios, ferramentas tecnológicas juntos com a sua equipe de profissionais  
145 especializados para desenvolvimento dessa pesquisa.

146 Ao programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas e o Departamento de Ciências  
147 Fisiológicas.

148 Em especial aos professores. Dr. Cléo Alcantara Costa Leite de Alcântara e Dra. Marisa  
149 Narciso Fernandes por permitirem o uso dos equipamentos dos seus laboratórios.

150

151 A coordenação de aperfeiçoamento pessoal de nível superior – CAPES, por me conceder  
152 uma bolsa de estudo para a realização do doutorado.

153

154 Finalmente, agradeço a todas as pessoas que colaboraram diretamente ou indiretamente para a  
155 realização desse trabalho.

156

157

158

160 O triclorfon (TCF) é amplamente utilizado na aquicultura brasileira e mundial como  
161 medicamento para controle e tratamento de ectoparasitas em peixes. O TCF é um pesticida com  
162 toxicidade moderada em vertebrados e, portanto, a sua aplicação pode ser um intensificador dos  
163 danos sobre as respostas fisiológicas e bioquímicas em peixes que já enfrentam problemas na  
164 qualidade ambiental como o acúmulo de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Neste estudo, adotou-se  
165 uma abordagem de investigação considerando os efeitos do TCF sobre a saúde dos peixes de  
166 forma isolada ou em associação com a alta concentração de CO<sub>2</sub> ([CO<sub>2</sub>]) na água. Dois  
167 experimentos foram desenvolvidos para investigar tais efeitos. No experimento 1, investigou-  
168 se a exposição da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) ao TCF por 96 h. Neste estudo  
169 registramos mudanças comportamentais, metabólicas e hormonais que modificaram os padrões  
170 de resposta do sistema de defesa imune e enzimático nos tecidos muscular e hepático. Houve o  
171 aumento do cortisol plasmático e glicose combinados com a redução da atividade da  
172 acetilcolinesterase no músculo e tecido hepático após 96 h de exposição ao TCF, indicando  
173 estresse químico. Verificou-se um aumento do número de leucócitos, trombócitos, atividade  
174 respiratória de monócitos, lisozima e leucócitos. O aumento na atividade da glutathione-S-  
175 transferase (GST) no tecido hepático após o período de contaminação química sugere que esta  
176 enzima tem participação direta no processo de desintoxicação do TCF nos peixes. A partir dos  
177 resultados obtidos, concluímos que o TCF afeta os parâmetros fisiológicos da tilápia do Nilo, o  
178 que pode gerar efeitos irreversíveis de recuperação do quadro clínico. No experimento 2,  
179 investigou-se a exposição da tilápia do Nilo ao TCF isolado ou associado a alta [CO<sub>2</sub>] por 48  
180 h. Verificou-se que a associação das condições experimentais intensificou os danos sobre o  
181 tecido sanguíneo dos peixes. A redução do número de eritrócitos (RBC) e hematócrito (Ht)  
182 revela uma deficiência no transporte de O<sub>2</sub>, compensado pelo aumento da hemoglobina (Hb).  
183 A redução dos leucócitos e trombócitos indica menor resistência imunológica para combater  
184 doenças patogênicas ou menor capacidade de recuperação após danos sobre o tecido sanguíneo.  
185 O aumento da lisozima sugere uma ação do sistema imunológico inespecífico no combate a  
186 infecções primárias nos peixes. Houve uma redução na atividade da acetilcolinesterase (AChE)  
187 no tecido muscular, indicando um distúrbio no sistema colinérgico neuromotor dos peixes. O  
188 sistema de defesas antioxidantes avaliado pelo marcador de lipoperoxidação (LPO) e atividade  
189 das enzimas catalase (CAT) e GST dos peixes foram alterados pela ação do TCF isolado ou  
190 associado com a alta [CO<sub>2</sub>]. O aumento da LPO sugere que o TCF e altas [CO<sub>2</sub>] na água são  
191 fatores pró-oxidantes. Portanto, a regulação positiva da atividade da CAT e GST verificada  
192 nesse estudo pode ser vista como uma resposta do sistema antioxidante para manter a  
193 concentrações de espécie reativa de oxigênio (ERO) em níveis não prejudiciais para o tecido  
194 hepático. Este estudo evidencia a necessidade de busca por novos compostos para o tratamento  
195 de parasitasxx que tenha nenhum impacto sobre a saúde dos peixes. Além disso, considerando  
196 que níveis elevados de CO<sub>2</sub> pode ocorrer na piscicultura intensiva, principalmente, em sistema  
197 de recirculação de água, recomendamos que os níveis de CO<sub>2</sub> dissolvido sejam monitorados  
198 regularmente nos tanques de cultivo.

199

200 **Palavras chaves:** Aquicultura, CO<sub>2</sub> da água, pesticida, toxicologia, biomarcadores de efeito

201 **Abstract**

202 Trichlorfon (TCF) is widely used in Brazil and worldwide aquaculture as a compound to control  
203 ectoparasites in fish. However, TCF is a pesticide with moderate toxicity in vertebrates and,  
204 therefore, its application can be an intensifier of damage on the physiological and biochemical  
205 responses in fish already facing problems in environmental quality such as the accumulation of  
206 carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). Thus, in this study, an investigation approach was adopted considering  
207 the effects of TCF on the health of fish isolated or associated with high [CO<sub>2</sub>] in the water. Two  
208 experiments were developed to investigate such effects: Experiment 1: Nile tilapia exposure to  
209 TCF for 96 h was investigated. In this study, we registered behavioral, metabolic and hormonal  
210 changes that modified the response patterns of the immune and enzymatic defense systems in  
211 the muscle and liver tissues. There was an increase in plasma cortisol and glucose combined  
212 with a reduction in acetylcholinesterase activity in muscle and liver tissue after 96 h of exposure  
213 to TCF, indicating chemical stress. In response to this harmful situation, we observed changes  
214 in the immune system that lead to an increase in the number of leukocytes, thrombocytes,  
215 monocyte respiratory activity, lysozyme and leukocytes. In addition, we associate the increased  
216 activity of GST in liver tissue as a strategy used by fish to combat the effects of TCF. Therefore,  
217 we conclude that the TCF affects the physiological parameters of Nile tilapia, which can  
218 generate irreversible effects of recovery of the clinical condition. In experiment 2: Nile tilapia  
219 exposure to TCF alone or associated with discharge [CO<sub>2</sub>] for 48 h was investigated. In this  
220 study, we found that the association of experimental conditions intensified the damage to the  
221 blood tissue of fish. The reduction in the number of RBC and Ht (%) reveals a deficiency in the  
222 transport of O<sub>2</sub>, offset by the increase in Hb. The reduction in leukocytes and thrombotics  
223 indicates less immunological resistance to fight pathogenic diseases or less capacity to recover  
224 after damage to the blood tissues. The increase in lysozyme suggests an increase in the action  
225 of the nonspecific immune system to fight primary infections in fish. The study also showed  
226 that TCF affects the neuromotor cholinergic system of fish by inhibiting acetylcholine (AChE).  
227 The antioxidant defense system assessed by the lipoperoxidation marker (LPO) and activity of  
228 the enzymes catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST) in fish were also altered by  
229 the action of TCF alone or associated with discharge [CO<sub>2</sub>]. The increase in OLP suggests that  
230 TCF and high [CO<sub>2</sub>] in water are pro-oxidant factors and, therefore, the positive regulation of  
231 CAT and GST activity was to maintain LPO concentrations at levels that are not harmful to  
232 liver tissue. Therefore, our study highlights the need to search for new compounds that could  
233 replace TCF, having no or few adverse effects on fish species. In addition, considering that high  
234 levels of CO<sub>2</sub> occur in intensive production, mainly in a water recirculation system, we  
235 recommend that the levels of dissolved CO<sub>2</sub> should be monitored regularly in the cultivation  
236 tanks.

237

238 **Key words:** Aquaculture, CO<sub>2</sub> from water, pesticide, toxicology, effect biomarkers

239

240

241

242

## SUMÁRIO

243		
244	Capítulo I	
245	1. Introdução.....	1
246	2. Fontes de CO <sub>2</sub> na aquicultura.....	3
247	2.1 <i>Metabolismo dos peixes</i> .....	3
248	2.2 <i>Mudanças climáticas, alto CO<sub>2</sub> atmosférico: implicações sobre a aquicultura</i> .....	4
249	3. Uso de produtos químicos na aquicultura.....	6
250	4. Triclorfon.....	8
251	5. Toxicidade aguda do triclorfon nos peixes.....	10
252	6. O uso de biomarcadores na avaliação de condições estressantes.....	11
253	6.1 Biomarcadores de efeito ao TCF.....	12
254	a) <i>Parâmetros Hematológicos</i> .....	12
255	b) <i>Acetilcolinesterase (AChE)</i> .....	14
256	c) <i>Metabolismo oxidativo</i> .....	16
257	6.2 Biomarcadores de efeito a altas [CO <sub>2</sub> ].....	18
258	7. Consideração da espécie em estudo, tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	20
259	8. Justificativa.....	22
260	9. Objetivos.....	23
261	9.1 Hipóteses testadas:.....	23
262	10. Referências bibliográficas.....	24
263	Capítulo II.....	35
264	Resumo.....	35
265	1. Introdução.....	37
266	2. Material e métodos.....	38
267	2.1 <i>Abastecimento e aclimação dos peixes</i> .....	38
268	2.2 <i>Triclorfon</i> .....	39
269	2.3 <i>Protocolo experimental</i> .....	39
270	2.4 <i>Parâmetros hematológicos</i> .....	40
271	2.5 <i>Parâmetros de estresse</i> .....	41
272	2.6 <i>Parâmetros imunológicos</i> .....	41
273	2.7 <i>Acetilcolinesterase (AChE)</i> .....	41
274	2.8 <i>Biomarcadores do estresse oxidativo hepático</i> .....	42
275	2.9 <i>Análise estatística</i> .....	43
276	3. Resultados.....	43
277	3.1 Hematologia.....	43
278	3.2 Sistema imunológico.....	43
279	3.3 Acetilcolinesterase (AChE).....	44
280	3.4 Estresse oxidativo.....	47
281	4. Discussão.....	47
282	5. Conclusão.....	51
283	6. Referências.....	52
284	Capítulo III.....	57
285	Resumo.....	57
286	1. Introdução.....	58
287	2. Material e métodos.....	60
288	2.1 <i>Aclimação dos peixes</i> .....	60
289	2.2 <i>Protocolo experimental</i> .....	61

290	2.3 Parâmetros hematológicos .....	62
291	2.4 Parâmetros do estresse .....	62
292	2.5 Parâmetros imunológicos .....	63
293	2.6 Acetilcolinesterase (AChE) .....	65
294	2.7 Biomarcadores de estresse oxidativo .....	64
295	2.8 Análise estatística .....	65
296	3. Resultados.....	66
297	4. Discussão .....	67
298	5. Conclusão .....	75
299	6.Referências .....	75
300	CAPÍTULO IV .....	88
301	Considerações Finais: .....	88
302		
303		
304		
305		
306		
307		
308		
309		
310		
311		
312		
313		
314		
315		
316		
317		
318		
319		
320		

## ÍNDICE DE TABELAS

322	Tabela 1: Hemoglobina (Hb; g.dL <sup>-1</sup> ), hematócrito (Ht;%), concentração média de hemoglobina	
323	celular (CHCM;%), glóbulos vermelhos (RBC; $\mu\text{L}^{-1}$ ), proteína plasmática total (TPP),	
324	concentrações plasmáticas de glicose (glicose) de tilápia do Nilo exposta a Triclorfom na	
325	concentração de 0,5 mg.L <sup>-1</sup> às 96h. Os valores são média $\pm$ erro padrão. Médias na mesma linha	
326	com sobrescritos (*) são significativamente diferentes (P <0,05) .....	44
327	Tabela 2: Parâmetros físico-químicos das unidades experimentais .....	83
328	Tabela 3: Hemoglobina (Hb; g / dL <sup>-1</sup> ), hematócrito (Ht;%), concentração média de hemoglobina	
329	celular (CHCM;%), glóbulos vermelhos (RBC; $\mu\text{L}^{-1}$ ), proteína plasmática total (TPP), plasma	
330	concentrações de glicose (glicose), concentrações de cortisol plasmático (cortisol) de tilápia do	
331	Nilo exposta por 48 horas em água livre de TCF e condição normal de CO <sub>2</sub> (Ctrl), triclorfon na	
332	concentração de 0,5 mg.L <sup>-1</sup> (TCF), água com alto teor de CO <sub>2</sub> (H-CO <sub>2</sub> ), e interação entre TCF	
333	e água com alto teor de CO <sub>2</sub> (TCF <sub>H-CO<sub>2</sub></sub> ). .....	84
334		
335		
336		
337		
338		
339		
340		
341		
342		
343		
344		
345		
346		
347		
348		
349		

351	Figura 1. Formula estrutural do triclorfon (ANVISA, 2009).... <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
352	Figura 2. Sinapse colinérgica na presença e ausência de um inibidor da acetilcolinesterase	
353	(IACHe) (Araújo et al., 2016) ..... <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
354	Figura 3. Contagem de leucócitos (A), trombócitos (B), monócitos (C) e linfócitos (D) em	
355	tilápia do Nilo do Controle (Ctrl) e exposta a 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de triclorfon por 96 h (TCF <sub>96h</sub> ). Barras	
356	representam médias ± erro padrão. * Diferenças entre os grupos (P <0,05) .....45	
357	Figura 4. Atividade da lisozima (A) e atividade respiratória dos leucócitos (B) da tilápia do Nilo	
358	do Controle (Ctrl) e exposta a 0,5 mg.L <sup>-1</sup> Triclorfon às 96 h (TCF <sub>96h</sub> ). Barras representam	
359	médias ± erro padrão. * Diferenças entre os grupos (P <0,05) .....45	
360	Figura 5. Atividade de acetilcolinesterase do músculo branco e do fígado (AChE; nmol.Min <sup>-1</sup>	
361	.mg proteína <sup>-1</sup> ) da tilápia do Nilo do Controle (Ctrl) e exposta a 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de Triclorfon por	
362	96 h (TCF <sub>96h</sub> ). Barras representam médias ± erro padrão. * Diferenças entre os grupos (P <0,05)	
363	.....46	
364	Figura 6. Níveis de peroxidação lipídica (LPO; nmol g tecido <sup>-1</sup> ), atividade da catalase (CAT;	
365	BU mg.proteína <sup>-1</sup> ) e Glutathione-S-transferase (GST; nmol mgPT <sup>-1</sup> ) no tecido hepático de tilápia	
366	do Nilo do Controle e exposta a 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de Triclorfon por 96 h (TCF <sub>96h</sub> ). Barras representam	
367	médias ± erro padrão. * Diferenças entre os grupos (P <0,05) .....46	
368	Figura 7. Leucócitos (A), contagem de trombócitos (B), atividade respiratória de leucócitos (C),	
369	atividade de lisozima (D) da tilápia do Nilo exposta por 48 horas em água livre de TCF e em	
370	condição normal de CO <sub>2</sub> (Ctrl), triclorfon na concentração de 0,5 mg.L <sup>-1</sup> (TCF); água com alto	
371	teor de CO <sub>2</sub> (H-CO <sub>2</sub> ), e interação entre TCF e água com alto teor de CO <sub>2</sub> (TCF <sub>H-CO2</sub> ). Barras	
372	representam médias ± desvio padrão. Letras pequenas indicam diferenças entre os grupos para	
373	p <0,05. ....85	
374	Figura 8. Atividade da acetilcolinesterase muscular (AChE; nmol. Min mg proteína <sup>-1</sup> ) da tilápia	
375	do Nilo exposta por 48 h em água livre de TCF e condição de CO <sub>2</sub> normal (Ctrl), triclorfon na	
376	concentração de 0,5 mg.L <sup>-1</sup> (TCF); água com alto CO <sub>2</sub> (H-CO <sub>2</sub> ) e interação entre TCF e água	
377	com alto teor de CO <sub>2</sub> (TCF <sub>H-CO2</sub> ). Barras representam médias ± desvio padrão. Letras pequenas	
378	indicam diferenças entre os grupos para p <0,05. ....86	
379	Figura 9. Níveis de peroxidação lipídica (LPO; nmol g tecido <sup>-1</sup> ), atividade da catalase (CAT;	
380	BU mg proteína <sup>-1</sup> ) e atividade da glutathione S-transferase (GST; nmol mgPT <sup>-1</sup> ) no tecido	
381	hepático de tilápia do Nilo exposta por 48-h em água livre de TCF e condição normal de CO <sub>2</sub>	
382	(Ctrl); triclorfon na concentração de 0,5 mg.L <sup>-1</sup> (TCF); água com alto CO <sub>2</sub> (H-CO <sub>2</sub> ) e interação	
383	entre TCF e água com alto teor de CO <sub>2</sub> (TCF <sub>H-CO2</sub> ). Barras representam médias ± desvio padrão.	
384	Letras pequenas indicam diferenças entre os grupos para p <0,05. ....87	

# Capítulo I

---

385

386

## 387 1. Introdução

388 A aquicultura é uma indústria com expressão significativa no setor agropecuário no que  
389 se refere à capacidade de produzir proteína animal para consumo humano, gerar fonte de renda  
390 e proporcionar meio de subsistência para a população. Atualmente, a aquicultura fornece ~50  
391 % do pescado consumido globalmente (Fazio, 2019), expandindo nos próximos anos, espera-  
392 se que essa atividade seja a principal fonte de pescado destinado para o consumo da população  
393 mundial (FAO, 2018). A projeção esperada para a produção de pescado pela aquicultura em  
394 2030 é de 109 milhões de toneladas, isso representa um aumento de 32 % (26 milhões de  
395 toneladas) em relação ao ano de 2018 (FAO, 2020).

396 O aumento das fazendas aquícolas que adotam o sistema intensivo como principal meio  
397 de produção, é um dos fatores que tem contribuído para o desenvolvimento e expansão da  
398 aquicultura nos últimos anos. Neste sistema de produção, é preconizado a alta densidade para  
399 obter maior produtividade de animal por área. Este método de produção conta com o uso de  
400 tecnologias sofisticadas para estimular o desenvolvimento dos peixes, desde o estágio inicial  
401 de alevino até alcançar as condições ideais para o consumo. As principais tecnologias que  
402 facilitam esse método de produção incluem o uso de rações nutricionalmente completas,  
403 fertilizantes, linhagens de animais aprimorados geneticamente, medicamentos veterinários,  
404 aeração mecânica e recirculação de água entre outros (Henriksson et al., 2018).

405 A aquicultura intensiva é altamente dependente dos nutrientes de origem externa como  
406 principal fonte alimentar. Uma alimentação inadequada, associada com altas densidades de  
407 estocagem, representam muitas vezes um risco para a qualidade da água do ambiente de cultivo.  
408 Condições inadequadas da qualidade da água podem resultar em prejuízos ao crescimento,  
409 reprodução, saúde, sobrevivência e na qualidade da proteína dos peixes, comprometendo o

410 desenvolvimento e o sucesso da produção (Leira et al., 2017). Por essa razão, para garantir que  
411 os peixes tenham as condições ambientais ideais, o monitoramento da qualidade da água é  
412 imprescindível.

413 Dentre os parâmetros físicos e químicos considerados essenciais na avaliação da  
414 qualidade da água dos tanques de cultivo, a concentração de dióxido de carbono ( $[CO_2]$ )  
415 dissolvido, geralmente, tende a ser ignorada como um parâmetro crítico para a saúde e  
416 desempenho dos peixes. Assim, poucas instalações em fazendas aquícolas monitoram  
417 regularmente a  $[CO_2]$  na água. A alta  $[CO_2]$  é considerada um fator de restrição à produção de  
418 peixes em sistema de aquicultura, devido às sensibilidades fisiológicas dos peixes ao aumento  
419 desse gás na água circundante (Hu et al., 2011; Aslam et al., 2019). Portanto, operar uma  
420 piscicultura em condições limitantes de qualidade da água pode reduzir a lucratividade da  
421 produção, pois problemas com os parâmetros abiótico da água podem ser letais ou levar a  
422 deterioração da saúde dos peixes, reduzindo o seu crescimento e aumentando o risco de infecção  
423 (Molleda, 2008).

424 Outro aspecto preocupante na piscicultura intensiva, envolve o uso crescente de  
425 produtos químicos, objetivando melhorar as condições da água, bem como controlar vetores de  
426 doenças. A maioria desses produtos químicos foram originalmente sintetizados para combater  
427 e/ou controlar pragas na agricultura, enquanto outros foram retirados da engenharia sanitária,  
428 medicina humana e indústria (Boyd & McNevim, 2015). Os efeitos toxicológicos desses  
429 químicos em sua grande maioria são desconhecidos em organismos aquáticos, aumentando o  
430 risco de contaminação. Além disso, por não serem desenvolvidos especificamente para a  
431 aquicultura, a toxicidade das moléculas químicas pode ser influenciada por meio da interação  
432 com os parâmetros físicos e químicos da água tornando necessário uma maior compreensão  
433 desta dinâmica.

434 A aplicação de produtos químicos pode ocorrer em momentos de altas [CO<sub>2</sub>] nos  
435 tanques de cultivo de peixes, mas, apesar disso, nossa compreensão das interações entre esses  
436 dois estressores é limitada. Uma vez desconhecido esse efeito sinérgico entre o produto químico  
437 e o meio aquoso, é possível que a intoxicação possa ocorrer em dosagens consideradas até então  
438 não tóxicas para os animais. Tal fato associado com o uso repetido e indiscriminado de produtos  
439 químicos, como aplicações em altas concentrações, pode corroborar para o desenvolvimento de  
440 um quadro de intoxicação irreversível dos peixes no sistema de cultivo (Lopes et al., 2006).

## 441 **2. Fontes de CO<sub>2</sub> na aquicultura**

### 442 *2.1 Metabolismo dos peixes*

443 O CO<sub>2</sub>, é encontrado na água como um gás dissolvido. Suas origens no meio aquático  
444 são: atmosfera, chuva, decomposição orgânica, respiração de organismos ou escoamento de  
445 fertilizantes (Sunda & Cai, 2012). O nível de CO<sub>2</sub> da água dos corpos hídricos naturais são  
446 geralmente baixos. Entretanto, em sistema de criação intensiva de peixes, o CO<sub>2</sub> derivado do  
447 metabolismo dos peixes pode ser um fator preponderante para o acúmulo desse gás na água  
448 circundante. Algumas circunstâncias podem contribuir para o acúmulo do CO<sub>2</sub> nos tanques de  
449 cultivo, isso inclui altas densidades de peixes, baixas taxas de troca de água por biomassa de  
450 peixe e alta decomposição da matéria orgânica oriunda das sobras de rações (Summerfelt et al.,  
451 2000). Estima-se que no período noturno, em função do decréscimo da fotossíntese, a  
452 concentração de CO<sub>2</sub> na água dos tanques de cultivo pode alcançar valores em torno de 10 – 15  
453 mg/L<sup>-1</sup> (Hargreaves & Bruson, 1996).

454 Os peixes produzem CO<sub>2</sub> como resultado normal do metabolismo aeróbico e excretam  
455 esse gás pelas brânquias para o ambiente (Good et al., 2010). O transporte de CO<sub>2</sub> pelo corpo  
456 dos peixes até sua excreção tem sido explicado pelo efeito de Bohr e Haldane que vinculam o  
457 transporte de CO<sub>2</sub> ao O<sub>2</sub>, onde a remoção de CO<sub>2</sub> dos tecidos aumenta a distribuição de O<sub>2</sub> e a  
458 descarga de O<sub>2</sub> facilita a remoção de CO<sub>2</sub> dos tecidos (Bohr et al., 1904; Christiansen et al.,

459 1914). A partir dessa correlação entre consumo de O<sub>2</sub> e produção de CO<sub>2</sub> a taxa de excreção de  
460 CO<sub>2</sub> nos tanques de cultivo pode ser estimada.

461 Em condição de confinamento, Forsberg (1997) relatou que a taxa de excreção de CO<sub>2</sub>  
462 em salmão do atlântico (*Salmo salar*) durante o período de jejum foi de 0,9 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>,  
463 aumentando para 2,1 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> após alimentação máxima; equivalente a uma taxa de  
464 excreção pós-prandial de 17 g CO<sub>2</sub> MJ<sup>-1</sup> de alimentação. Esses resultados, portanto, mostram  
465 que a alimentação dos peixes leva à excreção de grandes quantidades de CO<sub>2</sub> metabólico para  
466 a água. Considerando que o adensamento dos tanques resulta numa alta frequência de  
467 arraçoamento, a [CO<sub>2</sub>] metabólico pode aumentar substancialmente nos tanques de cultivo. Os  
468 processos de decomposição de resíduos de ração, fezes e mortalidade também contribuirá ainda  
469 mais para a liberação do CO<sub>2</sub> no sistema (Skov, 2019).

## 470 *2.2 Mudanças climáticas e alto CO<sub>2</sub> atmosférico: implicações sobre a aquicultura*

471 A [CO<sub>2</sub>] está entre os componentes de mudanças climáticas que tem atraído atenção  
472 global devido aos seus efeitos diretos sobre dinâmica química dos corpos hídricos. Nas últimas  
473 décadas a [CO<sub>2</sub>] na atmosfera teve um aumento significativo, passando de 310 ppm em 1950  
474 para 370 ppm nos anos 2000, isso representa um aumento de  $\cong 60$  ppm de CO<sub>2</sub> atmosférico no  
475 intervalo de 50 anos (ESRL, 2021). O ESRL registrou em 2020 uma concentração de 411 ppm  
476 de CO<sub>2</sub> atmosférico, esse resultado quando comparado com o ano 2000, indica um aumento de  
477  $\cong 40$  ppm em pouco mais de 20 anos. A tendência é que teremos um aumento substancial do  
478 CO<sub>2</sub> atmosférico projetado para o final deste século, passando de  $\sim 400$   $\mu$ atm registrados nos  
479 dias atuais para uma faixa de 800 – 1000  $\mu$ atm em 2100 (Ellis et al., 2017).

480 O aumento do CO<sub>2</sub> atmosférico acarreta uma variedade de perigos para os ecossistemas  
481 aquáticos e, se essa tendência não for interrompida, colocará uma pressão adicional sobre os  
482 corpos hídricos que irá exigir cada vez mais medidas adaptativas para explorar as oportunidades  
483 e minimizar os impactos nos sistemas de pesca e aquicultura (Cochrane, et al., 2009; Weiss et

484 al., 2018). Em termos de impactos diretos do aumento da [CO<sub>2</sub>] sobre a aquicultura, os estudos  
485 mostraram que o aumento da pressão parcial de CO<sub>2</sub> acima do nível atmosférico atual mudaria  
486 a dinâmica de alguns parâmetros químicos da água essenciais para a vida dos peixes (Ishimatsu,  
487 2005; Harley et al., 2006; Ficke et al., 2007; Rijnsdorp et al., 2009; Ou et al., 2015).

488 Os níveis em que os efeitos do CO<sub>2</sub> na água são percebidos como problemáticos são  
489 diferentes entre as espécies de peixes cultivadas comercialmente. Por exemplo, os níveis  
490 aceitáveis da [CO<sub>2</sub>] para o salmão do atlântico (*Salmo salar*) em sistemas de aquicultura,  
491 encontra-se na faixa de 10 a 20 mg.L<sup>-1</sup> (Fivelstad et al., 1998) sendo o limite seguro de CO<sub>2</sub>  
492 estabelecido em 15 mg.L<sup>-1</sup> (Fivelstad, 2013). Para juvenis e adultas de douradas (*Sparus aurata*)  
493 os níveis de CO<sub>2</sub> seguros nos tanques está abaixo de 40 mg.L<sup>-1</sup> (Blancheton, 2000).  
494 Considerando os valores de 15 mg.L<sup>-1</sup> como recomendado e 40 mg.L<sup>-1</sup> como valor máximo,  
495 isso equivale a um limite superior de CO<sub>2</sub> variando de > 5.000 a > 30.000 µatm, que são 12,5 a  
496 75 vezes maiores do que os níveis atmosféricos atuais, respectivamente (Ellis et al., 2017).

497 Por outro lado, a exposição de algumas espécies de peixes da produção comercial,  
498 principalmente, nos estágios iniciais do seu ciclo de vida parece estar mais susceptível aos  
499 efeitos adversos do CO<sub>2</sub>. Em níveis de exposição a uma pressão atmosférica (PCO<sub>2</sub>) 1,800  
500 µatm, as larvas do bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*), apresentaram reduções no  
501 crescimento, desenvolvimento e danos teciduais em muitos órgãos (Frommel et al., 2012;  
502 2014). Alevinos de linguado (*Paralichthys dentatus*) apresentaram alterações na sobrevivência,  
503 crescimento e desenvolvimento nos primeiros estágios de vida quando expostos a PCO<sub>2</sub> 1,808  
504 µatm (Chambers et al., 2014). É importante ressaltar que os impactos do CO<sub>2</sub> em peixes  
505 marinhos podem não ser diretamente aplicáveis para peixes de água doce devido às diferenças  
506 nas estratégias osmorregulatória e de equilíbrio ácido-base (Heuer & Martin, 2014).

507 Em ambiente de água doce, os estudos mostram que a elevação da concentração de CO<sub>2</sub>  
508 em apenas 1,0 – 2,0 vezes, projetada para o final deste século, pode ser potencialmente

509 prejudicial para os peixes. Ou et al. (2015) investigando os efeitos do CO<sub>2</sub> em uma PCO<sub>2</sub> em  
510 1000 e 2000 µatm sobre o desenvolvimento iniciais do salmão rosa (*Oncorhynchus gorbuscha*),  
511 observaram que durante a permanência dos peixes na água doce houve uma redução no  
512 crescimento larval, modificações nas repostas olfativas e interrupção nas repostas anti-  
513 predador. Vossen et al. (2016) verificaram que o zebrafish (*Danio rerio*) quando foram expostos  
514 em uma PCO<sub>2</sub> de 1600 µatm apresentou mudanças nas repostas de direção de natação,  
515 indicando que alguns comportamentos dos peixes expostos ao elevado CO<sub>2</sub> podem ser alterados  
516 em decorrência dessas repostas.

517 Com o aumento da [CO<sub>2</sub>] atmosférico, está previsto que ocorra um aumento na [CO<sub>2</sub>]  
518 na água tanto nos oceanos quanto nos ecossistemas de água doce em todo o mundo (Hannan &  
519 Rummer, 2018). Como a água doce cobre uma fração pequena da área da superfície da terra, os  
520 ecossistemas de água doce continentais (particularmente lagos, rios e reservatórios) raramente  
521 têm sido considerados como componentes quantitativos potencialmente importantes do ciclo  
522 do carbono em escala global ou regional (Cole, et al., 2007). Todavia, um estudo realizado por  
523 Raymond et al. (2013), descobriram que em mais de 6.700 sistemas de córregos e rios avaliados  
524 em uma escala global, 95 % tinham um nível médio de PCO<sub>2</sub> maior do que o nível atmosférico  
525 atual de ~415 ppm. Dado que os sistemas de água doce são afetados por muitos fatores  
526 ambientais e antrópicos diferentes, ainda é difícil correlacionar o aumento do CO<sub>2</sub> atmosférico  
527 como principal fonte do aumento de CO<sub>2</sub> nos ambientes de água doce (Lauerwald et al., 2013;  
528 Hannan & Rummer, 2018).

### 529 **3. Uso de produtos químicos na aquicultura**

530 O crescimento e expansão da produção aquícola tem sido acompanhado por doenças  
531 emergentes que surgiram gerando problemas econômicos ou ecológicos em espécies aquícolas  
532 (Murray & Peeler, 2005). Atualmente, a gama de doenças encontradas na aquicultura intensiva  
533 é um dos principais problemas enfrentados pelos aquicultores, pois as enfermidades se

534 constituem numa fonte de restrição primária ao cultivo de muitas espécies de peixes e uma das  
535 maiores causas de perdas econômicas na aquicultura (Ahne et al., 1989; Tavares-Dia e Martins,  
536 2017; Raja e Jithendra, 2015).

537 À medida que a aquicultura se expande e novas espécies são cultivadas, as doenças  
538 tendem a continuar surgindo ou se intensificando no ambiente de cultivo, afetando cada vez  
539 mais os meios de produção. Para prevenir as doenças, produtos químicos, tais como antibióticos  
540 e pesticidas são administrados profilaticamente, em momentos de maior risco de enfermidades  
541 e/ou terapêuticamente quando ocorre um surto de doença no sistema. A escolha do  
542 medicamento depende da eficácia, facilidade de aplicação, segurança humana, segurança do  
543 animal alvo, incluindo estresse aos peixes, impacto ambiental, aprovação regulamentar, custos  
544 e implicações para a comercialização dos peixes (Burka et al., 1997).

545 A aplicação de produtos químicos, embora tenham múltiplos impactos negativos no  
546 ambiente e na saúde humana, representa uma alternativa para reduzir as perdas econômicas  
547 associadas a surto de doenças no ambiente de cultivo (Guimarães et al., 2007; Reveter et al.,  
548 2014). Esses produtos químicos tornaram-se parte estratégica de gestão no cultivo de  
549 organismos aquáticos em todo mundo, pois são vistos como insumos essenciais para uma  
550 produção aquícola bem sucedida e duradoura (Subasinghe et al., 1996; Tonguthai, 1996).

551 Entre os químicos administrados na aquicultura intensiva, os organofosforados (OPs)  
552 são uma classe de pesticida bastante comum no combate e/ou prevenção de infestações  
553 parasitárias em aquicultura comercial (Rodrigues et al., 2001). Seu uso em muitas fazendas  
554 aquícolas tornou-se indispensável para melhorar a produtividade e evitar perdas econômicas  
555 por doenças. Atualmente, a classe dos OPs é representada por diferentes compostos químicos,  
556 dentre esses o triclorfon (TCF) é um composto ativo amplamente difundido no mercado  
557 veterinário aquícola (Guimarães et al., 2007; Ducan et al., 2020).

558 Na Europa, Ásia e Chile o TCF é autorizado para uso na aquicultura, objetivando  
559 controlar parasitas em culturas de salmão e trutas (Lopes et al., 2006). Nos Estados Unidos, o  
560 TCF está registrado como inseticida sistêmico para uso não agrícola, como em grama de campo  
561 de golfe, gramados domésticos, áreas de processamento de alimentos, arbustos, plantas  
562 ornamentais, peixes ornamentais, lagos com iscas e áreas residenciais e para tratamento de  
563 formigas colhedoras (EPA, 2001). No Brasil, o TCF é amplamente comercializado para uso no  
564 setor agropecuário como inseticida e vermicidas sendo então regulamentado pelo Ministério da  
565 Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA - instrução normativa N° 51/2011). A resolução  
566 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) n° 357, não dispõem informação sobre  
567 a concentrações do TCF em águas superficiais brasileiras. Dessa forma, não existe uma  
568 regulamentação quanto aos limites máximos do TCF nas águas superficiais brasileiras.

#### 569 **4. Triclorfon**

570 O TCF é um pesticida da classe dos OPs com o nome químico [O, O-dimetil- (2,2,2-  
571 tricloro-1-hidroxil-butil)-fosfonato], fórmula química  $C_4H_8Cl_3O_4$ , peso molecular 257,4  
572  $g \cdot mol^{-1}$  e solubilidade em água 120,000 mg.L a 20 °C; 15,4 g.100 ml<sup>-1</sup> a 25°C (ANVISA, 2009).  
573 O TCF foi introduzido no mercado comercial em 1950 para combater pragas em lavouras, em  
574 frutas, insetos florestais e para controlar parasitas em animais (IPCS, 1992). O TCF pode estar  
575 disponível em um concentrado emulsionável na forma de pó sólido branco cristalino ou amarelo  
576 com um odor de éter etílico, em formulação granular ou em solução (IPCS, 1992; Lopes et al.,  
577 2006).

578 O TCF possui persistência curta no ambiente, pois sofre rápida hidrólise no ar, na água  
579 e no solo (Feng, 2007). Conforme o estudo realizado por Lopes et al. (2006), o tempo de meia  
580 vida 50 % do TCF foi de 57 h ou 2,5 dias em tanques onde a água apresentava um pH na faixa  
581 de 6,3 e temperatura próxima de 20 °C; a dissipação de 95 % do TCF foi de 247,6 h ou 10,2  
582 dias para as mesmas condições ambientais. Araki et al. (2003) encontraram um tempo de meia-

583 vida do TCF na água de reservatório experimental menor que 17 dias. Samuelsen (1987)  
584 determinou o tempo de meia vida do TCF variando entre 1,2 e 5,3 dias em água salina com alta  
585 e baixa aeração, pH 7,7 – 8,0 e temperatura 4,5 – 13,5 °C. Em pH > 8 e temperatura de 35,5 °C  
586 este produto é 100 % hidrolisado em 24 h para produtos menos tóxicos como hidrogenofosfato  
587 de dimetila, dicloroacetaldeído e glioxal (IPCS, 1992). Tais resultados demostram que a meia  
588 vida do produto é diretamente influenciada por fatores como pH e temperatura da água, devendo  
589 influenciar ainda na sua toxicidade.

590 O TCF é um inseticida seletivo frequentemente usado em tratamentos quimioterápicos  
591 de infestações parasitárias em peixes, tais como: *Argulus* sp., *Ergasilus* sp., *Lernea* sp.,  
592 *Trichodina* sp., *Dactylogyrus* sp., *Gyrodactylus* sp. e trematódeos como *Piscicola* e outros  
593 (Coelho et al., 2011; Venturine et al., 2014). O TCF está presente como princípio ativo em  
594 diferentes marcas comerciais vendida no mercado agropecuário brasileiro. Todavia, o  
595 Masoten® é o único pesticida que contém o TCF como princípio ativo, liberado para tratamento  
596 quimioterápico em peixes. Entretanto, o princípio ativo do TCF também pode ser encontrado  
597 em outras marcas comerciais como Neguvon®, Triclorvet® e Triclorsil®. Esses produtos são  
598 indicados para o controle de parasitas em animais terrestres e, portanto, não estão liberados para  
599 uso na aquicultura. Embora sejam restritos apenas para uso em animais terrestres, é sabido que  
600 produtores comumente utilizam esses produtos em tratamentos terapêuticos nos tanques de  
601 cultivo, pois eles apresentam um preço comercial inferior ao do Masoten®.

602 Normalmente, o produtor realiza o tratamento químico com Masoten® em peixes  
603 parasitados seguindo a ficha técnica disponível no produto comercial. Para o tratamento de  
604 ectoparasitas com o TCF, a terapia de imersão é a mais recomendada. Geralmente, a aplicação  
605 ocorre por meio de banho de imersão de 1 a 2 horas de duração, o número de aplicação varia  
606 entre 2 a 4 vezes no intervalo de 48 h conforme o grau de infestação parasitária e a espécie de  
607 peixe. A dosagem de aplicação do TCF pode variar de 0,1 a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> (Xu et al., 2012). Antes

608 da aplicação desse produto químico, recomenda-se realizar um ensaio com alguns exemplares  
609 em função da susceptibilidade das espécies e do quadro clínico apresentado pelos peixes. Para  
610 a aplicação nos tanques, sugere-se que o volume da água dos tanques seja reduzido e,  
611 consequentemente, a quantidade de medicamento necessária obedeça à descrição da ficha  
612 técnica.

## 613 **5. Toxicidade aguda do triclorfon nos peixes**

614 O TCF é classificado toxicologicamente como classe II (altamente tóxico) (IPCS, 1992;  
615 ANVISA, 2009). Vários autores trataram da toxicidade aguda  $CL_{50}$  do TCF para diversas  
616 espécies de peixes. A  $CL_{50}$  do Pestanal® para zebrafish (*Danio rerio*) foi estimada em 28,8  
617  $mg.L^{-1}$  (Coelho et al., 2011); para tambaqui (*Colossoma macropomum*) a  $CL_{50}$  96 h do  
618 Masoten® foi estimada em 0,84  $mg.L^{-1}$  (Duncan et al., 2019); para enguia (*Anguilla aguila*) a  
619  $CL_{50}$  96 h do TCF foi estimada em 3,38  $mg.L^{-1}$  (Ferrando et al., 1991); para o ciclídeo maia  
620 (*Cichlasoma urophthalmus*) a  $CL_{50}$  em 24, 48, 72 h do Dipterex® foi estimada em 26,5, 23,7 e  
621 17,2  $mg.L^{-1}$ , respectivamente (Flores-Navas & Vizcarra-Quiroz, 1988).

622 A concentração letal avaliada do TCF em 96 h para pacu prata (*Piaractus*  
623 *branchyomus*) foi estimada em 0,18  $mg.L^{-1}$  (Méndez et al., 2014), para a tilápia do Nilo a  $CL_{50}$   
624 96 h do TCF (> 97% de pureza) foi estimada em 21,7  $mg.L^{-1}$  (Alkahem et al., 1998), para  
625 guppies (*Poecilia reticulata*) a  $CL_{50}$  96 h do Neguvon® foi estimada em 11  $mg.L^{-1}$  (Heo &  
626 Shin, 2009), para pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a  $CL_{50}$  em 96 h do TCF (Sigma®) foi  
627 estimada em 0,19  $mg.L^{-1}$  (Mataqueiro et al., 2009) e para os pacus expostos ao Masoten® a  
628  $CL_{50}$  foi estimada em 84  $\mu g mg.L^{-1}$  (Venturine et al., 2014); para tuvira (*Gymnotus carapo*) a  
629  $CL_{50}$  em 96 h do Masoten® foi estimada em 6,38  $mg.L^{-1}$  (Ferri et al., 2020).

630

631

## 632 6. O uso de biomarcadores na avaliação de condições estressantes

633 O termo "biomarcador" é usado em um sentido amplo para incluir medições que reflitam  
634 uma interação entre um sistema biológico e um agente ambiental, que pode ser químico, físico  
635 ou biológico (WHO, 1993). É preciso selecionar os biomarcadores adequado para cada  
636 condição permitindo um diagnóstico mais preciso.

637 De acordo com o NRC (1987), WHO (1993), os biomarcadores podem ser subdivididos  
638 em três classes:

- 639 • **biomarcador de exposição:** que avaliam a presença, em amostras biológicas,  
640 de uma substância exógena ou seu metabólito ou o produto de uma interação  
641 entre um agente xenobiótico e alguma molécula ou célula alvo que é medido em  
642 um compartimento dentro de um organismo;
- 643 • **biomarcador de efeito:** que indica alterações bioquímicas, fisiológicas,  
644 alteração comportamental ou outra mudança dentro de um organismo que,  
645 dependendo da magnitude, pode ser reconhecido como associado a um  
646 comprometimento de saúde estabelecido ou possível doença;
- 647 • **biomarcador de suscetibilidade:** que servem como indicador de uma inerente  
648 ou habilidade adquirida de um organismo para responder ao desafio de  
649 exposição a uma substância xenobiótica específica.

650 Na aquicultura, os biomarcadores de efeito têm sido bastante utilizados para estabelecer  
651 a relação entre o peixe e um agente químico, bem como identificar a partir dessa interação danos  
652 subletais prejudiciais para a saúde. Uma das vantagens de utilizar estes biomarcadores reside  
653 na capacidade de detectar alterações fisiológicas e metabólicas de maneira precoce antes do  
654 desenvolvimento de determinadas doenças, isso ajuda a aplicação de ações preventivas mais  
655 eficiente.

## 656 **6.1 Biomarcadores de efeito ao TCF em peixes**

657

### 658 *a) Parâmetros Hematológicos*

659 A hematologia é uma ferramenta que tem sido utilizada para monitorar o estado de saúde  
660 dos peixes em resposta às mudanças relacionadas à nutrição, qualidade da água e doenças  
661 (Fazio, 2019). Além disso, os parâmetros hematológicos podem fornecer informações sobre as  
662 mudanças fisiológicas, patológicas, perturbações metabólicas e bioquímicas no corpo dos  
663 peixes, agindo assim como biomarcadores não específicos no campo da toxicologia ambiental  
664 em sistemas de aquicultura (Ahmed et al., 2020).

665 Índices hematológicos são usados para avaliar o estado funcional do tecido sanguíneo,  
666 bem como alterações fisiopatológicas aguda ou crônica dos peixes. A avaliação dos parâmetros  
667 hematológicos mensurados inclui a determinação de contagem total de eritrócitos (RBC),  
668 hematócrito (Hct), concentração de hemoglobina (Hb), índices hematimétricos – volume  
669 corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração média de  
670 hemoglobina corpuscular (CHCM), contagem das células dos leucócitos total e contagem de  
671 trombócitos total (Campbell, 2015; Tavares-Dias & Mariano, 2015). Glicose, cortisol, lisozima  
672 e o *burst* oxidativo também têm sido utilizados como uma ferramenta para avaliar o estado de  
673 saúde dos peixes.

674 Os peixes vivem em interação direta com o ambiente aquático e são, portanto, muito  
675 sensíveis à presença de xenobióticos na água. No ambiente de aquicultura intensiva, os peixes  
676 estão em constante contato com diferentes substâncias químicas utilizadas para melhorar a  
677 qualidade e a eficiência do sistema de cultivo. Os pesticidas da classe dos OPs formam a  
678 categoria de poluentes de ampla ocorrência nesses ambientes. Embora os OPs sejam  
679 considerados moderadamente tóxicos para os peixes, a eficácia no combate de ectoparasitas e  
680 outros microrganismos patogênicos justificam seu amplo uso em tratamentos quimioterápicos.

681 Pesquisadores têm relatado que os OPs promovem várias alterações substanciais nos  
682 parâmetros sanguíneos de diversas espécies de peixes. O TCF, por exemplo, tem causado  
683 alterações nos parâmetros hematológicos dos peixes mesmo em concentrações subletais. Na  
684 literatura, estudos confirmam tais modificações, por exemplo, Tavares-Dias et al. (1999)  
685 observaram uma redução no número de RBC e Hb em pacus tratados com 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de  
686 Triclorfon®. Whoo et al. (2018) ao expor a carpa comum (*Cyprinus carpio*) ao Metrifonato®  
687 em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) verificaram redução nos valores de  
688 RBC, Hct e Hb. Venturine et al. (2014) estudando os efeitos da concentração 8 µg.L<sup>-1</sup> do  
689 Masoten® para mesma espécie, observaram uma redução no nível de Hb. Essas reduções  
690 descritas em peixes quando submetidos ao tratamento do TCF indicam um quadro inicial de  
691 anemia, e pode ser associada com o aumento na taxa de destruição de eritrócitos nos tecidos  
692 hematopoiético e disfunção osmorregulatória (Banaei et al., 2008).

693 Alterações nos parâmetros imunológicos também foram registradas após a exposição  
694 dos peixes ao TCF. Cardoso et al. (2020), analisando o efeito da concentração 0,5 mg.L<sup>-1</sup> do  
695 Masoten® em tilápia do Nilo, observaram um aumento na contagem dos leucócitos e  
696 trombócitos total, na porcentagem de monócitos, na atividade da lisozima e no *burst* oxidativo  
697 e redução na porcentagem de linfócito. Os autores associaram essa resposta com as perturbações  
698 da homeostase dos peixes causadas pelo estresse químico em outros órgãos. Chandrasekara e  
699 Pathiratne (2005) reportaram que carpas comuns expostas ao Dipterx® nas concentrações 0,25  
700 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> exibiram quadros clínicos de leucopenia e linfocitopenia. A supressão do sistema  
701 imunológico neste caso representa maior susceptibilidade dos peixes a doenças, pois as células  
702 leucocitárias detectam uma ampla variedade de agentes infecciosos como vírus, bactérias e  
703 parasitas, protegendo os peixes contra as doenças oriundas desses patógenos, além de distinguir  
704 esses agentes patogênicos das células e tecido saudável do próprio animal (Magnadottir, 2010).

705 A medição do cortisol e glicose plasmática tem sido uma excelente ferramenta utilizada  
706 para avaliar os efeitos agudos de um determinado estressor em peixes (Aerts et al., 2015; Whoo  
707 et al., 2018; Sadoul & Geffroy, 2019). De forma consistente, os dados disponíveis na literatura  
708 suportam que os níveis de cortisol e glicose no plasma em peixes indicam efeitos tóxicos de  
709 certos estressores (Aerts et al., 2015; Sadoul & Geffroy 2019). Níveis aumentados de cortisol  
710 no sangue são considerados uma resposta primária de estresse químico ou ambiental em peixes  
711 (Barton e Iwama 1991; Wendelaar Bonga 1997; Ray & Sinha 2014).

712 Quando os peixes são submetidos a condições de estresse, uma sequência combinada de  
713 mobilização de energia adaptativa pode ser observada (Balasch & Tort 2019). O modelo  
714 proposto é que o cortisol regula positivamente as vias envolvidas na mobilização de substratos  
715 energéticos, incluindo a gliconeogênese, enquanto regula as vias que requerem energia para  
716 lidar com o estresse (Faught et al., 2016). Assim, a hiperglicemia observada após a exposição  
717 a xenobióticos parece benéfica, pois fornece a energia necessária para metabolizar e eliminar o  
718 composto tóxico (Ahmad, 2011).

719

#### 720 *b) Acetilcolinesterase (AChE)*

721 O TCF, assim como outros organofosforados, é um potente inibidor da  
722 acetilcolinesterase (Who, 1992). O mecanismo de inibição da AChE é promovido através da  
723 fosforilação do sítio ativo da enzima, inibindo a sua capacidade de hidrolisar o neurotransmissor  
724 acetilcolina (ACh) (Futuko, 1990). O bloqueio da atividade da AChE no sistema nervoso causa  
725 o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, gerando estimulação contínua na membrana pós-  
726 sináptica, processo que pode levar à estimulação contínua das fibras musculares (Araújo &  
727 Gonsalves, 2016). Se o OPs permanecer ligado a AChE dentro de 24 a 48 horas, ele se liga  
728 irreversivelmente à enzima, tornando-a permanentemente inativada; este processo é chamado  
729 de “envelhecimento” (Braitberg, 2019).

730 Os OPs apresentam uma ampla gama de efeitos tóxicos em vertebrados e artrópodes-  
731 alvo após a inibição da AChE (McKenzie et al., 2017). O bloqueio da atividade da AChE com  
732 o acúmulo subsequente de ACh na terminação nervosa, provoca uma superestimulação dos  
733 receptores muscarínicos (mAChR) e nicotínicos (nAChR) nas fendas sinápticas das junções  
734 neuromusculares, resultando em excitotoxicidade, convulsões e espasmos (Hung et al., 2015).  
735 Além disso, foi sugerido que os OPs podem afetar diferentes partes do corpo do animal por  
736 meio de receptores colinérgicos extraneuronais presente em células do sistema imune, hemácias  
737 e fígado (Díaz-Resendiz et al., 2015).

738 Em ambiente de aquicultura, os peixes estão sujeitos a exposição ao TCF ou outros OPs  
739 através da sua administração em programa de tratamento sanitário. O pesticida quando presente  
740 na água pode ser absorvido pelos peixes por três vias (i) dermicamente, absorção direta através  
741 da pele; (ii) pela respiração, absorvendo diretamente os pesticidas pelas brânquias; e (iii) por  
742 via oral, por meio da ingestão de água ou se alimentando de ração suplementada com o pesticida  
743 (Mathur & Singh, 2006). Quando o TCF alcança o sistema circulatório dos peixes, promove a  
744 ruptura da barreira hematoencefálica em poucas horas de exposição, este rompimento permite  
745 a passagem descontrolada do pesticida a partir do tecido sanguíneo para o sistema nervoso  
746 central (Baldissera et al., 2019). Tal fato, pode explicar as manifestações dos efeitos  
747 neurotóxicos do TCF nos peixes em um curto período de exposição.

748 A ação inibitória do TCF sobre a atividade da AChE é uma resposta evidenciada para  
749 diferentes espécies de peixes. Chandrasekara & Pathiratne (2005), que submeteram a carpa  
750 comum a 0,25 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Dipterex®, registraram uma redução na atividade da AChE no  
751 cérebro após 24 h de exposição. Guimarães et al. (2007), que expuseram a tilápia do Nilo a 0,25  
752 mg.L<sup>-1</sup> de TCF (Bayer®), observaram uma redução na atividade da AChE no músculo no  
753 período de 8, 24, 48 e 96 horas de exposição. Lu et al. (2018) observaram redução da atividade  
754 da AChE em carpa prussiana (*Carassius auratus gibelio*) no plasma e fígado após 24 h de

755 exposição ao TCF (> 90% puro) nas concentrações 0,5, 1,0 e 2,0 g.kg<sup>-1</sup>. Duncan et al. (2019),  
756 registraram observaram uma redução da atividade da AChE no cérebro, musculo, intestino e  
757 fígado do tambaqui após 24, 48 e 96 h de exposição ao Masoten® nas concentrações 0,26 e  
758 0,46 mg.L<sup>-1</sup>. Baldissera et al. (2019), que expuseram o jundiá (*Rhamdia quelen*) a 11 e 22 mg.L<sup>-1</sup>  
759 <sup>1</sup> de Masoten®, reportaram redução na atividade da AChE no cérebro no período de 24 e 48 h  
760 de exposição. Venturini et al. (2015), verificaram uma redução na atividade da AChE no  
761 cérebro e músculo do pacu após 96 h ao Masoten® na concentração 8 µg.L<sup>-1</sup>. Cardoso et al.  
762 (2020), que expôs a tilápia do Nilo a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Masoten®, registraram uma redução  
763 na atividade da AChE no músculo e fígado após 96 h de exposição.

764

#### 765 *c) Metabolismo oxidativo*

766 O oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) é um composto necessário para todos os organismos  
767 aeróbicos, uma vez que este elemento é essencial para a produção de energia (Biller &  
768 Takahashi, 2018). No entanto, o O<sub>2</sub> é considerado um radical livre potente porque contém dois  
769 elétrons desacoplados em seus orbitais e pode, portanto, sofrer redução, produzindo metabólitos  
770 de oxigênio diferentes, que são chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Poljsak &  
771 Fink, 2014).

772 O organismo durante o seu metabolismo normal produz EROs como subprodutos, tais  
773 como o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila [OH]<sup>•</sup>  
774 (Kuruta, 2015). Em algumas situações a produção excessiva de EROs pode promover o  
775 desequilíbrio entre a produção oxidante e sua remoção por meio do sistema antioxidante,  
776 gerando uma perturbação no equilíbrio redox celular conhecido como “estresse oxidativo” (EO)  
777 (Nita & Grzybowski, 2016). O EO tem sido associado a uma ampla variedade de doenças em  
778 função das injúrias causadas em células, tecidos, órgãos, mediante aos danos estruturais sobre  
779 as moléculas de lipídios, proteínas e DNA e outras biomoléculas (Abdalla, 2001).

780 A peroxidação lipídica (LPO) é um dos principais processos induzidos pelo EO (Oruç  
781 & Usta, 2006). O EO pode ser descrito como um processo sob o qual oxidantes, como os  
782 radicais livres, atacam as membranas celulares, lipoproteínas e outras moléculas que contêm  
783 lipídios (Ayala et al., 2014; Fuch et al., 2014). Geralmente, a peroxidação lipídica ocorre  
784 quando um radical hidroxila [OH]<sup>•</sup> abstrai um elétron de um ácido graxo insaturado, isso cria  
785 um radical lipídico instável, que pode reagir com o oxigênio, formando um radical peroxil  
786 [RO<sub>2</sub>•] de ácido graxo ou pode reagir com outros ácidos graxos insaturados para formar  
787 hidroperóxido de ácido graxo, um novo radical lipídico (Jancic & Stocic, 2014).

788 Na condição de peroxidação lipídica média ou alta (condições tóxicas), as células  
789 estimulam sua manutenção e sobrevivência por meio da defesa de antioxidantes, como uma  
790 resposta adaptativa ao estresse (Ayala et al., 2014). No sistema antioxidante, tanto a catalase  
791 (CAT) quanto a glutathiona-S-transferase (GST) são enzimas essenciais para manter baixas  
792 concentrações de EROs. A CAT é uma enzima presente na primeira linha de defesa das células,  
793 atuando para manter a baixa concentração de peróxido de hidrogênio, em uma reação de oxi-  
794 redução onde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é decomposto em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O durante o estresse oxidativo (Coelho et al.,  
795 2011). A GST é uma enzima que conjuga a glutathiona reduzida (GSH) com uma variedade de  
796 compostos químicos na fase II do sistema de desintoxicação, tornando esses produtos menos  
797 tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a excreção (Wheatley et al., 1994; Rao, 2006;  
798 Huber et al., 2008).

799 Na literatura os estudos mostram que a atividade da CAT e GST tem sido afetada  
800 durante o período de exposição dos peixes ao TCF. Isso pode ser observado pelo aumento ou  
801 depleção dessas enzimas. Segundo Oruç & Usta (2006), a atividade antioxidante pode ser  
802 aumentada ou inibida sob estresse químico dependendo da intensidade e da duração do estresse  
803 aplicado, bem como da suscetibilidade das espécies expostas. Thomas et al. (2009) observaram  
804 que a exposição da tilápia do Nilo ao Neguvon® na concentração 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, resultou em

805 estresse oxidativo no coração, verificado principalmente pela depleção da GST e elevação do  
806 hidroperóxido. O estudo também revelou que o aumento da atividade de enzimas antioxidantes  
807 foram o suficiente para remover os EROs na brânquia e fígado, evitando o aumento da  
808 peroxidação de lipídio nesses tecidos. Xu et al. (2012) demonstraram que a exposição da carpa  
809 prussiana ao TCF (> 90% de pureza) na concentração 2 e 4 mg.L<sup>-1</sup>, causou redução das enzimas  
810 na superperóxido dismutase (SOD) e CAT plasmático e levou ao aumento da LPO seguido de  
811 apoptose dos hepatócitos.

## 812 **6.2 Biomarcadores de efeito a altas [CO<sub>2</sub>]**

813 O acúmulo de CO<sub>2</sub> em um sistema de criação de peixes é conhecido por prejudicar a  
814 saúde, o bem-estar e o desempenho dos peixes (Aslam et al., 2019). Tal fato, tem preocupado  
815 a cadeia produtiva de pescado nos últimos anos. Por essa razão, houve um aumento dos estudos  
816 que buscam entender os efeitos do elevado [CO<sub>2</sub>] na água sobre a biologia dos peixes que são  
817 produzidos comercialmente.

818 Na literatura, de forma contundente, os estudos mostram que o aumento da [CO<sub>2</sub>] na  
819 água no ambiente de aquicultura pode afetar de diferentes maneiras, principalmente de forma  
820 negativa, a saúde dos peixes. (Fivelstad et al., 1998; 2003; 2007, 2013, Petochi et al., 2011;  
821 Good et al., 2010; 2018; Kaya et al., 2016). Por exemplo, o aumento de CO<sub>2</sub> na água circundante  
822 pode reduzir a taxa na qual o CO<sub>2</sub> do próprio metabolismo dos peixes é liberado do sangue  
823 através das brânquias, isso resulta em uma queda no pH do sangue, condição fisiológica  
824 conhecida como acidose (Goss et al., 1994; Pörtner et al., 2004; Ishimatsu et al., 2005). Para  
825 peixes em sistema intensivo, os problemas com transporte reduzido de oxigênio para os tecidos  
826 devido aos efeitos Bohr são geralmente causados pela acidose resultante de altas concentrações  
827 de CO<sub>2</sub> no sangue (Wedemeyer, 1996).

828 Existem alguns estudos que investigaram o alto teor do CO<sub>2</sub> sobre os parâmetros  
829 sanguíneos dos peixes em condições de cultivo. Por exemplo, Kaya et al. (2016) estudando os

830 efeitos do aumento do CO<sub>2</sub> em tilápia moçambica (*Oreochromis mossambicus*) verificaram uma  
831 redução nos valores do pH do sangue, RBC e aumento da Hb, MCH e CHCM após a exposição  
832 dos peixes ao ambiente com 14 mg.L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> na água. Fivelstad et al. (2007) observaram uma  
833 redução nos valores Hct, MCV, e aumento no MCHC do salmão do atlântico expostos a alto  
834 teor de CO<sub>2</sub> (> 30 mg.L<sup>-1</sup>) na água. Conforme os níveis de CO<sub>2</sub> no ambiente aumentam a  
835 concentração desse gás no sangue também tende a aumentar, conseqüentemente, a capacidade  
836 de transporte de oxigênio da hemoglobina começa a diminuir devido ao efeito Bohr  
837 (Wedemeyer, 1996), o que pode levar a mudanças no conteúdo de hematócrito e hemoglobina  
838 das hemácias (Hayashi et al., 2004). Para superar condições de baixo teor de O<sub>2</sub> no sangue pela  
839 deficiência no sistema hematológico, o CHCM em peixes é uma das respostas hematológicas  
840 que geralmente aumenta (Rauf & Arain 2013). Portanto, o aumento desse parâmetro em peixes  
841 expostos ao alto teor de CO<sub>2</sub> na água, pode ser visto como um ajuste fisiológico para manter a  
842 distribuição normal de O<sub>2</sub> no corpo do animal.

843 A exposição à alto teor de CO<sub>2</sub> na água pode ser estressante para os peixes. Isto pode  
844 ser visto a partir do aumento do cortisol e glicose no sangue. Fivelstad et al. (1999), reportaram  
845 que após o 3º dia de exposição do salmão do atlântico em água com 32 mg.L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> houve  
846 um aumento do cortisol plasmático. Petochi et al (2011), estudando os efeitos do elevado nível  
847 de CO<sub>2</sub> sobre a fisiologia do robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), observaram um aumento  
848 do cortisol e glicose circulante após 45 dias de exposição dos peixes a 16,9 mg.L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> na  
849 água. Portanto, a exposição dos peixes a altas [CO<sub>2</sub>], sugere uma condição de estresse e o  
850 aumento da glicose pode ser visto como uma via de manutenção da homeostase dos tecidos  
851 periféricos.

852 Níveis mais altos de cortisol parecem afetar o sistema imunológico dos peixes. O  
853 estresse, por meio da ação do cortisol, pode reduzir o número de linfócitos e a capacidade de  
854 produção de anticorpos dos peixes (Barton & Iwama, 1991). A disfunção imunológica é

855 aparentemente um efeito colateral da hipercortisolemia normal que ocorre durante a resposta  
856 fisiológica ao estresse (Wedemeyer, 1996). Portanto, o aumento do cortisol pode ser uma das  
857 vias de explicações da supressão do sistema imune dos peixes em ambientes com alta [CO<sub>2</sub>].  
858 Estudos que avaliam os impactos do ambiente com elevada [CO<sub>2</sub>] sobre o sistema imunológico  
859 dos peixes são poucos ou inexistentes na literatura. Sendo assim, para melhor elucidar essa  
860 resposta sobre os peixes mais estudos são necessários.

861 Alterações no biomarcador oxidativo como HP e atividades da SOD, GSH-Px e CAT  
862 também foram observadas na exposição de peixes em condições de alta [CO<sub>2</sub>] na água. A  
863 exposição do pacu a alta [CO<sub>2</sub>] levou ao aumento da formação hidroperóxido e redução na  
864 atividade da GSH-Px e da CAT no músculo branco (Sampaio et al., 2012). Almroth et al.  
865 (2019), verificaram que uma PCO<sub>2</sub> (de 1000 μatm) promoveu um aumento do estresse oxidativo  
866 nos juvenis de halabote do atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*), o que resultou no aumento  
867 da CAT e na redução na atividade da SOD, GST e GPx no fígado. Pimentel et al. (2015)  
868 observaram que houve um aumento na atividade da CAT e GST das larvas de linguado (*Solea*  
869 *senegalensis*) expostas a PCO<sub>2</sub> (~1600 μatm) e temperatura de 22 °C.

## 870 **7. Consideração da espécie em estudo, tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

871 A tilápia do Nilo é uma espécie de peixe da família ciclidae, nativa da África, Israel e  
872 Jordânia (Abdel-Fattahm e El-Sayed, 2006). No cenário da produção aquícola mundial a tilápia  
873 do Nilo é uma das principais espécies cultivadas e sua produção está difundida em todos os  
874 continentes, totalizando 135 países (FAO, 2014).

875 A tilápia tem uma grande representatividade na aquicultura mundial. Tendo em vista a  
876 crescente comercialização e crescimento contínuo da indústria da tilápia, essa espécie tem um  
877 potencial para liderar o ranking da produção de pescado e, assim, se tornar, ao lado da carpa, a  
878 espécie mais importante da aquicultura mundial do século XXI (Shelton, 2002; Thodesen et al.,  
879 2011). No ano de 2018 a produção da tilápia do Nilo atingiu 4,5 milhões de toneladas,

880 representando quase o dobro da produção registrada no ano de 2010 que foi de 2,5 milhões de  
881 toneladas. Isto representa 8,3 % da produção total da atividade aquícola, atrás apenas do grupo  
882 de carpas (FAO, 2020).

883 O sucesso alcançado pela tilápia do Nilo na aquicultura mundial está inteiramente  
884 associado com a facilidade de produzir essa espécie em sistema de confinamento e também  
885 com as qualidades biológicas que se sobressaem aos demais grupos de peixes cultivados. Entre  
886 as vantagens encontradas se destacam: características fisiológicas, biologia reprodutiva,  
887 plasticidade genética, fácil domesticação, além de apresentar grande facilidade de adaptação  
888 em diversas condições de cultivos, aceitação de uma ampla variedade de alimentos, alta  
889 produtividade, crescimento rápido e rusticidade que está associada à resistência a doenças,  
890 tolerância ao cultivo em altas densidades em ambientes hostis e estressantes (Meurer et al.,  
891 2000; Scorvo filho et al., 2010; Fitzmmons, 2012).

892 A introdução dessa espécie de peixes no território nacional foi na década de 70 por meio  
893 do programa pelo DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra as Secas), para a produção  
894 de alevinos em reservatórios públicos da região Nordeste (Ribeiro et al., 2010). Neste mesmo  
895 período o estado de São Paulo e Minas Gerais, também produziram quantidades significativas  
896 de alevinos para o povoamento de reservatórios das companhias hidrelétricas (Junior & Junior,  
897 2008). Em meados da década de 1990 a produção de tilápia no território nacional avançou  
898 significativamente, posicionando o Brasil entre os maiores produtores de tilápia do mundo  
899 (Schulter & Filho, 2001).

900 A tilápia lidera amplamente o ranking entre as espécies de peixes cultivadas na  
901 piscicultura brasileira. A espécie apresentou aumentos consecutivos na produção desde a  
902 introdução da aquicultura na pesquisa da produção agropecuária, em 2013 (IBGE, 2018). A  
903 produção dessa espécie no ano de 2018 foi de 60,0 %, isso representa um aumento de 16,9 %  
904 da produção dessa espécie de peixes comparado com 43,1 %, em 2013 (IBGE, 2013, 2016).

905 Em 2019, a produção houve um aumento de 3,5%, em termos quantitativos a produção foi de  
906 obtidas 323,7 mil toneladas (IBGE, 2019). O cenário futuro para a produção dessa espécie no  
907 país é de crescimento contínuo, pois conforme a FAO (2016) o Brasil apresentará um aumento  
908 considerável em sua produção aquícola até 2025 o que de certa forma inclui o aumento do  
909 cultivo da tilápia no território brasileiro.

## 910 **8. Justificativa**

911 Na aquicultura intensiva, o uso de químicos para o manejo da saúde dos peixes tornou-  
912 se uma ferramenta necessária para o sucesso da produção. Tecnicamente, as substâncias  
913 químicas em sua grande maioria, apresentam um certo risco para a saúde dos animais,  
914 principalmente, quando eles já enfrentam problemas associados a qualidade do ambiente.  
915 Assim, a principal preocupação da aquicultura atual é se alguns dos produtos químicos  
916 utilizados em tratamentos quimioterápicos podem interagir com as condições físicas e químicas  
917 da água, de modo que, em conjunto, exerçam um efeito sinérgico potencializando seus efeitos  
918 deletérios para os peixes.

919 Uma questão importante para ser abordada em estudos dessa natureza é a possibilidade  
920 de ambos os estressores agirem simultaneamente nos mesmos pontos toxicológicos (receptor  
921 ou sítio de ação celular) no organismo dos peixes, desencadeando um risco modificado de  
922 exposição não observado na exposição isolada dos produtos. Nesse contexto, o uso de  
923 marcadores hematológicos, metabólicos e bioquímicos possibilitam uma maior compreensão  
924 dos mecanismos de ação desses estressores sobre o bem-estar dos peixes, a fim de melhor  
925 gerenciar o uso racional dos químicos na aquicultura.

926

927

928

929 **9. Objetivos**

930 Estudar a ação do TCF e da alta [CO<sub>2</sub>] de forma isolada e associada nos biomarcadores  
931 oxidativos, metabólicos e hematológicos da tilápia do Nilo.

932

933 *9.1 Hipóteses testadas:*

934

935 Hipótese 1: A exposição às concentrações de 0,5 mg de TCF altera os biomarcadores,  
936 metabólicos, hematológicos e imunológico de juvenis de tilápia do Nilo?

937 Hipótese 2: A exposição a hipercarbia  $PCO_2$  7,5 mm Hg altera os biomarcadores,  
938 metabólicos, hematológicos de juvenis de tilápia do Nilo?

939 Hipótese 3: Existe interação entre os níveis de TCF e hipercarbia nos biomarcadores,  
940 metabólicos, hematológicos de juvenis de tilápia do Nilo?

941

942 Uso dos biomarcadores de efeito decorrente da exposição ao estressor:

943 a) Respostas hematológicas, mesurando os parâmetros hematológicos de eritrócitos (RBC)  
944 e índices hematimétricos de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e concentração de  
945 hemoglobina corpuscular média (MCHC);

946 b) Respostas imunológicas, contando o número de células de leucócitos e trombócitos;  
947 mensurando os valores do burst oxidativo e a atividade da lisozima;

948 c) Metabolismo intermediário, determinando o cortisol e glicose plasmática;

949 d) Metabolismo oxidativo, avaliando a concentrações de lipoperoxidação lipídica e as  
950 atividades da CAT e GST no fígado.

951 e) Atividade do sistema colinérgico, mensurando a atividade da acetilcolinesterase  
952 (AChE) no fígado e músculo.

953

954 **10. Referências bibliográficas**

- 955 Abdel-fattah, m. & El-sayed. Basic biology and ecology. In: Abdel-fattah, m & El-sayed Tilapia  
956 culture. Oceanography Department, Faculty of Science, Alexandria: Egypt CABI, P. 25-33,  
957 2006.
- 958
- 959 Aerts, J., Metz, J. R., Ampe, B., Decostere, A., Flik, G., De Saeger, S. Scales tell a story on the  
960 stress history of fish. PLoS One. v. 10, p. 1-17, 2015.
- 961
- 962 Ahmad, Z., Acute toxicity and haematological changes in common carp (*Cyprinus carpio*)  
963 caused by diazinon exposure. African Journal. Biotechnology. 10, 13852–13859, 2011.  
964 <https://doi.org/10.5897/ajb11.1247>
- 965
- 966 Ahmed, I., Reshi, Q. M., Fazio, F. The influence of the endogenous and exogenous factors on  
967 hematological parameters in different fish species: a review. Aquaculture International. v. 28  
968 p. 1-31, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00501-3>
- 969
- 970 Ahne, W., Winton, J. R., Kimura, T. Prevention of infectious diseases in aquaculture. Journal  
971 of Veterinary Medicine, Series B, v. 36, p. 561-567, 1989. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1989.tb00646.x>
- 972
- 973
- 974 Alkahem, H. F., Ahmed, Z., Al-Akel, A.S., Shamsi, M. J. K. Toxicity bioassay and changes in  
975 haematological parameters of *Oreochromis niloticus* induced by trichlorfon. Arab Gulf Journal.  
976 Scientific. Research. v. 16, p. 581-593, 1998.
- 977
- 978 Almroth, B. C., de Souza, K. B., Jönsson, E., Sturve, J. Oxidative stress and biomarker  
979 responses in the Atlantic halibut after long term exposure to elevated CO<sub>2</sub> and a range of  
980 temperatures. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular  
981 Biology, v. 238, p.1-24, 2019. <https://doi.org/10.1101/510818>.
- 982
- 983 ANVISA, 2009. Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo Triclorfon. Agência Nac.  
984 Vilância Sanitária 1-95.
- 985
- 986 Araki, D., Takase, I., Motoyama, N. Leaching of pesticides Applied to an experimental putting  
987 green and their fate in a reservoir. Journal of Pesticide Science. v. 28, p. 76-82, 2003.  
988 <https://doi.org/10.1584/jpestics.28.76>
- 989
- 990 Araújo, C. R. M., Santos, V. L. A., Gonsalves, A. A. Acetylcholinesterase AChE: A  
991 pharmacological interesting enzyme. Revista Virtual de Química. v. 8, p. 1818-1834, 2016.  
992 <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160122>
- 993
- 994 Aslam, S. N., Navada, S., Bye, G. R., Mota, V. C., Terjesen, B. F., Mikkelsen, Ø. Effect of CO<sub>2</sub>  
995 on elemental concentrations in recirculating aquaculture system tanks. Aquaculture, v. 511, p.  
996 1-8, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734254>
- 997
- 998 Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and  
999 signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxidative medicine and  
1000 cellular longevity. p. 32, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- 1001

1002 Baldissera, M. D., Souza, C. F., Descovi, S. N., Zanella R., Prestes, O. D., Da Silva, A. S.,  
1003 Baldisserotto B. Organophosphate pesticide trichlorfon induced neurotoxic effects in  
1004 freshwater silver catfish *Rhamdia quelen* via disruption of blood-brain barrier: Implications on  
1005 oxidative status, cell viability and brain neurotransmitters. *Comparative. Biochemistry.*  
1006 *Physiology Part. C: Toxicology & Pharmacology.* v. 218: p. 8-13, 2019.  
1007 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.12.006>  
1008  
1009 Banaei, M., Mir, V, A., Rafei, G. R., Majazi, A. B. Effect of sub-lethal diazinon concentrations  
1010 on blood plasma biochemistry. *International Journal of Environmental Reseach.* v. 2, p. 189-  
1011 198, 2008. <https://doi.org/10.22059/IJER.2010.193>  
1012  
1013 Barton, B. A., e Iwama, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with  
1014 emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of fish diseases.* v. 1,  
1015 p. 3-26, 1991. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)  
1016  
1017 Biller, J. D., & Takahashi, L. S. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and  
1018 leukocyte respiratory burst activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* v. 90, p. 3403-  
1019 3414, 2018. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170730>  
1020  
1021 Blancheton, J. P. Developments in recirculation systems for Mediterranean fish species.  
1022 *Aquacultural engineering,* v. 22, p.17-31, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(00\)00030-](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(00)00030-3)  
1023 3  
1024  
1025 Bohr, C., Hasselbalch, K., Krogh, A. Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen  
1026 Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt 1.  
1027 *Skandinavisches Archiv Für Physiologie.* v. 16, p. 402-412, 1904.  
1028  
1029 Braitberg, G. Drugs and antidotes in acute intoxication. In: *Critical Care Nephrology.* Elsevier.  
1030 p. 574-588, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44942-7.00098-4>  
1031  
1032 CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). Resolução Nº 357, de 17 de março de  
1033 2005. Diário Oficial da União, Brasília. Disponível via registro  
1034 <http://www.mma.gov.br/portconama/rest0.5/res35705.pdf>. Acessado em 16. 03. 2021  
1035  
1036 Burka, J. F., Hammell, K. L., Horsberg, T. E., Johnson, G. R., Rainnie, D. J., Speare, D. J.  
1037 Drugs in salmonid aquaculture a review. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics.*  
1038 v. 20, p. 333-349, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.1997.00094.x>  
1039  
1040 Boyd, C., & McNevin, A. Water quality, an introduction. 2. Ed. Springer, New York, New  
1041 York, USA. p. 349, 2015.  
1042  
1043 Cardoso, I., Soares, M., Angelis, C., Ferri, G., Ishikawa, M., Jonsson, C., Sampaio, F.  
1044 Physiological and biochemical responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute  
1045 trichlorfon exposure. *International Aquatic Research,* v. 12, p. 243-253, 2020.  
1046 <https://doi.org/10.22034/IAR.2020.1904943.1071>  
1047  
1048 Campbell T.W. Exotic Animal Hematology and Cytology. 4th edn. Ames: Wiley-Blackwell,  
1049 402p, 2015.  
1050

1051 Coelho, S., Oliveira, R., Pereira, S., Musso, C., Domingues, I., Bhujel, R. C., Nogueira, A. J.  
1052 Assessing lethal and sub-lethal effects of trichlorfon on different trophic levels. *Aquatic*  
1053 *toxicology*. v. 103, p. 191-198, 2011.  
1054  
1055 Cochrane, K.; De Young, C.; Soto, D.; Bahri, T. (eds). *Climate change implications for fisheries*  
1056 *and aquaculture: overview of current scientific knowledge*. FAO Fisheries and Aquaculture  
1057 Technical Paper. No. 530. Rome, FAO. 2009. 212p.  
1058  
1059 Cole, J. J., Prairie, Y. T., Caraco, N. F., McDowell, W. H., Tranvik, L. J., Striegl, R. G., Melack,  
1060 J. Plumbing the global carbon cycle: integrating inland waters into the terrestrial carbon budget.  
1061 *Ecosystems*. v. 10, p. 172-185, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10021-006-9013-8>  
1062  
1063 Chambers, R. C., Candelmo, A. C., Habeck, E. A., Poach, M. E., Wiczorek, D., Cooper, K.  
1064 R., Phelan, B. A. Effects of elevated CO<sub>2</sub> in the early life stages of summer flounder,  
1065 *Paralichthys dentatus*, and potential consequences of ocean acidification. *Biogeosciences*. v.  
1066 11, p.1613-1626, 2014. [https://doi.org/ doi:10.5194/bg-11-1613-2014](https://doi.org/doi:10.5194/bg-11-1613-2014)  
1067  
1068 Chandrasekara, H. U., & Pathiratne, A. Influence of low concentrations of Trichlorfon on  
1069 haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus*  
1070 *carpio* L. *Aquaculture research*. v. 36, p. 144-149, 2005. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01197.x)  
1071 [2109.2004.01197.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01197.x)  
1072  
1073 Christiansen, J., Douglas, C. G., Haldane, J. S. The absorption and dissociation of carbon  
1074 dioxide by human blood. *The Journal of physiology*. v. 48, p. 244-271, 1914.  
1075  
1076 Díaz-Resendiz, K. J. G., Toledo-Ibarra, G. A., Girón-Pérez, M. I. Modulation of immune  
1077 response by organophosphorus pesticides: fishes as a potential model in immunotoxicology.  
1078 *Journal of immunology research*. v. 1, p. 1-11, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/213836>  
1079  
1080 Duncan, W. P., Idalino, J. J. S., da Silva, A. G., Moda, R. F., da Silva, H. C. M., Matoso, D. A.,  
1081 Gomes, A. L. S. Acute toxicity of the pesticide trichlorfon and inhibition of acetylcholinesterase  
1082 in *Colossoma macropomum* (*Characiformes: Serrasalminidae*). *Aquaculture International*, 28,  
1083 815-830, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00497-w>  
1084  
1085 Ellis, R. P., Urbina, M. A., Wilson, R. W. Lessons from two high CO<sub>2</sub> worlds future oceans  
1086 and intensive aquaculture. *Global change biology*. 23, 2141-2148, 2017.  
1087 <https://doi.org/10.1111/gcb.13515>  
1088  
1089 EPA. US Environmental Protection Agency. Report on FQPA Tolerance Reassessment  
1090 Progress and Interim Risk Management Decision (TRED) for Trichlorfon. EPA, Washington,  
1091 DC. 2001.  
1092  
1093 ESRL (Earth System Research Laboratories). Monthly Average Mauna Loa CO<sub>2</sub>. Disponível  
1094 em: <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/>. Acessado em: 19/02/2021.  
1095  
1096 Faught, E., & Vijayan, M. M. Mechanisms of cortisol action in fish hepatocytes. *Comparative*  
1097 *Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 199, p. 136-145,  
1098 2016. 10.1016/j.cbpb.2016.06.012  
1099

1100 Fazio, F. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: review. *Aquaculture*. v.  
1101 v. 500, p. 237-242, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>  
1102  
1103 FAO. 2016. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security*  
1104 *and nutrition for all*. Rome. 200 pp  
1105  
1106 FAO. 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2014*. Rome. 223 pp.  
1107  
1108 FAO. 2018. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable*  
1109 *development goals*. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.  
1110  
1111 FAO. 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome.  
1112 <https://doi.org/10.4060/ca9229en>  
1113  
1114 Feng, T., Li, Z.B., Guo, X.Q., Guo, J.P. Effects of trichlorfon and sodium dodecyl sulphate on  
1115 antioxidant defense system and acetylcholinesterase of tilapia Nilo in vitro. *Pesticide*  
1116 *Biochemistry. Physiol.* 92, 107-113, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.10.002>  
1117  
1118 Ferrando, M.D., Sancho, E., Andreu-Moliner, E. Comparative acute toxicities of selected  
1119 pesticides to *Anguilla anguilla*. *Journal Environment Science Health. Part B*. v. 26, p. 491–498,  
1120 1991. <https://doi.org/10.1080/03601239109372751>  
1121  
1122 Ferri, G. H., Cardoso, I. L., Gil, J. A., Jonsson, C. M., Rantin, F. T., Ishikawa, M. M.  
1123 Determination of acute median lethal concentration and sublethal effects on AChE activity of  
1124 *Gymnotus carapo* (Teleostei: Gymnotidae) exposed to trichlorfon. *Brazilian. Journal.*  
1125 *Veterinary Research Animal Science*. v. 57 e169354-e169354.  
1126 <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2020.169354>  
1127  
1128 Ficke, A. D., Myrick, C. A., Hansen, L. J. Potential impacts of global climate change on  
1129 freshwater fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. v. 17, p. 581-613, 2007.  
1130 <https://doi.org/10.1007/s11160-007-9059-5>  
1131  
1132 Fitzsimmons, K. Tilapia: the most important aquaculture species of the 21st century. In:  
1133 *Proceedings from the fifth International Symposium on tilapia Aquaculture*. Rio de Janeiro:  
1134 ISTA. p. 3-8, 2000.  
1135  
1136 Fivelstad, S., Haavik, H., Løvik, G., Olsen, A.B. Sublethal effects and safe levels of carbon  
1137 dioxide in seawater for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.): Ion regulation and growth.  
1138 *Aquaculture* 160, 305-316, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00166-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00166-X)  
1139  
1140 Fivelstad, S., Olsen, A. B., Kløften, H., Ski, H., Stefansson, S. Effects of carbon dioxide on  
1141 Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater.  
1142 *Aquaculture*. v. 178, p. 171-187, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(99\)00125-8](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(99)00125-8)  
1143  
1144 Fivelstad, S., Olsen, A. B., Asgard, T., Baeverfjord, G., Rasmussen, T., Vindheim, T.,  
1145 Stefansson, S. Long-term sublethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts (*Salmo*  
1146 *salar* L.): ion regulation, haematology, element composition, nephrocalcinosis and growth  
1147 parameters. *Aquaculture*. v 215, 301-319, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00048-](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00048-0)  
1148 [0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00048-0)  
1149

1150 Fivelstad, S., Waagbø, R., Stefansson, S., Olsen, A. B. Impacts of elevated water carbon dioxide  
1151 partial pressure at two temperatures on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr growth and  
1152 haematology. *Aquaculture* v. 269, 241-249, 2007.  
1153 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.039>  
1154  
1155 Fivelstad, S. Long-term carbon dioxide experiments with salmonids. *Aquacultural Engineering*.  
1156 v. 53, p. 40-48, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.11.006>  
1157  
1158 Flores-Nava, A., & Vizcarra-Quiroz, J.J. Acute toxicity of trichlorfon (Dipterex®) to fry of  
1159 *Cichasoma urophthalmus* Gunther. *Aquacult. Fish Manage.* v. 19, p. 341-345, 1988.  
1160 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1988.tb00583.x>  
1161  
1162 Forsberg, O. I. The impact of varying feeding regimes on oxygen consumption and excretion  
1163 of carbon dioxide and nitrogen in post-smolt Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture*  
1164 *Research*. v. 28, p. 29-41, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1997.00826.x>  
1165  
1166 Fuchs, P.; Perez-Pinzon, M.A.; Dave, K.R. Chapter 2 Cerebral Ischemia in Diabetics and  
1167 Oxidative Stress A2 Preedy, Victor, R. In *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*;  
1168 Academic Press: San Diego, CA, USA, 2014; pp. 15-23. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405885-9.00002-4)  
1169 [405885-9.00002-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405885-9.00002-4)  
1170  
1171 Futuko, T. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides.  
1172 *Environmental Health Perspectives*. v. 87, p. 245-254, 1990.  
1173 <https://doi.org/10.1289/ehp.9087245>  
  
1174 Frommel, A. Y., Maneja, R., Lowe, D., Malzahn, A. M., Geffen, A. J., Folkvord, A.,  
1175 Clemmesen, C. Severe tissue damage in Atlantic cod larvae under increasing ocean  
1176 acidification. *Nature Climate Change*. v. 2, p. 42-46, 2012.  
1177 <https://doi.org/10.1038/nclimate1324>  
  
1178 Frommel, A. Y., Maneja, R., Lowe, D., Pascoe, C. K., Geffen, A. J., Folkvord, A., Clemmesen,  
1179 C. Organ damage in Atlantic herring larvae as a result of ocean acidification. *Ecological*  
1180 *Applications*. v. 24, p. 1131-1143, 2014. <https://doi.org/10.1890/13-0297.1>  
  
1181 Good, C., Davidson, J., Welsh, C., Snekvik, K., & Summerfelt, S. The effects of carbon dioxide  
1182 on performance and histopathology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in water  
1183 recirculation aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, v. 42, p. 51-56, 2010.  
1184 <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2009.11.001>  
1185  
1186 Good, C., Davidson, J., Terjesen, B. F., Takle, H., Kolarevic, J., Bæverfjord, G., Summerfelt,  
1187 S. The effects of long-term 20 mg/L carbon dioxide exposure on the health and performance of  
1188 Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts in water recirculation aquaculture systems.  
1189 *Aquacultural Engineering*, v. 81, p. 1-9, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.01.003>  
1190  
1191 Goss, G. G., Laurent, P., Perry, S. F. Gill morphology during hypercapnia in brown bullhead  
1192 (*Ictalurus nebulosus*): role of chloride cells and pavement cells in acid-base regulation. *Journal*  
1193 *of Fish Biology*. v. 45, p. 705-718, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1994.tb00938.x>  
1194  
1195 Guimarães, A. T. B., De Assis, H. S., Boeger, W. The effect of trichlorfon on  
1196 acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*.

1197 Ecotoxicology and Environmental Safety. v. 68, p. 57-62, 2007.  
 1198 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.08.005>  
 1199

1200 Hannan, K. D., & Rummer, J. L. Aquatic acidification: a mechanism underpinning maintained  
 1201 oxygen transport and performance in fish experiencing elevated carbon dioxide  
 1202 conditions. *Journal of Experimental Biology*. v. 221, p. 1-8, 2018.  
 1203 <https://doi.org/10.1242/jeb.154559>  
 1204

1205 Harley, C. D., Randall Hughes, A., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J., Thornber, C. S.,  
 1206 Williams, S. L. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology letters*. v. 9,  
 1207 p. 228-241, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00871.x>  
 1208

1209 Hargreaves, J. A., & Brunson, M. Carbon dioxide in fish ponds. Starkville, Mississippi:  
 1210 Southern Regional Aquaculture Center. p. 1-6, 1996.  
 1211

1212 Hayashi, M., Kita, J. Ishmatsu, A. Acid-base responses to lethal aquatic hypercapnia in three  
 1213 marine fishes. *Marine biology*. v. 144, p. 153-160, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1172-y>.  
 1214  
 1215

1216 Henriksson, P. J. G., Belton, B., Murshed-e-Jahan, K., Rico, A. Measuring the potential for  
 1217 sustainable intensification of aquaculture in Bangladesh using life cycle assessment.  
 1218 *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 115, p. 2958-2963, 2018.  
 1219 <https://doi.org/10.1073/pnas.1716530115>  
 1220

1221 Heo, G., & Shin, G. Acute and subacute toxicity of trichlorfon in guppies (*Poecilia reticulata*).  
 1222 *Korean Journal Veterinary Research*. v. 49, p. 253-256, 2009.  
 1223

1224 Heuer, R. M., & Grosell, M. Physiological impacts of elevated carbon dioxide and ocean  
 1225 acidification on fish. *American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative*  
 1226 *Physiology*. v. 307, p. 1061-1084, 2014. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00064.2014>  
 1227

1228 Hu, Y., Ni, Q., Wu, Y., Zhang, Y., Guan, C. Study on CO<sub>2</sub> removal method in recirculating  
 1229 aquaculture waters. *Procedia Engineering*. v. 15, p. 4780-4789, 2011.  
 1230 <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.08.894>  
 1231

1232 Huber, P. C., Almeida, W. P., Fátima, Â. D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico  
 1233 e importância em processos patológicos. *Química Nova*. v. 31, p. 1170-1179, 2008.  
 1234 <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>.

1235 Hung, D. Z., Yang, H. J., Li, Y. F., Lin, C. L., Chang, S. Y., Sung, F. C., Tai, S. C. The long-  
 1236 term effects of organophosphates poisoning as a risk factor of CVDs: a nationwide population-  
 1237 based cohort study. *PloS one*, v. 10, p. 1-15, 2015.  
 1238 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137632>

1239 IBGE. Produção da agropecuária municipal. Ministério de planejamento. Rio Janeiro, v. 40, p.  
 1240 1-108. 2013  
 1241

1242 IBGE. Produção da agropecuária municipal. Ministério de planejamento. Rio Janeiro, v. 43, p.  
 1243 1-53. 2016.  
 1244

1245 IBGE. Produção da agropecuária municipal. Ministério de planejamento. Rio Janeiro, v. 45, p.  
1246 1-20. 2018.  
1247  
1248 IBGE. Produção da agropecuária municipal. Ministério de planejamento. Rio Janeiro, v. 46, p.  
1249 1-20. 2019.  
1250  
1251 International programme on chemical safety (IPCS). WHO Environmental Health Criteria 132  
1252 Triclorfon. World Health Organization, 1992.  
1253  
1254 Ishimatsu, A., Hayashi, M., Lee, K. S., Kikkawa, T., and Kita, J.: Physiological effects on fishes  
1255 in a high-CO<sub>2</sub> world, *Journal of Geophysical Research Atmosphere.*, v. 110, p. 1-8,  
1256 doi:10.1029/2004JC002564, 2005.  
1257  
1258 Jancic, S. A., & Stosic, B. Z. Cadmium effects on the thyroid gland. *Vitamins & Hormones*, v.  
1259 94, p. 391-425, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00014-6>  
1260  
1261 Júnior, F. C. A., & Júnior, V. A. S. Cultivo de tilápia no Brasil: origens e cenário atual. In:  
1262 Congresso da sociedade brasileira de economia, administração e sociologia rural, 46., 2008,  
1263 Rio Branco, Acre Anais. Rio Branco: SOBER, 2008.  
1264  
1265 Lauerwald, R., Hartmann, J., Moosdorf, N., Kempe, S., & Raymond, P. A. What controls the  
1266 spatial patterns of the riverine carbonate system? A case study for North America. *Chemical*  
1267 *Geology*. v. 337, p. 114-127, 2013.  
1268  
1269 Leira, M. H., da Cunha, L. T., Braz, M. S., Melo, C. C. V., Botelho, H. A., Reghim, L. S.  
1270 Qualidade da água e seu uso em pisciculturas. *Pubvet*. v. 11, p. 11-17, 2017.  
1271  
1272 Lopes, R. B., Paraiba, L. C., Ceccarelli, P. S., Tornisielo, V. L. Bioconcentration of trichlorfon  
1273 insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Chemosphere*. v. 64, p. 56-62, 2006.  
1274 10.1016/j.chemosphere.2005.11.029  
1275  
1276 Lu, J., Zhang, M., Lu, L. Tissue metabolism, hematotoxicity, and hepatotoxicity of trichlorfon  
1277 in *Carassius auratus gibelio* after a single oral administration. *Frontiers in Physiology*. v. 9, p.  
1278 1-9, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00551>  
1279  
1280 Kaya, H., Hisar, O., Yilmaz, S., Gürkan, M., Hisar, Ş.A., The effects of elevated carbon dioxide  
1281 and temperature levels on tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Respiratory enzymes, blood pH  
1282 and hematological parameters. *Environmental Toxicology. Pharmacology*. 44, 114-119, 2016.  
1283 <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.003>  
1284  
1285 Kurutas, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against  
1286 oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*. v. 15, p. 1-22, 2015.  
1287 <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>  
1291  
1292 MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução normativa nº 51, de 4  
1293 de novembro de 2011. Disponível via relatório em:  
1294 [http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPort](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1505617819)  
1295 [alMapa&chave=1505617819](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1505617819). Pdf. Acessado em 16.03.2021.  
1296

1297 Magnadottir, B. Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology*. v. 12, p. 361-  
1298 379, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9279-x>  
1308  
1309 Mathur SM & Singh JK. Chemical spraying in agriculture and its environmental impact. All  
1310 India seminars on Environmental Impact Assessment. Udaipur, India: The Institution of  
1311 Engineers; 2006.  
1312  
1313 Meurer, f., |Hayashi, c., Soares, c. M., Boscolo, W. R. Utilização de levedura spray dried na  
1314 alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L). *Acta Scientiarum*. v. 22,  
1315 p. 479-484, 2000. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v22i0.2995>  
1316  
1317 Méndez, M, G. A., Chacón Novoa, R. A., Céspedes Rubio, Á. E., Barragán, R., Schroniltgen,  
1318 I. Toxicity of trichlorfon exposure using an experimentally induced model with Silver Pacu  
1319 (*Piaractus brachypomus*). *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. v. 9, p. 190-202, 2014.  
1320  
1321 Molleda, M. I., Thorarensen, H., Johannsson, R. Water quality in recirculating aquaculture  
1322 systems (RAS) for arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) culture. The United Nation University,  
1323 Fisheries Training Programme. 2008.  
1324  
1325 McKenzie, D.J., Blasco, F.R., Belão, T.C., Killen, S.S., Martins, N.D., Taylor, E.W., Rantin,  
1326 F.T. Physiological determinants of individual variation in sensitivity to an organophosphate  
1327 pesticide in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic Toxicology*. 189, 108-114, 2017.  
1328 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.001>  
1329  
1330 Murray, A. G., & Peeler, E. J. A framework for understanding the potential for emerging  
1331 diseases in aquaculture. *Preventive veterinary medicine*, v. 67, p. 223-235, 2005.  
1332 <https://doi:10.1016/j.prevetmed.2004.10.012>  
1333  
1333 Nita, M., and Grzybowski, A. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in  
1334 the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and  
1335 posterior eye segments in adults. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 23 pp, 2016.  
1336 <https://doi.org/10.1155/2016/3164734>  
1337  
1338 Ou, M., Hamilton, T. J., Eom, J., Lyall, E. M., Gallup, J., Jiang, A., Brauner, C. J. Responses  
1339 of pink salmon to CO<sub>2</sub> induced aquatic acidification. *Nature Climate Change*. v. 5, p. 950-955,  
1340 2015. <https://doi.org/10.1038/nclimate2694>  
1341  
1342 Oruç, E. Ö., & Usta, D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of  
1343 diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental toxicology and pharmacology*,  
1344 v. 23, p. 48-55, 2007.  
1345  
1346 Petochi, T., Di Marco, P., Priori, A., Finioia, M. G., Mercatali, I., Marino, G. Coping strategy  
1347 and stress response on European sea bass *Dicentrarchus labrax* to acute and chronic  
1348 environmental hypercarbia under hyperoxic conditions. *Aquaculture*. v. 315, p. 312-320, 2011.  
1349 <https://doi:10.1016/j.aquaculture.2011.02.028>  
1350  
1351 Pimentel, M. S., Faleiro, F., Diniz, M., Machado, J., Pousão-Ferreira, P., Peck, M. A., Rosa, R.  
1352 Oxidative stress and digestive enzyme activity of flatfish larvae in a changing ocean. *PLoS One*.  
1353 v. 10, p. 1-15, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134082>  
1354

1355 Poljsak, B., & Fink, R. The protective role of antioxidants in the defense against ROS/RNS-  
1356 mediated environmental pollution. *Oxidative medicine and cellular longevity*. v. 1, p. 1-22,  
1357 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/671539>  
1358

1359 Pörtner, H.O., Langenbuch, M., Reipschläger, A. Biological Impact of Elevated Ocean CO<sub>2</sub>  
1360 Concentrations: Lessons from Animal Physiology and Earth History. *Journal of Oceanography*.  
1361 v. 60, 705-718, 2004. <https://doi.org/10.1007/s10872-004-5763-0>  
1362

1363 Rao, J.V. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical  
1364 parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Pesticide. Biochemical. Physiology*.  
1365 v. 86, p. 78-84, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.01.008>  
1366

1367 Raja, R. A., & Jithendran, K. P. Aquaculture disease diagnosis and health management. In:  
1368 *Advances in marine and brackishwater aquaculture*. Springer, New Delhi. p. 247-255, 2015.  
1369

1370 Rauf, A., & Arain, N. Acute toxicity of diazinon and its effects on hematological parameters in  
1371 the Indian carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Turkish Journal of Veterinary and Animal*  
1372 *Sciences*, v. 37, p. 535-540, 2013. <https://doi.org/10.3906/vet-1212-39>  
1373

1374 Ray, S. N. C., & Sinha, R. C. Serum cortisol and glucose: reliable bioindicators of stress in the  
1375 fish *Labeo rohita*. *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*. v.  
1376 1, p. 1-12, 2014.  
1377

1378 Raymond, P. A., Hartmann, J., Lauerwald, R., Sobek, S., McDonald, C., Hoover, M., Guth, P.  
1379 Global carbon dioxide emissions from inland waters. *Nature*. v. 503, p. 355-359, 2013.  
1380 <https://doi.org/10.1038/nature12760>  
1381

1382 Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P. Use of plant extracts in fish  
1383 aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives.  
1384 *Aquaculture*. v. 433, p. 50-61, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>  
1385

1386 Ribeiro, L. G., Garcia, S., Schwingel, P. R., Amaral Júnior, H., Mello, G. L., Pasco, J., Silva,  
1387 F. Desenvolvimento da tilápia GIFT *Oreochromis niloticus* em diferentes densidades de cultivo  
1388 no litoral norte do estado de Santa Catarina. In *IV Congresso Brasileiro de Oceanografia* (Vol.  
1389 5). 2010.  
1390

1391 Rijnsdorp, A. D., Peck, M. A., Engelhard, G. H., Möllmann, C., Pinnegar, J. K. Resolving the  
1392 effect of climate change on fish populations. *ICES journal of marine science*. v. 66, p. 1570-  
1393 1583, 2009. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsp056>  
1394

1395 Rodrigues, E. L., Ranzani-Paiva, M. J. T., Pacheco, F. J., Veiga, M. L. Histopathologic lesions  
1396 in the liver of *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to a sublethal  
1397 concentration of the organophosphate insecticide Dipterex 500<sup>@</sup> (Trichlorfon). *Acta*  
1398 *Scientiarum*. v. 23, p. 503-505, 2001.  
1399

1400 Sadoul, B., & Geffroy, B. Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *Journal of*  
1401 *Fish Biology*. v. 94, p. 540-555, 2019. <https://doi.org/10.1111/jfb.13904>  
1402

1403 Sampaio, F. G., Boijink, C. D. L., Dos Santos, L. R., Oba, E. T., Kalinin, A. L., Luiz, A. J. B.,  
1404 Rantin, F. T. Antioxidant defenses and biochemical changes in the neotropical fish pacu,

1405 *Piaractus mesopotamicus*: Responses to single and combined copper and hypercarbia exposure.  
 1406 Comparative. Biochemical. Physiology. - C Toxicology. Pharmacology. v. 156, p. 178-186,  
 1407 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.07.002>  
 1408

1409 Samuelsen, O.B. Aeration rate, pH and temperature effects on the degradation of trichlorfon to  
 1410 DDVP and half-life lives of trichlorfon and DDVP in seawater. *Aquaculture*. v. 66, p. 373-380,  
 1411 1987. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90121-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90121-9)  
 1412

1413 Shelton, W.L. Tilapia culture in the 21st century. Pages 1-28, in R.D. Guerrero III (Editor),  
 1414 Proceedings of the International Forum on Tilapia Farming in the 21<sup>st</sup> Century, Los Baños,  
 1415 Laguna, Philippines. 2002.  
 1416

1417 Subasinghe, R. P., Barg, U., Tacon, A. Chemicals in Asian aquaculture: need, usage, issues  
 1418 and challenges. 2000. In Use of Chemicals in Aquaculture in Asia: Proceedings of the  
 1419 Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia 20-22 May 1996, Tigbauan, Iloilo,  
 1420 Philippines (pp. 1-5). Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development  
 1421 Center.

1422

1423 Summerfelt, S.T., Vinci, B.J., Piedrahita, R.H. Oxygenation and carbon dioxide control in water  
 1424 reuse systems. *Aquaculture Engineering*. v. 22, p. 87-108, 2000.  
 1425 [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(00\)00034-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(00)00034-0)  
 1426

1427 Sunda, W. G., & Cai, W. J. Eutrophication induced CO<sub>2</sub> acidification of subsurface coastal  
 1428 waters: interactive effects of temperature, salinity, and atmospheric pCO<sub>2</sub>. *Environmental*  
 1429 *Science & Technology*, v. 46, n. 19, p. 10651-10659, 2012. <https://doi.org/10.1021/es300626f>  
 1430

1431 Scorvo filho, J. D., Frascá-scorvo, C. M. D., Alves, J. M. C., Souza, F. R. A. D. A. Tilapicultura  
 1432 e seus insumos, relações econômicas. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 39, p. 112-118, 2010.  
 1433

1434 Schöner, F. J. Nutritional effects of organic acids. In: BRUFAU, J. Feed manufacturing in the  
 1435 Mediterranean region. Zaragoza: Improving safety: From feed to food Conference of Feed.  
 1436 Manufacturers of the Mediterranean, 2000/03/22-24, 2001. p. 6-55.  
 1437

1438 Skov, P. V. CO<sub>2</sub> in aquaculture. In Grosell, M., Munday, P. L., Farrell, A. P., Brauner, C. J.,  
 1439 (Eds), Carbon Dioxide. *Fish Physiology*, vol. 37. pp. 281-321. 2019. Academic Press.  
 1440 <https://doi.org/10.1016/bs.fp.2019.07.004>  
 1441

1442 Tavares-Dias, M., Martins, M. L., Kronka, S. D. N. Evaluation of the haematological  
 1443 parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) with *Argulus* sp.  
 1444 (Crustacea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. *Revista Brasileira de*  
 1445 *Zoologia*. v. 16, p. 553-555, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751999000200019>.  
 1446

1447 Tavares-Dias, M., & Martins, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the  
 1448 Brazilian fish farms. *Journal of Parasitic Diseases*, v. 41, n. 4, p. 913-918, 2017.  
 1449 <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>  
 1450

1451 Thodesen, J., Rye, M., Wang, Y. X., Yang, K. S., Bentsen, H. B., Gjedrem, T. Genetic  
 1452 improvement of tilapias in China: genetic parameters and selection responses in growth of Nile

1453 tilapia (*Oreochromis niloticus*) after six generations of multi-trait selection for growth and fillet  
1454 yield. *Aquaculture*. v. 322, p. 51-64, 2011.  
1455  
1456 Thomaz, J. M., Martins, N. D., Monteiro, D. A., Rantin, F. T., Kalinin, A. L. Cardiorespiratory  
1457 function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate  
1458 insecticide trichlorfon (Neguvon®). *Ecotoxicol. Environ. Saf* 72: 1413–1424, 2009.  
1459 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.11.003>  
1460  
1461 Tonguthai, K. The use of chemicals in aquaculture in Thailand. In *Use of Chemicals in*  
1462 *Aquaculture in Asia: Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in*  
1463 *Asia 20-22 May 1996, Tigbauan, Iloilo, Philippines* (pp. 207-220). Aquaculture Department,  
1464 Southeast Asian Fisheries Development Center. 2000.  
1465  
1466 Venturini, F. P., Moraes, F. D., Cortella, L. R., Rossi, P. A., Cruz, C., Moraes, G. Metabolic  
1467 effects of trichlorfon (Masoten®) on the neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus*  
1468 *mesopotamicus*). *Fish physiology. Biochemical*. v. 41, p. 299-309, 2014.  
1469 <https://doi.org/10.1007/s10695-014-9983-y>  
1470  
1471 Vossen, L. E., Jutfelt, F., Cocco, A., Thörnqvist, P. O., Winberg, S. Zebrafish (*Danio rerio*)  
1472 behaviour is largely unaffected by elevated pCO<sub>2</sub>. *Conservation physiology*. v. 4. p. 1-8, 2016.  
1473 cow065; doi:10.1093/conphys/cow065. <https://doi.org/10.1093/conphys/cow065>  
1474  
1475 Xu, W., Liu, W., Lu, K., Jiang, Y., & Li, G. Effect of trichlorfon on oxidative stress and  
1476 hepatocyte apoptosis of *Carassius auratus gibelio* in vivo. *Fish physiology and biochemistry*.  
1477 v. 38. p. 769-775, 2012.  
1478  
1479 Weiss, L. C., Pötter, L., Steiger, A., Kruppert, S., Frost, U., Tollrian, R. Rising pCO<sub>2</sub> in  
1480 freshwater ecosystems has the potential to negatively affect predator-induced defenses in  
1481 *Daphnia*. *Current Biology*. v. 28, p. 327-332, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.022>  
1482  
1483 Wedemeyer G. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Chapman and Hall, New Yor.  
1484 pp 247. 1996.  
1485  
1486 Wendelaar Bonga, S. E. The stress response in fish. *Physiological reviews*. v. 77, p. 591-625,  
1487 1997.  
1488  
1489 Wheatley, J. B., Kelley, M. K., Montali, J. A., Berry, C. O., Schmidt Jr, D. E. Examination of  
1490 glutathione-S-transferase isoenzyme profiles in human liver using high-performance affinity  
1491 chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 663, p. 53-63, 1994.  
1492 [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80495-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80495-8)  
1493  
1494 Woo, S. J., Kim, N. Y., Kim, S. H., Ahn, S. J., Seo, J. S., Jung, S. H., Chung, J. K. Toxicological  
1495 effects of trichlorfon on hematological and biochemical parameters in *Cyprinus carpio* L.  
1496 following thermal stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology &*  
1497 *Pharmacology*, v. 209, p. 18-27, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.03.001>  
1498

## Capítulo II

---

1499

1500

1501

Artigo publicado na revista *International Aquatic Research*

1502 International Aquatic Research (2020) 12:243-253 <https://doi.org/10.22034/IAR.2020.1904943.1071>

1503

1504

### **Respostas fisiológicas e bioquímicas da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) à exposição aguda a triclorfon**

1505

1506

1507

**Israel Luz Cardoso, Michelly Pereira Soares, Carolina De Angelis, Giovanni Henrique Ferri, Marcia Mayumi Ishikawa, Claudio Martin Jonsson, Francisco Tadeu Rantin, Fernanda Garcia Sampaio**

1508

1509

1510

1511

Recebido: 14 de abril de 2020 - Aceito: 04 de setembro de 2020 / Publicado online: 25 de dezembro de 2020 © O Autor (s) 2020

1512

1513

#### **Resumo**

1514

1515

1516

Triclorfon [TCF] é um composto organofosforado usado para eliminar ou controlar uma variedade de parasitas em peixes de cultivo. As respostas fisiológicas e bioquímicas de juvenis de tilápia do Nilo foram estudadas após 96 horas de exposição ao TCF. O experimento foi conduzido aleatoriamente com dois tratamentos: controle e TCF (0,5 mg L<sup>-1</sup>). Nenhuma mortalidade ou mudanças no perfil hematológico foram registrados para os peixes. Por outro lado, descobriu-se que a exposição ao TCF causou mudanças comportamentais, metabólicas e hormonais que modificaram os padrões de resposta do sistema de defesa imune e enzimático nos tecidos muscular e hepático dos peixes. O aumento do cortisol plasmático e da glicose, associados com a redução da atividade da acetilcolinesterase no músculo e no tecido hepático, indica estresse químico. Em resposta a esta situação prejudicial, observou-se mudanças no sistema imunológico que levou a um aumento do número de leucócitos, trombócitos, atividade respiratória de monócitos e lisozima. Além disso, associou-se o aumento da atividade da glutathione-S-transferase no tecido hepático como uma estratégia usada pelos peixes para combater os efeitos do TCF. Por isso, concluiu-se que o TCF afeta os parâmetros fisiológicos da tilápia do Nilo, o que pode gerar efeitos irreversíveis em situações de recuperação do quadro clínico. Tal fato evidencia a necessidade de busca por novos compostos os quais poderiam substituir o TCF e que tenham nenhum ou poucos efeitos adversos nas espécies de peixes.

1517

1518

1519

1520

1521

1522

1523

1524

1525

1526

1527

1528

1529

1530

1531

1532

1533

1534

**Palavras-chave:** Aquicultura. Toxicologia. Biomarcadores de efeito. Triclorfon

1535

1536 **Abstract**

1537

1538 Trichlorfon [TCF] is an organophosphate compound used to eliminate or control a variety of  
1539 parasites in farmed fish. The physiological and biochemical responses of juvenile Nile tilapia  
1540 were studied after 96 hours of exposure to TCF. The experiment was conducted randomly with  
1541 two treatments: control and TCF (0.5 mg L<sup>-1</sup>). No mortality or changes in hematological profile  
1542 were recorded for the fish. On the other hand, we found that TCF exposure caused behavioral,  
1543 metabolic and hormonal changes that modified the response patterns of the immune and  
1544 enzymatic defense system in muscle and liver tissues. Increased plasma cortisol and glucose  
1545 combined with the reduction of acetylcholinesterase activity in muscle and liver tissue after 96-  
1546 h of TCF exposure indicates chemical stress. In response to this harmful situation, we observed  
1547 changes in the immune system that lead to an increased number of leukocytes, thrombocytes,  
1548 monocytes, lysozyme and leukocyte respiratory burst activity. Furthermore, we associate the  
1549 increased activity of glutathione-S-transferase in liver tissue as a strategy fish use to combat the  
1550 effects of TCF. Thus, we conclude that TCF affects the physiologic parameters of Nile tilapia,  
1551 which can generate irreversible situations of recovery of the clinical condition. Such fact  
1552 highlights the need to search for new compounds that could replace TCF, that have no or few  
1553 adverse effects on fish species.

1554

1555 **Keywords:** Aquaculture, toxicology, chemotherapy, trichlorfon

1556

1557 **1. Introdução**

1558

1559 Para a aquicultura, os produtos químicos tornaram-se estratégicos para o manejo de peixes  
1560 e são considerados um fator importante para o sucesso dessa atividade (Faruk et al. 2010), pois  
1561 auxiliam na redução de perdas econômicas associados a surtos de doenças (Guimarães et al.  
1562 2007; Sinha et al. 2010; Reverter et al. 2014). Contudo, o uso inadequado de produtos químicos  
1563 em pisciculturas pode afetar negativamente os peixes ao diminuir sua imunidade e  
1564 produtividade, além de impactar negativamente o meio ambiente, a economia e indiretamente  
1565 afetar a saúde humana.

1566 Triclorfon [TCF] é um composto organofosforado usado para eliminar ou controlar uma  
1567 variedade de parasitas que são encontrados em espécies de peixes de viveiro como, por  
1568 exemplo, *Lernae* sp. *Argulus* sp. *Ergasilus* sp. *Lernea* sp. *Dactylogyrus* sp. e *Trichodina* sp.  
1569 (Heo e Shin 2009; Burridge et al. 2010; Coelho et al. 2011). Em fazendas de peixes, o TCF é  
1570 geralmente usado em banhos de imersão em concentrações de 0,1 a 0,5 mg L<sup>-1</sup> para tratar  
1571 infestações parasitárias (Pavanelli et al. 2002; Chandrasekara & Pathiratne 2005; Hispano et al.  
1572 2013). Para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a empresa que fabrica este pesticida  
1573 recomenda que seja usado 0,5 mg.L<sup>-1</sup> para tratar diferentes parasitas. Embora TCF ajude a  
1574 reduzir as perdas econômicas causadas por parasitas em peixes, este produto químico é  
1575 toxicologicamente classificado pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) como um Pesticida  
1576 de Uso Geral (GUP) que é Moderadamente Tóxico (Classe II; EPA 1991). Em muitos países  
1577 desenvolvidos, é ilegal usar esse composto, mas ainda é comercializado no Brasil e em outros  
1578 países em desenvolvimento.

1579 O principal modo de ação dos pesticidas organofosforados como o TCF é a inibição da  
1580 acetilcolinesterase (AChE) (WHO 1992; Sinha et al. 2010). Em peixes, a inibição do TCF na  
1581 atividade da AChE foi relatada no cérebro ou músculo de tambaqui (*Colossoma macropomum*)  
1582 por Ducan et al. (2020), em jundiá (*Rhamdia quelen*) por Baldissera et al. (2019), em pacu

1583 (*Piaractus mesopotamicus*) por Venturine et al. (2014) e bagre pangas (*Pangassius pangassius*)  
1584 por Tham et al. (2014). Além disso, o TCF também foi associado a toxicidade grave para muitas  
1585 espécies de peixes, por exemplo, imunotoxicidade e hematotoxicidade para carpa comum  
1586 (*Cyprinus carpio*) (Chandrasekara & Pathiratne 2005; Woo et al. 2018), hepatotoxicidade para  
1587 carpa prussiana (*Carassius auratus gibelio*) (Xu et al. 2009) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*)  
1588 (Venturine et al. 2014), e embriotoxicidade para peixe-zebra (*Danio rerio*) (Coelho et al. 2011).  
1589 É essencial destacar que poucas pesquisas foram realizadas para elucidar o impacto do TCF na  
1590 tilápia do Nilo, uma espécie amplamente utilizada na aquicultura (Costa-Pierce, 2003).

1591 A produção de tilápia do Nilo é difundida em todos os continentes, incluindo 135 países  
1592 (FAO - Organização para Alimentos e Agricultura das Nações Unidas 2014). No Brasil, a tilápia  
1593 do Nilo é a espécie mais comum cultivada em fazendas de peixes. A produção dessa espécie  
1594 em 2018 foi superior a 311 mil toneladas, representando mais da metade (55,4%) do total da  
1595 produção pesqueira brasileira (IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2018). No  
1596 entanto, a produção de tilápia do Nilo é afetada por diversos parasitas que causam perdas  
1597 econômicas consideráveis (Zago et al. 2014), demonstrando a importância de estudos focados  
1598 em compreender como o TCF afeta a fisiologia da tilápia do Nilo

1599 Considerando que existem poucos estudos sobre os efeitos do TCF nas respostas fisiológicas  
1600 e bioquímicas da tilápia do Nilo, este estudo pode fornecer informações valiosas aos produtores  
1601 de peixes sobre os riscos para a saúde associados ao uso de TCF. Assim, este estudo teve como  
1602 objetivo avaliar se o tratamento TCF em uma concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> altera o perfil  
1603 hematológico, imunológico, metabólico e bioquímico da tilápia do Nilo após 96 horas de  
1604 exposição.

## 1605 **2. Material e métodos**

1606

### 1607 *2.1 Abastecimento e aclimatação dos peixes*

1608

1609 Juvenis de *O. niloticus* ( $42,23 \pm 1,09$  g) foram obtidos em uma piscicultura comercial  
1610 (Poletini, Mogi Mirim, SP, Brasil). Os peixes foram aclimatados em condições de laboratório  
1611 por três semanas antes da experimentação. Os peixes foram mantidos em sistema de  
1612 recirculação de água ( $4 \text{ L min}^{-1}$  por aquário) com filtro físico e biológico (1500 L) e  
1613 fornecimento contínuo de água bem aerada, sem cloro e parâmetros físico-químicos constantes.  
1614 Temperatura ( $27,6 \pm 0,68$  °C), oxigênio dissolvido ( $6,7 \pm 1,24 \text{ mg L}^{-1}$ ) e pH ( $7,3 \pm 0,43$ ) foram  
1615 medidos diariamente com um multiparâmetro (U-50, Horiba, Minami-ku, Kyoto, Japão) e  
1616 amônia ( $0,03 \pm 0,49 \text{ mg L}^{-1}$ ) com um kit comercial (Hach, Loveland, CO, EUA).

1617 Durante a aclimatação, os peixes foram alimentados *ad libitum* com ração comercial  
1618 (Guabi® específico para tilápia: 4-5 milímetros; 10% de umidade; 32% de proteína; 6,5% de  
1619 gordura), consumindo em média 4% do peso corporal.

1620

## 1621 2.2 Triclorfon

1622

1623 O produto comercial utilizado foi o Masoten Bayer®, que contém 80% de triclorfon (dimetil  
1624 2,2,2-tricloro-1-hidroxietil fosfato). A concentração ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) usada foi recomendada para  
1625 fazendas de peixes para eliminar infestações parasitárias (Pavanelli et al. 2002; Chandrasekara  
1626 & Pathiratne 2005).

## 1627 2.3 Protocolo experimental

1628

1629 Todos os procedimentos envolvendo os animais deste estudo foram realizados seguindo os  
1630 princípios éticos em experimentação animal e aprovados pelo Comitê de Ética em  
1631 Experimentação Animal da Embrapa Meio Ambiente (protocolo nº 005/2017).

1632 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos: grupo  
1633 exposto a  $0,5 \text{ mg. L}^{-1}$  TCF por 96-h (TCF<sub>96h</sub>; n = 12) e grupo controle (Ctrl; n = 12) com três  
1634 repetições e 36 peixes por tratamento. Os peixes foram colocados em um aquário de vidro

1635 (volume 150 L) contendo água biofiltrada. Durante o período experimental, o comportamento  
1636 dos peixes foi observado e registrado.

1637 Após 96 h de exposição, quatro peixes por unidade experimental (12 peixes por  
1638 tratamento/24 peixes no total) foram anestesiados com benzocaína (65 mg.L<sup>-1</sup>) para coleta de  
1639 sangue, em eutanasiados para excisão do músculo e fígado. Em seguida, o músculo e o fígado  
1640 foram lavados com solução salina (NaCl 0,9%), secos com papel filtro, identificados e  
1641 armazenados a -80 ° C para posterior análise bioquímica.

1642 O sangue foi coletado por punção caudal com seringas perfundidas com EDTA (3%) para  
1643 análise hematológica, heparina para determinação da atividade respiratória burst de leucócitos  
1644 e com GLISTAB (EDTA 6 g/dL<sup>-1</sup> e KF 12 g/dL<sup>-1</sup>, Labtest, São Paulo, Brasil (código 29) para  
1645 coletar plasma para determinar os parâmetros de estresse. O anticoagulante não foi usado para  
1646 obter o soro usado para avaliar as concentrações de lisozima. Além das análises de lisozima e  
1647 cortisol, os parâmetros foram analisados logo após a coleta de sangue, como descrito abaixo.

#### 1648 *2.4 Parâmetros hematológicos*

1649  
1650 Para determinar a concentração de hemoglobina (Hb) foi utilizado um kit comercial (Labtest,  
1651 São Paulo, Brasil). Os eritrócitos foram contados em câmara Neubauer com microscópio óptico  
1652 (Leica DM750 w) 40 x.

1653 O hematócrito foi determinado para o microhematócrito em tubos capilares heparinizados  
1654 em centrífuga (NI 1807 Nova Instruments, Piracicaba, SP, Brasil) por 5 min a 10.000 rpm. Os  
1655 índices hematimétricos foram determinados da seguinte forma:

1656  
1657  
1658  
1659  
1660

$$\text{VCM (fL)} = \text{Ht} \cdot 10 / \text{RBC} \text{ e } \text{CHCM (\%)} = [\text{Hb}] \cdot 100 / \text{Ht}.$$

1661 Leucócitos e trombócitos foram determinados usando lâminas de extensão de sangue coradas  
1662 com May-Grunwald-Giemsa-Wright e contados sob um microscópio (Leica DM750 w) usando  
1663 objetiva de imersão em óleo (100 x).

1664

#### 1665 *2.5 Parâmetros de estresse*

1666

1667 O sangue foi centrifugado e o plasma usado para determinar a concentração de glicose  
1668 medida pela glicose oxidase (Labtest, São Paulo, Brasil, código 84), e as concentrações de  
1669 cortisol foram determinadas por um ensaio imunoenzimático de um kit comercial (DRG  
1670 International, Inc., EUA; Cortisol ELISA – EIA – 1887).

1671

#### 1672 *2.6 Parâmetros imunológicos*

1673

1674 A atividade leucocitária de explosão respiratória (RAL) foi determinado de acordo com  
1675 Biller-Takahashi et al. (2013). Este método é baseado na determinação colorimétrica das  
1676 espécies reativas de oxigênio (ROS), que são produzidas pela explosão respiratória dos  
1677 leucócitos, e promove a redução do nitrobluetetrazólio (NBT, Sigma, St. Louis, MO, EUA) em  
1678 precipitado azul escuro dentro o fagócito denominado grânulos de formazan (Soares et al.  
1679 2018). A densidade óptica (OD) da solução final foi medida a 540 nm.

1680 A atividade da lisozima foi medida usando um ensaio turbidimétrico (Ellis et al. 1990), com  
1681 modificações parciais (Abreu et al. 2009), que lisou uma suspensão de *Micrococcus luteus*  
1682 (Sigma-Aldrich M3770). Os resultados foram expressos em uma concentração sérica de  
1683 lisozima (ng/dL). Uma unidade é definida como a quantidade de amostra que desencadeia uma  
1684 redução na absorbância de  $0,001 \cdot \text{min}^{-1}$  a 450 nm em comparação com o controle (suspensão de  
1685 *M. luteus* sem soro).

#### 1686 *2.7 Acetilcolinesterase (AChE)*

1687

1688 A atividade da AChE foi determinada usando a técnica colorimétrica (Ellman et al. 1961) e  
1689 adaptada para microplaca (Silva de Assisi 1998). As amostras de músculo branco e fígado

1690 foram homogeneizadas em 50 mM tampão fosfato pH 7,0 e centrifugadas a (10.000 rpm, por  
1691 10 min, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para a análise. Para medir a atividade da AChE, o  
1692 iodeto de acetilcolina (ATC) 9 mM foi usado como substrato e ácido 5,50-ditio-bis (2-  
1693 nitrobenzóico) (DTNB) como um reagente de cor. A densidade óptica a 412 nm foi medida a  
1694 cada minuto durante 10 min usando um leitor de placa ELISA (BIO-RAD Benchmark). A  
1695 atividade da AChE foi expressa em mg de proteína. As concentrações de proteína foram  
1696 medidas a 595 nm pelo método de Bradford (1976) usando albumina de soro bovino (Sigma)  
1697 como padrão.

### 1698 *2.8 Biomarcadores do estresse oxidativo hepático*

1699  
1700 Para analisar a peroxidação lipídica (LPO), a atividade da catalase (CAT) e a glutathione-S-  
1701 transferase (GST), as amostras de fígado foram pesadas e homogeneizadas a 12000 rpm em  
1702 tampão fosfato por 20 minutos. A centrifugação foi realizada em centrífuga refrigerada Hermle-  
1703 Z323K (Hermle Labortechnik, Germany) e o sobrenadante utilizado.

1704 A proteína do fígado foi determinada pelo método de Bradford (Kruger 1976), adaptado para  
1705 o leitor de microplacas Dynex MRXTC 250 (1994). A peroxidação lipídica foi quantificada  
1706 usando a oxidação ferrosa-xilenol laranja (Método FOX) (Jiang et al. 1992). A atividade CAT  
1707 (Aebi et al. 1983) avaliou continuamente a diminuição na concentração de peróxido de  
1708 hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em  $\lambda = 240$  nm. A atividade da GST foi medida de acordo com Habig et al.  
1709 (1974), usando l-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato.

1710 As leituras espectrofotométricas foram registradas com um espectrofotômetro pectronic  
1711 Genesys 5 (Milton Roy Company, PA, EUA), e as leituras das microplacas foram feitas com  
1712 um leitor Tecan-SNR (Sunrise-Basic Tecan, NS 1105003419 Groding, Áustria).

1713

1714

1715 *2.9 Análise estatística*

1716

1717 Os dados deste estudo foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e Teste de  
1718 Levene de homogeneidade. Para comparar as médias dos grupos Ctrl e TCF96h, foi realizado  
1719 um teste t de Student com nível de significância  $P < 0,05$  no software R studio (v. 1.3). Os  
1720 resultados são apresentados como média  $\pm$  DP.

1721 **3. Resultados**

1722 Neste estudo, a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de TCF não causou mortalidade na tilápia do  
1723 Nilo. No entanto, a exposição ao TCF causou comportamento anormal, como aumento dos  
1724 movimentos das brânquias e natação anormal variando de errático a letárgico e finalmente  
1725 ficando imóvel no fundo do aquário.

1726

1727 **3.1 Hematologia**

1728

1729 Os valores de Hb (%), Ht (%), CHCM (%), RBC (10<sup>6</sup>  $\mu$ L<sup>-1</sup>) e TPP (mg dL<sup>-1</sup>) de Ctrl e  
1730 TCF96h apresentaram médias semelhantes ao longo do experimento. Por outro lado, os níveis  
1731 de glicose e cortisol no plasma do grupo TCF<sub>96h</sub> foi significativamente maior do que o Ctrl  
1732 (Tabela 1).

1733

1734 **3.2 Sistema imunológico**

1735

1736 A exposição ao TCF promoveu aumento nos leucócitos totais (25,4%), trombócitos (42,3%)  
1737 e monócitos (43,4%) quando comparados ao Ctrl (Figuras 1A, 1B e 1C). Por outro lado, em  
1738 comparação com o Ctrl houve diminuição dos linfócitos totais (37,1%) no tratamento TCF96  
1739 (Figura 1D).

1740 Para a atividade respiratória de leucócitos (RAL), houve um aumento de 18,2% no TCF<sub>96h</sub>  
1741 em comparação com o grupo Ctrl, levando a uma possível relação entre aumento de leucócitos

1742 e aumento de RAL (Figura 2A). Para a atividade da lisozima, houve um aumento de 24,6% no  
 1743 grupo TCF<sub>96h</sub> em comparação com o grupo Ctrl (Figura 2B).

1744 3.3 Acetilcolinesterase (AChE)

1745

Tabela 1: Hemoglobina (Hb; g.dL<sup>-1</sup>), hematócrito (Ht;%), concentração média de hemoglobina celular (CHCM;%), glóbulos vermelhos (RBC;  $\mu\text{L}^{-1}$ ), proteína plasmática total (TPP), concentrações plasmáticas de glicose (glicose) de tilápia do Nilo exposta a Triclorfom na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> às 96h. Os valores são média  $\pm$  erro padrão. Médias na mesma linha com sobrescritos (\*) são significativamente diferentes (P <0,05)

Parameters	Treatments	
	Ctrl	TCF <sub>96h</sub>
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	9.18 $\pm$ 1.7	8.60 $\pm$ 1.5
Ht (%)	27.6 $\pm$ 2.3	25.7 $\pm$ 1.0
MCHC (%)	38.9 $\pm$ 4.8	36.5 $\pm$ 7.4
RBC (10 <sup>6</sup> $\mu\text{L}^{-1}$ )	1.43 $\pm$ 0.2	1.55 $\pm$ 0.3
TPP (mg dL <sup>-1</sup> )	4.02 $\pm$ 0.1	3.98 $\pm$ 0.3
Glicose (mg L <sup>-1</sup> )	48.3 $\pm$ 8.7	67.9 $\pm$ 14.4*
Cortisol (ng/mL)	23.6 $\pm$ 2.5	34.8 $\pm$ 9.1*

1746 A atividade da AChE diminuiu 86,3% no músculo e 59,2% no fígado no grupo TCF<sub>96h</sub> em  
 1747 comparação com o grupo Ctrl (Figura 3A e 3B).

1748

1749

1750

1751

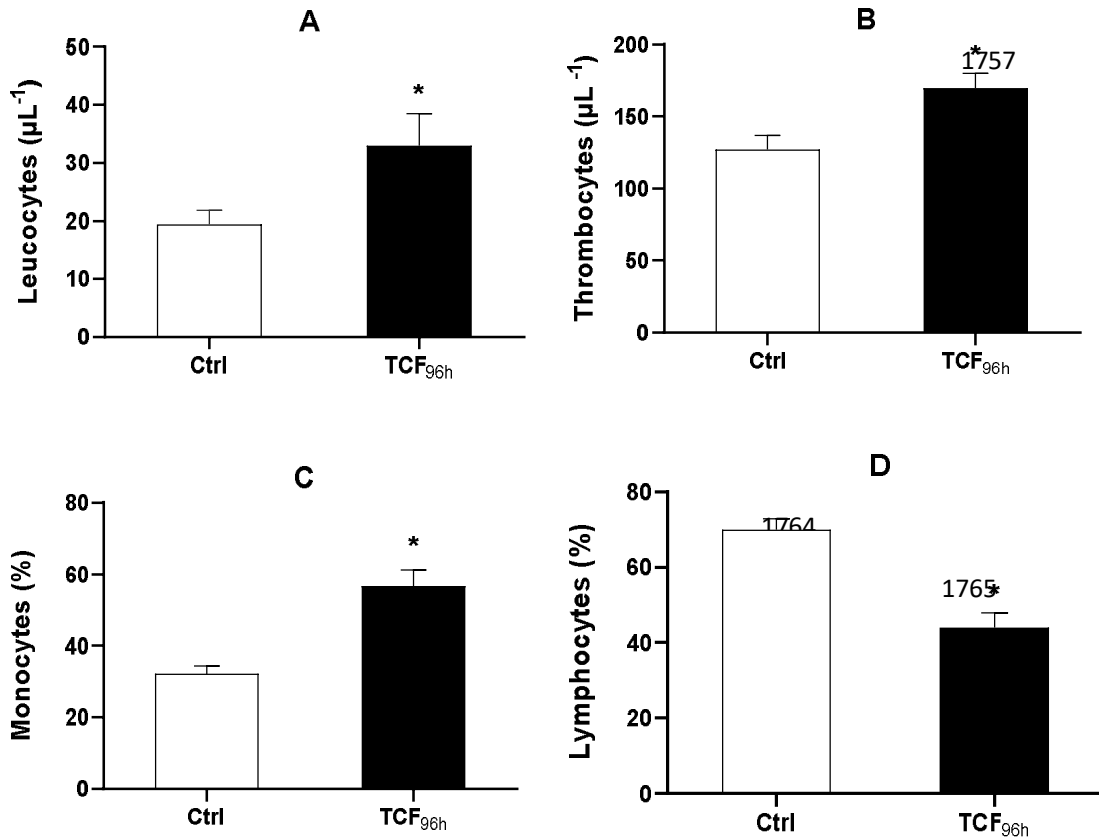
1752

1753

1754

1755

1756



1761

1762

1763

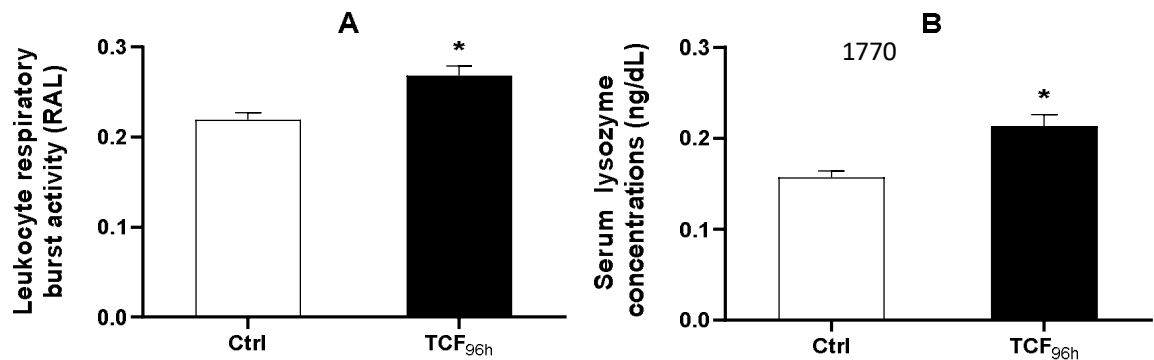
1766

Figura 1. Contagem de leucócitos (A), trombócitos (B), monócitos (C) e linfócitos (D) em tilápia do Nilo do Controle (Ctrl) e exposta a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de triclorfon por 96 h (TCF<sub>96h</sub>). Barras representam médias ± erro padrão. \* Diferenças entre os grupos (P < 0,05)

1767

1768

1769



1771

Figura 2. Atividade da lisozima (A) e atividade respiratória dos leucócitos (B) da tilápia do Nilo do Controle (Ctrl) e exposta a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> Triclorfon às 96 h (TCF<sub>96h</sub>). Barras representam médias ± erro padrão. \* Diferenças entre os grupos (P < 0,05)

1772

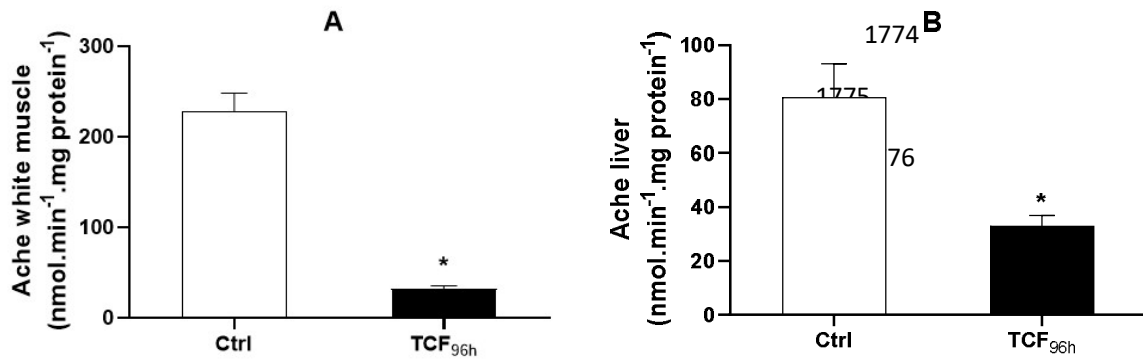
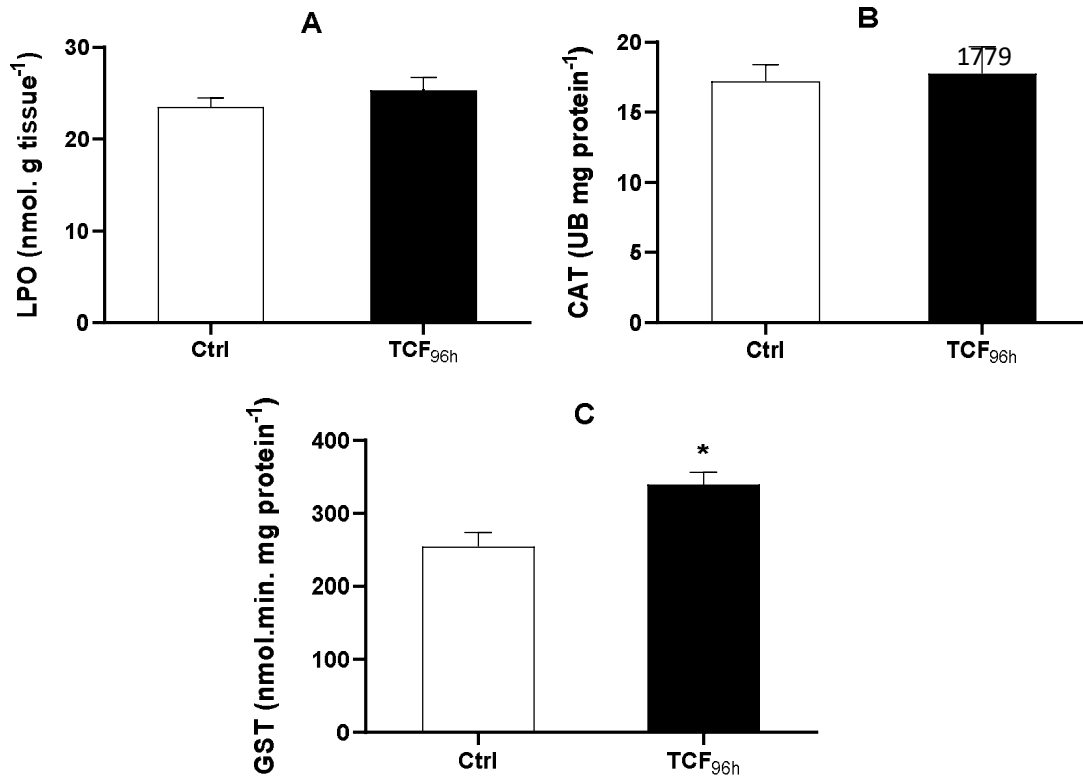


Figura 3. Atividade de acetilcolinesterase do músculo branco e do fígado (AChE; nmol.Min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>) da tilápia do Nilo do Controle (Ctrl) e exposta a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Triclorfon por 96 h (TCF<sub>96h</sub>). Barras representam médias ± erro padrão. \* Diferenças entre os grupos (P < 0,05)

1777

1778



1780

1781

1782

1783

1784

1785

1786

1787

Figura 4. Níveis de peroxidação lipídica (LPO; nmol g tecido<sup>-1</sup>), atividade da catalase (CAT; BU mg.proteína<sup>-1</sup>) e Glutaciona-S-transferase (GST; nmol mgPT<sup>-1</sup>) no tecido hepático de tilápia do Nilo do Controle e exposta a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Triclorfon por 96 h (TCF<sub>96h</sub>). Barras representam médias ± erro padrão. \* Diferenças entre os grupos (P < 0,05)

1788

1789 3.4 Estresse oxidativo

1790 A atividade de CAT hepática e LPO foram iguais em ambos os grupos (Figura 4A e 4B).  
1791 Por outro lado, os peixes do TCF96h apresentaram um aumento de 25,1% na atividade hepática  
1792 da enzima GST em relação ao Ctrl (Figura 4C).

1793 **4. Discussão**

1794 A tilápia do Nilo sobreviveu à exposição a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de TCF após 96h. No entanto, os  
1795 peixes exibiram comportamentos anormais de natação e suas respostas fisiológicas mudaram  
1796 devido à condição de estresse. Embora o TCF não tenha sido letal para a tilápia do Nilo, ele  
1797 pode causar estresse em peixes, destacando a necessidade do uso controlado e cuidadoso do  
1798 TCF na aquicultura.

1799 De forma consistente, os dados disponíveis na literatura suportam que os níveis de cortisol  
1800 plasmático e glicose em peixes indicam efeitos tóxicos de certos estressores (Aerts et al. 2015;  
1801 Sadoul e Geffroy 2019). Níveis aumentados de cortisol no sangue são considerados uma  
1802 resposta primária de peixes sob estresse (Barton e Iwama 1991; Ray e Sinha 2014) e exposição  
1803 química (Wendelaar Bonga 1997). Quando os peixes são submetidos a condições de estresse,  
1804 uma sequência combinada de mobilização de energia adaptativa pode ser observada (Balasch e  
1805 Tort 2019). O modelo proposto é que o cortisol regula positivamente as vias envolvidas na  
1806 mobilização de substratos energéticos, incluindo a gliconeogênese, enquanto regula as vias que  
1807 requerem energia para lidar com o estresse (Faught et al. 2016). Assim, a hiperglicemia  
1808 observada após a exposição ao xenobiótico parece benéfica, pois fornece a energia necessária  
1809 para metabolizar e eliminar o composto tóxico (Ahmad 2011). A tilápia do Nilo exposta ao  
1810 TCF<sub>96h</sub> respondeu com hiperglicemia e aumentou seus níveis de cortisol plasmático, sugerindo  
1811 que os peixes estavam submetidos a uma condição de estresse. A hiperglicemia parece ser uma  
1812 resposta notável à exposição ao TCF em peixes e foi relatada por outros autores: Venturini et  
1813 al. (2014) observaram hiperglicemia em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após exposição a 8,4

1814  $\mu\text{g}$  de TCF (Masoten®) e Woo et al. (2018) relataram hiperglicemia em carpa comum (*Cyprinus*  
1815 *carpio L.*) após exposição ao TCF (Metriofonate®), na faixa de 0,5 a 4,0  $\text{mg.L}^{-1}$ .

1816 Além disso, o perfil de glóbulos vermelhos da tilápia do Nilo não foi influenciado pela  
1817 exposição ao TCF<sub>96h</sub>. No entanto, os glóbulos brancos totais aumentaram sob o TCF<sub>96h</sub> com  
1818 níveis aumentados de monócitos e trombócitos e diminuição dos linfócitos. Entre os leucócitos,  
1819 os monócitos da tilápia do Nilo exposta dobraram em comparação com os peixes não expostos.  
1820 Os leucócitos são conhecidos por sua capacidade de combater patógenos, aumentando a  
1821 produção de ROS em um processo conhecido como atividade respiratória de leucocitária (RAL)  
1822 (Biller-Takahashi et al. 2013). Além disso, os monócitos são considerados leucócitos com alta  
1823 capacidade de combater agentes estranhos pelo RAL no sistema imunológico (Girón-Pérez et  
1824 al. 2009; Biller-Takahashi et al. 2018). O aumento registrado de RAL observado para o TCF<sub>96h</sub>  
1825 pode ser entendido como uma estratégia que a tilápia do Nilo usou para lidar com a exposição  
1826 ao TCF. Nossos achados corroboram os relatos de Méndez et al. (2014), que observaram um  
1827 aumento do RAL em pacu prata (*Piaractus brachypomus*) exposto a 0,029  $\text{mg.L}^{-1}$  de TCF e por  
1828 Girón-Pérez et al. (2009), que expôs a tilápia do Nilo a 1,96  $\text{mg.L}^{-1}$  de outro organofosforado,  
1829 o Diazinon.

1830 A tilápia do Nilo ativou o sistema imunológico inato quando exposta ao TCF, enquanto o  
1831 sistema imunológico adaptativo mostrou-se reduzido. Essa redução de linfócitos indica uma  
1832 deficiência no sistema imune adaptativo de tilápia do Nilo exposta ao TCF. Foi sugerido que  
1833 os OPs podem modular os linfócitos por meio de receptores colinérgicos presentes no sistema  
1834 colinérgico não neuronal (Diáz e Pérez 2015). De acordo com Toledo-Ibarra et al. (2014), o  
1835 baço, importante órgão linfóide para os peixes, apresenta relevante atividade da AChE,  
1836 indicando atividade colinérgica no tecido. Assim, na presença da atividade colinérgica a  
1837 estrutura extraneural torna os peixes suscetíveis à ação do organofosforado envolvendo a AChE  
1838 (Araújo et al. 2016). Girón-Pérez et al. (2008) observaram que a tilápia do Nilo exposta a 3,9 e

1839 7,8 mg.L<sup>-1</sup> de Diazinon por 96-h apresentou redução da atividade da AChE e menor quantidade  
1840 de acetilcolina no baço, levando à exaustão a capacidade de proliferação de linfócitos.  
1841 Respostas semelhantes foram registradas por Toledo-Ibarra et al. (2016) após a tilápia do Nilo  
1842 ser exposta a 0,97, 1,95 e 3,91 mg.L<sup>-1</sup> de Diazinon por 24 h.

1843 A lisozima sérica, uma enzima importante no sistema imunológico inato dos peixes,  
1844 aumentou na tilápia do Nilo em resposta à exposição ao TCF<sub>96h</sub>. A lisozima é uma enzima do  
1845 mecanismo fisiológico inato dos peixes que possui propriedades antivirais, antibacterianas e  
1846 antiinflamatórias (Balfry e Iwama 2004). Esta enzima é sintetizada tanto no fígado quanto em  
1847 locais extra-hepáticos como os neutrófilos, monócitos e uma pequena quantidade em  
1848 macrófagos (Sauruabh e Sahoo et al. 2008). A lisozima é frequentemente alterada por  
1849 organofosforados (Díaz-Resendiz e Girón-Pérez et al. 2015), e dados específicos sobre a  
1850 atividade da lisozima em resposta à exposição ao TCF são escassos para a tilápia do Nilo.  
1851 Resultados semelhantes também foram registrados para outras espécies de peixes: Khoshbavar-  
1852 Rostami et al. (2006) registraram um aumento no conteúdo de lisozima no soro, rim e baço do  
1853 grande esturjão (*Huso huso*) exposto a 1,5 mg L<sup>-1</sup> de Diazinon. Li et al. (2013) observaram um  
1854 aumento na lisozima sérica de carpas comuns (*Cyprinus carpio* L.) expostas a 15 µg.L<sup>-1</sup> do  
1855 pesticida Clorpirifós®.

1856 Organofosforados, principalmente TCF, têm sido destacados como inibidores da AChE para  
1857 diferentes espécies de peixes (Sinha et al. 2010). Para a tilápia do Nilo, a exposição ao TCF<sub>96h</sub>  
1858 diminuiu a atividade muscular da AChE, corroborando os achados de outros autores e  
1859 enfatizando essa enzima como um potencial biomarcador para contaminação por TCF. A  
1860 diminuição da atividade da AChE em resposta à exposição ao TCF também foi registrada por  
1861 Chandrasekara & Pathiratne (2005), que submeteram a carpa comum a 0,25 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de  
1862 Dipterex®, Venturini et al. (2015) que expôs pacu a 8 µg L<sup>-1</sup> de Masoten®, Lu et al. (2018)  
1863 que expôs a carpa prussiana (*Carassius auratus gibelio*) a 500, 1.000 e 2.000 mg.L<sup>-1</sup> de TCF (>

1864 90% puro), Duncan et al. (2019) que expôs o tambaqui (*Colossoma macropomum*) a 0,26 e 0,46  
1865 mg.L<sup>-1</sup> de Masoten® e Baldissera et al. (2019) que expôs o jundiá (*Rhamdia quelen*) a 11 e 22  
1866 mg L<sup>-1</sup> de Masoten®.

1867 Poucos estudos avaliaram a atividade da AChE no fígado dos peixes; no entanto, alguns  
1868 autores relataram que o TCF altera a expressão gênica e a atividade da AChE no fígado de  
1869 peixes (Sinha et al. 2010; Lu et al. 2010). Assim, a avaliação da cinética da AChE é uma  
1870 ferramenta essencial para avaliar o grau de toxicidade do TCF em tecidos extraneuronais como  
1871 o fígado. Além disso, até onde sabemos, este é o primeiro estudo a demonstrar os efeitos do  
1872 TCF na cinética da AChE no fígado da tilápia do Nilo. A atividade reduzida da AChE no fígado  
1873 mostra a presença de uma estrutura colinérgica não neuronal na tilápia do Nilo suscetível as  
1874 alterações estruturais e funcionais devido à presença de TCF. A suscetibilidade da AChE  
1875 hepática significa que a ação do TCF no sistema colinérgico não se limita ao sistema nervoso  
1876 central dos peixes. A AChE é uma enzima que está presente na junção neuromuscular entre o  
1877 nervo motor e o músculo. Nessa região, essa enzima tem funções neurofisiológicas cruciais,  
1878 como a propagação de impulsos nervosos no sistema nervoso periférico. No fígado, o  
1879 conhecimento sobre a organização celular do sistema colinérgico e seu significado biológico é  
1880 muito limitado.

1881 A influência marcante do TCF em uma variedade de espécies reafirma o papel inibidor do  
1882 TCF na atividade da AChE, destacando a importância do uso de uma quantidade segura ou  
1883 limitando o uso deste composto em aquicultura. A influência do TCF na atividade da AChE  
1884 também reforça a necessidade de pesquisas específicas para esclarecer a correlação entre a  
1885 exposição dos peixes e os comportamentos anormais de natação aqui observados.

1886 Observando o sistema de defesa antioxidante da tilápia do Nilo exposta ao TCF96h, houve  
1887 aumento da atividade da GST hepática, enquanto a atividade da CAT ou a formação de LPO  
1888 hepática permaneceram em níveis de controle. É sabido que a enzima GST desempenha um

1889 papel importante no processo de biotransformação química e na rota de desintoxicação dos  
1890 xenobióticos no tecido hepático (Huber et al. 2008). Em peixes, o GST está envolvido com o  
1891 mecanismo de conjugação de GSH com diclorvos, um metabólito hepático do TCF, permitindo  
1892 a desintoxicação de pesticidas (Peña-Llopis et al. 2003). Coelho et al. (2011) também relataram  
1893 um aumento na atividade da GST do fígado em peixes-zebra (*Danio rerio*) expostos a 2,5 mg.L<sup>-1</sup>  
1894 de TCF (Pestanal®). A regulação positiva da atividade GST em resposta to TCF enfatiza que  
1895 a enzima desempenha um papel crucial na desintoxicação fisiológica da tilápia do Nilo.

1896 A atividade aumentada da GST no fígado em tilápia do Nilo pareceu ser suficiente para  
1897 prevenir a produção de ROS, enquanto não houve aumento no LPO hepático de peixes expostos  
1898 ao TCF. O efeito observado do TCF no sistema de defesa antioxidante também foi relatado por  
1899 Thomaz et al. (2009), que expôs a tilápia do Nilo a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Neguvon® por 96 h, e  
1900 verificou aumento na atividade da GST hepática, enquanto a atividade da CAT e LPO não se  
1901 alteraram. O Diazinon também aumentou a atividade hepática de GST na tilápia do Nilo (Uner  
1902 et al. 2007) e na tilápia moçambicana (*O. mossambicus*) (Rao 2006), respectivamente. Assim,  
1903 parece que a indução da atividade da GST é uma resposta ao processo de desintoxicação dos  
1904 organofosforados que previne injúrias químicas nos corpos dos peixes.

1905

## 1906 **5. Conclusão**

1907 Apesar do efeito extremamente eficiente do TCF no combate aos parasitas de peixes, os  
1908 efeitos colaterais podem causar distúrbios bioquímicos e fisiológicos em peixes, levando a uma  
1909 condição de estresse. O TCF levou a ações neurotóxicas nos sistemas nervosos central e  
1910 periférico e causou anormalidades no sistema imunológico, mesmo em doses subletais. Tais  
1911 fatos destacam a necessidade de busca de novos compostos que tenham pouco ou nenhum efeito  
1912 adverso sobre as espécies de peixes e substituir o TCF, eliminando seu uso na produção de  
1913 peixes.

1914 **Agradecimentos**

1915

1916 Os autores agradecem à Piscicultura Polettini pela doação de peixes. Agradecemos também  
1917 aos técnicos de laboratório Gino Vitorio Zambon, Marisa Pereira Carvalho e Ana Lucia Marigo  
1918 pelo apoio e assistência durante a fase experimental tentativas. Este estudo foi financiado pela  
1919 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Brasil, Banco  
1920 Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social - BNDES e Empresa Brasileira de Pesquisa  
1921 Agropecuária – EMBRAPA Meio Ambiente.

1922

1923 **Conflito de interesses.** Os autores declaram não haver conflito de interesses.

1924

1925 **6. Referências**

1926

1927 Abreu JS, Marzocchi-Machado CM, Urbaczek AC, Fonseca LM, Urbinati EC (2009)  
1928 Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus*  
1929 Holmberg, 1887). *Braz J Biol* 69: 1133–1139. [https://doi.org/10.1590/s1519-](https://doi.org/10.1590/s1519-69842009000500018)  
1930 [69842009000500018](https://doi.org/10.1590/s1519-69842009000500018)

1931 Aebi H (1983) Catalase. In: Bergmeyer HU (eds) *Methods of enzymatic analysis*. Third Edition.  
1932 Academic Press, London, pp 273–286.

1933 Aerts J, Metz JR, Ampe B, Decostere A, Flik G, De Saeger S (2015) Scales tell a story on the  
1934 stress history of fish. *PLoS One* 10: 2–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123411>

1935 Ahmad Z (2011) Acute toxicity and haematological changes in common carp (*Cyprinus carpio*)  
1936 caused by diazinon exposure. *African J Biotechnol* 10: 13852–13859.  
1937 <https://doi.org/10.5897/ajb11.1247>

1938 ANVISA - National health monitoring agency (2009) Reavaliação toxicológica do ingrediente  
1939 ativo triclorfon 95p .

1940 Araújo CRM, Santos VL dos A, Gonsalves AA (2016) Acetylcholinesterase - AChE: A  
1941 pharmacological interesting enzyme. *Rev Virtual Quim* 8: 1818–1834.  
1942 <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160122>

1943 Balasch JC, Tort L (2019) Netting the stress responses in fish. *Front Endocrinol* 10: 1–12.  
1944 <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00062>

1945 Baldissera MD, Souza CF, Descovi SN, Zanella R, Prestes OD, da Silva AS, and Baldisserotto  
1946 B (2019) Organophosphate pesticide trichlorfon induced neurotoxic effects in freshwater  
1947 silver catfish *Rhamdia quelen* via disruption of blood-brain barrier: Implications on  
1948 oxidative status, cell viability and brain neurotransmitters. *Comp Biochem Phys C:*  
1949 *Toxicology & Pharmacology* 218: 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.12.006>

- 1950 Balfry SK, Iwama, GK (2004) Observations on the inherent variability of measuring lysozyme  
1951 activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comp Biochem Phys B: Biochemistry*  
1952 and *Molecular Biology* 138: 207–211. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2003.12.010>
- 1953 Barton BA e Iwama GK (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with  
1954 emphasis on response and effects of corticosteroids. *Annual Rev Fish Diseases* 1: 3–26.  
1955 [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)
- 1956 Biller-Takahashi JD, Takahashi LS, Saita MV, Gimbo RY, Urbinati EC (2013) Leukocytes  
1957 respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus*  
1958 *mesopotamicus*. *Braz J Biol* 73: 425–429. [http://dx.doi.org/10.1590/S1519-](http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842013000200026)  
1959 [69842013000200026](http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842013000200026)
- 1960 Biller JD, Takahashi LS (2018) Oxidative stress and fish immune system: Phagocytosis and  
1961 leukocyte respiratory burst activity. *An Acad Bras de Cienc* 90: 3403–3414.  
1962 <http://10.1590/0001-3765201820170730>
- 1963 Bradford (1976) Revisiting a dogma: The effect of volume exclusion in molecular, crowding.  
1964 *Curr Opin Struct Biol* 30: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.10.005>
- 1965 Burrige L, Weis JS, Cabello F, Pizarro J, Bostick K (2010) Chemical use in salmon  
1966 aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquacul*  
1967 306: 7–23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.020>
- 1968 Coelho S, Oliveira R, Pereira S, Musso C, Domingues I, Bhujel RC, Soares AMVM, Nogueira  
1969 AJA (2011) Assessing lethal and sub-lethal effects of trichlorfon on different trophic  
1970 levels. *Aquat Toxicol* 103: 191–198.
- 1971 CONAMA - National environment council. Resolução N° 357, de 17 de março de 2005. Diário  
1972 Oficial da União, Brasília. Available via report  
1973 <http://www.mma.gov.br/portconama/rest0.5/res35705.pdf>. Accessed 16 jul 2020.
- 1974 Costa-Pierce BA (2003) Rapid evolution of an established feral tilapia (*Oreochromis* spp.): the  
1975 need to incorporate invasion science into regulatory structures. *Biol Invasions* 5: 71–84.
- 1976 Chandrasekara HU, Pathiratne A (2005) Influence of low concentrations of trichlorfon on  
1977 haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp,  
1978 *Cyprinus carpio* L. *Aquac Res* 36: 144–149. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01197.x)  
1979 [2109.2004.01197.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01197.x)
- 1980 Díaz-Resendiz KJG, Giron-Perez MI (2015) Effect of chlorpyrifos on the immune response of  
1981 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Rev Bio Cien* 3: 59–64.  
1982 <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.03.01.70>.
- 1983 Duncan WP, Idalino JJS, da Silva AG, Moda RF, da Silva HCM, Matoso DA, Gomes ALS  
1984 (2019) Acute toxicity of the pesticide trichlorfon and inhibition of acetylcholinesterase in  
1985 *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae). *Aquacul Int* 28: 815–830.  
1986 <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00497-w>
- 1987 Ellman GL, Courtney KD, Andres AJ, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric  
1988 determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88–95.  
1989 [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- 1990 Ellis AE (1990). Lysozyme assays. *Tech fish immun* 1: 101–103.

- 1991 EPA - Environmental protection agency (1991) Memorandum from the office of pesticides and  
 1992 toxic substances to office of pesticide programs division director, Washington, DC, U.S.5–  
 1993 6p
- 1994 FAO - Food and agriculture organization of the united nations (2014) The state of world  
 1995 fisheries and aquaculture, 2014. Available in <http://fao.org/2/sofia14e>. Access at 11  
 1996 September of 2020.
- 1997 Faruk MAR, Ali MM, Patwary ZP (2010). Evaluation of the status of use of chemicals and  
 1998 antibiotics in freshwater aquaculture activities with special emphasis to fish health  
 1999 management. J Bangladesh Agric Univ 6: 381–390.  
 2000 <https://doi.org/10.3329/jbau.v6i2.4838>
- 2001 Faught E, Vijayan MM (2016) Mechanisms of cortisol action in fish hepatocytes. Comp  
 2002 Biochem Phys B: Biochemistry and Molecular Biology 199: 136–145.  
 2003 <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.06.012>
- 2004 Girón-Pérez MI, Zaitseva G, Casas-Solis J, Santerre A (2008) Effects of diazinon and diazoxon  
 2005 on the lymphoproliferation rate of splenocytes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*):  
 2006 The immunosuppressive effect could involve an increase in acetylcholine levels. Fish  
 2007 Shellfish Immunol 25: 517–521.
- 2008 Girón-Pérez MI, Velázquez-Fernández J, Díaz-Resendiz K, Díaz-Salas F, Canto-Montero C,  
 2009 Medina-Díaz I, Robledo-Marengo M, Rojas-García A, Zaitseva G (2009) Immunologic  
 2010 parameters evaluations in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal  
 2011 concentrations of diazinon. Fish Shellfish Immunol 27: 383–385.  
 2012 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.06.004>
- 2013 Guimarães ATB, Silva de Assis HC, Boeger W (2008) The effect of trichlorfon on  
 2014 acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*.  
 2015 Ecotoxicol Environ Saf 68: 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.environ.2006.08.005>
- 2016 Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione-S-transferase, the first enzymatic step in  
 2017 mercapturic acid formation. J Biol Chem 249: 7130–7139.
- 2018 Heo GJ, Shin GW (2009) Acute and subacute toxicity of trichlorfon in guppies (*Poecilia*  
 2019 *reticulata*). Korean J Vet Res 49: 253–256.
- 2020 Hispano C, Bultó P, Blanch, AR (2013) Gnathia maxillaris infestation in exhibition aquaria:  
 2021 control and treatment strategies. J Appl Ichthyol 29: 1139–1144.  
 2022 <https://doi.org/10.1111/jai.12249>
- 2023 Huber PC, Almeida WP, Fátima ÂD (2008) Glutathione and related enzymes: biological roles  
 2024 and importance in pathological processes. Química Nova 31: 1170–1179.
- 2025 IBGE- Brazilian institute of geography and estatistic (2018) Produção da agropecuária  
 2026 municipal. Ministério de planejamento. Rio Janeiro, 108p. Link:  
 2027 <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/18/0> Acessed: in 17/09/2020.
- 2028 Jiang ZY, Hunt JV, Wolf SP (1992) Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for  
 2029 detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. Anal Biochem 202: 384–389.  
 2030 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-n](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-n)

- 2031 Khoshbavar-Rostami HA, Soltani M, Hassan HMD (2006) Immune response of great sturgeon  
2032 (*Huso huso*) subjected to long-term exposure to sublethal concentration of the  
2033 organophosphate, diazinon. *Aquacul* 256: 88–94.  
2034 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.041>
- 2035 Kruger NJ, Walker JM (1994). The Bradford method for protein quantification. *Meth Mol Biol*  
2036 32: 9–15.
- 2037 Lu J, Zhang M, Lu L (2018) Tissue metabolism, hematotoxicity, and hepatotoxicity of  
2038 trichlorfon in *Carassius auratus gibelio* after a single oral administration. *Front Physiol* 9:  
2039 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00551>
- 2040 Marín Méndez GA, Chacón Novoa RA, Céspedes Rubio ÁE, Barragán R, Schroniltgen I  
2041 (2014). Toxicity of trichlorfon exposure using an experimentally induced model with  
2042 silver pacu (*Piaractus brachyomus*). *Ces Med Vet Zootec* 9: 190–202.
- 2043 Pavanelli GC, Eiras JC, Takemoto RM (2002) Doenças de peixes: Profilaxia, diagnóstico e  
2044 tratamento. Second edition. Eduem, Maringá, 305p.
- 2045 Peña-Llopis S, Ferrando MD, Peña JB (2003) Fish tolerance to organophosphate-induced  
2046 oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-  
2047 acetylcysteine. *Aquat Toxicol* 65: 337–360. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00148-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00148-6)
- 2049 Ray SNC, Sinha RC (2014) Serum cortisol and glucose: Reliable bioindicators of stress in the  
2050 fish *Labeo rohita*. *J Innov* 1: 6–17.
- 2051 Rao JV (2006) Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain  
2052 biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Pestic Biochem*  
2053 *Physiol* 86: 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.01.008>
- 2054 Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal P (2014) Use of plant extracts in fish  
2055 aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives.  
2056 *Aquacul* 433: 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>
- 2057 Sadoul B, Geffroy B (2019) Measuring cortisol the major stress hormone in fishes. *Journal of*  
2058 *fish biology* 94: 540–555. <https://doi.org/10.1111/jfb.13904>
- 2059 Saurabh S, Sahoo PK (2008) Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune  
2060 system. *Aquac Res* 39: 223–239.
- 2061 Silva de Assis HC (1998) Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung vom  
2062 Gewässerverschmutzungen. Thesis, Berlin Technical University, Germany 83p.
- 2063 Sinha AK, Vanparys C, De Boeck G, Kestemont P, Wang N, Phuong NT, Scippo ML, De Coen  
2064 W, Robbens J (2010) Expression characteristics of potential biomarker genes in Tra  
2065 catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, exposed to trichlorfon. *Comp Biochem Physiol*  
2066 *Part D. Genomics Proteomics* 5: 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2010.05.001>
- 2067 Soares MP, Oliveira FC, Cardoso IL, Urbinati E C, de Campos CM, Hisano H, (2018) Glucan-  
2068 MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally  
2069 infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 73: 133–140.  
2070 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.046>

- 2071 Tham LG, Halmi MIE, Sharif MSA, Perumal N, Begum G, Syed MA, Shukor MY (2014)  
 2072 Sensitivity of crude and partially purified acetylcholinesterase from fish to carbamates and  
 2073 organophosphates. *J Environ Biol* 35: 286–287.
- 2074 Thomaz JM, Martins ND, Monteiro DA, Rantin FT, Kalinin AL (2009) Cardio-respiratory  
 2075 function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate  
 2076 insecticide trichlorfon (NEGUVON®). *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 1413–1424.  
 2077 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.11.003>
- 2078 Toledo-Ibarra GA, Díaz-Resendiz KJG, Pavon L, Girón-Pérez MI (2014) Cholinergic activity  
 2079 in mononuclear cells of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish. *Adv Neuroimmune Biol*  
 2080 5: 229–234. <https://doi.org/10.3233/NIB-140091>
- 2081 Toledo-Ibarra GA, Díaz-Resendiz KJG, Pavón-Romero L, Rojas-García AE, Medina-Díaz IM,  
 2082 Girón-Pérez MI (2016) Effects of diazinon on the lymphocytic cholinergic system of Nile  
 2083 tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Vet Immunol Immunopathol* 176: 58–63.
- 2084 Üner N, Oruç EÖ, Sevgler Y, Sahin N, Durmaz H, Usta D (2006) Effects of diazinon on  
 2085 acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*.  
 2086 *Environ Toxicol Pharmacol* 21: 241–245.
- 2087 Venturini FP, Moraes FD, Cortella LR, Rossi PA, Cruz C, Moraes G (2015) Metabolic effects  
 2088 of trichlorfon (Masoten®) on the neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus*  
 2089 *mesopotamicus*). *Fish Physiol Biochem* 41: 299–309. [https://doi.org:10.1007/s10695-014-](https://doi.org/10.1007/s10695-014-9983-y)  
 2090 [9983-y](https://doi.org/10.1007/s10695-014-9983-y)
- 2091 Wendelaar Bonga SE (1997) The stress response in fish. *Physiol Rev* 77: 591–625.  
 2092 <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>
- 2093 Woo SJ, Kim NY, Kim SH, Ahn SJ, Seo JS, Jung SH, Cho MY, Chung JK (2018) Toxicological  
 2094 effects of trichlorfon on hematological and biochemical parameters in *Cyprinus carpio* L.  
 2095 following thermal stress. *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol* 209: 18–27.  
 2096 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.03.001>
- 2097 WHO, World health organization (1992). Environmental health criteria 132: trichlorfon.  
 2098 International program on chemical safety. Genova. 1992, 166p.
- 2099 Xu WN, Liu WB, Liu ZP (2009) Trichlorfon induced apoptosis in hepatocyte primary cultures  
 2100 of *Carassius auratus gibelio*. *Chemosphere* 77: 895–901.  
 2101 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.043>
- 2102 Zago AC, Franceschini L, Garcia F, Schalch SHC, Gozi KS, Da Silva RJ (2014) Ectoparasites  
 2103 of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in cage farming in a hydroelectric reservoir in  
 2104 Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 23: 171–178.
- 2105  
 2106  
 2107  
 2108  
 2109  
 2110  
 2111  
 2112  
 2113

## Capítulo III

---

2114

2115

2116 **Defesas antioxidantes e alterações bioquímicas na tilápia do Nilo (*Oreochromis***  
2117 ***niloticus*): Respostas à exposição isolada e associada de triclofon e hipercarbia**

2118 **Resumo**

2119 Este estudo investigou os potenciais efeitos do triclofon (TCF) e da alta concentração de CO<sub>2</sub>  
2120 aquático, isoladamente ou associados, em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).  
2121 Os peixes permaneceram por 48 h nas condições experimentais, sendo os grupos: Controle (Ctrl  
2122 - livre de TCF, normocarbia = CO<sub>2</sub>  $\cong$  0,25 mm Hg); Triclofon (TCF - 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, normocarbia  
2123 = CO<sub>2</sub>  $\cong$  0,25 mm Hg); Hipercarbia (Hip - CO<sub>2</sub>  $\cong$  7,5 mm Hg) e Triclofon 0,5 mg.L<sup>-1</sup> +  
2124 hipercarbia (TCF<sub>Hip</sub> - CO<sub>2</sub>  $\cong$  7,5 mm Hg). Verificamos que a associação das condições  
2125 experimentais intensificou os danos sobre o tecido sanguíneo dos peixes. A redução do número  
2126 de eritrócitos e do hematócrito em peixes do grupo TCF e TCF<sub>Hip</sub> revelou uma deficiência no  
2127 transporte de O<sub>2</sub>, compensado pelo aumento na concentração de hemoglobina. A redução dos  
2128 leucócitos e trombócitos em peixes do grupo TCF e TCF<sub>Hip</sub> indicou uma menor resistência  
2129 imunológica para combater doenças patogênicas ou menor capacidade de recuperação após  
2130 danos sobre o tecido sanguíneo. Observou-se um aumento na atividade da lisozima em peixes  
2131 do grupo TCF, Hip e TCF<sub>Hip</sub>, sugerindo um aumento da ação do sistema imunológico  
2132 inespecífico no combate a infecções primárias nos peixes. O estudo também mostrou que o TCF  
2133 afeta o sistema colinérgico neuromotor dos peixes por meio da inibição da acetilcolinesterase  
2134 (AChE). O sistema de defesa antioxidante, avaliado pelo marcador de lipoperoxidação (LPO)  
2135 e atividade das enzimas catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), também foi alterado  
2136 pela ação do TCF associado com a hipercarbia. O aumento da LPO sugere que o TCF e  
2137 hipercarbia na água são fatores pró-oxidantes e, assim, a regulação positiva da atividade da  
2138 GST foi para manter as concentrações de LPO em níveis não prejudiciais para o tecido hepático.  
2139 Portanto, estes resultados mostram que os efeitos da interação dos fatores sobre a saúde dos  
2140 peixes são maiores quando comparado aos efeitos isolados do TCF. Assim, nossa pesquisa  
2141 destaca a importância de se considerar a interação dos múltiplos estressores no ambiente de  
2142 aquicultura a fim de melhor gerenciar o uso racional de compostos químicos em sistemas de  
2143 produção intensiva.

2144

2145 **Palavras chaves:** Aquicultura, dióxido de carbono, triclofon, toxicologia.

## 2146 **1. Introdução**

2147 O acúmulo de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) no ambiente aquícola tem se tornado uma das  
2148 principais preocupações para o cultivo dos peixes em sistemas de produção intensiva. Pelo  
2149 processo de respiração, os peixes excretam CO<sub>2</sub> pelas brânquias como um resultado esperado  
2150 do metabolismo aeróbio (Good et al., 2010). Em circunstância onde ocorrem altas densidades  
2151 e baixas taxas de troca de água por biomassa de peixes, o CO<sub>2</sub> excretado pode se acumular na  
2152 água circundante, tornando um fator limitante para o sistema de produção (Summerfelt et al.,  
2153 2000).

2154 A exposição altos níveis de CO<sub>2</sub> (hipercarbia) pode ter consequências prejudiciais para  
2155 os peixes (Aslam et al., 2019), como redução no ganho de peso e crescimento, na ingestão e  
2156 conversão alimentar (Fivelstad et al., 1998; 2003; 2007), alterações na concentração de íons  
2157 plasmático, nos parâmetros hematológicos e pH sanguíneo (Hayashi et al., 2004; Fivelstad,  
2158 2013; Kaya et al., 2016), elevação do cortisol e glicose plasmática (Petoichi et al., 2011) e  
2159 nefrocalcinose (Hosfeld et al., 2008). Mudanças no biomarcador oxidativo como hidroperóxido  
2160 (HP) e atividades das enzimas antioxidantes também foram observadas na exposição de peixes  
2161 em condição elevadas de CO<sub>2</sub> (Sampaio et al., 2012; Tomanek, 2014; Almroth et al., 2019).

2162 Os níveis operacionais seguros de CO<sub>2</sub> dependem da espécie de peixe e das  
2163 características físicas e químicas do ambiente. Por exemplo, a maioria das pesquisas sobre  
2164 níveis seguros de CO<sub>2</sub> na aquicultura foram conduzidos em salmonídeos, e o nível aceitável  
2165 para essa espécie varia de 10 a 20 mg.L<sup>-1</sup> (Boyd, 1979; Fivelstad et al., 1998). No entanto, sabe-  
2166 se que em água doce, devido a interação com os fatores abióticos como temperatura, saturação  
2167 de oxigênio, metais como o alumínio, alcalinidade e pH, a tolerância ao CO<sub>2</sub> pode ser bem  
2168 menor para a mesma espécie de peixe (Fivelstad, 2013). Por essa razão, o CO<sub>2</sub> é um parâmetro  
2169 crucial a ser controlado no ambiente de aquicultura intensiva, em especial, ambientes de água  
2170 doce (Aslam et al., 2019). Portanto, o monitoramento constante desse gás em conjunto com os

2171 parâmetros físicos e químicos da água são altamente recomendados (EFSA, 2008; Hosfeld et  
2172 al., 2008).

2173 Altos níveis de CO<sub>2</sub>, é uma condição que pode ser observado em sistema de recirculação  
2174 de água - RAS (Summerfelt et al., 2000). O sistema de RAS requer uma intensificação de  
2175 produção, o que dá origem a uma série de questões de qualidade da água que devem ser  
2176 consideradas, incluindo o acúmulo de dióxido de carbono (Skov, 2019). Devido a reutilização  
2177 da água nesse sistema de cultivo, o CO<sub>2</sub> é um parâmetro de qualidade da água que pode atingir  
2178 concentrações problemáticas por causa das altas densidades de estocagem ou baixo fluxo de  
2179 água (Brazil, 2006). Portanto, se o processo de tratamento da água não for controlado  
2180 adequadamente, a exposição de longo prazo a altos níveis de CO<sub>2</sub> pode ter consequências  
2181 prejudiciais para os peixes.

2182 Outra preocupação emergente na aquicultura intensiva é o uso do organofosforados  
2183 (OPs). O OPs são um grupo de compostos químicos sintéticos classificados como inseticidas  
2184 agrícolas. O principal efeito dos OPs em organismos invertebrados e vertebrados, incluindo  
2185 humanos, é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Monteiro et al., 2006). O  
2186 triclofon (TCF) (2,2,2-tricloro-1-dimetoxifosforiletanol) é um OPs amplamente utilizado em  
2187 tanques de cultivo de peixes em programas de controle de infestações parasitárias devido a sua  
2188 eficácia contra um amplo espectro de organismos. Embora o principal modo de ação dos OPs  
2189 seja a inibição da AChE, os estudos mostram que para os peixes expostos ao TCF, seus efeitos  
2190 não se limitam apenas à inibição desta enzima. Outros problemas também têm sido observados,  
2191 tais como supressão do sistema imunológico (Dunier et al., 1991; Chandrasekara & Pathiratne,  
2192 2005; Mendez et al., 2014 ), alteração nos parâmetros hematológicos (Whoo et al., 2018; Yonar  
2193 et al., 2020), inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Ducan et al., 2019; Baldissera et  
2194 al., 2019; Ferri et al., 2020), elevação do cortisol e glicose plasmática (Cardoso et al., 2020),

2195 distúrbios metabólicos e estresse oxidativo (Feng et al., 2008; Thomaz et al., 2009; Coelho et  
2196 al., 2011; Venturini et al., 2015) e alteração no desempenho de natação (McKenzie et al., 2017).

2197 A preocupação com o potencial efeito combinado de pesticidas com fatores abióticos  
2198 na produção de organismos aquáticos é importante para garantir a segurança da produção de  
2199 pescado. Entender os efeitos isolados do composto químico e sua interação com a condição  
2200 ambiental é essencial para facilitar as previsões das possíveis consequências. Embora vários  
2201 estudos tenham investigado o impacto individual do TCF e do CO<sub>2</sub>, estudos que consideram o  
2202 uso do TCF em altas concentrações de CO<sub>2</sub> não foram realizados, sendo somente determinada  
2203 a CL<sub>50</sub> das principais espécies considerando condições limnológicas adequadas. Sendo assim,  
2204 o presente estudo destaca a importância de considerar não apenas os efeitos isolados dos  
2205 agrotóxicos, mas também suas interações. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar se a  
2206 tilápia do Nilo expostas a concentrações subletais de TCF em ambientes com elevada  
2207 concentração de CO<sub>2</sub> experimentaria alterações fisiológicas e bioquímicas, conforme  
2208 determinado a partir da mensuração dos parâmetros hematológicos, imunológicos e  
2209 enzimáticos.

## 2210 **2. Material e métodos**

### 2211 *2.1 Aclimação dos peixes*

2212 Juvenis de tilápia do Nilo ( $42,23 \pm 1,09$  g) obtidos em uma piscicultura comercial  
2213 (Poletini, Mogi Mirim, SP, Brasil) foram mantidos em sistema de recirculação de água (4  
2214 L.min<sup>-1</sup> por aquário), com filtro físico e biológico (1500 L) e um suprimento contínuo de água  
2215 aerada e sem cloro para aclimação por três semanas antes da experimentação. Temperatura  
2216 (27,6 °C), oxigênio dissolvido (6,7) e pH (7,3) foram medidos diariamente com uma sonda  
2217 multiparâmetros (U-50, Horiba, Minami-ku, Kyoto, Japão) e amônia (0,03 mg.L<sup>-1</sup>) com um kit  
2218 comercial (Hach, Loveland, CO, EUA). Durante a aclimação, os peixes foram alimentados

2219 *ad libitum* com ração comercial (Guabi® específico para tilápia: 4-5 mm; 10% de umidade;  
2220 32% de proteína; 6,5% de gordura), consumindo em média 4% do peso corporal.

## 2221 *2.2 Protocolo experimental*

2222 Todos os procedimentos envolvendo os animais deste estudo foram realizados seguindo  
2223 os princípios éticos em experimentação animal e aprovados pelo Comitê de Ética em  
2224 Experimentação Animal da Embrapa Meio Ambiente (protocolo nº 005/2017).

2225 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro grupos  
2226 experimentais e três repetições, com 12 animais em cada unidade experimental, totalizando 36  
2227 peixes para cada grupo. Os peixes permaneceram por 48 h nas condições experimentais, sendo  
2228 os grupos: Controle (livre de TCF, normocarbica =  $\text{CO}_2 \cong 0,25$  mm Hg) (Ctrl); Triclorfon (0,5  
2229  $\text{mg.L}^{-1}$ , normocarbica =  $\text{CO}_2 \cong 0,25$  mm Hg) (TCF); Hipercarbica ( $\text{CO}_2 \cong 7,5$  mm Hg) (Hip) e  
2230 Triclorfon 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  + hipercarbica ( $\text{CO}_2 \cong 7,5$  mm Hg) (TCF<sub>Hip</sub>). Os parâmetros físico-  
2231 químicos da água foram medidos diariamente conforme descrito anteriormente.

2232 A exposição ao TCF foi feita adicionando ao aquário experimental o Masoten Bayer®,  
2233 um produto comercial que contém 80% de triclorfon (dimetil 2,2,2-tricloro-1-hidroxietyl  
2234 fosfato). A concentração escolhida de 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  foi baseada na recomendação para eliminar as  
2235 infestações de parasitas em tanques de cultivo (Pavanelli et al., 2002; Chandrasekara e  
2236 Pathiratne, 2005). O fabricante recomenda a aplicação do TCF por meio de banho de imersão  
2237 com duração de 1 hora, com 2 a 4 repetições no intervalo de 48 h conforme o grau de infestação  
2238 parasitária e a espécie de peixe.

2239 A hipercarbica foi determinada pelo método de adição do  $\text{CO}_2$  na água por meio de um  
2240 difusor de cerâmica no fundo do tanque, segundo Fivelstad et al. (2007) e Kaya et al. (2016). O  
2241 difusor dissolveu rapidamente o  $\text{CO}_2$  na água e também serviu como um agitador vigoroso.  
2242 Durante o período experimental, as amostras de água de cada unidade experimental foram  
2243 coletadas para quantificar a concentração de  $\text{CO}_2$  dissolvido. O método utilizado para esta

2244 coleta foi o headspace, descrito por Ioffe e Vitenberg (1984). Na Central Analítica Inorgânica,  
2245 da Embrapa Meio Ambiente – Jaguariúna, SP, a leitura do CO<sub>2</sub> nas amostras de água foi  
2246 determinada em cromatógrafo a gás (Shimadzu, GC-14A, Brasil), equipado com detector de  
2247 ionização por chama (Detector de Ionização por Chama, FID). Os valores de solubilidade de  
2248 Weiss, (1974) foram aplicados para converter a concentração de CO<sub>2</sub> em mg/L para pressão  
2249 parcial em microatmosfera (µatm). A conversão de pCO<sub>2</sub> (µatm) para pCO<sub>2</sub> (mm Hg) ocorreu  
2250 pela conversão (1 µatm x 10<sup>-6</sup> atm) e (10<sup>-6</sup> atm x 760 mm Hg). O pH da água foi monitorado  
2251 continuamente durante o teste de toxicidade com um microelétrodo de pH conectado a um  
2252 medidos de pH Quimis. Mod. 400A (Quimis Scientific Apparatus, São Paulo, SP, Brasil).

### 2253 *2.3 Parâmetros hematológicos*

2254 As amostras de sangue foram coletadas por punção caudal com seringa embebida com  
2255 EDTA (3%) para as análises hematológicas. A hemoglobina (Hb) foi dosada com kit comercial  
2256 (Labtest, São Paulo, Brasil). Os eritrócitos (RBC) foram contados em câmara de Neubauer com  
2257 microscópio óptico (Leica DM750 w) 40 x. O hematócrito foi determinado pelo  
2258 microhematócrito em tubos capilares heparinizados em centrífuga (NI 1807 Nova Instruments,  
2259 Piracicaba, SP, Brasil) por 5 min a 10.000 rpm. Os índices hematimétricos volume corpuscular  
2260 médio (VCM), concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM) foram calculados.

### 2261 *2.4 Parâmetros do estresse*

2262 O sangue foi centrifugado e o plasma foi usado para determinar a concentração de  
2263 glicose medida por glicose oxidase (Labtest, São Paulo, Brasil, código 84), e as concentrações  
2264 de cortisol foram determinadas por um ensaio imunoenzimático com kit comercial (DRG  
2265 International, Inc., EUA; Cortisol ELISA – EIA - 1887).

2266

## 2267 2.5 Parâmetros imunológicos

2268 Os leucócitos e trombócitos foram determinados usando lâminas de extensão de sangue  
2269 coradas com May-Grunwald-Giemsa-Wright e contadas ao microscópio (Leica DM750 w)  
2270 usando uma objetiva de imersão em óleo (100 x).

2271 Para determinar a atividade respiratória de leucócitos (RAL), as amostras de sangue  
2272 foram coletadas com uma seringa com heparina e processadas após a coleta (Biller-Takahashi  
2273 et al., 2013). Este método é baseado na determinação colorimétrica das espécies reativas de  
2274 oxigênio (ROS), que são produzidas pela atividade respiratória dos leucócitos e promove a  
2275 redução do nitrobluetetrazólio (NBT, Sigma, St. Louis, MO, EUA) em precipitado azul escuro  
2276 dentro do fagócito denominado grânulos de formazan (Soares et al., 2018). A densidade óptica  
2277 da solução final foi medida a 540 nm.

2278 Após a extração do soro, a atividade da lisozima foi medida por meio de ensaio  
2279 turbidimétrico (Ellis et al., 1990), com modificações parciais (Abreu et al., 2009), que lisou  
2280 uma suspensão de *Micrococcus luteus* (Sigma-Aldrich, M3770) e expressou como a  
2281 concentração de lisozima sérica ( $\text{ng dL}^{-1}$ ). Uma unidade de lisozima sérica é definida como a  
2282 quantidade de amostra que desencadeia uma redução na absorvância de  $0,001 \text{ min}^{-1}$  a 450 nm  
2283 em comparação com o controle (suspensão de *M. luteus* sem soro).

2284

## 2285 2.6 Obtenção dos tecidos

2286 No final de 48-h de exposição ao TCF e hipercarbia, os peixes das unidades  
2287 experimentais foram submetidos a eutanásia por meio da transecção da medula espinhal. Os  
2288 órgãos fígado e músculo foram cuidadosamente excisados e lavados com solução fisiológica  
2289 (0,9 % NaCl), secos com papel filtro, identificados e congelados em biofreezer ( $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até as  
2290 determinações bioquímicas.

2291

2292 *2.7 Estimativa de proteína*

2293 A concentração de proteína homogeneizada do fígado e músculo foi determinada pelo  
2294 método de Bradford (Bradford, 1976), adaptado para o leitor de microplacas Dynex MRXTC  
2295 250 (Kruge, 1994). Para essa análise foi utilizado a albumina de soro bovino (Sigma) como  
2296 padrão. A absorbância das amostras foi medida a 595 nm.

2297

2298 *2.8 Metabolismo oxidativo*

2299 As amostras de fígado foram rapidamente pesadas e homogeneizadas em Turratec TE  
2300 102 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 18.000 rpm. O tampão utilizado para homogeneização  
2301 foi o tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 a uma razão de diluição 1:10 p / v para os ensaios  
2302 de atividade CAT. Para o ensaio da atividade da GST foi utilizado o tampão de fosfato de  
2303 potássio 0,1 M pH 7,0 a uma razão de 1:5 p / v. Os homogeneizados foram centrifugados a  
2304 12000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Para a centrifugação foi utilizado uma centrífuga refrigerada  
2305 Hermle-Z323K (Hermle Labortechnik, Alemanha).

2306 A atividade da CAT foi determinada de acordo com Aebi et al. (1983) pelo  
2307 monitoramento da diminuição do peróxido de hidrogênio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 240 nm. Os decaimentos na  
2308 absorbância foram registrados a cada 15 s em tampão fosfato 50 mM e pH 7,0 contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
2309 15 mM e o extrato enzimático, com leitura em absorbância de 240 nm. Os valores da CAT estão  
2310 expressos em Bergmeyer (B.U.) por mg de proteína. A atividade da GST foi medida de acordo  
2311 com Habig et al. (1974) usando o substrato l-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato  
2312 para a medição da atividade enzimática. A mistura de ensaio continha 1 mM CDNB em etanol,  
2313 1 mM GSH, tampão de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e homogenatos de tecido. A  
2314 formação do aduto S-2,4-dinitrofenil glutathione foi monitorado pelo aumento da absorbância a  
2315 340 nm contra o branco durante 4 minutos com um pico de leitura a cada 30 segundos. As

2316 leituras da CAT e GST foram realizadas em microplacas utilizando um leitor Tecan-SNR  
2317 (Sunrise-Basic Tecan, NS 1105003419 Groding, Áustria).

2318

### 2319 *2.9 Lipoperoxidação lipídica (LPO)*

2320 A atividade da LPO foi determinada de acordo com o método proposto por Jiang et al.  
2321 (1991) que utilizou o xilenol laranja para determinar o hidroperóxido de lipídio (FOX –  
2322 oxidação ferrosa – laranja de xilenol). Homogenatos de tecidos foram previamente preparados  
2323 aplicando os mesmos procedimentos descritos acima para a enzima CAT. O hidroperóxido  
2324 lipídico foi determinado com 100 µL de amostra de tecido (previamente desproteneisados com  
2325 TCA 10%) adicionados 900 µL de reagentes de FOX contendo 250 µM de sulfato ferroso de  
2326 amônia, 100 µM alaranjado de xilenol, 25 µM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e 4 mM BHT em metanol 90% (v/v). As  
2327 misturas foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente antes das medições em um  
2328 espectrofotômetro SpectronicGenesys 5 (Milton Roy Company, PA, EUA) a 560 nm. Os níveis  
2329 de hidroperóxidos lipídicos foram expressos em nmol.g<sup>-1</sup> de tecido.

### 2330 *2.10 Acetilcolinesterase (AChE)*

2331 A atividade da AChE foi determinada pela técnica colorimétrica (Ellman et al. 1961) e  
2332 adaptada para microplaca (Silva de Assis, 1998). Iodeto de acetiltiocolina (ATC) 9 mM foi  
2333 usado como substrato e ácido 5,50-dítio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB) como reagente de cor.  
2334 A densidade óptica a 415 nm foi medida a cada minuto durante 10 minutos usando um leitor de  
2335 placas ELISA Dynex MRXTC 250 (Dynex Technologies Inc., Reino Unido). A atividade da  
2336 AChE foi expressa por mg de proteína.

### 2337 *2.11 Análise estatística*

2338 A influência dos fatores e sua interação foram avaliadas por ANOVA de dois fatores  
2339 para dados não balanceados, com base na teoria do modelo linear geral (GLM). Para cada

2340 variável, se a interação foi significativa ( $p < 0,05$ ), o teste t foi aplicado para comparar as  
2341 respostas entre os níveis dentro de cada fator. Além disso, foram realizados testes de Dunnett  
2342 para determinar qual fator particular era diferente do controle ( $p < 0,05$ ). Os resultados são  
2343 apresentados como média e respectivo desvio padrão para cada grupo. Todas as estatísticas  
2344 foram realizadas pelo software R studio (v. 1.3).

### 2345 **3. Resultados**

2346 Mortalidades não foram registradas em nenhum grupo experimental após exposição. O  
2347 pH da água caiu simultaneamente com a adição de  $\text{CO}_2$ . Nos grupos Hip e  $\text{TCF}_{\text{Hip}}$  o valor médio  
2348 do pH da água foi de 6,0 e o nível médio de  $\text{CO}_2$  ficou em torno de  $15 \text{ mg.L}^{-1}$ . No grupo Ctrl e  
2349 TCF o pH da água permaneceu acima de 7,0 e o nível médio de  $\text{CO}_2$  foi de cerca de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ .  
2350 Os achados relacionados ao pH, dióxido de carbono, oxigênio dissolvido e temperatura da  
2351 água durante o experimento estão apresentados na Tabela 1.

2352 Houve interação entre o TCF e Hip para a Hb ( $p = 0,006$ ) indicando que os níveis de Hb  
2353 em resposta à exposição ao TCF dependem dos níveis de  $\text{CO}_2$  na água (Tabela 2). Não houve  
2354 interação entre os níveis de TCF e Hip nos parâmetros Ht ( $p = 0,308$ ), MCHC ( $p = 0,210$ ), RBC  
2355 ( $p = 0,805$ ), TPP ( $p = 0,171$ ), glicose plasmática ( $p = 0,233$ ) e cortisol plasmático ( $p = 0,273$ ).  
2356 Essas variáveis plasmáticas apresentaram o mesmo padrão de resposta à exposição ao TCF em  
2357 condições de normocarbina e hipercarbina.

2358 Houve interação entre os níveis de TCF e de  $\text{CO}_2$  da água para os trombócitos ( $p =$   
2359  $0,001$ ) (Figura 1). Por outro lado, leucócitos ( $p = 0,117$ ), atividade respiratória de leucócitos ( $p$   
2360  $= 0,254$ ) e lisozima ( $p = 0,409$ ) não apresentaram interação entre o TCF e hipercarbina.

2361 Não houve interação entre o TCF e hipercarbina na atividade da AChE muscular ( $p =$   
2362  $0,12$ ; Figura 2). Na tilápia do Nilo, independentemente da condição de hipercarbina, a exposição  
2363 ao TCF diminuiu a atividade da AChE.

2364 Houve interação entre os fatores TCF e hipercarbia na atividade da GST do fígado (p =  
2365 0,031; Figura 3). Por outro lado, não houve interação entre o TCF e a hipercarbia para o  
2366 marcador de LPO e atividade da CAT no fígado.

#### 2367 **4. Discussão**

2368 O presente estudo é o primeiro a descrever as repostas fisiológicas e bioquímicas da  
2369 tilápia do Nilo (*O. Nilóticos*) após 48 h de exposição a concentração subletal de TCF combinado  
2370 a hipercarbia ambiental. A exposição aguda dos peixes a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de TCF no ambiente de  
2371 hipercarbia demonstrou afetar a eficiência de transporte de O<sub>2</sub> sanguíneo dos peixes, conforme  
2372 observado pela redução da RBC, Ht e aumento da Hb. O estudo também demonstra que a  
2373 aplicação do TCF em um ambiente em hipercarbia intensifica o estresse oxidativo nos  
2374 hepatócitos, evidenciado por mudanças na LPO e na atividade da GST. De modo isolado, a  
2375 exposição dos peixes a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de TCF também mostrou ser prejudicial para a função  
2376 neuromuscular. A redução na atividade da AChE observado neste estudo, demonstra que as  
2377 alterações conhecidas associadas ao TCF em artrópodes-alvos podem se traduzir em efeitos  
2378 semelhantes em organismos como os peixes. A exposição isolada dos peixes a condição de  
2379 hipercarbia promoveu efeitos adversos sobre os parâmetros cortisol e glicose, indicando maior  
2380 estresse metabólico nos peixes.

2381 A combinação do TCF e hipercarbia afetou o mecanismo envolvido na captação e  
2382 transporte de O<sub>2</sub> mais do que qualquer um dos fatores isoladamente. O aumento da Hb pode ser  
2383 visto como um ajuste fisiológico dos eritrócitos remanescentes para garantir a eficiência do  
2384 transporte e entrega de O<sub>2</sub> para os tecidos adjacentes, uma vez que, a redução RBC e Ht (%) foi  
2385 evidenciada. A diminuição no número de RBC e nos valores de Ht pode ser atribuída à hemólise  
2386 das hemácias, falha ou supressão do sistema hematopoiético (Jekins et al., 2003). Alterações  
2387 no conteúdo hematológico após a exposição a classe de OPs em condições de normocarbia é  
2388 uma resposta que também foi observada para a tilápia do Nilo (Cardoso et al., 2020) e outras

2389 espécies de peixes (Yonar et al., 2015; Haider et al., 2014; Whoo et al., 2018). Do mesmo modo,  
2390 a hipercarbia é uma condição ambiental que também tem sido relacionada com danos no tecido  
2391 sanguíneo dos peixes (Fivelstad et al., 2003; Sampaio 2012; Kaya et al., 2016). A presente  
2392 investigação, além de demonstrar que o TCF e a hipercarbia pode comprometer o sistema de  
2393 transporte de O<sub>2</sub> sanguíneo, reforçando os achados na literatura, também mostrou que ao  
2394 combinar esses fatores os efeitos destes compostos sobre componentes hematológicos como  
2395 RBC, Ht e Hb podem ser potencializados.

2396 Outro aspecto importante do sangue avaliado neste estudo foram os valores plasmáticos  
2397 de cortisol e glicose. Esses parâmetros quando analisados em conjunto, têm sido utilizados  
2398 como indicadores práticos para mensurar a extensão do estresse em peixes (Martínez-Porchas  
2399 et al., 2009). No presente estudo, os valores de cortisol aumentaram consideravelmente para os  
2400 peixes em condição de hipercarbia corroborando os achados já descritos na literatura. Ivanis et  
2401 al. (2008) observaram o aumento cortisol plasmático para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)  
2402 após a exposição de 24 h a 7,5 mm Hg. Petochi et al. (2011), verificaram valores elevados de  
2403 cortisol para o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) exposto a 24,7 mmHg. Fivelstad et al.  
2404 (1999; 2003), relataram o aumento do cortisol plasmático em salmão do atlântico após 2 e 3  
2405 dias de exposição a 5,7 e 9,0 mmHg, respectivamente. Crocker et al. (2000), reportaram um  
2406 aumento do cortisol plasmático em esturjão branco (*Acipenser transmontanus*) exposto a 20  
2407 mm Hg, sugerindo que a hipercarbia iniciou uma resposta de estresse nos peixes.

2408 Os mecanismos que explicam os maiores valores de cortisol em peixes expostos a  
2409 ambientes de hipercarbia não estão completamente elucidados na literatura. Raymond et al.  
2410 (2014), sugeriram que o aumento da concentração do cortisol plasmático em peixes expostos  
2411 ao elevado CO<sub>2</sub> na água está associado à necessidade da proliferação de células ricas em H<sup>+</sup>  
2412 ATPase (HRCs) e células ricas em Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (NaRCs), responsáveis por ajustar os  
2413 mecanismos do transporte de íons nas brânquias em condições de acidose imposta pela

2414 hipercarbia. Este aumento do cortisol ativa os processos de glicogenólise e gliconeogênese que,  
2415 normalmente, resulta na elevação na concentração da glicose plasmática (Crocker et al., 2000;  
2416 Martínez-Porachas et al., 2009). O aumento da glicose induzido pelo cortisol é fundamental  
2417 para os peixes, pois fornece substratos energéticos necessários para atender o aumento da  
2418 demanda energética de tecidos como o cérebro, brânquias e músculos diante do estresse  
2419 (Feidantsis et al., 2015). Portanto, a condição de hipercarbia induz mudanças nos processos  
2420 fisiológicos que envolve o deslocamento de energia que poderia ser utilizado no crescimento e  
2421 reprodução para elaborar uma resposta ao estresse, isso pode resultar em prejuízos no  
2422 desempenho como o crescimento dos peixes. Deste modo, o aumento do cortisol seguido da  
2423 elevação da glicose plasmática registrada nesse estudo, sugere que a exposição aguda a 7,5 mm  
2424 Hg é uma condição que induz o desequilíbrio alostático da tilápia do Nilo, esse distúrbio pode  
2425 resultar em perdas quantitativas de crescimento dos peixes no sistema de produção.

2426 Os OPs também são compostos capazes de alterar os componentes do sistema  
2427 imunológico dos peixes. Embora os mecanismos dessa imunotoxicidade não estejam  
2428 elucidados, os estudos mostram que as vias de geração de toxicidade dos OPs com efeitos  
2429 imunomoduladores em peixes incluem alterações no número de células leucócitos como  
2430 neutrófilos, macrófagos, linfócitos e também nos complementos séricos. Por exemplo,  
2431 Chandrasekara e Pathiratne (2005), reportam que a exposição da carpa comum (*Cyprinus*  
2432 *carpio*) nas concentrações 0,25 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de DiptereX® provocou redução dos linfócitos  
2433 nessa espécie. Uma redução na capacidade fagocítica dos leucócitos foi observado na tilápia do  
2434 Nilo exposta ao Diazinon nas concentrações 0,97 e 1,95 mg.L<sup>-1</sup> (Toledo-Ibarra et al., 2016;  
2435 Covantes-Rosales et al., 2018). No presente estudo, níveis mais baixos de leucócitos e  
2436 trombócitos foram registrados após a exposição da tilápia a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de TCF. O sistema  
2437 imunológico inato é um mecanismo de defesa fundamental dos peixes contra agentes estranhos  
2438 (Magnadóttir, 2006). Portanto, a redução dos leucócitos registrado no presente estudo sugere

2439 uma diminuição da resistência dos animais, tornando os indivíduos mais suscetíveis às doenças  
2440 causadas por patógenos. A trombocitopenia costuma ser o resultado da diminuição da produção  
2441 de trombócitos pela medula óssea ou destruição periférica excessiva dessas células (Campbell,  
2442 2015). Nos peixes, a redução dessas células indica deficiência no mecanismo de coagulação do  
2443 sangue, situação que prejudica cicatrização de feridas ou evitar quadros de hemorragias (Lang  
2444 et al., 2010). A exposição isolada da tilápia a 7,5 mm Hg também promoveu supressão do  
2445 sistema imune dos peixes, isso pode ser explicado em partes pelo aumento do cortisol  
2446 plasmático. A presença deste hormônio em níveis elevado no sangue tem o potencial de  
2447 suprimir as repostas imunológicas dos peixes (Balasch et al., 2019).

2448 A atividade da lisozima também aumentou na presença do TCF. Em peixes, a lisozima  
2449 é uma importante molécula de defesa do sistema imune inato, frequentemente alterada pelos  
2450 OPs (Díaz-Resendiz et al., 2015). Os estudos tem demonstrado que a exposição ao OPs tem  
2451 provocado aumento na atividade da lisozima em algumas espécies de peixes, Díaz-Resendiz &  
2452 Girón-Pérez (2014), que expuseram a tilápia do Nilo a 0,10 e 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de Clorpirifós®;  
2453 Khoshbavar-Rostami et al. (2006) que expuseram o esturjão (*Huso huso*) a 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de  
2454 Diazinon®; Li et al. (2013) que expuseram carpas comuns a 15 µg.L<sup>-1</sup> de Clorpirifós®. A  
2455 indução do sistema imunológico inato em condição de hipercarbia, também foi relatada para o  
2456 alabote do atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*) (De souza et al., 2016). O aumento na  
2457 atividade da lisozima sugere que os mecanismos de defesa inato com propriedades antivirais,  
2458 antibacterianas e anti-inflamatórias foram induzidos (Balfry & Iwama, 2004; Sauruabh &  
2459 Sahoo et al., 2008). Nesse estudo, os níveis mais altos na atividade da lisozima podem ser visto  
2460 como uma resposta compensatória do sistema imunológico não específico na proteção contra  
2461 infecções, uma vez que, houve supressão das células de leucócitos e trombócitos totais  
2462 circulantes.

2463 A inibição da atividade da AChE corresponde ao principal efeito dos OPs sobre os  
2464 artrópodes além de animais não alvos (McKenzie et al., 2017). Devido ao seu potencial  
2465 neurotóxico, o monitoramento da inibição da atividade da AChE tem sido utilizado como  
2466 biomarcador de toxicidade dessa classe de pesticida nos peixes (Fulton & Key, 2000; Kwong,  
2467 2002). No ambiente de aquicultura, para reduzir as infestações parasitárias, os piscicultores têm  
2468 utilizado os OPs como agentes quimioterápicos, sendo o TCF o mais difundido (Ducan et al.,  
2469 2020). Todavia, os estudos têm mostrado que a inibição da atividade da AChE em peixes  
2470 expostos ao TCF pode ocorrer em concentrações mais baixas do que 10% da CL<sub>50</sub>.  
2471 Chandrasekara & Pathiratne (2005) verificaram que a atividade da AChE foi reduzida em carpa  
2472 comum expostas a 0,25 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Dipterex®; Venturini et al. (2015) reportaram uma  
2473 inibição na atividade da AChE em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) expostos a 8 µg.L<sup>-1</sup> de  
2474 Masoten®; Duncan et al. (2019) observaram redução na atividade da AChE em tambaqui  
2475 (*Colossoma macropomum*) expostos a 0,26 e 0,46 mg.L<sup>-1</sup> de Masoten®. Cardoso et al. (2020)  
2476 que expuseram a tilápia do Nilo a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Masoten® por 96 h também verificaram a  
2477 redução da AChE no músculo e fígado.

2478 A redução na atividade da AChE no músculo observado nesse estudo apoia os achados  
2479 da literatura sobre o potencial neurotóxico do TCF sobre os peixes. Ao observarmos a redução  
2480 na atividade da AChE sabemos não só que os peixes foram contaminados por TCF, mas também  
2481 que uma concentração subletal de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> foi o suficiente para atingir o sítio de ligação da  
2482 molécula alvo para produzir desordem no sistema colinérgico dos peixes. A presença do TCF  
2483 na placa neuromotora em 48 h registrado nesse estudo pode explicar o seu potente efeito  
2484 neurotóxico. Baldissera et al. (2019) demonstraram em seus estudos que a exposição do jundiá  
2485 (*Rhamdia quelen*) ao TCF provocou uma ruptura da barreira hematoencefálica após 24 h, o que  
2486 pode indicar uma passagem descontrolada do pesticida do sangue para o sistema nervoso central

2487 nesse período e, assim, explicar a alta eficiência deste pesticida na inibição da AChE em um  
2488 curto período de exposição.

2489 Outro aspecto importante que deve ser considerado após a exposição dos peixes aos  
2490 diferentes estressores químicos, é o estresse oxidativo e seus efeitos nos tecidos. O estresse  
2491 oxidativo se desenvolve quando há um desequilíbrio entre a proporção de pró-oxidantes e  
2492 antioxidantes, levando à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Costa et al., 2008).  
2493 Quando ocorre o aumento da ERO, uma sequência de lesões pode ser observada em células,  
2494 tecidos e órgãos dos animais (Lima & Abdalla, 2001). Um dos principais processos induzidos  
2495 pelo ERO é a peroxidação lipídica (LPO) que ocorre em membranas biológicas ricas em ácidos  
2496 graxos poliinsaturados (Oruç & Usta, 2006). A LPO, por sua vez, altera as propriedades das  
2497 membranas celulares, perturbando a fisiologia normal das células (Yang et al., 2020). Portanto,  
2498 a LPO está entre os melhores preditores de danos oxidativos induzidos por diversos compostos  
2499 químicos (Ercal et al., 2001; Ozkan et al., 2012).

2500 Avaliando os resultados do presente estudo, verificamos que a combinação entre o TCF  
2501 e hipercarbia, resultou no aumento de LPO no tecido hepático dos peixes. Os OPs são  
2502 substâncias lipofílicas, e eles podem aumentar a LPO ao interagir diretamente com a membrana  
2503 plasmática celular (Hazarika et al., 2003). Os estudos também mostram que a condição de  
2504 hipercarbia é um fator que induz a formação de ERO em peixes (Tomanek et al., 2011; Sampaio  
2505 et al., 2012; Almroth et al., 2019). Portanto, podemos considerar que no ambiente de produção  
2506 em que ocorre o aumento de CO<sub>2</sub>, a aplicação de TCF na dosagem de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> pode  
2507 intensificar a LPO e, conseqüentemente, gerar estresse oxidativo nos hepatócitos.

2508 Na condição de peroxidação lipídica média ou alta, as células estimulam sua  
2509 manutenção e sobrevivência por meio dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, como  
2510 uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo (Ayala et al., 2014). Antioxidantes enzimáticos e  
2511 não enzimáticos são essenciais para manter o status redox das células dos peixes e servem como

2512 uma importante defesa biológica contra o estresse oxidativo (Monteiro et al., 2006). No sistema  
2513 antioxidante enzimático, tanto a CAT como a GST são importantes enzimas que desempenham  
2514 funções essenciais na neutralização da formação exacerbada de ERO, protegendo as células do  
2515 estresse oxidativo (Pisoschi & Pop, 2015).

2516 Neste estudo, a atividade da CAT aumentou após 48 h de exposição a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de  
2517 TCF e a hipercarbia, isolado ou associado. A CAT é uma importante enzima que atua em  
2518 conjunto com a SOD na eliminação de ROS, e o aumento na atividade dessas enzimas  
2519 representa o primeiro mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (Oruc, 2011). Além  
2520 disso, a CAT juntamente com a SOD são sensíveis e responde mais rapidamente contra o ROS  
2521 e, portanto, essas enzimas têm sido sugeridas como potenciais biomarcadores de toxicidade em  
2522 peixes de água doce expostos aos xenobióticos (Nwani et al., 2010). O aumento na atividade  
2523 da CAT em peixes expostos ao TCF é uma resposta que tem sido relacionada com a maior  
2524 formação de ERO. Thomaz et al. (2009) observaram que os níveis de ERO produzidos durante  
2525 a exposição da tilápia do Nilo a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Neguvon® alteram a capacidade de defesa dos  
2526 sistemas antioxidantes por meio do aumento de enzimas como o CAT. Xu et al. (2012)  
2527 relataram que o aumento da CAT após a exposição da carpa prussiana (*Carassius auratus*) a  
2528 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de TCF pode ser atribuído à capacidade desta enzima de eliminar ERO. Da mesma  
2529 forma, foi demonstrado que outros OPs também causam o aumento da CAT nos peixes.  
2530 Monteiro et al. (2006), reportaram que o aumento da CAT induzidos pelo Folisuper 600® em  
2531 matrinxã (*Brycon cephalus*), indica um estado antioxidante elevado na tentativa de neutralizar  
2532 os impactos do ROS no fígado, musculo e brânquias nessa espécie.

2533 Concentrações elevadas de CO<sub>2</sub> na água também são conhecidas por alterar a atividade  
2534 da CAT em organismos aquáticos. Almoroth et al. (2019), que investigaram os efeitos da pCO<sub>2</sub>  
2535 1000 µatm sobre as respostas das enzimas envolvidas na defesa antioxidante do tecido hepático  
2536 do alabote do atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*), reportaram um aumento na atividade

2537 CAT. Estudos anteriores também mostraram que a exposição de algumas espécies de  
2538 organismos aquáticos expostos a níveis aumentados de CO<sub>2</sub> na água pode resultar em regulação  
2539 positiva de genes de proteínas antioxidantes associados à desintoxicação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por exemplo,  
2540 Harm et al. (2014), mostraram que a exposição do caranguejo-aranha (*Hya araneus*) a pCO<sub>2</sub>  
2541 1,120 µatm e 1960 µatm apresentou regulação positiva na expressão de vários genes de  
2542 proteínas envolvidas na defesa antioxidante celular, incluindo peroxidases responsáveis pela  
2543 decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Portanto, a hipercarbia pode ser considerado um dos responsáveis  
2544 direto do aumento na atividade da CAT nos peixes.

2545 A GST é um grupo de isoenzimas multifuncionais e principalmente citosólicas, que  
2546 desempenham um papel importante na biotransformação e desintoxicação de vários compostos  
2547 eletrofilicos, por conjugação com a GSH (Rao et al., 2006). Além disso, a GST é considerada  
2548 uma importante enzima que atua contra as lesões celulares por estresse oxidativo, decompondo  
2549 radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio antes de interagir para formar a hidroxila reativa,  
2550 que tem uma série de efeitos biológicos adversos quando presente em grandes quantidades  
2551 (Kaur and Jindal, 2017). A indução da GST deve ser considerada benéfica em peixes e,  
2552 portanto, esta enzima tem sido usada como um biomarcador de exposição a xenobióticos (Van  
2553 der Oost et al., 2003; Coelho et al., 2011).

2554 A interação entre TCF e hipercarbia foi uma resposta observada no presente estudo. Isso  
2555 mostra que o efeito da combinação dos fatores é maior do que o observado no mesmo nível de  
2556 exposição de cada componente isoladamente. É sabido que, além de desempenhar uma função  
2557 importante no processo de desintoxicação de xenobióticos, a GST também atua na catálise de  
2558 vários compostos endógenos, incluindo produtos da peroxidação lipídica e produtos resultantes  
2559 do estresse oxidativo (Hayes & Pulford, 1995). Considerando o potencial pró-oxidantes do TCF  
2560 e a condição de hipercarbia, o aumento da GST pode estar relacionado com a necessidade de  
2561 redução do efeito tóxico do TCF ao mesmo tempo que tenta neutralizar os impactos da ERO no

2562 fígado dos peixes resultante das mudanças fisiológicas para lidar com a hipercarbia e da  
2563 biotransformação desse pesticida. Isso indica claramente que essa enzima desempenha um  
2564 papel importante na neutralização de produtos resultantes da LPO que tem uma série de efeitos  
2565 biológicos adversos quando presente em alta quantidade.

## 2566 **5. Conclusão**

2567 Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que os peixes expostos a  
2568 concentração subletal de TCF em associação a hipercarbia enfrentam problemas no sistema de  
2569 transporte de O<sub>2</sub>, distúrbios no sistema imunológicos e enzimático. Diante disso, é recomendado  
2570 realizar a mensuração dos parâmetros da qualidade da água, principalmente, da concentração  
2571 do CO<sub>2</sub> na água antes da aplicação do TCF em tratamento químico para controle de infestações  
2572 parasitárias. Os dados aqui apresentados também levantam preocupações em relação ao  
2573 aumento do uso de TCF e destacam a necessidade de mais testes sobre seus efeitos subletais  
2574 em peixes quando associado ao ambiente de hipercarbia.

2575

## 2576 **Agradecimentos**

2577 Os autores agradecem à Piscicultura Poletini pela doação de peixes. Agradecemos  
2578 também aos técnicos de laboratório Gino Vitorio Zambon, Marisa Pereira Carvalho e Ana Lucia  
2579 Marigo pelo apoio e assistência durante o ensaio experimental. Este estudo foi financiado pela  
2580 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / CAPES, Brasil, Banco  
2581 Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social / BNDES e Empresa Brasileira de Pesquisa  
2582 Agropecuária / EMBRAPA / Meio Ambiente.

## 2583 **6. Referências**

2584 Abreu, J. S., Marzocchi-Machado, C. M., Urbaczek A, C., Fonseca, L. M., Urbinati, E. C  
2585 Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus*  
2586 Holmberg, 1887). Brazilian Journal Biology. v 69, p. 1133–1139, 2009.

- 2587 <https://doi.org/10.1590/s1519-69842009000500018>
- 2588 Aebi, H. Catalase. In: Bergmeyer, H. U (ed) Methods of enzymatic analysis, 3rd edn. Academic  
2589 Press, London, pp 273–286, 1983.
- 2590 Almroth, B. C., de Souza, K. B., Jönsson, E., Sturve, J. Oxidative stress and biomarker  
2591 responses in the Atlantic halibut after long term exposure to elevated CO<sub>2</sub> and a range of  
2592 temperatures. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and  
2593 Molecular Biology. v. 238, p. 1–8, 2019. <https://doi.org/10.1101/510818>.
- 2594 Araújo C. R. M., Santos, V. L. A., Gonsalves, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A  
2595 pharmacological interesting enzyme. Revista Virtual de Química. v. 8, p. 1818–1834,  
2596 2016. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160122>
- 2597 Aslam, S. N., Navada, S., Bye, G. R., Mota, V. C., Terjesen, B. F., Mikkelsen, O. Effect of CO<sub>2</sub>  
2598 on elemental concentrations in recirculating aquaculture system tanks. Aquaculture. v.  
2599 511, 1–8, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734254>.
- 2600 Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and  
2601 signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxidative medicine  
2602 and cellular longevity. p. 32, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- 2603 Balfry, S. K., and Iwama, G. K. Observations on the inherent variability of measuring lysozyme  
2604 activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Comparative Biochemistry and  
2605 Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. v. 138, p. 207–211, 2004.  
2606 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2003.12.010>
- 2607 Baldissera, M. D., Souza, C. F., Descovi, S. N., Zanella R., Prestes, O. D., da Silva, A. S.,  
2608 Baldisserotto B. Organophosphate pesticide trichlorfon induced neurotoxic effects in  
2609 freshwater silver catfish *Rhamdia quelen* via disruption of blood-brain barrier:  
2610 Implications on oxidative status, cell viability and brain neurotransmitters. Comparative  
2611 Biochemistry. Physiology parte C: Toxicology & Pharmacology. v. 218, p. 8–13, 2019.  
2612 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.12.006>
- 2613 Biller, J. D., and Takahashi, L. S. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and  
2614 leukocyte respiratory burst activity. Anais da Academia Brasileira de Ciências. v. 90, p.  
2615 3403–3414, 2018. [Http://10.1590/0001-3765201820170730](http://10.1590/0001-3765201820170730)
- 2616 Boyd, C.E. Water Quality in Warm Water Fish Ponds. Agricultural Experiment Station, Auburn  
2617 University, Auburn, AL, 1979.
- 2618 Bradford. Revisiting a dogma: The effect of volume exclusion in molecular, crowding. Current  
2619 Opinion in Structural Biology. v. 30, p. 1–6, 1976.  
2620 <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.10.005>
- 2621 Brazil, B. L. Performance and operation of a rotating biological contactor in a tilapia  
2622 recirculating aquaculture system. Aquacultural engineering. v. 34, p. 261–274, 2006.  
2623 <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.06.005>
- 2624 Cardoso, I., Soares, M., Angelis, C., Ferri, G., Ishikawa, M., Jonsson, C., Sampaio, F. 2020.  
2625 Physiological and biochemical responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute  
2626 trichlorfon exposure. International Aquatic Research. v. 12, p. 243–253.  
2627 <https://doi.org/10.22034/IAR.2020.1904943.1071>

- 2628 Campbell T.W. Exotic Animal Hematology and Cytology. 4th edn. Ames: Wiley-  
2629 Blackwell,402p, 2015.
- 2630 Coelho, S., Oliveira, R., Pereira, S., Musso, C., Domingues, I., Bhujel, R. C., Soares, A. M. V.  
2631 M., Nogueira, A. J. A. Assessing lethal and sub-lethal effects of trichlorfon on different  
2632 trophic levels. Aquatic Toxicology. v. 103, p. 191–198, 2011.  
2633 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.03.003>
- 2634 Costa, M. J., Monteiro, D. A., Oliveira-Neto, A. L., Rantin, F. T., & Kalinin, A. L. Oxidative  
2635 stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®.  
2636 Ecotoxicology. v. 17, p. 153-163, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10646-007-0178-5>
- 2637 Covantes-Rosales, C. E., Trujillo-Lepe, A. M., Díaz-Reséndiz, K. J. G., Toledo-Ibarra, G. A.,  
2638 Ventura-Ramón, G. H., Ortiz-Lazareno, P. C., & Girón-Pérez, M. I. Phagocytosis and ROS  
2639 production as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) leukocytes by exposure  
2640 to organophosphorus pesticides. Fish & shellfish, v, 84, 189–195, 2019.  
2641 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.002>
- 2642 Chandrasekara, H. U., Pathiratne, A. Influence of low concentrations of Trichlorfon on  
2643 haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp,  
2644 *Cyprinus carpio* L. Aquacatic Research. v. 36, p. 144–149, 2005.  
2645 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01197.x>
- 2646 De Souza, K. B., Asker, N., Jönsson, E., Förlin, L., Sturve, J. Increased activity of lysozyme  
2647 and complement system in Atlantic halibut exposed to elevated CO<sub>2</sub> at six different  
2648 temperatures. Marine environmental research. v. 122, p. 143–147, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.09.005>
- 2650 Diaz-Resendiz, K. J. G., & Giron-Perez, M. I. Effect of chlorpyrifos on the immune response  
2651 of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Rev Bio Cien 3:59–64, 2015.  
2652 <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.03.01.70>
- 2653 Dunier, M., Siwicki, A. K., Demaël, A. Effects of organophosphorus insecticides: Effects of  
2654 trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*): III. In Vitro  
2655 effects on lymphocyte proliferation and phagocytosis and in Vivo effects on humoral  
2656 response. Ecotoxicology and Environmental Safety. v. 22, p. 79–87, 1991.  
2657 [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(91\)90049-u](https://doi.org/10.1016/0147-6513(91)90049-u)
- 2658 Duncan, W. P., Idalino, J. J. S., da Silva, A. G., Moda, R. F., da Silva, H. C. M., Matoso, D. A.,  
2659 Gomes, A. L. S. Acute toxicity of the pesticide trichlorfon and inhibition of  
2660 acetylcholinesterase in *Colossoma macropomum* (*Characiformes: Serrasalminidae*).  
2661 Aquaculture International. v. 28, p. 815–830, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00497-w>
- 2663 Ellis, A.E. Lysozyme assays. Techniques in fish immunology. v. 1, p. 101–103, 1990.
- 2664 Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric  
2665 determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology. v. 7, p. 88–95,  
2666 1961. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- 2667 EFSA (European Food Safety Authority). Scientific report of EFSA prepared by Working  
2668 Group on seabream welfare on Animail Welfare Aspects of Husbandry Systems for  
2669 Farmed European seabass and gilthead seabream. Annex I. EFSA J. 844, p. 1–89, 2008.

- 2670 Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N. Toxic metals and oxidative stress part I:  
2671 mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal*  
2672 *chemistry*. v. 1, p. 529-539, 2001. <https://doi.org/10.2174/1568026013394831>
- 2673 EPA - Environmental protection agency. Memorandum from the office of pesticides and toxic  
2674 substances to office of pesticide programs division director, Washington, DC, U.S. 5–6 p,  
2675 1991.
- 2676 Feidantsis, K., Poertner, H. O., Antonopoulou, E., & Michaelidis, B. Synergistic effects of acute  
2677 warming and low pH on cellular stress responses of the gilthead seabream *Sparus aurata*.  
2678 *Journal of Comparative Physiology B*. v. 185, p. 185–205, 2015.  
2679 <https://doi.org/10.1007/s00360-014-0875-3>
- 2680 Feng, T., Li, Z.B., Guo, X.Q., Guo, J.P., Effects of trichlorfon and sodium dodecyl sulphate on  
2681 antioxidant defense system and acetylcholinesterase of tilapia *Nilotica* in vitro. *Pesticide*  
2682 *Biochemistry and Physiology*. v. 92, p.107–113, 2008.  
2683 <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.10.002>
- 2684 Ferri, G. H., Cardoso, I. L., Gil, J. A., Jonsson, C. M., Rantin, F. T., & Ishikawa, M. M. .  
2685 Determination of acute median lethal concentration and sublethal effects on AChE activity  
2686 of *Gymnotus carapo* (Teleostei: Gymnotidae) exposed to trichlorfon. *Brazilian Journal*  
2687 *of Veterinary Research Animal Science*. e169354-e169354, 2020.  
2688 <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2020.169354>
- 2689 Fivelstad, S., Haavik, H., Løvik, G., Olsen, A.B. Sublethal effects and safe levels of carbon  
2690 dioxide in seawater for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.): Ion regulation and  
2691 growth. *Aquaculture* 160, 305-316, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00166-](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00166-X)  
2692 [X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00166-X)
- 2693 Fivelstad, S., Olsen, A. B., Asgard, T., Baeverfjord, G., Rasmussen, T., Vindheim, T.,  
2694 Stefansson, S. Long-term sublethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts  
2695 (*Salmo salar* L.): ion regulation, haematology, element composition, nephrocalcinosis and  
2696 growth parameters. *Aquaculture*. v. 215, p. 301–319, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0044-](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00048-0)  
2697 [8486\(02\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00048-0)
- 2698 Fivelstad, S., Waagbø, R., Stefansson, S., Olsen, A. B. Impacts of elevated water carbon dioxide  
2699 partial pressure at two temperatures on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr growth and  
2700 haematology. *Aquaculture* v. 269, p. 241–249, 2007.  
2701 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.039>
- 2702 Fivelstad, S. Long-term carbon dioxide experiments with salmonids. *Aquacultural Engineering*.  
2703 v. 53, p. 40–48, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.11.006>
- 2704 Fulton, M. H., & Key, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates  
2705 as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental*  
2706 *Toxicology and Chemistry: An International Journal*. v. 20, p. 37-45, 2001.  
2707 [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(2001\)020<0037:aiiefa>2.0.co;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(2001)020<0037:aiiefa>2.0.co;2)
- 2708 Good, C., Davidson, J., Welsh, C., Snekvik, K., & Summerfelt, S. The effects of carbon dioxide  
2709 on performance and histopathology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in water  
2710 recirculation aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, v. 42, p. 51-56, 2010.  
2711 <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2009.11.001>

- 2712 Habig, W. H., Pabst, M. J., Jacoby, W. B. . Glutathione S-transferase, the first enzymatic step  
2713 in mercapturic acid formation. *Journal of Biology Chemistry*. v. 249, p. 7130–7139, 1974.  
2714 [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- 2715 Haider, M. J., Rauf, A. Sub-lethal effects of diazinon on hematological indices and blood  
2716 biochemical parameters in Indian carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Brazilian Archives*  
2717 *of Biology and Technology*, v. 57, p. 947-953, 2014. [http://dx.doi.org/10.1590/S1516-](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201402086)  
2718 [8913201402086](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201402086)
- 2719 Harms, L., Frickenhaus, S., Schiffer, M., Mark, F. C., Storch, D., Held, C., Lucassen, M. Gene  
2720 expression profiling in gills of the great spider crab *Hyas araneus* in response to ocean  
2721 acidification and warming. *BMC genomics*, v. 15, p. 1-17. 2014. [https://doi.org/10.1186/1471-](https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-789)  
2722 [2164-15-789](https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-789)
- 2723 Hayashi, M., Kita, J. Ishmatsu, A. Acid-base responses to lethal aquatic hypercapnia in three  
2724 marine fishes. *Marine biology*. v. 144, p. 153–160, 2004. [https://doi.org/10.1007/s00227-](https://doi.org/10.1007/s00227-003-1172-y)  
2725 [003-1172-y](https://doi.org/10.1007/s00227-003-1172-y).
- 2726 Hayes, J. D., Pulford, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST  
2727 and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance.  
2728 *Critical Reviews Biochemistry Molecular Biology*. v. 30, p. 445–600, 1995. [https://doi:](https://doi.org/10.3109/10409239509083491)  
2729 [10.3109/10409239509083491](https://doi.org/10.3109/10409239509083491)
- 2730 Hazarika, A., Sarkar, S. N., Hajare, S., Kataria, M., & Malik, J. K. Influence of malathion  
2731 pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study.  
2732 *Toxicology*. v. 185, p. 1-8, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00574-7](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00574-7)
- 2733 Hosfeld, C. D., Engevik, A., Mollan, T., Lunde, T. M., Waagbo, R., Olsen, A. B., Breck, O.,  
2734 Stefansson, S., Fivelstad, S. Long-term separate and combined effects of environmental  
2735 hypercapnia and hyperoxia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*. v.  
2736 280, p. 146–153, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05>.
- 2737 Ivanis, G., Esbaugh, A. J., Perry, S. F. Branchial expression and localization of SLC9A2 and  
2738 SLC9A3 sodium/hydrogen exchangers and their possible role in acid–base regulation in  
2739 freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, v.  
2740 211, p. 2467-2477, 2008. [https://doi.org/ 10.1242/jeb.017491](https://doi.org/10.1242/jeb.017491)
- 2741 Ioffe, B.V., e Vitenberg, A.G., Head-space analysis and related methods in gas  
2742 chromatography. New York: Ed. Wiley, 1984.
- 2743 Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., Wolf, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for  
2744 detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochemistry*. v. 202, p.  
2745 384–389, 1992. [https://doi.org/ 10.1016/0003-2697\(92\)90122-n](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-n)
- 2746 Jenkins, F., Smith, J., Rajanna, B., Shameem, U., Umadevi, K., Sandhya, V., Madhavi, R.  
2747 Effect of sub-lethal concentrations of endosulfan on hematological and serum biochemical  
2748 parameters in the carp *Cyprinus carpio*. *Bulletin of environmental contamination and*  
2749 *toxicology*. v. 70, p. 993–997, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-0080-7>
- 2750 Kaya, H., Hisar, O., Yilmaz, S., Gürkan, M., Hisar, Ş.A. The effects of elevated carbon dioxide  
2751 and temperature levels on tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Respiratory enzymes,  
2752 blood pH and hematological parameters. *Environmental Toxicology and Pharmacology*.  
2753 v. 44, p. 114–119, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.003>

- 2754 Kaur, M., and Jindal, R. Oxidative stress response in liver, kidney and gills of  
2755 *Ctenopharyngodon idellus* (cuvier & valenciennes) exposed to chlorpyrifos. *MOJ Biology*  
2756 *and Medicine*, v. 1, p. 103-112, 2017. <https://doi/10.15406/mojbm.2017.01.00021>
- 2757 Kwong, T. C. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Therapeutic*  
2758 *drug monitoring*. v. 24, p. 144-149, 2002.
- 2759 Khoshbavar-Rostami, H. A., Soltani, M., Hassan, H. M. D. Immune response of great sturgeon  
2760 (*Huso huso*) subjected to longterm exposure to sublethal concentration of the  
2761 organophosphate, diazinon. *Aquaculture*. v. 256, p. 88–94, 2006.  
2762 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.041>
- 2763 Lang, M. R., Gihir, G., Gawaz, M. P., Müller, I. I. Hemostasis in *Danio rerio*: is the zebrafish a  
2764 useful model for platelet research?. *Journal of thrombosis and haemostasis*. v. 8, p. 1159–  
2765 1169, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03815.x>
- 2766 Lima, E. S., & Abdalla, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras  
2767 biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 37, 293-303, 2001.
- 2768 Li, X., Liu, L., Zhang, Y., Fang, Q., Li, Y., Li, Y. Toxic effects of chlorpyrifos on lysozyme  
2769 activities, the contents of complement C3 and IgM, and IgM and complement C3  
2770 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L). *Chemosphere*. v. 93, p. 428–433, 2013.  
2771 <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.023>.
- 2772 Magnadóttir, B. Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish immunology*, v. 20, 137-  
2773 151, 2006.
- 2774 Martínez-Porchas, M., Martínez-Cordova, L. R., Ramos-Enriquez, R. Cortisol and glucose:  
2775 reliable indicators of fish stress?. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*. p. 58–178,  
2776 2009.
- 2777 Mendez, G. A. M., Novoa, R. A. C., Rubio, Á. E. C., Barragán, I. S. R. Efectos toxicológicos  
2778 generados por la exposición a triclofon en un modelo inducido experimentalmente en  
2779 cachama blanca (*Piaractus brachypterus*). *Revista CES Medicina Veterinaria y*  
2780 *Zootecnia*. v. 9 , p. 190–203, 2014.
- 2781 Monteiro, D. A., De Almeida, J. A., Rantin, F. T., Kalinin, A. L. Oxidative stress biomarkers  
2782 in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide  
2783 Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C:*  
2784 *Toxicology & Pharmacology*. v. 14, p. 141–149, 2006.  
2785 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.01.004>
- 2786 McKenzie, D. J., Blasco, F. R., Belão, T. C., Killen, S. S., Martins, N. D., Taylor, E. W., &  
2787 Rantin, F. T. Physiological determinants of individual variation in sensitivity to an  
2788 organophosphate pesticide in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquatic Toxicology*, v.  
2789 189, p. 108–114, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.001>
- 2790 Nita, M., & Grzybowski, A. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the  
2791 pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior  
2792 and posterior eye segments in adults. *Oxidative medicine and cellular longevity*, p. 23 ,  
2793 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3164734>
- 2794 Oruc, E. Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver  
2795 of *Cyprinus carpio* (L.). *Environmental toxicology*, v. 26, p. 571-578, 2011.

- 2796 <https://doi.org/10.1002/tox.20573>
- 2797 Oruç, E. Ö., & Usta, D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of  
2798 diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental toxicology and*  
2799 *pharmacology*. v. 23, p. 48–55, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.06.005>
- 2800 Özkan, F., Gündüz, S. G., Berköz, M., Hunt, A. Ö., Yalın, S. The protective role of ascorbic  
2801 acid (vitamin C) against chlorpyrifos-induced oxidative stress in *Oreochromis niloticus*.  
2802 *Fish physiology and biochemistry*. v. 38, p. 635-643, 2012. [https://doi.org/10.1007/s10695-](https://doi.org/10.1007/s10695-011-9544-6)  
2803 [011-9544-6](https://doi.org/10.1007/s10695-011-9544-6)
- 2804 Pavanelli, G. C., Eiras, J. C., Takemoto, R. M. Doenças de peixes: profilaxia, diagnó stico  
2805 tratamento. Eduem, Maringa, 2002.
- 2806 Pisoschi, A. M., & Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A  
2807 review. *European journal of medicinal chemistry*. v. 97, p. 55–74, 2015.  
2808 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- 2809 Petochi, T., Di Marco, P., Priori, A., Finoia, M. G., Mercatali, I., Marino. Coping strategy and  
2810 stress response on European sea bass *Dicentrarchus labrax* to acute and chronic  
2811 environmental hypercarbia under hyperoxic conditions. *Aquaculture*. v. 315, p. 312–320,  
2812 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.028>
- 2813 Rao, J.V. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical  
2814 parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Pesticide. Biochemical.*  
2815 *Physiology*. v. 86, p. 78-84, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.01.008>
- 2816 Sampaio, F. G., Boijink, C. D. L., Dos Santos, L. R., Oba, E. T., Kalinin, A. L., Luiz, A. J. B.,  
2817 Rantin, F. T. Antioxidant defenses and biochemical changes in the neotropical fish pacu,  
2818 *Piaractus mesopotamicus*: Responses to single and combined copper and hypercarbia  
2819 exposure. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* v. 156, p. 178–186, 2012.  
2820 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.07.002>
- 2821 Saurabh S., & Sahoo, P. K. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune  
2822 system. *Aquatic Research*. v. 39, p. 223–239, 2008. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x)  
2823 [2109.2007.01883.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x)
- 2824 Silva de Assis HC. Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung vom  
2825 Gewässerverschmutzungen. Thesis, Berlin Technical University, Germany p, 83, 1998.
- 2826 Soares, M. P., Oliveira, F. C., Cardoso, I. L., Urbinati, E. C., de Campos, C. M., Hisano, H.  
2827 Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally  
2828 infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* v. 73, p. 133–140, 2018.  
2829 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.046>
- 2830 Summerfelt, S.T., Vinci, B.J., Piedrahita, R.H. Oxygenation and carbon dioxide control in water  
2831 reuse systems. *Aquacultural Engineering*. v. 22, p. 87–108, 2000.  
2832 [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(00\)00034-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(00)00034-0)
- 2833 Toledo-Ibarra, G. A., Díaz-Resendiz, K. J. G., Pavón-Romero, L., Rojas-García, A. E., Medina-  
2834 Díaz, I. M., & Girón-Pérez, M. I. Effects of diazinon on the lymphocytic cholinergic  
2835 system of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary immunology and*  
2836 *immunopathology*. v. 176, p. 58-63, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.05.010>

2837 Tomanek, L., Zuzow, M. J., Ivanina, A. V., Beniash, E., & Sokolova, I. M. Proteomic response  
2838 to elevated  $PCO_2$  level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative  
2839 stress. *Journal of Experimental Biology*. v. 214, p. 1836-1844, 2011. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1242/jeb.055475)  
2840 [10.1242/jeb.055475](https://doi.org/10.1242/jeb.055475)

2841 Tomanek, L. Proteomics to study adaptations in marine organisms to environmental stress.  
2842 *Journal of proteomics*. v. 105, p. 92-106, 2014. [https:// doi: 10.1016/j.jprot.2014.04.009](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.009)

2843 Thomaz, J. M., Martins, N. D., Monteiro, D. A, Rantin, F. T., Kalinin, A. L. Cardio-respiratory  
2844 function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate  
2845 insecticide trichlorfon (Neguvon®). *Ecotoxicol and Environmental Safety*. v 72, p. 1413–  
2846 1424, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.11.003>

2847 Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in  
2848 environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*,  
2849 v.13, 57-149, 2003. [https://doi/10.1016/s1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00126-6)

2850 Venturini, F. P., Moraes, F. D., Cortella, L. R., Rossi, P. A., Cruz, C., Moraes, G. Metabolic  
2851 effects of trichlorfon (Masoten®) on the neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus*  
2852 *mesopotamicus*). *Fish physiology and biochemistry*. v. 41, p. 299–309, 2015.  
2853 [https://doi.org:10.1007/s10695-014-9983-y](https://doi.org/10.1007/s10695-014-9983-y)

2854 Woo, S. J., Kim, N. Y., Kim, S. H., Ahn, S. J., Seo, J. S., Jung, S. H., Cho, M. Y., Chung, J. K.  
2855 Toxicological effects of trichlorfon on hematological and biochemical parameters in  
2856 *Cyprinus carpio L.* following thermal stress. *Comparative Biochemistry. Physiology*  
2857 *Part - C Toxicology & Pharmacology*. v. 209: p. 18–27, 2018.  
2858 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.03.001>

2859 Xu, W., Liu, W., Lu, K., Jiang, Y., Li, G. Effect of trichlorfon on oxidative stress and hepatocyte  
2860 apoptosis of *Carassius auratus gibelio* in vivo. *Fish physiology and biochemistry*. v. 38, p.  
2861 769-775, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9559-z>

2862 Yang, C., Lim, W., & Song, G. Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid  
2863 pesticides in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology &*  
2864 *Pharmacology*, 108758, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108758>

2865 Yonar, S. M., Yonar, M. E., Pala, A., Sağlam, N., Sakin, F. Effect of trichlorfon on some  
2866 haematological and biochemical changes in *Cyprinus carpio*: The ameliorative effect of  
2867 lycopene. *Aquaculture Reports*. v. 16, p. 1–6. 2020  
2868 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100246>

2869

2870

2871

2872

2873

2874

2875

2876 **TABELAS:**

2877

2878 Tabela 1: Parâmetros da água das unidades experimentais com tilápia.

<b>Grupos experimentais</b>	<b>Parâmetros</b>			
	pH	Dióxido de carbono (mg.L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Oxigênio dissolvido (mm Hg)
Ctrl	7.4 ± 0.02	5.10 ± 1.9	25.67 ± 0.68	4.50 ± 0.58
TCF	7.4 ± 0.12	5.16 ± 7.1	25.55 ± 0.86	5.94 ± 0.45
H-CO <sub>2</sub>	6.1 ± 0.43	14.20 ± 6.7	26.17 ± 0.24	5.34 ± 1.24
TCF <sub>H-CO<sub>2</sub></sub>	5.8 ± 0.10	14.53 ± 1.65	25.00 ± 0.49	5.76 ± 0.98

2879

2880

2881

2882

2883

2884

2885

2886

2887

2888

2889

2890

2891

2892

2893

2894

2895

2896

2897

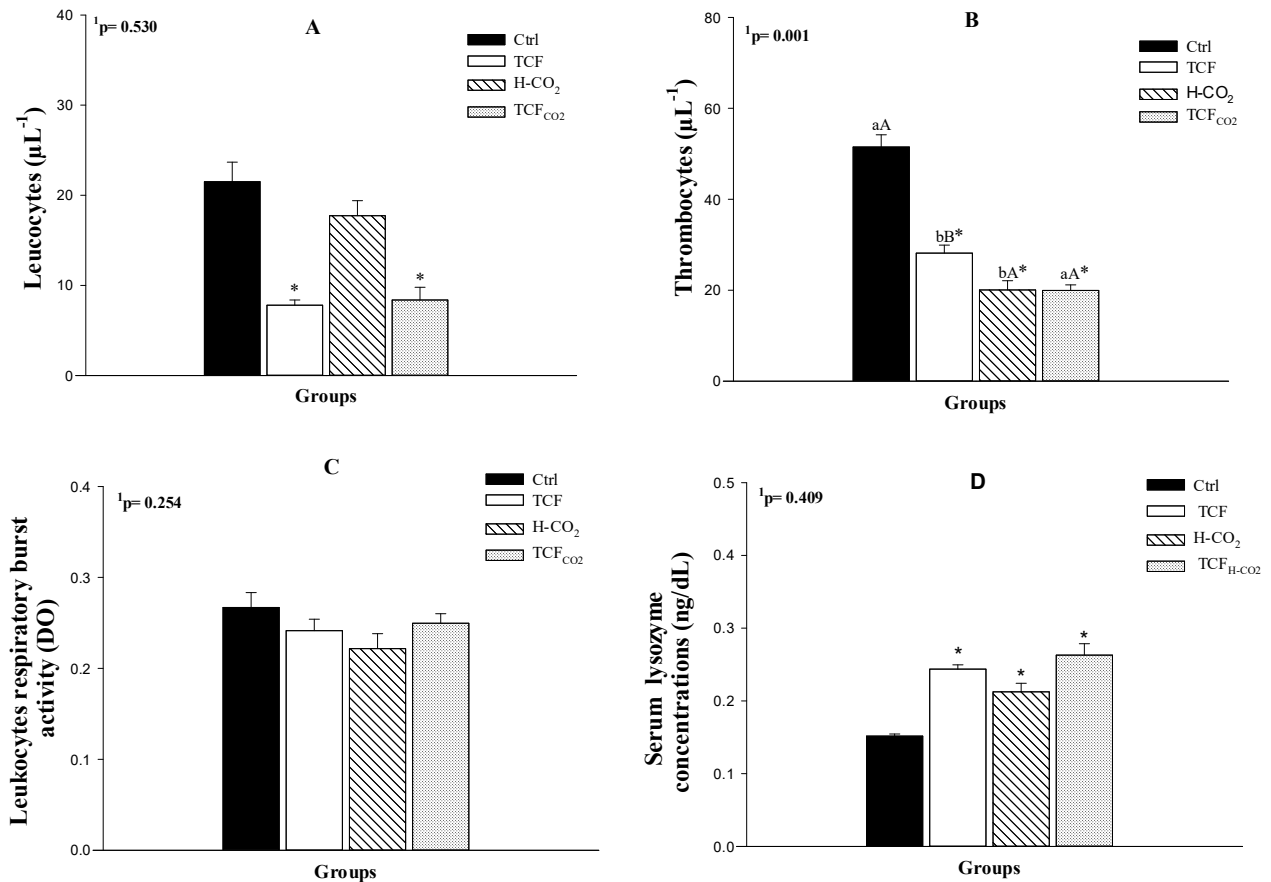
2898 Tabela 2: Hemoglobina (Hb; g / dL<sup>-1</sup>), hematócrito (Ht;%), concentração média de hemoglobina  
 2899 celular (CHCM;%), glóbulos vermelhos (RBC;  $\mu\text{L}^{-1}$ ), proteína plasmática total (TPP), plasma  
 2900 concentrações de glicose (glicose), concentrações de cortisol plasmático (cortisol) de tilápia do  
 2901 Nilo exposta por 48 horas em água livre de TCF e condição normal de CO<sub>2</sub> (Ctrl), triclofon na  
 2902 concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (TCF), água com alto teor de CO<sub>2</sub> (H-CO<sub>2</sub>), e interação entre TCF  
 2903 e água com alto teor de CO<sub>2</sub> (TCF<sub>H-CO2</sub>).

Parâmetros	Tratamentos				
	Ctrl	TCF	H-CO <sub>2</sub>	TCF <sub>H-CO2</sub>	TCF x [CO <sub>2</sub> ] <sup>1</sup>
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	8.8 ± 1.7 <sup>aA</sup>	7.5 ± 1.7 <sup>bA</sup>	7.8 ± 1.6 <sup>aB</sup>	10.6 ± 1.5 <sup>aA</sup>	<i>P</i> = 0.006
Ht (%)	28.7 ± 3.6	27.0 ± 3.1	29.7 ± 0.2	25.7 ± 1.3*	<i>P</i> = 0.308
MCHC (%)	32.3 ± 5.2	29.6 ± 7.3	27.31 ± 4.8	39.3 ± 8.4	<i>P</i> = 0.210
RBC (10 <sup>6</sup> $\mu\text{L}^{-1}$ )	1.65 ± 0.17	1.31 ± 0.27*	1.45 ± 0.19	1.24 ± 0.19*	<i>P</i> = 0.805
TPP (mg dL <sup>-1</sup> )	4.2 ± 0.38	4.0 ± 0.13	3.9 ± 0.26	3.9 ± 0.16	<i>P</i> = 0.171
Glicose (mg L <sup>-1</sup> )	48.4 ± 8.6	34.1 ± 5.9	58.8 ± 7.8*	54.6 ± 12.1	<i>P</i> = 0.233
Cortisol (ng/mL)	25.7 ± 0.89	20.7 ± 0.85	38.2 ± 0.95*	27.4 ± 1.28	<i>P</i> = 0.273

2904 Barras representam médias ± desvio padrão. As letras minúsculas mostram as diferenças entre  
 2905 os grupos com as mesmas condições de TCF, em diferentes níveis de CO<sub>2</sub> na água. As letras  
 2906 maiúsculas mostram as diferenças entre os grupos com mesmo nível de CO<sub>2</sub> na água em  
 2907 diferentes níveis de TCF. Barras representam médias ± erro padrão. \*Os grupos experimentais  
 2908 diferem do grupo controle (*teste t*; *p* < 0,05). <sup>1</sup> *p* valor para interação entre TCF e CO<sub>2</sub>.  
 2909

2910  
2911  
2912

FIGURAS:



2913 Figura 5. Leucócitos (A), contagem de trombócitos (B), atividade respiratória de leucócitos (C),  
2914 atividade de lisozima (D) da tilápia do Nilo exposta por 48 horas em água livre de TCF e em  
2915 condição normal de CO<sub>2</sub> (Ctrl), triclorfon na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (TCF); água com alto  
2916 teor de CO<sub>2</sub> (H-CO<sub>2</sub>), e interação entre TCF e água com alto teor de CO<sub>2</sub> (TCF<sub>H-CO2</sub>). Barras  
2917 representam médias ± desvio padrão. As letras minúsculas mostram as diferenças entre os  
2918 grupos com as mesmas condições de TCF, em diferentes níveis de CO<sub>2</sub> na água. As letras  
2919 maiúsculas mostram as diferenças entre os grupos com mesmo nível de CO<sub>2</sub> na água em  
2920 diferentes níveis de TCF. Barras representam médias ± erro padrão. \*Os grupos experimentais  
2921 diferem do grupo controle (*teste t*;  $p < 0,05$ ). <sup>1</sup> *p* valor para interação entre TCF e CO<sub>2</sub>.

2922

2923

2924

2925

2926

2927

2928  
2929  
2930  
2931  
2932  
2933  
2934  
2935  
2936  
2937  
2938  
2939  
2940  
2941  
2942  
2943  
2944  
2945  
2946  
2947  
2948  
2949  
2950  
2951  
2952  
2953  
2954  
2955  
2956  
2957  
2958  
2959

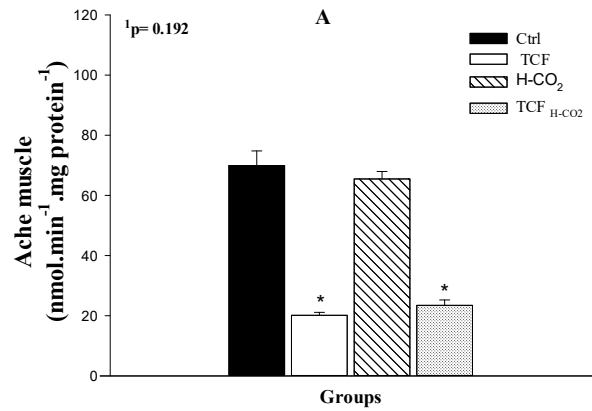


Figura 6. Atividade da acetilcolinesterase muscular (AChE; nmol. Min mg proteína<sup>-1</sup>) da tilápia do Nilo exposta por 48 h em água livre de TCF e condição de CO<sub>2</sub> normal (Ctrl), triclofon na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (TCF); água com alto CO<sub>2</sub> (H-CO<sub>2</sub>) e interação entre TCF e água com alto teor de CO<sub>2</sub> (TCF<sub>H-CO<sub>2</sub></sub>). Barras representam médias ± desvio padrão. As letras minúsculas mostram as diferenças entre os grupos com as mesmas condições de TCF, em diferentes níveis de CO<sub>2</sub> na água. As letras maiúsculas mostram as diferenças entre os grupos com mesmo nível de CO<sub>2</sub> na água em diferentes níveis de TCF. Barras representam médias ± erro padrão. \*Os grupos experimentais diferem do grupo controle (*teste t*;  $p < 0,05$ ). <sup>1</sup> *p* valor para interação entre TCF e CO<sub>2</sub>.

2960

2961

2962

2963

2964

2965

2966

2967

2968

2969

2970

2971

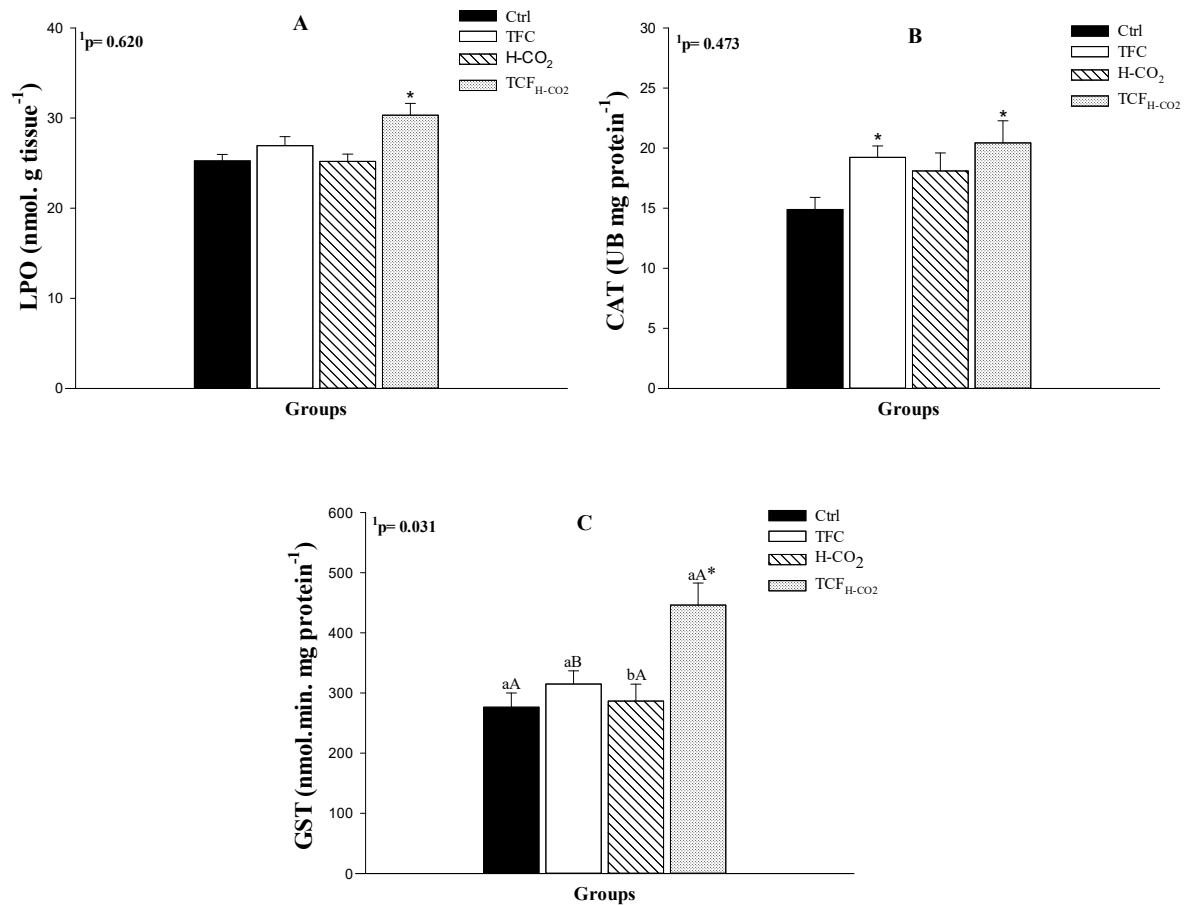
2972

2973

2974

2975

2976



2977 Figura 7. Níveis de peroxidação lipídica (LPO; nmol g tecido<sup>-1</sup>), atividade da catalase (CAT; BU mg proteína<sup>-1</sup>) e atividade da glutathiona S-transferase (GST; nmol mgPT<sup>-1</sup>) no tecido hepático de tilápia do Nilo exposta por 48-h em água livre de TCF e condição normal de CO<sub>2</sub> (Ctrl); triclorfon na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (TFC); água com alto CO<sub>2</sub> (H-CO<sub>2</sub>) e interação entre TCF e água com alto teor de CO<sub>2</sub> (TCF<sub>H-CO<sub>2</sub></sub>). Barras representam médias ± desvio padrão. As letras minúsculas mostram as diferenças entre os grupos com as mesmas condições de TCF, em diferentes níveis de CO<sub>2</sub> na água. As letras maiúsculas mostram as diferenças entre os grupos com mesmo nível de CO<sub>2</sub> na água em diferentes níveis de TCF. Barras representam médias ± erro padrão. \*Os grupos experimentais diferem do grupo controle (teste t; p < 0,05). 1 p valor para interação entre TCF e CO<sub>2</sub>.

2987

2988

2989

2990

2991

## Capítulo IV

---

2992

2993

### 2994 **Considerações Finais:**

2995         Neste estudo, verificou-se que a exposição da tilápia do Nilo ao TCF (Masoten®) TCF  
2996 por 96 h promove distúrbios nos biomarcadores do sistema colinérgico, no metabolismo  
2997 oxidativo, nos parâmetros hematológicos e imunológicos. Embora a concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>  
2998 <sup>1</sup> seja considerada baixa em tratamentos quimioterápicos para os peixes produzidos  
2999 comercialmente, essa concentração tem o potencial de promover danos subletais que exige  
3000 ajustes fisiológicos e bioquímicos para lidar com o estresse químico.

3001         Além disso, este estudo fornece informações sobre como os peixes são afetados pelo  
3002 efeito combinado do TCF e alta [CO<sub>2</sub>] ~ 14 mg.L<sup>-1</sup> na água. Aqui, mostramos que o uso de 5  
3003 mg.L<sup>-1</sup> de TCF em águas com elevada [CO<sub>2</sub>] potencializou o estresse oxidativo, evidenciado  
3004 no aumento da LPO e da atividade da CAT e GST. Promoveu distúrbios no tecido sanguíneo  
3005 como redução dos RBC e Ht. Além disso, induziu a supressão das células de defesa do sistema  
3006 imunológico. Portanto, a gestão adequada da qualidade da água, especialmente do controle da  
3007 [CO<sub>2</sub>], são necessárias antes do tratamento do TCF nos tanques de cultivo.

3008         Ao considerar um cenário experimental mais próximo da realidade da aquicultura  
3009 intensiva, este estudo pode ser considerado um dos primeiros a investigar a interação entre o  
3010 TCF e a alta [CO<sub>2</sub>], representando, portanto, uma contribuição na compreensão dos impactos  
3011 desses estressores na saúde da tilápia do Nilo no sistema de cultivo. Além disso, os resultados  
3012 aqui apresentados suportam a hipótese de que os níveis elevados de CO<sub>2</sub> na água podem  
3013 representar desafios fisiológicos para os peixes em ambientes de aquicultura. Este é um campo  
3014 de interesse para muitos grupos de pesquisa e não há dúvida de que receberá ainda maior  
3015 atenção no futuro.