

Efeito tóxico da mistura dos inseticidas clorpirifós e fipronil em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

*Toxic effect of the insecticide mixture chlorpyrifos and fipronil on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)*

Leticia Margarete de Moliner¹, Indianara Fernanda Barcarolli¹

¹ Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina, Brasil

Contato: leticia.mdemoliner@outlook.com

Keyword

biomarcador
toxicidade aquática
stresse oxidativo
análise enzimática

RESUMO

O aumento do uso de agrotóxicos na agricultura tem causado grande preocupação devido aos seus efeitos tóxicos em organismos aquáticos. Entre os inseticidas mais utilizados, destacam-se o clorpirifós e o fipronil, os quais chegam a ser utilizados em combinação em determinadas situações, podendo intensificar seu potencial tóxico. Nesse cenário, o presente estudo buscou avaliar os efeitos da exposição aguda (96 horas) à mistura dos referidos inseticidas em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), por meio da análise das atividades enzimáticas da acetilcolinesterase (AChE), catalase (CAT) e glutationa-S-transferase (GST) nos tecidos cerebral, branquial e hepático. Utilizou-se cinco grupos experimentais, incluindo um controle e quatro concentrações distintas dos inseticidas. Os resultados demonstraram que a exposição à mistura de clorpirifós e fipronil resultou em alterações significativas nas atividades das enzimas AChE, CAT e GST. No cérebro, houve ativação da AChE e aumento significativo da CAT em concentrações mais baixas, enquanto o fígado e as brânquias apresentaram inibição de CAT e GST em determinadas concentrações. Concluiu-se que a mistura de clorpirifós e fipronil tem o potencial de intensificar os danos em peixes, representando um risco ambiental significativo no ambiente aquático.

Palavras-Chave

biomarker
aquatic toxicity
oxidative stress
enzymatic analysis

ABSTRACT

The increasing use of pesticides in agriculture has raised great concern due to their toxic effects on aquatic organisms. Among the most commonly used insecticides are chlorpyrifos and fipronil, which are sometimes used in combination in certain situations, potentially increasing their toxic effects. In this context, the present study aimed to evaluate the effects of acute exposure (96 hours) to a mixture of these insecticides on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by analyzing the enzymatic activities of acetylcholinesterase (AChE), catalase (CAT), and glutathione S-transferase (GST) in brain, gill, and liver tissues. Five experimental groups were used, including one control and four different concentrations of the insecticides. The results showed that exposure to the chlorpyrifos and fipronil mixture led to significant changes in the activities of AChE, CAT, and GST. In the brain, AChE activation and a significant increase in CAT activity were observed at lower concentrations, while the liver and gills showed inhibition of CAT and GST at specific concentrations. It was concluded that the chlorpyrifos and fipronil mixture has the potential to intensify damage in fish, representing a significant environmental risk in aquatic ecosystems.

Informações do artigo

Recebido: 17 de junho, 2025
Aceito: 16 de dezembro, 2025
Publicado: 30 de dezembro, 2025

Introdução

O aumento populacional, a crescente necessidade de alimentos e a limitação de áreas cultiváveis têm levado ao uso excessivo de agrotóxicos. Esses produtos químicos são amplamente empregados para prevenir pragas e proteger as culturas agrícolas, garantindo a produtividade. No entanto, o uso indiscriminado desses compostos resulta em toxicidade para seres humanos e animais, além de ameaçar o equilíbrio ecológico e a biodiversidade. Além disso, a combinação de diferentes agrotóxicos, frequentemente utilizada em práticas agrícolas, intensifica os riscos, podendo gerar efeitos sinérgicos que aumentam os impactos negativos no meio ambiente (ABDOLLAHDOKHT *et al.*, 2022; LOURTHURAJ; HATSHAN; HUSSEIN, 2022; ZHANG *et al.*, 2022).

Entre os agrotóxicos amplamente usados no Brasil, destacam-se o clorpirifós e o fipronil. O clorpirifós é um inseticida organofosforado tóxico, amplamente empregado na agricultura (IHSAN; EDWIN; YANTI, 2019). Já o fipronil, um inseticida da classe dos fenilpirazois, interfere na transmissão dos impulsos nervosos, podendo causar paralisia e morte nos insetos (MONTEIRO *et al.*, 2019). Além de seus efeitos tóxicos diretos, o fipronil também pode impactar indiretamente os ecossistemas ao reduzir a disponibilidade de recursos essenciais, gerando riscos significativos para peixes sensíveis (GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015).

Logo, o aumento no uso de agrotóxicos representa uma séria ameaça à saúde humana e à biodiversidade. As misturas de produtos químicos utilizados na agricultura frequentemente interagem, gerando riscos toxicológicos adicionais, pois no cultivo de uma mesma cultura, são utilizados diversos agrotóxicos, os quais acabam se misturando, e, assim, prevalecendo no meio. Assim, para uma avaliação mais realista dos impactos ambientais, deve considerar esses efeitos combinados (KUNWAR *et al.*, 2021; FALFUSHYNNSKA *et al.*, 2022; SINHA *et al.*, 2022).

Ademais, os agrotóxicos no sistema aquáticos provêm de inúmeras fontes, ocasionando uma mistura de agrotóxicos no meio aquático. A presença de resíduos de agrotóxicos em ambientes aquáticos é preocupante, pois pode resultar em danos significativos aos organismos aquáticos, com peixes sendo particularmente vulneráveis (NAZ *et al.*, 2019; KUNWAR *et al.*, 2021; SINHA *et al.*, 2022).

Dado que os corpos d'água próximos a áreas agrícolas são frequentemente contaminados por uma variedade de agrotóxicos, torna-se essencial compreender como essas substâncias interagem e afetam os organismos quando misturadas (MENA *et al.*, 2022). Nesse contexto, a análise de parâmetros de estresse oxidativo em peixes é uma ferramenta relevante para avaliar os efeitos tóxicos dessas misturas. Alterações nas enzimas antioxidantes, como a CAT e a GST, podem servir como biomarcadores para a exposição a agrotóxicos, fornecendo informações cruciais sobre os impactos ambientais (NAZ *et al.*, 2019; BEVILAQUA *et al.*, 2020).

Diante disso, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos tóxicos da exposição combinada aos inseticidas clorpirifós e fipronil em tilápia

do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para isso, foram analisadas as atividades enzimáticas da AChE, CAT e GST nos tecidos cerebral, branquial e hepático de tilápias do Nilo expostas a esses agrotóxicos por 96 horas.

Material e métodos

O presente experimento foi conduzido no Centro de Ciências Agroveterinárias (Cav) da Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc), localizado no Município de Lages, Santa Catarina, Brasil. O estudo recebeu a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UDESC (CEUA/Udesc), sob n. 4289260323.

Juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram utilizadas no estudo, adquiridos em piscicultura da região, com massa de $10,88 \pm 6,54$ g e comprimento de $8,52 \pm 2,16$ cm. Os peixes foram aclimatados por 36 (trinta e seis) dias sob condições de aeração e temperatura constante, sendo alimentados e submetidos a trocas de água duas vezes ao dia.

Teste de toxicidade

Após o período de aclimatação, os peixes foram submetidos aos testes de toxicidade aguda (96 h), sendo distribuídos em cinco grupos distintos, conforme demonstrado na Tabela 1. Para o teste de toxicidade, utilizou-se duas formulações comerciais: uma contendo fipronil (2,5%) e outra composta por clorpirifós (48%) e xitol (50%).

Tabela 1 – Concentrações de clorpirifós e fipronil para cada grupo.

Grupo	Sigla	Quantidade (mg/L) Clorpirifós	Quantidade (%) Fipronil	Quantidade (mg/L) Clorpirifós	Quantidade (%) Fipronil
Controle	CTR	0,00	0,00	0	0
Mistura 1	T1	0,015	0,12	11,11	88,89
Mistura 2	T2	0,03	0,16	15,79	84,21
Mistura 3	T3	0,05	0,32	13,51	86,49
Mistura 4	T4	0,06	0,64	8,57	91,43

Fonte: Autores (2025)

Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em cinco aquários de 20 L cada, com 6 indivíduos por aquário. Durante as 96 h do teste de toxicidade aguda, foram mantidas condições de fotoperíodo de 12h claro: 12h escuro, aeração constante, pH $8,55 \pm 0,18$, temperatura de $28,00 \pm 0,32$ °C. Os peixes não foram alimentados e a água dos aquários não foi renovada durante o teste.

Após o teste, os peixes foram eutanasiados, e os tecidos (cérebro, brânquias e fígado) foram coletados, armazenados em microtubo tipo Eppendorf com capacidade de 1,5 mL, e mantidos sob refrigeração a baixa temperatura até a realização das análises enzimáticas. Os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um agitador mecânico em solução tampão de fosfato de potássio (1,0 M e pH=7,0).

Ressalta-se que, inicialmente realizou-se o teste de toxicidade aguda somando as concentrações de clorpirifós na quantidade de 0,015, 0,050, 0,075 e 0,1 mg/L, e de fipronil na quantidade de 0,00, 0,12, 0,16, 0,32 e 0,64 mg/L, respectivamente.

Contudo, ocorreu alta taxa de mortalidade dos indivíduos nos aquários que contia o clorpirifós na quantidade de 0,075 e 0,1 mg/L, motivo pelo qual, repetiu-se o teste de toxicidade, acrescentando concentrações menores de clorpirifós (0,03 e 0,06 mg/L), nos quais todos os indivíduos sobreviveram ao período experimental.

Atividade da acetilcolinesterase

A atividade da AChE foi determinada utilizando a metodologia proposta por Ellman *et al.* (1961), que se baseia na medição da taxa de produção de tiocolina. O ensaio foi realizado com 100 µL de iodeto de acetilcolina como substrato, que reagiu com 100 µL do reagente de cor DTNB, 50 µL do homogeneizado e 2 mL de tampão fosfato monopotássio (0,1 M, pH 7,0). Os reagentes foram misturados em cubetas de 4 mL, e a absorbância foi medida a cada 30 segundos durante 2 minutos, a 412 nm. A análise foi realizada exclusivamente no tecido cerebral da tilápia do Nilo.

Atividade da catalase

A atividade da CAT foi avaliada de acordo com o método de Beutler (1975). Foram utilizados 20 µL de amostras de tecido previamente homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (1,0 M, pH 7,0), 10 µL de peróxido de hidrogênio e 2 mL de solução tampão (composta por Tris-HCl 1M e EDTA 5 mM). Os reagentes foram adicionados a cubetas de quartzo de 4 mL, e a cinética da reação foi lida em um espectrofotômetro a 240 nm. A atividade foi determinada nos tecidos cerebrais, branquiais e hepáticos.

Atividade da glutationa-S-transferase

A atividade da GST foi medida com base na metodologia descrita por Keen *et al.* (1976). O ensaio envolveu a reação da glutationa reduzida com o substrato (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), catalisada pela GST presente na amostra. A análise foi realizada em cubetas de 4 mL, utilizando 2 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), 20 µL de CDNB, 20 µL de GSH e 20 µL da amostra. As leituras espectrofotométricas foram feitas a 340 nm, com a atividade determinada nos tecidos cerebral, branquial e hepático.

Análise de proteína totais

As proteínas totais foram determinadas com o emprego do método de biureto, que consiste na utilização do reagente de biureto, que é composto por sulfato de cobre, citrato trissódico, carbonato de sódio e hidróxido de sódio. O reagente de biureto reage com as proteínas da amostra, formando um complexo corado de cor azul, sendo proporcional a concentração proteica da amostra. O ensaio foi realizado em cubetas de 4 mL, utilizando 2 mL do reagente de biureto (Labtest) e 50 µL do homogeneizado das amostras.

O padrão foi preparado com 2 mL do reagente de biureto e 0,2 mL do reagente de cor, enquanto o branco continha apenas 2 mL do reagente de biureto. As leituras foram feitas a 545 nm, após ajustar o zero com o branco. A determinação foi realizada nos tecidos cerebral, branquial e hepático.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias foi analisada com o teste de Levene. Em seguida, para identificar diferenças significativas entre os grupos aplicou-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey para detalhar as diferenças específicas entre as médias ($p < 0,05$). Quando os pressupostos de normalidade e/ou homogeneidade não foram atendidos, aplicou-se a transformação de dados com base no método de Box e Cox (1964). As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares SAS e R Studio.

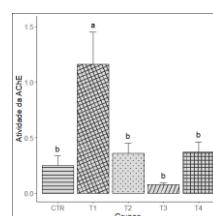
Resultados e discussão

Atividade cerebral da acetilcolinesterase

Os resultados da atividade cerebral da AChE em tilápia do Nilo após a exposição aguda aos inseticidas fipronil e clorpirifós são expostos na Figura 1 e apresentaram diferença estatisticamente significativa, sendo que, em T1 ocorreu a ativação da atividade cerebral da AChE, quando comparada aos demais grupos. Embora não haja diferença estatisticamente significativa, em T3 é possível uma leve inibição da atividade enzimática.

Registro da inibição da atividade da AChE sob a exposição combinada de agrotóxico foi constatada por Jiang *et al.* (2022) que, na mistura de clorpirifós e 1,1-dicloro-2,2-bis (p-clorofenil) etileno (p,p'-DDE), observaram que a atividade da AChE no cérebro de peixe zebra foi inibida significativamente em 60,6%. Aduziram que na exposição ao clorpirifós, a AChE facilita a hidrolização do neurotransmissor acetilcolina, e consequentemente, melhora a neurotransmissão nas sinapses colinérgicas.

Figura 1. Atividade da AChE no cérebro de *Oreochromis niloticus* após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h



Nota: Atividade da AChE em $\mu\text{mol}.\text{mg proteína}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Fonte: Autores (2025)

A atividade cerebral da AChE em peixes zebra também diminuiu significativamente sob efeito da exposição combinada de clorpirifós e glifosato em todas as concentrações testadas dos agrotóxicos (FALFUSHYNSKA *et al.*, 2022). Hatami, Banaee e Hagh (2019) observaram a inibição da atividade da AChE no cérebro de carpa capim sob a exposição combinada de clorpirifós e polietilenoglicol.

Bonifácio *et al.* (2016) analisaram o efeito tóxico do fipronil e do glifosato em *Cnesterodon decemmaculatus*, durante a exposição nas concentrações de 0,0084 µL/L e 0,00084 µL/L de clorpirifós, e 0,2 e 2 mg/L de glifosato, bem como as combinações dos dois agrotóxicos, durante seis semanas, e constataram que a mistura de clorpirifós e glifosato não afetou significativamente a atividade cerebral da AChE em *Cnesterodon decemmaculatus*.

Ainda, situação semelhante ao ocorrido no presente estudo, em T1, foi constatado sob efeito da mistura de fipronil e 2,4-D, no qual a atividade da AChE no músculo de peixe zebra foi ativada (VIANA *et al.*, 2022).

Por outra perspectiva, Reinwald *et al.* (2022), utilizando embrião de peixe-zebra, caracterizaram as respostas transcriptômicas a uma variedade de concentrações subletais de seis inseticidas direcionados a nervos e músculos com diferentes modos de ação primários específicos (abamectina, carbaril, clorpirifós, fipronil, imidaclopride e metoxicloro). Utilizaram concentrações de fipronil de 0,5-464 µg/L e de clorpirifós de ≤10 µg/L, sendo a pureza das substâncias de ≥99 e ≥98%, respectivamente. Os autores analisaram os fatores biológicos afetados e identificaram candidatos a biomarcadores para um conjunto de inseticidas direcionados a nervos e músculos que atuam pelos modos de ação, sendo que o clorpirifós tem como modo de ação a inibição da AChE e o fipronil possui o modo de ação de antagonista do canal de cloreto fechado GABA.

Atividade da catalase

Atividade da catalase no cérebro

A atividade cerebral da CAT em tilápia do Nilo sob efeito da exposição à combinação de fipronil e clorpirifós é apresentada na Figura 2 (A). Os resultados do experimento apresentaram diferença estatisticamente significativa, sendo que, em T1 ocorreu aumento significativo da atividade da CAT, se comparada aos demais grupos testados.

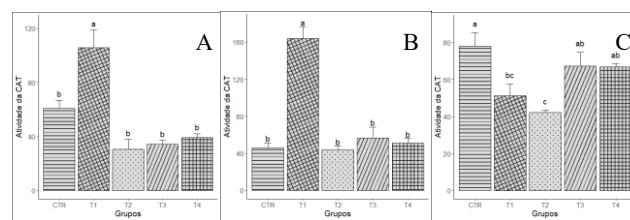
Situação similar foi constatada após a exposição da mistura de clorpirifós e p,p'-DDE, onde a atividade da CAT no cérebro de peixe zebra aumentou significativamente (JIANG *et al.*, 2022).

Todavia, sob efeito da combinação de clorpirifós e endosulfan, a atividade cerebral da CAT em *Labeo rohita* foi inibida significativamente após a exposição de 96 h aos agrotóxicos, enquanto a atividade da CAT nos músculos de *Labeo rohita* sob efeito da mistura dos dois agrotóxicos também diminuiu significativamente (NAZ *et al.*, 2019).

No cérebro de carpa comum, ocorreu a inibição da atividade da CAT após a exposição combinada de fipronil e buprofezina (GHAZANFAR; SHAHID; QURESHI, 2018).

Após a exposição à mistura de clorpirifós e atrazina, Xing *et al.* (2012) verificaram que a atividade cerebral da CAT em carpa comum diminuiu significativamente diante da exposição aos agrotóxicos.

Figura 2. Atividade da CAT no cérebro, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus* após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h



Nota: Atividade da CAT (µmol H₂O₂ metabolizado.mg de proteína-1.min-1) no cérebro (A), brânquias (B) e fígado (C) de *Oreochromis niloticus* exposta ao fipronil e clorpirifós por 96 h. Letras diferentes diferem estatisticamente ($p<0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Fonte: Autores (2025)

Bevilaqua *et al.* (2020) estudaram o efeito tóxico de fipronil em mistura com fungicidas (piraclostrobin e metil-tiofanato) em peixes zebra adultos, por sete dias, e verificaram que a mistura dos referidos agrotóxicos ocasionou a diminuição da atividade da CAT no cérebro dos peixes analisados.

Atividade da catalase nas brânquias

Em brânquias de tilápias do Nilo, os resultados obtidos da exposição aguda aos inseticidas fipronil e clorpirifós apresentaram diferenças estatisticamente significativas [Figura 2 (B)]. Similar à atividade cerebral da CAT, a atividade branquial da CAT aumentou significativamente na concentração T1.

A ativação da atividade da CAT em brânquias de peixes foi constatada por Viana *et al.* (2022), que observaram o aumento da atividade da CAT nas brânquias de peixe zebra após a exposição da mistura de fipronil e 2,4-D. Em brânquias de *Labeo rohita* expostas a clorpirifós e endosulfan (NAZ *et al.*, 2019) e em brânquias de peixe zebra sob a exposição combinada de clorpirifós e p,p'-DDE (JIANG *et al.*, 2022), a atividade da CAT também aumentou significativamente.

Resposta enzimática contrária foi constatada em carpa comum: a atividade da CAT nas brânquias foi inibida após a exposição em conjunto de fipronil e buprofezina (GHAZANFAR; SHAHID; QURESHI, 2018).

No coração de *Labeo rohita*, a atividade da CAT sofreu inibição sob efeito da combinação de clorpirifós e endosulfan pelo período de 96 h (NAZ *et al.*, 2019).

Já a exposição combinada de 2,4-D e fipronil não apresentou diferença significativa para a atividade da CAT nas brânquias de *Prochilodus lineatus*, embora houve uma leve inibição da atividade enzimática (PORTRUNELI *et al.*, 2021).

Viana et al. (2022) avaliaram o efeito do fipronil em *Danio rerio* após a exposição de 96 h da mistura de fipronil (3.10 L/kg) e 2,4-D (1.27 L/kg). Sob efeito da mistura de fipronil e 2,4-D, a atividade da CAT de corpo inteiro de peixe zebra não sofreu diferença significativa.

Sob uma perspectiva diferente, Fuller et al. (2022) enriqueceram pastilhas com a mistura de clorpirifós, fipronil, p,p'-DDE, bifentrina e esfenvalerato, e verificam seu efeito em juvenis de *Oncorhynchus tshawytscha*, bem como a influência da temperatura. Assim, constataram que a temperatura aumentou os efeitos dos agrotóxicos no desempenho da natação e de dois genes homeostáticos lipídios em juvenis de rei salmão.

Atividade da catalase no fígado

Sob efeito da exposição aguda à combinação dos inseticidas clorpirifós e fipronil, a atividade hepática da CAT em tilápia do Nilo apresentou diferença estatisticamente significativa, sendo que, em T1 e T3 foi constatado a inibição da CAT no fígado dos peixes após a exposição de 96 h ao fipronil, se comparado ao grupo controle, evidenciando que o fipronil afeta a atividade enzimática da CAT em tilápia do Nilo [Figura 2 (C)].

Do mesmo modo, a atividade hepática da CAT em carpa comum foi inibida após a exposição combinada de fipronil e buprofezina (GHAZANFAR; SHAHID; QURESHI, 2018). A combinação de fipronil e chumbo também ocasionou a inibição significativa da CAT em carpa comum (EL-MURR et al., 2016).

Já a exposição combinada de clorpirifós e p,p'-DDE ativou significativamente a atividade da CAT no fígado de peixe zebra (JIANG et al., 2022). Em *Labeo rohita*, a atividade hepática da CAT aumentou sob a exposição de 96 h da combinação de clorpirifós e endosulfan, sendo que no rim do espécime também foi identificado a ativação da atividade enzimática da CAT (NAZ et al., 2019). Carpas capim quando expostas a combinação de polietilenoglicol e clorpirifós apresentaram aumento significativo da atividade hepática da CAT para a espécie (HATAMI; BANAE; HAGHI, 2019).

Porém, a atividade da CAT no fígado de *Cnesterodon decemmaculatus* não foi afetada significativamente após a exposição combinada de clorpirifós e glifosato (BONIFACIO et al., 2016).

Atividade da glutationa-S-transferase

Atividade da glutationa-S-transferase no cérebro

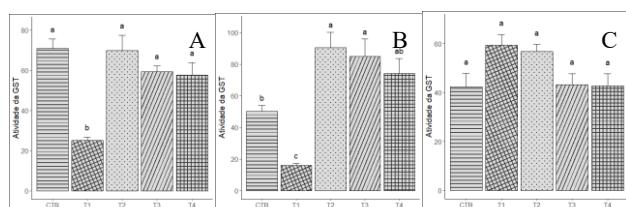
A atividade cerebral da GST em tilápia do Nilo sob efeito da exposição combinada de fipronil e clorpirifós é exposta na Figura 3 (A), os quais apresentaram diferença estatisticamente significativa. Sob a concentração T2, foi registrado a inibição da atividade da GST em tilápia do Nilo, quando comparada aos demais grupos do experimento.

Ao contrário do constatado no presente estudo, os demais experimentos relacionados com os inseticidas clorpirifós e fipronil relatam a ativação da atividade cerebral da GST nos peixes.

Nesse sentido, têm-se os peixes da espécie *Labeo rohita* que, quando expostos a mistura de clorpirifós e endosulfan pelo período de 96h, apresentaram o aumento significativo da atividade da GST no cérebro e no músculo cardíaco (NAZ et al., 2019).

A atividade da GST no tecido cerebral de peixe zebra foi ativada significativamente após a exposição combinada de clorpirifós e p,p'-DDE (JIANG et al., 2022). Sob efeito da mistura de clorpirifós e glifosato, a atividade cerebral de GST em *Cnesterodon decemmaculatus* aumentou significativamente (BONIFACIO et al., 2016).

Figura 3. Atividade da GST no cérebro, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus* após a exposição combinada de fipronil e clorpirifós no período de 96 h.



Nota: Atividade da GST ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ metabolizado}.\text{mg de proteína}^{-1}.\text{min}^{-1}$) no cérebro (A), brânquias (B) e fígados (C) de *Oreochromis niloticus* exposta ao fipronil e clorpirifós por 96 h. Letras diferentes diferem estatisticamente ($p<0,05$) e letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Fonte: Autores (2025)

Entretanto, posterior à mistura de fipronil e 2,4-D, a atividade da GST de corpo inteiro de peixe zebra foi aumentada (VIANA et al., 2022).

Atividade da glutationa-S-transferase nas brânquias

A Figura 3 (B) apresenta os resultados da atividade da GST nas brânquias de tilápia do Nilo após a exposição à mistura dos inseticidas clorpirifós e fipronil, evidenciando diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Observou-se inibição da atividade enzimática da GST em T1 quando comparada aos demais tratamentos. Em contraste, nos tratamentos T2 e T3, a atividade da GST apresentou aumento significativo em relação ao grupo controle.

Resposta semelhante aos grupos T2 e T3 foi observada sob a exposição combinada de clorpirifós e endosulfan, na qual a atividade da GST em brânquias e no músculo de *Labeo rohita* aumentou significativamente dentro do período de 96 h (NAZ et al., 2019). A atividade da GST nas brânquias de peixe zebra também foi ativada significativamente após a exposição combinada de clorpirifós e p,p'-DDE (JIANG et al., 2022).

Diferença não significativa da atividade GST em brânquias de *Cnesterodon decemmaculatus* foi relatado após a exposição a mistura de clorpirifós e glifosato por Bonifacio et al. (2016).

Sob efeito da mistura de fipronil e 2,4-D, a atividade da GST nas brânquias de peixe zebra não sofreu alterações significativas se comparada ao grupo controle (VIANA et al., 2022).

Em brânquias de *Prochilodus lineatus*, a atividade da GST não apresentou diferença significativa após a exposição combinada de 2,4-D e fipronil, porém, foi possível identificar um leve aumento da atividade enzimática (PORTRUNELI *et al.*, 2021).

Atividade da glutationa-S-transferase no fígado

A atividade hepática da GST em tilápia do Nilo após a exposição à mistura de clorpirifós e fipronil não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos; contudo, em T4 observou-se uma leve inibição da atividade enzimática [Figura 3 (C)].

Não obstante, a atividade hepática da GST em peixes zebra expostos a mistura de clorpirifós e glifosato diminuiu significativamente (concentrações de Roundup 500 µg/L com clorpirifós 0,1 µg/L, e Roundup 15 µg/L com clorpirifós 3 µg/L), sendo que a maior inibição ocorreu na menor concentração de clorpirifós com a maior concentração de glifosato (FALFUSHYNSKA *et al.*, 2022).

Bonifacio *et al.* (2016) também verificaram que a exposição combinada de clorpirifós e glifosato ocasionou a inibição da atividade de GST no fígado de *Cnesterodon decemmaculatus* em relação ao grupo controle. Ainda, a atividade enzimática da GST no fígado de carpa comum foi inibida significativamente após a exposição combinada de fipronil e chumbo (EL-MURR *et al.*, 2016).

Outrossim, a atividade hepática da GST em *Labeo rohita* foi ativada significativamente sob efeito da mistura de clorpirifós e endosulfan, do mesmo modo, a atividade da CAT no rim aumentou significativamente após a exposição combinada dos referidos agrotóxicos (NAZ *et al.*, 2019). Jiang *et al.* (2022) observaram que a exposição combinada de clorpirifós e p,p'-DDE também ativou a atividade da GST no fígado de peixe zebra.

Ademais, Kunwar *et al.* (2022) analisaram a toxicidade individual e em mistura dos inseticidas clorpirifós e diclorvos por meio da exposição aguda de *Tor putitora* a mistura de clorpirifós (0,075 mg/L) e de diclorvos (1,29 mg/L). Os resultados obtidos no estudo demonstraram que a maioria dos biomarcadores analisados (glicemia, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, ureia, albumina sanguínea e triglicerídeos) foram afetados pela exposição aos agrotóxicos, porém se recuperaram durante o período de depuração.

Conclusão

A análise das atividades enzimáticas da AChE, CAT e GST nos tecidos cerebral, branquial e hepático de tilápias do Nilo expostas por 96 horas à mistura dos inseticidas clorpirifós e fipronil revelou alterações estatisticamente significativas.

A exposição combinada resultou na alteração da AChE no cérebro, da CAT em todos os tecidos avaliados e da GST no cérebro e nas brânquias, indicando efeitos tóxicos relevantes sobre os sistemas neuroquímico e oxidativo. A atividade da AChE apresentou modulação dependente da concentração, enquanto as enzimas CAT e

GST exibiram respostas teciduais distintas, incluindo ativação e inibição, indicando desequilíbrio nos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo.

Portanto, os resultados demonstram que a exposição combinada desses inseticidas intensifica o estresse oxidativo em organismos aquáticos, reforçando a importância de se considerar os efeitos de misturas químicas em avaliações de risco ambiental. Assim, este estudo contribui para a compreensão dos impactos ecotoxicológicos associados à presença simultânea de clorpirifós e fipronil em ambientes aquáticos, destacando o uso de biomarcadores enzimáticos como ferramentas sensíveis para o monitoramento da contaminação ambiental.

Considerando que esta pesquisa representa uma contribuição pioneira sobre os efeitos combinados de clorpirifós e fipronil em tilápias do Nilo, recomenda-se a realização de novos experimentos com diferentes espécies de peixes. Tal abordagem permitirá avaliar se a toxicidade sinérgica observada se repete em outros organismos aquáticos, contribuindo para uma melhor compreensão dos riscos ecológicos associados à presença simultânea desses inseticidas no ambiente.

Agradecimentos

À Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e ao Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina (UNIEDU), mantido pelo Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento do Ensino Superior (FUNDES), pelo apoio financeiro ao presente estudo.

Referências

- ABDOLLAHDOKHT, D. *et al.* Conventional agrochemicals towards nano-biopesticides: an overview on recent advances. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 9, n. 13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00281-0>
- BEVILAQUA, F. *et al.* A mixture of fipronil and fungicides induces alterations on behavioral and oxidative stress parameters in zebrafish. *Ecotoxicology*, vol. 290, p. 140-147, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02146-7>
- BONIFACIO, A. F. *et al.* Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. *Ecological Indicators*, vol. 68, p. 88-97, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.02.011>
- BOX, G. E. P.; COX, D. R. An Analysis of Transformations. *Journal of Royal Statistical Society, Series B*, vol. 26, n. 2, p. 211-252, 1964.
- EL-MURR, A. *et al.* The β-1,3-glucan alleviated the hepatotoxicity induced by combination of fipronil and lead in common carp (*Cyprinus carpio*). *Comp Clin Pathol*, vol. 25, p. 689-697, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00580-016-2249-6>
- FALFUSHYNSKA, H. *et al.* Toxic effects and mechanisms of common pesticides (Roundup and chlorpyrifos) and their mixtures in a zebrafish model (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment*, vol. 833, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155236>

- FULLER, N. et al. Dietary exposure to environmentally relevant pesticide mixtures impairs swimming performance and lipid homeostatic gene expression in Juvenile Chinook salmon at elevated water temperatures. **Environmental Pollution**, vol. 314, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120308>
- GHAZANFAR, M.; SHAHID, S.; QURESHI, I. Z. Vitamin C attenuates biochemical and genotoxic damage in common carp (*Cyprinus carpio*) upon joint exposure to combined toxic doses of fipronil and buprofezin insecticides. **Aquatic toxicology**, vol. 196, p. 42-52, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.015>
- GIBBONS, D.; MORRISSEY, C.; MINEAU, P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. **Environ Sci Pollut Res**, vol. 22, p. 103–118. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>
- GOTTARDI, M. et al. The effects of epoxiconazole and a-cypermethrin on *Daphnia magna* growth, reproduction, and offspring size. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 36, n. 8, p. 2155–2166, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.3752>
- HATAMI, M.; BANAEI, M.; HAGHI, B. N. Sub-lethal toxicity of chlorpyrifos alone and in combination with polyethylene glycol to common carp (*Cyprinus carpio*). **Chemosphere**, vol. 2019, p. 981-988, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.077>
- IHSAN, T.; EDWIN, T.; YANTI, R. D. The Effect of Sublethal Exposure of Chlorpyrifos to Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Case Study of Twin Lakes of West Sumatra, Indonesia. **Nature Environment and Pollution Technology**, vol. 18, p. 1399-1403, 2019. DOI:
- JIANG, J. et al. The toxic effects of combined exposure of chlorpyrifos and p, p'-DDE to zebrafish (*Danio rerio*) and tissue bioaccumulation. **Aquatic Toxicology**, vol. 248, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106194>
- KUMARI, S. Impacts of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in fish. **International Journal of Fauna and Biological Studies**, vol. 7, n. 4, p. 45-54, 2020. DOI:
- KUNWAR, P. S. et al. Joint toxicity assessment reveals synergistic effect of chlorpyrifos and dichlorvos to common carp (*Cyprinus carpio*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, vol. 246, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.108975>
- KUNWAR, P. S. et al. Modulations of blood biochemical parameters of golden mahseer, *Tor putitora* following exposures to single and mixed organophosphate. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, vol. 251, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109207>
- LOURTHURAJ, A. A.; HATSHAN, M. Rafe; H., DINA S. Biocatalytic degradation of organophosphate pesticide from the wastewater and hydrolytic enzyme properties of consortium isolated from the pesticide contaminated water. **Environmental Research**, vol. 205, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112553>
- MONTEIRO, H. R. et al. Assessment of fipronil toxicity to the freshwater midge *Chironomus riparius*: Molecular, biochemical, and organismal responses. **Aquatic Toxicology**, vol. 216, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105292>
- NAZ, H. et al. Toxic Effect of Insecticides Mixtures on Antioxidant Enzymes in Different Organs of Fish, *Labeo rohita*. **Pakistan Journal of Zoology**, vol. 51, n. 4, p. 1355-1361, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/2019.51.4.1355.1361>
- MENA, F. et al. Can a mixture of agrochemicals (glyphosate, chlorpyrifos and chlorothalonil) mask the perception of an individual chemical? A hidden trap underlying ecological risk. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 230, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113172>
- PORTRUNELI, N. et al. Whole-body bioconcentration and biochemical and morphological responses of gills of the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or fipronil individually or in a mixture. **Aquatic Toxicology**, vol. 240, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105987>
- REINWALD, H. et al. Toxicogenomic profiling after sublethal exposure to nerve- and muscle-targeting insecticides reveals cardiac and neuronal developmental effects in zebrafish embryos. **Chemosphere**, vol. 291, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132746>
- SINHA, A. K. et al. Modulations of blood biochemical parameters of golden mahseer, *Tor putitora* following exposures to single and mixed organophosphate. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, vol. 251, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109207>
- VIANA, N. P. et al. Bioconcentration and toxicological impacts of fipronil and 2,4-D commercial formulations (single and in mixture) in the tropical fish, *Danio rerio*. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 29, p. 11685-11698, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16352-6>
- XING, H. et al. Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. **Chemosphere**, vol. 88, p. 377-383, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.049>
- ZHANG, W. et al. Antagonistic effects and mechanisms of carbendazim and chlorpyrifos on the neurobehavior of larval zebrafish. **Chemosphere**, vol. 293, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133522>