

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS E ENGENHARIA

Programa de Pós-Graduação em Agronegócio e Desenvolvimento

FERNANDA BLINI MARENGO MALHEIROS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO IMPACTO E EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DO
PESTICIDA PIROFOSFATO DE TETRAETILO (TEPP) EM ÁGUA COM A
UTILIZAÇÃO DE PRODUTO DE ORIGEM NATURAL COM PROPRIEDADES
ADSORVENTES**

TUPÃ

2024

FERNANDA BLINI MARENGO MALHEIROS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO IMPACTO E EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DO
PESTICIDA PIROFOSFATO DE TETRAETILO (TEPP) EM ÁGUA COM A
UTILIZAÇÃO DE PRODUTO DE ORIGEM NATURAL COM PROPRIEDADES
ADSORVENTES**

Tese apresentada à Banca de Defesa do Programa de Pós-Graduação em Agronegócio e Desenvolvimento (PGAD), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Tupã, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciência.

Área de concentração: Agronegócio e Desenvolvimento

Linha de pesquisa: Desenvolvimento e meio ambiente

Orientadora:

Prof^a. Dra. Angélica Gois Morales

Coorientadores:

Prof. Dr. Eduardo Festozo Vicente

Prof. Dr. Carlos Alberto-Silva

TUPÃ

2024

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação da FCE – Unesp, Câmpus Tupã:

M249a Malheiros, Fernanda Blini Marengo.
Avaliação *in vitro* e *in vivo* do impacto e eficiência da remoção do pesticida pirofosfato de tetraetilo (TEPP) em água com a utilização de produto de origem natural com propriedades adsorventes. – Tupã: [s.n.], 2024.
97 f. : il.

Tese (Doutorado em Agronegócio e Desenvolvimento) – Universidade Estadual Paulista UNESP – Faculdade de Ciências e Engenharia, 2024.

Orientadora: Angélica Gois Morales
Coorientador: Eduardo Festozo Vicente
Coorientador: Carlos Alberto-Silva

1. Adsorvente. 2. Acetilcolinesterase. 3. Organofosforados. 4. Pesticidas. I. Título. II. Autor.

Fonte: Eliana Kátia Pupim, bibliotecária CRB 8 – 6202. Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DO IMPACTO E EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DO PESTICIDA PIROFOSFATO DE TETRAETILO (TEPP) EM ÁGUA COM A UTILIZAÇÃO DE PRODUTO DE ORIGEM NATURAL COM PROPRIEDADES ADSORVENTES

AUTORA: FERNANDA BLINI MARENGO MALHEIROS

ORIENTADORA: ANGELICA GOIS MORALES

COORIENTADOR: EDUARDO FESTOZO VICENTE

COORIENTADOR: CARLOS ALBERTO DA SILVA

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

Documento assinado digitalmente
 ANGELICA GOIS MORALES
Data: 18/04/2024 14:41:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. ANGELICA GOIS MORALES (Participação Virtual)
Departamento de Gestão, Desenvolvimento e Tecnologia / Faculdade de Ciências e Engenharia - FCE - UNESP - Tupã/SP

Documento assinado digitalmente
 DALVA PAZZINI GRION
Data: 19/04/2024 14:42:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. DALVA PAZZINI GRION (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Centro Universitário de Adamantina - UNIFAI - Adamantina/SP

Documento assinado digitalmente
 JOSE CARLOS CAVICHOLI
Data: 22/04/2024 14:03:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisador Dr. JOSÉ CARLOS CAVICHOLI (Participação Virtual)
Docente do Curso de Agronomia / Centro Universitário de Adamantina - UNIFAI - Adamantina/SP

Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia - FEIS - UNESP  ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA
Data: 23/04/2024 09:45:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. JULIANE CRISTINA FORTI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Biosistemas / Faculdade de Ciências e Engenharia - FCE - UNESP - Tupã/SP

Documento assinado digitalmente
 JULIANE CRISTINA FORTI
Data: 22/04/2024 16:24:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Tupã, 25 de março de 2024

Dedico esta tese aos meus filhos, Eleonora e Heitor, ao meu esposo Hélio,
Aos meus pais Ana Maria e José Augusto (*in memoriam*) e   minha irmã Eliana que
me apoiaram para a realização de mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me conduziu na realização deste sonho.

À minha orientadora, Dra. Angélica Gois Morales que aceitou a minha ideia de pesquisa em trabalhar com o zebrafish, pelo apoio, dedicação e amizade que fizemos neste período. Ao professor e coorientador, Dr. Eduardo Festozo Vicente pelas orientações e colaboração no desenvolvimento da tese. E ao professor e amigo, Dr. Carlos Alberto-Silva, por suas relevantes orientações, conselhos, confiança e entusiasmo que contagiaram para a execução de mais este trabalho em parceria.

Ao Professor Dr. Paulo César Meletti por toda paciência em contribuir com os seus ensinamentos e que, gentilmente, cedeu o seu Laboratório de Ecofisiologia Animal da UEL e não poupou esforços para me auxiliar mesmos aos finais de semana e férias nos experimentos com o zebrafish. Agradeço a todos os integrantes da UEL, especialmente a Fujiko.

Ao meus queridos pais, José Augusto (in *memorian*) e Ana Maria, por todo incentivo, apoio, carinho, compreensão e cuidado. Vocês são meus exemplos!

À minha irmã preferida, Eliana, pela moradia, incentivo e motivação na realização desta tese. Você é muito especial em minha vida!

Às minhas pérolas, Eleonora e Heitor, por compreenderem a minha ausência em alguns momentos e pelo carinho. Aprendo a ser cada dia melhor com e por vocês. Amo infinito!

Vale enfatizar que este trabalho não seria possível sem o apoio de meu companheiro de vida, admirador e esposo Hélio pelo incentivo em nunca parar de estudar e que não mediu esforços para a realização deste estudo. Que sorte a minha!

Incluo aqui, também, todos os familiares que tiveram participação direta ou indireta ao longo da trajetória de conclusão deste trabalho.

Deixo expresso o meu reconhecimento e gratidão a todos os meus colegas, professores e funcionários da Universidade Júlio de Mesquita Filho (UNESP/Tupã).

“Ainda que eu falasse a língua dos
homens, e falasse a língua dos anjos,
sem amor, eu nada seria”

(Renato Russo, 1989).

MALHEIROS, Fernanda Blini Marengo. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do impacto e eficiência da remoção do pesticida pirofosfato de tetraetilo (TEPP) em água com a utilização de produto de origem natural com propriedades adsorventes.** 2024. 97p. Tese (Doutorado em Agronegócio e Desenvolvimento) – Faculdade de Ciências e Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Tupã, 2024.

RESUMO

O Brasil está no ranking dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos. Isso contribui na intensificação da exposição da população e do meio ambiente a essas perigosas substâncias. A temática deste trabalho tem como relevância a avaliação e minimização dos impactos ambientais das atividades agroindustriais causadas pelo uso do contaminante pirofosfato de tetraetila (TEPP), utilizado nas culturas de café, feijão e soja, a partir do uso dos embriões de zebrafish (*Danio rerio*). O TEPP é um inseticida organofosforado que inibe irreversivelmente a acetilcolinesterase (AChE). Assim, o presente estudo, com proposta inovadora, avaliou o impacto do pesticida TEPP na atividade da acetilcolinesterase em células neuronais PC12 (*in vitro*) e comparou, *in vivo*, a eficiência da remoção do pesticida da água com a utilização de grânulos de cortiça como adsorvente natural em uma espécie de zebrafish, peixe bem sensível às alterações e adversidades ambientais, a fim de analisar os efeitos toxicológicos do TEPP como contaminante no desenvolvimento e comportamento dos embriões e juvenis. O TEPP inibiu a atividade da AChE de maneira dose dependente. Pela primeira vez, mostrou-se *in vitro* que diferentes concentrações de TEPP diluído em água após experiências de adsorção utilizando grânulos de cortiça diminuíram os efeitos inibitórios do TEPP na atividade da AChE em enzima comercial e meio de cultura de células neuronais PC12. Além disso, foram avaliados os efeitos toxicológicos induzidos pelo TEPP no desenvolvimento e comportamento do zebrafish e na possível descontaminação da água utilizando os grânulos de cortiça com propriedades adsorventes. A exposição ao TEPP diminuiu a taxa de viabilidade dos embriões. Em conclusão, este estudo realizado sugere que o zebrafish em diferentes estágios de desenvolvimento foi capaz de detectar efeitos toxicológicos induzidos por TEPP em concentrações nanomolares, o que é mais sensato do que os experimentos realizados *in vitro*.

Palavras-chave: Adsorvente. Acetilcolinesterase. Organofosforados. Pesticidas.

MALHEIROS, Fernanda Blini Marengo. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the impact and efficiency of removing the pesticide tetraethyl pyrophosphate (TEPP) in water using a product of natural origin with adsorbent properties. 2024. 97p. Thesis (Doctorate degree in Agribusiness and Development) – Faculty of Science and Engineering, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, Tupã, 2024.

ABSTRACT

Brazil is in the ranking of the world's largest consumers of pesticides. This contributes to the intensification of exposure of the population and the environment to these dangerous substances. The issue of this work is relevant to the assessment and minimization of the environmental impacts of agro-industrial activities caused by the use of the contaminant tetraethyl pyrophosphate (TEPP), used in coffee, beans and soybean crops, from the use of zebrafish embryos (*Danio rerio*). TEPP is an organophosphate pesticide that irreversibly inhibits acetylcholinesterase (AChE). Thus, the present study, with an innovative proposal, evaluated the impact of the pesticide TEPP on the activity of acetylcholinesterase in PC12 neuronal cells (*in vitro*) and compared, *in vivo*, the efficiency of removing the pesticide from water with the use of cork granules as a natural adsorbent in a species of zebrafish, a fish very sensitive to environmental changes and adversities, in order to analyze the toxicological effects of TEPP as a contaminant on the development and behavior of embryos and juveniles. TEPP inhibited AChE activity in a dose-dependent manner. For the first time, it was shown *in vitro* that different concentrations of TEPP diluted in water after adsorption experiments using cork granules decreased the inhibitory effects of TEPP on AChE activity in commercial enzyme and PC12 neuronal cell culture medium. Furthermore, the toxicological effects induced by TEPP on the development and behavior of zebrafish and on the possible decontamination of water using cork granules with adsorbent properties were evaluated. Exposure to TEPP decreased the viability rate of embryos. In conclusion, our research suggests that zebrafish at different developmental stages were able to detect TEPP-induced toxicological effects at nanomolar concentrations, which is more sensible than experiments performed *in vitro*.

Keywords: Adsorbent. Acetylcholinesterase. Organophosphates. Pesticides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do primeiro defensivo agrícola da classe organofosforado foi o TEPP.....	17
Figura 2 - Macho (esquerda) e fêmea (direita) respectivamente de zebrafish.....	18
Figura 3 - Ranking com os maiores consumidores de agrotóxicos.....	19
Figura 4 - Exemplos de pesticidas OPs responsáveis pelo grande avanço de pesticidas na agricultura.....	25
Figura 5 - Etapas de registro de novo composto químico.....	29
Figura 6 - Total de agrotóxicos registrados no Brasil por ano.....	30
Figura 7 - Primeiros OPs de uso industrial: Scharadan e TEPP.....	32
Figura 8 - Estrutura química básica dos OPs.....	33
Figura 9 - Reação de hidrólise da ACh.....	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Exemplos de agrotóxicos quanto à natureza da praga controlada e quanto ao grupo químico.....	22
Quadro 2- Classificação e efeitos e/ou sintomas agudos e crônicos dos agrotóxicos.....	26
Quadro 3- Nova classificação toxicológica dos agrotóxicos no Brasil.....	30

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh	- Acetilcolina
AChE	- Acetilcolinesterase
AGROFIT	- Sistema de agrotóxicos fitossanitários
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHE	- Barreira Hematoencefálica
C	- Carbono
Ch	- Colina
CAPES	- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil
CETESB	- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CeTICS	- Centro de Toxinas, Resposta-Imune e Sinalização Celular
CH	- Hidrocarboneto
CO	- Monóxido de carbono
CP	- Consulta pública
DCA	- 3,4-dicloroanilina
DDT	- Diclorodifeniltricloroetano
DL 50	- Dose letal mediana
DMEM	- Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	- Dimetilsulfóxido
D.O.U.	- Diário Oficial da União
DTNB	- 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)
FAI	- Faculdades Adamantinenses Integradas/Centro Universitário de Adamantina
FAO	- <i>Food and Agriculture Organization</i> - Organização para a Alimentação e Agricultura
FBS	- Soro fetal bovino
Fiocruz	- Fundação Oswaldo Cruz
hpf	- horas pós fertilização
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
INCA	- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
LMR	- Limite máximo de resíduos

MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMA	- Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima
mmHg	- Milímetro de mercúrio
OECD	- Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OH	- Hidroxila
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OPs	- Organofosforados
P	- Fósforo
PARA	- Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PIB	- Produto interno bruto
pH	- Potencial hidrogeniônico
PL	- Projeto de lei
PNCRC	- Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
SINDAG	- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
SINITOX	- Sistema nacional de informações tóxico-farmacológicas
SNC	- Sistema nervoso central
SURV	- Taxa de sobrevivência
TEPP	- Tetraetilpirofosfato
UEL	- Universidade Estadual de Londrina
UNESP	- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UNINOVE	- Universidade Nove de Julho

SUMÁRIO

PERSPECTIVAS DA PESQUISADORA SOBRE O ZEBRAFISH.....	14
CONTEXTUALIZAÇÃO.....	16
CAPÍTULO I.....	38
EFICIÊNCIA NA REMOÇÃO DO PESTICIDA PIROFOSFATO DE TETRAETILA (TEPP) EM ÁGUA: UTILIZAÇÃO DE GRÂNULOS DE CORTIÇA COMO ADSORVENTE NATURAL NA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM CÉLULAS NEURONAIS PC12.....	38
1 Introdução.....	39
2 Materiais e métodos.....	40
2.1 Reagentes e soluções.....	40
2.2 Linha celular neuronal PC12.....	41
2.3 Preparo dos grânulos de cortiça.....	41
2.4 Experimentos de adsorção.....	42
2.5 Atividade de AChE em enzima comercial de <i>E. electricus</i>	42
2.6 Atividade AChE em cultura de células neuronais PC12.....	43
2.7 Estudos de toxicidade celular.....	43
3 Análise estatística.....	44
4 Resultados.....	44
4.1 Grânulos de cortiça.....	44
4.2 Efeitos do TEPP na atividade da AChE.....	45
4.3 Atividade de AChE em lisados celulares e meio de cultura da linha celular neuronal PC12.....	47
4.4 Efeitos do TEPP na atividade da AChE no meio de cultura da linhagem celular neuronal PC12.....	48
4.5 Citotoxicidade do TEPP na linhagem celular neuronal PC12.....	49
5 Discussão.....	50
Referências.....	53
CAPÍTULO II.....	57

O IMPACTO DO PESTICIDA PIROFOSFATO DE TETRAETILA (TEPP) NO DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTO DO <i>Danio rerio</i>: AVALIANDO O POTENCIAL DOS GRÂNULOS DE CORTIÇA COMO ADSORVENTE NATURAL PARA REMOÇÃO DE TEPP DE AMBIENTES AQUOSOS.....	57
1 Introdução.....	58
2 Materiais e métodos.....	60
2.1 Produtos químicos e soluções	60
2.2 Solução de água reconstituída.....	60
2.3 Coleta e manutenção de zebrafish	60
2.4 Preparo dos grânulos de cortiça	61
2.5 Experimentos de adsorção	62
2.6 Projeto experimental.....	62
2.7 Ensaios de toxicidade embrionária de peixe (FET)	63
2.8 Análises de parâmetros biométricos.....	63
2.9 Ensaio de preferência claro-escuro.....	63
2.10 Teste de resistência à natação.....	64
3 Análise estatística.....	64
4 Resultados.....	65
4.1 Grânulos de cortiça e adsorção TEPP.....	65
4.2 Toxicidade do TEPP e Cortiça + TEPP na viabilidade de embriões.....	65
4.3 Efeitos do TEPP e cortiça + TEPP nas anomalias do desenvolvimento.....	68
4.4 Toxicidade do TEPP e cortiça + TEPP na viabilidade de juvenis de peixe-zebra.....	70
4.5 Efeitos do TEPP e da cortiça no comportamento dos peixes (preferência por ambiente claro-escuro)	71
4.6 Efeitos do TEPP e da cortiça no comportamento dos peixes (teste de resistência natatória)	72
5 Discussão.....	73
Referências.....	77
 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	 82
 REFERÊNCIAS.....	 83

PERSPECTIVAS DA PESQUISADORA SOBRE O ZEBRAFISH¹

Para melhor entendimento sobre o estudo em questão nessa tese, considero importante relatar meu percurso acadêmico e profissional.

Sou graduada em Farmácia desde 2003 pelas Faculdades Adamantinenses Integradas (FAI), atualmente Centro Universitário de Adamantina (FAI). Mestre em Ciências da Reabilitação pela Universidade Nove de Julho (UNINOVE) em 2011 com a orientação do Prof. Dr. Carlos Alberto-Silva. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronegócio e Desenvolvimento – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências e Engenharia (UNESP – Tupã/SP) sob a orientação da Profa. Dra. Angélica Gois Morales.

Desde 2004, trabalho na FAI, onde fui subindo degrau a degrau, passei pelas funções de estagiária, orientadora e supervisora de estágio, coordenadora da Comissão Permanente de Avaliação, docente desde 2011 e recentemente (2023), coordenadora dos cursos de Farmácia e Tecnologia em Estética e Cosmética do Centro Universitário de Adamantina – FAI.

O que me despertou fazer o doutorado com este tema foi que em uma visita ao site do Instituto Butantan-SP, fiquei fascinada com as diversas possibilidades de estudo que a Plataforma Zebrafish demonstrou com o zebrafish, um modelo experimental que serve para testar novos fármacos assim como, a toxicidade de compostos químicos, possibilitando observar seus efeitos antes de submeter o ser humano ao seu uso. Assim, compreender o manejo e criação do zebrafish é a chave para o sucesso de uma pesquisa. A partir dali, busco me atualizar cada vez mais sobre o peixe paulistinha, um modelo inovador na pesquisa científica.

Foi então que, realizei uma visita e mantive contato e realizei meus experimentos com o Laboratório de Manejo e Criação do Zebrafish na Universidade Estadual de Londrina (UEL). Realizei o curso intitulado: “Mergulho na Plataforma Zebrafish” realizado pelo Centro de Toxinas, Resposta-Imune e Sinalização Celular (CeTICS) do Instituto Butantan - SP, ministrado pela Dr^a. Mônica Lopes Ferreira, a qual criei uma aproximação.

Assim, agradeço aos membros do meu comitê de orientação, Profa. Dra. Angélica Góis Morales, Prof. Dr. Carlos Alberto-Silva e Prof. Dr. Eduardo Festozo Vicente que se sensibilizaram e aceitaram embarcar nesse tema comigo.

O interesse em conhecer mais profundamente esse modelo experimental deu origem ao Doutorado. Durante esses anos de pesquisa, busquei informações relevantes sobre pesquisas realizadas e seus resultados, assim como outras características do zebrafish.

Para tanto, compreendo a necessidade de ampliar e aprofundar sobre esse assunto tão inovador capaz de trazer experiências inéditas para a pesquisa científica, oportunizando uma linha de pesquisa na minha atuação acadêmica e profissional na FAI.

¹Nesta parte da apresentação, tomei a liberdade de expressar-me na primeira pessoa do singular para falar do caminho da minha trajetória, a fim de posicionar quem é a pesquisadora desse estudo e sua relação com esta pesquisa desenvolvida.

CONTEXTUALIZAÇÃO

O agronegócio brasileiro é considerado, numa perspectiva econômica, um indicador de rentabilidade positiva em relação ao crescimento do país, tendo força na balança comercial e em negociações internacionais. Mesmo sendo caracterizado como um dos setores mais dinâmicos do país, é imprescindível a aplicação da sustentabilidade, levando em consideração os impactos ambientais oriundos do agronegócio como o uso incorreto de agrotóxicos (Silva, 2017). Neste contexto, ressalta-se que, em 2018, o Brasil assumiu mundialmente a primeira posição no ranking de maior mercado consumidor de agrotóxicos (Inca, 2018).

Neste modelo de desenvolvimento moderno, os agrotóxicos, substâncias químicas de ação direta ou indireta de vida animal ou vegetal, são imprescindíveis na agricultura para prevenir ou reduzir perdas, além de manter a alta produtividade das *commodities*, garantindo o comércio e a satisfação do consumidor (Kmellár *et al.*, 2008a; Hess; Nodarf; Lopes-Ferreira, 2021).

Assim, a expansão das monoculturas, como soja e milho, contribuiu para a ampliação do uso de agrotóxicos, reforçado pelo aumento de pragas e doenças. No meio ambiente, o destino dos agrotóxicos podem ser por retenção, transformação, processo de transporte, sendo que sua interação no meio aquático causa desequilíbrio de espécies, afetando a biodiversidade e o ecossistema (Pirsaheb *et al.*, 2017; HESS; Hess; Nodarf; Lopes-Ferreira, 2021).

O órgão nacional responsável por definir os níveis de toxicidade e o emprego dos agrotóxicos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que os classifica em: extremamente tóxico a improvável de causar dano agudo (Brasil, 2019). Esses parâmetros dependem da dose, da exposição, da idade, do sexo e da dose que causa mortalidade em metade dos animais expostos. São definidos pelo Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima (MMA) como agentes de processos químicos, físicos e biológicos, de acordo com a ANVISA e os agrotóxicos são classificados como herbicidas, fungicidas e inseticidas (Guilherme *et al.*, 2012; Who, 2018).

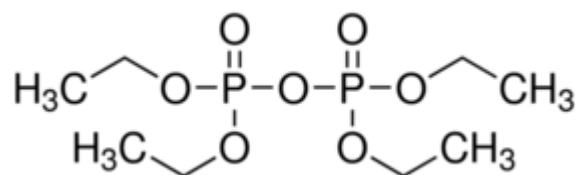
No ano de 2012, o Brasil avaliou em US\$ 2,5 bilhões o mercado de produtos de defensivos agrícolas, seguidos pelos herbicidas e inseticidas com 52% e 27,5% de

vendas, respectivamente, segundo o levantamento do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (Sindag, 2012).

Os compostos que contém pelo menos um átomo de fósforo central é chamado de organofosforado (Santos *et al.*, 2007). Essa classe de inseticidas age inibindo irreversivelmente a acetilcolinesterase (AChE), promovendo a hiperestimulação colinérgica e resultando em perda do controle muscular, batimentos cardíacos irregulares, convulsões, desregulação endócrina, depressão respiratória e morte (Santos *et al.*, 2007). A acetilcolina (ACh) é um mediador químico responsável pela transmissão dos impulsos nervosos (Abrasco, 2015; Cavalcanti *et al.*, 2016).

O organofosforado que será utilizado neste estudo é o TEPP (Sigma-Aldrich Brasil Ltda), também conhecido por difosfato de tetraetila ou pirofosfato de tetraetila (Figura 1). O TEPP foi sintetizado na Alemanha em 1944 e foi utilizado no campo como substituto da nicotina para o controle de pulgões (Santos *et al.*, 2007). Também é comumente utilizado como inseticida nas culturas de soja, feijão e café. Apresenta como características físico químicas um aspecto líquido e incolor, com peso molecular de $290,19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, é neurotóxico e apresenta lipossolubilidade, sendo altamente eficaz como inseticida. Os organofosforados (OPs) possuem toxicidade superior aos organoclorados, porém são de fácil biodegradabilidade, baixo custo e fácil síntese (Usepa, 2000; Jeschke *et al.*, 2011).

Figura 1 - Estrutura química do primeiro defensivo agrícola da classe organofosforado foi o TEPP.



Fonte: Santos *et al.*, 2007.

Além do conhecimento das possíveis rotas de chegada dos poluentes ao meio ambiente, analisar o risco ambiental requer uma caracterização dos efeitos que podem ser desencadeados em organismos não-alvo (Layton *et al.*, 2015). Deste modo, o modelo experimental utilizado para a compreensão da toxicidade de contaminantes em peixes é o *Danio rerio* (Hamilton, 1822), conhecido como zebrafish ou peixe paulistinha, por suas listras no corpo, especialmente nas regiões laterais. É

um peixe teleósteo, de água doce, proveniente dos rios do Sul da Ásia (Figura 2) e pertencente à família Cyprinidae e classe Actinopterygii. São onívoros de comportamento pacífico e muito ativo (Grunwald; Eisen, 2002; Knie; Lopes, 2004; Westerfield, 2007).

Figura 2 – Macho (esquerda) e fêmea (direita) respectivamente de zebrafish (Hamilton-Buchanan, 1822).



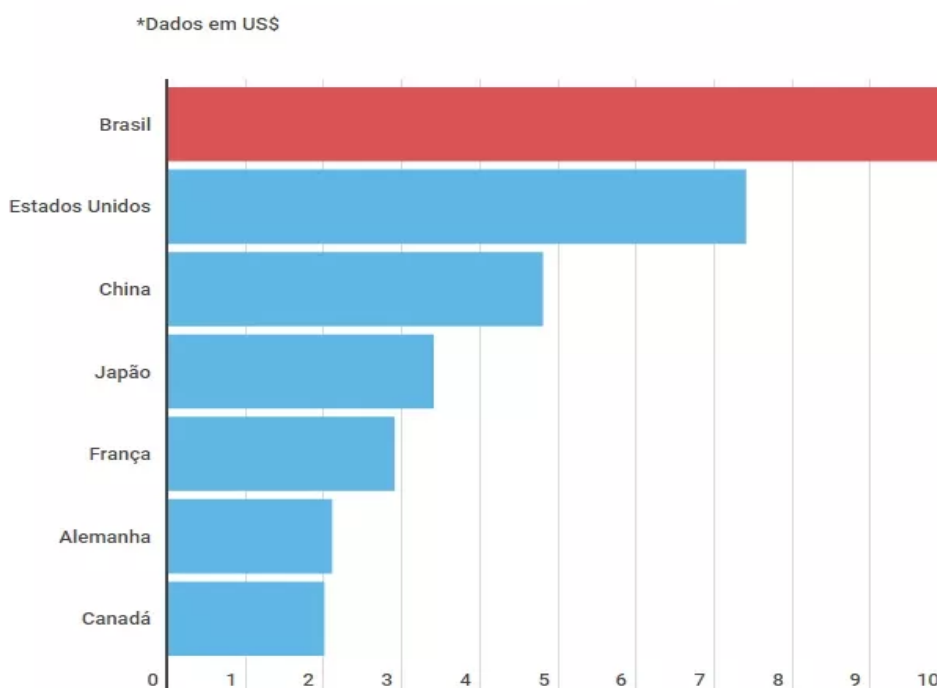
Fonte: N C Station citado por Rechi, 2015.

O zebrafish tem sido considerado como um modelo animal que oferece vantagens de caráter prático e econômico, de baixo custo de manutenção e alta fecundidade, conferindo o escaneamento de média a alta performance para a identificação de produtos tóxicos em potencial e de novas drogas, devido sua sensibilidade à exposição a produtos químicos, bem como a capacidade de absorver de forma rápida os compostos que são diretamente adicionados na água (Koenig *et al.*, 2016). O seu desenvolvimento embrionário é rápido e externo ao organismo da fêmea o que é relevante para estudos de toxicidade embrionária, permitindo a observação de alterações morfológicas desde as primeiras horas após a fertilização, sem o sacrifício das fêmeas (Bambino; Chu, 2017; Koenig *et al.*, 2016). Os ensaios realizados na fase embrionária de zebrafish são bioindicadores de poluição, pois nessa fase as alterações fenotípicas já podem ser identificadas, permitindo analisar os efeitos dos agrotóxicos (Carvan *et al.*, 2000; Begum, 2004). Desta forma, este modelo é considerado relevante para avaliar a genotoxicidade em relação aos 3Rs (reutilizar, redução e refinamento) para estudos de agrotóxicos (Faßbender; Braunbeck, 2013) que recentemente evoluíram para 5Rs (repensar, recusar, reduzir, reutilizar e reciclar) preconizando os princípios da sustentabilidade (Alkmim, 2015).

Cenário da utilização de agrotóxicos no Brasil e no mundo

A economia brasileira ocupa enfaticamente, desde 2008, a posição de destaque de maior consumidor de pesticidas do mundo (Carneiro *et al.*, 2015; Zhang, 2018), com 19% do consumo mundial (Mangas *et al.*, 2016), ultrapassando a marca de 1 milhão de toneladas de substâncias tóxicas consumidas nos anos de 2010 e 2011 (Ibama, 2013; Rigotto; Vasconcelos; Rocha, 2014; Carneiro *et al.*, 2015; Porto; Soares, 2012). Em 2019, o Brasil manteve sua classificação, onde consumiu US\$ 10 bilhões em agrotóxicos, o que deixou os Estados Unidos, a China, o Japão e a França nas posições seguintes (Figura 3).

Figura 3 - Ranking com os maiores consumidores de agrotóxicos.



Fonte: FAO/Consultoria Philips Mcdougall/UNESP/ANDEF, 2019.

O amplo impacto do uso de pesticidas e agrotóxicos associado à alta produção no Brasil, que se destaca no cenário mundial como excelente produtor e cultivador de lavouras transgênicas, e também como exportador de *commodities* minerais e agrícolas, tem ocasionado efeitos adversos à saúde humana dos trabalhadores rurais, que estão ligados diretamente com esses compostos químicos (Friedrich, *et al.*, 2021). O contato rotineiro com pesticidas e agrotóxicos por humanos e outros animais pode resultar em problemas de saúde que podem estar associados

à presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos, assim como os impactos negativos no ecossistema, como a contaminação do meio ambiente, do solo, da água e do ar (Peres; Moreira; Dubois, 2003; Pignati *et al.*, 2007; Rice; Arthur; Barefoot, 2007; Khalili-Zanjani *et al.*, 2008; Londres, 2011; Carneiro *et al.*, 2015; Cavalcanti *et al.*, 2016).

O mercado internacional de agrotóxicos teve uma estimativa de crescimento de 93%, na década de 2010 e entre os anos de 2007 a 2013, o uso de pesticidas cresceu 50% em relação à área plantada que cresceu apenas 20% (Brasil, 2018). O total de pesticidas vendidos em 2013, 2016, 2017 e 2018 foram respectivamente 495,7, 541,8, 539,9 e 549,28 mil toneladas, respectivamente (Grigori, 2019). Segundo Jobim *et al.* (2010), a tecnologia agrícola proporciona o crescimento econômico, mas acarreta riscos ao meio ambiente e à saúde humana. No Brasil, em meados de 1970, período da ditadura, o aumento no consumo de agrotóxicos esteve atrelado ao Plano Nacional de Defensivos Agrícolas, subordinando o crédito rural ao uso de agrotóxicos (Carneiro *et al.*, 2015; Pelaez; Terra; Silva, 2010). Ainda, a liberação de crédito estrangeiro para o meio rural estava vinculada à implantação de maquinários, fertilizantes químicos e agrotóxicos.

Em 2018, de acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama, 2019), o Brasil consumiu 549.280 mil toneladas de agrotóxicos. As culturas transgênicas que mais demandam o uso de agrotóxicos são soja, milho e cana-de-açúcar (Carneiro *et al.*, 2015). Em pesquisa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil, em 2017-2018, estimou-se que essas culturas representaram 35.100, 16.645 e 51,3 milhões de hectares de área plantada, respectivamente (Brasil, 2018).

Nas últimas duas décadas, segundo o IBAMA (2016), foram consumidas aproximadamente 495 mil toneladas de herbicidas, destacando-se como principal responsável pelo rápido crescimento em volume de negócios, devido às monoculturas (Ecobichon, 1991).

Certamente, o agronegócio brasileiro é um setor essencial da economia brasileira, pois dados do Produto Interno Bruto (PIB) foram estimados em R\$ 2,63 trilhões em 2023, representando 24,4% da produtividade nacional (Cepea-Esalq, 2023). Entretanto, até 2030, a União Europeia deseja reduzir em 50% o uso de pesticidas químicos e preservar 25% das terras agrícolas para a agricultura orgânica, que hoje é menor que 10% (European Commission, 2020a).

Definição e classificação dos agrotóxicos

A ANVISA foi criada em 1999 pela Lei nº 9.782/99, e é responsável por produtos e serviços relacionados à saúde.

O principal instrumento normativo sobre agrotóxicos no Brasil é Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, chamada de Lei dos Agrotóxicos, sendo seu regulamento previsto no Decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002 (Brasil, 1989, 2002), que define, em seu Artigo 1º, Inciso IV, o termo AGROTÓXICOS, também conhecido por pesticida, praguicida, defensivos agrícolas e biocidas, por:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

Essa definição de agrotóxicos não inclui fertilizantes e produtos químicos administrados a animais que estimulam o crescimento ou modificam a reprodução (Santos *et al.*, 2007). Porém, incluem os reguladores de crescimento de plantas, preventivos de queda prematura de frutos e preventivos de deterioração durante a estocagem ou transporte (Who, 2009a).

Essa lei é considerada uma conquista para o movimento ambientalista que utiliza o termo “agrotóxicos” para definir os venenos agrícolas, conferindo o grau de perigo dessas substâncias. Isto contraria a propagação do termo “defensivos agrícolas” que a indústria, políticos e universidades utilizam, apesar dos riscos para a saúde humana (Londres, 2011; Ferreira, 2015; Carvalho; Nodari; Nodari, 2017).

A ANVISA (2018) utiliza o termo agrotóxico como alerta aos trabalhadores e à população sobre riscos potenciais do seu uso. Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com o tipo de ação/deposição do composto químico ao alvo, que pode ser inseticidas, herbicidas, fungicidas e rodenticidas (Ecobichon, 1991; Cope; Leidy; Hodgsona, 2004; Heinzow; Andersen, 2006; Poppenga; Oehme, 2010). São subdivididos em classes de acordo com a estrutura química do princípio ativo ou do grupo funcional, dos efeitos à saúde humana e ao meio ambiente, assim como os

insetos, as doenças e as plantas daninhas que controlam (Quadro 1). O mecanismo de ação dos agrotóxicos pode ser por interferências no transporte de íons sódio, potássio e cálcio ou íons cloreto através da membrana; inibição da seletividade da atividade enzimática, ou contribuição para a liberação e/ou a persistência de transmissores químicos nas terminações nervosas (Cope; Leidy; Hodgsona, 2004).

Quadro 1 - Exemplos de agrotóxicos quanto à natureza da praga controlada e quanto ao grupo químico.

CLASSIFICAÇÃO QUANTO À NATUREZA DA PRAGA CONTROLADA	CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO GRUPO QUÍMICO	EXEMPLOS
Inseticidas	Inorgânicos	Fosfato de alumínio, arsenato de cálcio
Inseticidas	Extratos vegetais	Óleos vegetais
Inseticidas	Organoclorados	Aldrin, DDT, BHC
Inseticidas	Organofosforados	Fenitrothion, Paration, Malation, Metil-paration
Inseticidas	Carbamatos	Carbofuran, Aldicarb, Carbaril
Inseticidas	Piretróides Sintéticos Microbiais	Deltametrina, Permetrina, <i>Bacillus thuringiensis</i>
Fungicidas	Inorgânicos	Calda Bordalesa, enxofre
Fungicidas	Ditiocarbamatos	Mancozeb, Tiram, Metiram
Fungicidas	Dinitrofenóis	Binapacril
Fungicidas	Organomercuriais	Acetato de fenilmercúrio
Fungicidas	Antibióticos	Estreptomicina, Ciclo-hexamida
Fungicidas	Trifenil estânico	Duter, Brestam
Fungicidas	Compostos Formilamina	Triforina, Cloraniformetam
Fungicidas	Fentalamidas	Captafol, Captam
Herbicidas	Inorgânicos	Arsenito de sódio, cloreto de sódio
Herbicidas	Dinitrofenóis	Bromofenoxim, Dinoseb
Herbicidas	Fenoxiacéticos	2,4-D, 2,4,5-T
Herbicidas	Carbamatos	Profam, Cloroprofam, Bendiocarb

Herbicidas	Dipiridilos	Diquat, Paraquat, Difenzoquat
Herbicidas	Dinitroanilinas	Nitralin, Profluralin
Herbicidas	Benzonitrilas	Bromoxinil, Diclobenil
Herbicidas	Glifosato	Round-up
Desfoliantes	Dipiridilos	Diquat, Paraquat
Desfoliantes	Dinitrofenóis	Dinoseb
Fumigantes	Hidrocarbonetos halogenados	Brometo de metila, cloropicrina
Fumigantes	Geradores de Metil-isocianato	Dazomet, Metam
Fumigantes	-	Formaldeídos

Fonte: Peres; Moreira; Dubois, 2003.

A eficácia dos processos físicos e biológicos, as características do ambiente e do composto químico definem a retenção dos agrotóxicos no meio ambiente (Lemos; Musafir, 2014).

Os pesticidas são divididos em agentes biológicos, inorgânicos e orgânicos, de origem sintética ou natural (Zuin; Vilegas, 2000; Ware; Whitacre, 2004) e classificados de acordo com a função, mecanismo de ação e composição química. Podem ser divididos em quatro grupos, sendo os principais os organoclorados, carbamatos, organofosforados e piretróides (United States, 2016).

A história da utilização dos agrotóxicos completa-se com o desenvolvimento das pesquisas que avaliam como esses defensivos agrícolas passaram de armas químicas a insumos utilizados em lavouras (Carneiro *et al.*, 2015). Entre 1873 e 1874, foi descoberto pelo cientista alemão Othomar Ziedler, o primeiro inseticida organoclorado conhecido como diclorodifeniltricloroetano (DDT), um dos produtos químicos mais difundidos durante a Segunda Guerra Mundial (Zacharia, 2011), sendo considerado de amplo espectro e extremamente prejudicial à saúde humana com até 30 anos para ocorrer sua degradação. Apenas em 1939, foi descoberta sua propriedade inseticida pelo suíço Paul Müller (Carson, 2010). Em 2009, foi proscrito no Brasil pela Lei nº 11.936/2009 (Brasil, 2009).

Os organoclorados apresentam como características a resistência ao ambiente, ou seja, são propícios à bioconcentração e bioamplificação ao longo da cadeia alimentar (Derouiche *et al.*, 2007; López *et al.*, 2007; Bala *et al.*, 2017).

Entre os anos 1940 e 1960, os seguintes organoclorados: a Dieldrina, a Aldrina, a Endrina, o Heptacloro, o Lindano (Zuin; Vilegas, 2000; Ware; Whitacre, 2004), se destacaram pela baixa volatilidade, pela lipossolubilidade, pela estabilidade química e baixa taxa de degradação.

Foi então que, a partir de 1960, ocorreu a Revolução Verde, quando o Brasil adotou o modelo de produção agrícola que possuía a finalidade de renovar a área agrícola e melhorar a produção no campo, sanando a fome mundial, a partir da contribuição e uso dos fertilizantes e agrotóxicos, além de sementes híbridas (Londres, 2011; Moreira, 2000). Portanto, no Brasil, os OPs foram introduzidos a partir de 1960 para aplicações agrícolas, industriais e domésticas (Baronio *et al.*, 2019).

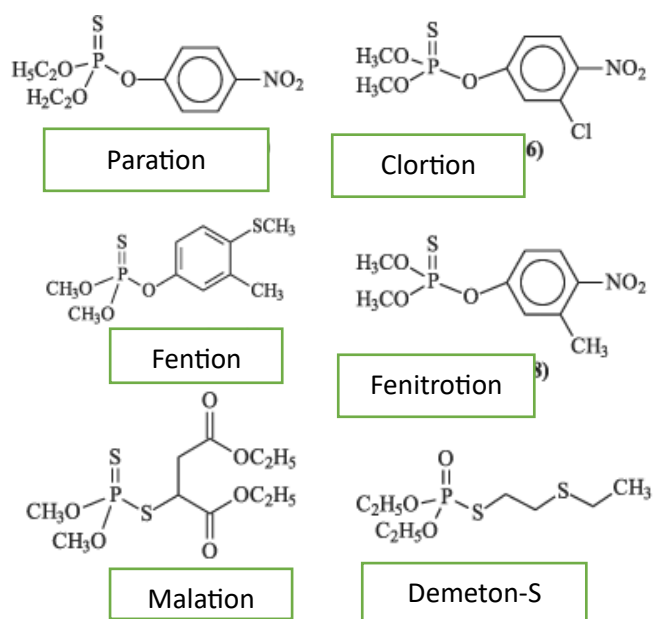
Assim, os OPs, surgiram na década de 1940, mas foram introduzidos apenas entre 1960 e 1980, com a suspensão dos organoclorados do comércio mundial (Mor; Ozmen, 2010). O interesse na síntese de novos OPs foi devido à sua aplicabilidade e sua relevância toxicológica e comercial na agricultura, na pecuária como agrotóxico e inseticida (Zhao *et al.*, 2015). São muito potentes e afetam tanto a saúde animal quanto a humana (Rastogi; Dash; Ballal, 2017; Cheng *et al.*, 2017, Ogasawara *et al.*, 2017). Os OPs apresentam vantagens em relação aos organoclorados devido ao baixo custo, ao reduzido tempo de meia-vida (Zuin; Vilegas, 2000; Ware; Whitacre, 2004), à facilidade de síntese de novos derivados, à baixa toxicidade para muitos organismos tratados, são altamente lipossolúveis, possuem baixa ação residual, são biodegradáveis apresentando menor tempo de residência no meio ambiente, são facilmente hidrolisados em pH alto, sofrem degradação por hidrolases, se acumulam no tecido adiposo e são voláteis (Yu *et al.*, 2016; Storm; Rozman; Doull, 2000).

Os OPs são conhecidos como agrotóxicos não persistentes (United States, 2017), que apresentam nas suas estruturas, principalmente, átomos de carbono (C) e fósforo central (P), (Santos *et al.*, 2007); ésteres, amidas ou tióis derivados de ácidos fosfóricos, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico, conforme apresentado na Figura 4 com exemplos de OPs responsáveis pelo grande avanço de pesticidas na agricultura. Salienta-se que possuem grande afinidade pela AChE (Petronilho; Pinto; Villar, 2011), responsável pela inativação do neurotransmissor ACh (Vale, 2017; Pauyal, 2008).

Os OPs são utilizados como inseticidas e acaricidas agrícolas e compreendem três categorias baseadas em sua natureza química: alifáticos (malathion, vaponal entre outros), os derivados de grupos fenil (etil e metil parathion,

fenitrothion, temephos entre outros) e os heterocíclicos (clorpirifos, metil- clorpirifos) (Braga; Valle, 2007b). Alguns exemplos de OPs são: Clorpirifós (Dursban®, Lorsban®, Capataz®, Klorpan®, Nufos®, Record®, Sabre®) Diclorvos (DDVP®), Dimetoato (Dimexion®, Agritoato®), Fenitrothion (Pirephos®, Sumigran®, Sumithion®), Fention (Lebaycid®), Malation (Malatol, Malaton®), Metamidofós (Tamaron®), Paration metílico (Folisuper®, Paracap®).

Figura 4 – Exemplos de pesticidas OPs responsáveis pelo grande avanço de pesticidas na agricultura.



Fonte: Santos, *et al.*, 2007.

A ANVISA proibiu no Brasil alguns ativos de agrotóxicos dos OPs devido a sua elevada toxicidade como o metamidofós (RDC n.º 1 de 14/1/2011), triclorfom (RDC n.º 37 16/8/2010), forato (RDC n.º 12 13/3/2015) e parationa metílica (CP n.º 8 de 19/1/2012).

É sabido que os OPs são responsáveis pelas intoxicações no meio rural (Nero *et al.*, 2007) e o tratamento dado às intoxicações é baseado no uso da atropina e compostos específicos que reativam a colinesterase (Cavaliere *et al.*, 1996).

Impacto de agrotóxicos sobre a saúde humana

O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox), criado em 1980, liderado pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), tem como proposta

a “principal atribuição de coordenar a coleta, a compilação, a análise e a divulgação dos casos de intoxicação e envenenamento notificados no país” (Fiocruz, 2001). O Sinitox é responsável por divulgar informações sobre as intoxicações em humanos e animais anualmente.

No período de 2007 a 2013, os casos de intoxicação por agrotóxicos dobraram (Fernandes, 2018) em decorrência da toxicidade do produto, da quantidade absorvida, do tempo de absorção e do tempo de exposição ao produto que se deu em tentativas de suicídio (Freire & Koifman, 2013; Tennakoon; Karunarathna; Udugampala, 2013; Kim; Shin; Lee, 2014; Muller *et al.*, 2014). A intoxicação por agrotóxicos pode ser classificada em três tipos: aguda, subaguda e crônica (Quadro 2) (Londres, 2011; Carneiro *et al.*, 2015).

Quadro 2 - Classificação e efeitos e/ou sintomas agudos e crônicos dos agrotóxicos.

PRAGA QUE CONTROLA	GRUPO QUÍMICO	SINTOMAS DE INTOXICAÇÃO AGUDA	SINTOMAS DE INTOXICAÇÃO CRÔNICA
Inseticidas	Organofosforados e carbamatos	Fraqueza, cólicas abdominais, vômitos, espasmos musculares e convulsões	Efeitos neurotóxicos retardados, alterações cromossômicas e dermatites de contato
Inseticidas	Organoclorados	Náuseas, vômitos, contrações musculares involuntárias	Lesões hepáticas, arritmias cardíacas, lesões renais e neuropatias periféricas
Inseticidas	Piretroides sintéticos	Irritação das conjuntivas, espirros, excitação, convulsões	Alergias, asma brônquica, irritações nas mucosas, hipersensibilidade
Fungicidas	Ditiocarbamatos	Tonteiras, vômitos, tremores musculares, dor de cabeça	Alergias respiratórias, dermatites, doença de Parkinson, cânceres
Fungicidas	Fentalamidas	-	Teratogêneses
Herbicidas	Dinitroferois e pentaclorofenol	Dificuldade respiratória, hipertermia, convulsões	Cânceres, cloroacnes
Herbicidas	Fenoxiacéticos	Perda de apetite, enjoo, vômitos, fasciculação muscular	Indução de produção de enzimas hepáticas, cânceres, teratogênese

Fonte: Opas/OMS (1996).

Salientando que, a forma de intoxicação por agrotóxicos varia pelo modo de contato: por inalação, ingestão ou via transdérmica dos Ops, por dosagem, tempo

de exposição e tipo de agrotóxico (Valente, 2012). São capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e causar elevada toxicidade neurológica (Mangas *et al.*, 2016).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se a ocorrência de cerca de 3 a 5 milhões de intoxicações agudas provocadas pela exposição aos agrotóxicos anualmente no mundo, e contempla que para cada caso notificado, 50 outros não são notificados sendo que as intoxicações por agrotóxicos intencionais e por OPs correspondem a 30% dos casos de suicídio no mundo, sendo a justificativa desses números a disponibilidade, a facilidade de acesso e a exposição (Cavalcanti *et al.*, 2016), desse modo sendo a exposição aos agrotóxicos um problema de saúde pública (Martins *et al.*, 2012).

Os inseticidas são neurotóxicos e agem por envenenamento do sistema nervoso, sendo que sua exposição e duração é baseado nas relações estrutural-atividade específicas (Ecobichon, 1991; Cope; Leidy; Hodgsona, 2004; Poppenga; Oehme, 2010).

Programa de monitoramento de resíduos e agrotóxicos

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), com o apoio do Ministério de Saúde, é responsável pela definição do Limite Máximo de Resíduos (LMR) permitido no solo e águas subterrâneas para alguns agrotóxicos, enquanto que a ANVISA delibera os agrotóxicos em culturas e também em alimentos (Brasil, 2008).

O programa de monitoramento de resíduos e agrotóxicos, coordenado pelo MAPA, é conhecido como Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). Até 1990, o Brasil seguiu os limites de resíduos de agrotóxicos estabelecidos pela OMS (Who, 2004) que tinha como parâmetro de classificação o grau de toxicidade. Hoje em dia, o arroz, feijão, milho, café e outros grãos armazenados possuem regulamentado e estabelecido o LMR (Brasil, 2014a) pela Legislação Federal de Agrotóxicos e Afins (Caldas, 2004; Codex, 2012). Vale ressaltar que são mais de 300 agrotóxicos regulamentados pela ANVISA em mais de 2000 formulações comerciais diferentes; os respectivos LMR não demonstrados nesse texto podem ser encontrados e acessados no site da ANVISA (<http://www.anvisa.gov.br/>).

Salienta-se que alguns agrotóxicos com uso autorizado no Brasil são proibidos em outros países. Alguns exemplos: acefato, fosmete e paraquate (União Europeia); carbofurano e lactofem (Estados Unidos e União Europeia); Tiram (Estados Unidos) e parationa metílica (União Europeia, Japão e China) (Brasil, 2018).

Desde 2001, a ANVISA desenvolveu um programa conhecido como Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), que dissemina o conhecimento e atualiza a população sobre quais compostos estão expostos pelos alimentos consumidos. Mas ainda não existe no Brasil um monitoramento contínuo de agrotóxicos no meio ambiente que atualize constantemente o inventário (Hess, Nodarf, Lopes-Ferreira, 2021).

Em 2019, o PARA estimou que 51% dos alimentos analisados, presentes no dia-a-dia da população brasileira, apresentaram resíduos de agrotóxicos (Brasil, 2019).

Os impactos e a dimensão atual dos agrotóxicos no Brasil

O Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário (AGROFIT) é responsável pelas informações sobre os produtos químicos destinados à agricultura com registro no MAPA, instituído pela Portaria Ministerial nº 23, de 06 de abril de 2016.

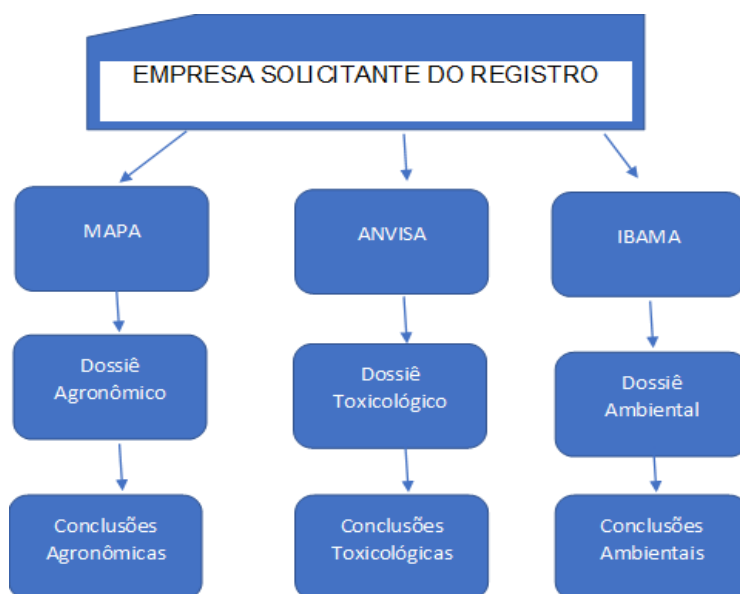
No final dos anos 1980, o aumento na incidência de câncer entre trabalhadores rurais e pessoal envolvido nas campanhas sanitárias despertou a atenção para mais estudos sobre a relação interativa dos agrotóxicos com o organismo (Peres; Moreira; Dubois, 2003; Chen *et al.*, 2016).

A literatura relata que, a longo prazo, patologias de pele, teratogênese, carcinogênese, desregulação endócrina, neurotoxicidade, efeitos na reprodução humana e no sistema imunológico podem ser consequências do uso de agrotóxicos (Silva, 2017). Assim, conhecer a classificação e o grupo químico dos agrotóxicos permite o diagnóstico das intoxicações (Carvalho *et al.*, 2017).

Conforme o MAPA (Brasil, 1997), os registros de novos agrotóxicos aprovados em 2019 são em média superior a um por dia, marcando o momento, ressaltando que o registro de agrotóxicos não tem prazo de validade. Assim, uma vez que um produto entra no mercado, ele pode ser comercializado indefinidamente. Para endossar um agrotóxico no Brasil, é necessário tramitar em três órgãos federais, como observa-se na Figura 5: 1) ANVISA, a qual avalia os riscos à saúde; 2) IBAMA, o qual

analisa a periculosidade ambiental; e 3) MAPA, onde se analisa a eficácia no combate de pragas e doenças no campo, ou seja, a eficácia agronômica e formaliza-se o registro, após a aprovação dos dois órgãos anteriores (Brasil, 1997).

Figura 5 - Etapas de registro de novo composto químico.



Fonte: Adaptado de Brasil, 1997.

Em 2014, sete empresas transnacionais controlavam a produção mundial de agrotóxicos e de sementes, das quais seis encontravam-se no Brasil: Syngenta, Bayer, Basf, Dow, Dupont e Monsanto. Em contrapartida, devido à fusão destas empresas, hoje em dia com aproximadamente 70% da venda mundial de agrotóxicos são quatro empresas multinacionais líderes do mercado de produção e comercialização de agrotóxicos (Castilho, 2018).

Em 2018, a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO) classificou os agrotóxicos quanto à periculosidade ambiental em duas classes, sendo CLASSE I: produtos impeditivos e obtenção de registro, produtos altamente perigosos ao meio ambiente (compostos extremamente tóxicos, $DL_{50} < 5 \text{ mg kg}^{-1}$) e CLASSE II: produtos muito perigosos ao meio ambiente (altamente tóxicos, $5 < DL_{50} < 50 \text{ mg kg}^{-1}$); CLASSE III: produtos perigosos ao meio ambiente (medianamente tóxicos, $50 < DL_{50} < 500 \text{ mg kg}^{-1}$); e, CLASSE IV: produtos pouco perigosos ao meio ambiente (pouco ou muito pouco tóxicos, $DL_{50} > 5.000 \text{ mg kg}^{-1}$).

A classificação toxicológica dos agrotóxicos (Quadro 3) é demonstrada por uma faixa colorida em seus rótulos, conforme regulamentado na Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989 (Brasil, 1989), que se baseia na dose letal (DL₅₀) sob a responsabilidade do Ministério da Saúde.

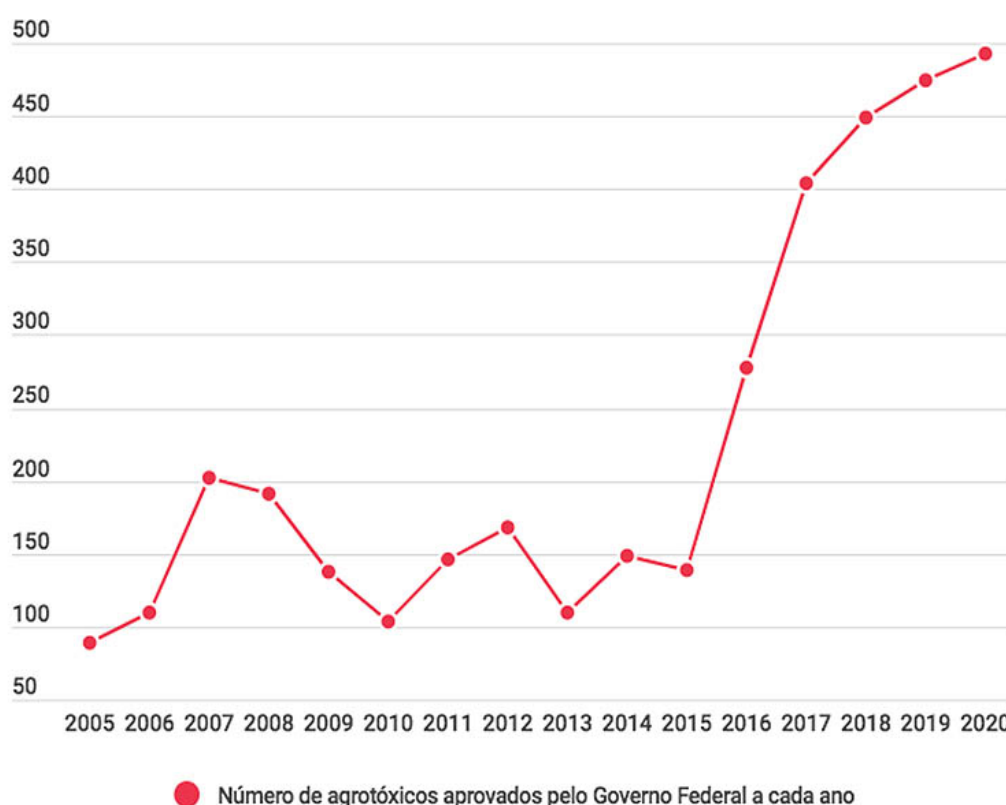
Quadro 3 - Nova classificação toxicológica dos agrotóxicos no Brasil.

	CATEGORIA 1	CATEGORIA 2	CATEGORIA 3	CATEGORIA 4	CATEGORIA 5	NÃO CLASSIFICADO
	EXTREMAMENTE TÓXICO	ALTAMENTE TÓXICO	MODERAMENTE TÓXICO	POUCO TÓXICO	IMPROVÁVEL DE CAUSAR DANO AGUDO	NÃO CLASSIFICADO
PICTOGRAMA					Sem símbolo	Sem símbolo
PALAVRA DE ADVERTÊNCIA	PERIGO	PERIGO	PERIGO	CUIDADO	CUIDADO	Sem advertência
CLASSE DE PERIGO						
Oral	Fatal se ingerido	Fatal se ingerido	Tóxico se ingerido	Nocivo se ingerido	Pode ser perigoso se ingerido	-
Dérmica	Fatal em contato com a pele	Fatal em contato com a pele	Tóxico em contato com a pele	Nocivo em contato com a pele	Pode ser perigoso em contato com a pele	-
Inalatória	Fatal se inalado	Fatal se inalado	Tóxico se inalado	Nocivo se inalado	Pode ser perigoso se inalado	-
COR DA FAIXA	Vermelho PMS Red 199 C	Vermelho PMS Red 199 C	Amarelo PMS Yellow C	Azul PMS Blue 293 C	Azul PMS Blue 293 C	Verde PMS Green 347 C

Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2019.

Atributo de retrocesso, tramita na Câmara dos Deputados o projeto de lei (PL) nº 3.200/2015 que prevê alteração da Lei dos Agrotóxicos que objetiva facilitar o registro dos agrotóxicos assim como alterar a nomenclatura para “defensivos fitossanitários” (Brasil, 2015a), que supostamente retiraria a toxicidade dos mesmos. Apenas em 2020, foram registrados 493 novos pesticidas, o maior número em 10 anos (Figura 6).

Figura 6 - Total de agrotóxicos registrados no Brasil por ano.



Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2021.

A Lei nº 58/2019, recém publicada pela ANVISA, reduziu a classificação toxicológica de várias formulações de agrotóxicos, sendo que nenhum dos 93 produtos alterados (comparados com 24 anteriores à mudança) foram classificados como “Extremamente Tóxico”. Ademais, serão alterados nas etiquetas apenas os símbolos de advertência (caveira e ossos cruzados) para indicação de atenção (Brasil, 2019).

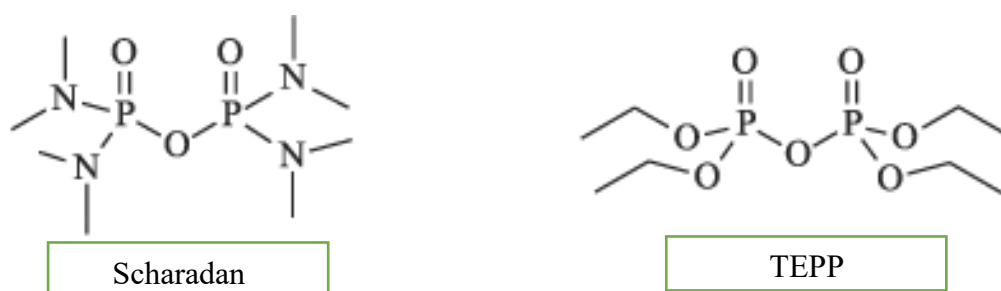
Em 8 de outubro de 2021, foi publicado no Diário Oficial da União (D.O.U.) o Decreto 10.833/2021, que alterou o Decreto 4.074/2002, o qual regulamentou atualizações às regras brasileiras aplicadas aos agrotóxicos, previstas na Lei 7.802/1989 Brasil, 1989). Uma das vantagens e melhorias significativas do decreto, segundo a ANVISA, é facilitar o registro de agrotóxicos, realizado por três órgãos e prever o treinamento obrigatório dos aplicadores destes compostos químicos.

A Câmara dos Deputados aprovou o PL 6299/2002 (“pacote do veneno”), que legaliza e agiliza o processo de autorização dos agrotóxicos genéricos no país (Brasil, 2018b).

TEPP como inibidor da AChE

Em 1941, os primeiros OPs com aplicação industrial e comercial na agricultura começaram com Schrader e colaboradores que descobriram o inseticida octametilpirofosforamida, chamado de Scharadan. Após isso, outros ésteres organofosforados foram descobertos, sendo o primeiro composto inseticida, altamente potente com atividade anticolinesterásica, chamado de Bladan, que continha TEPP, em 1944 na Alemanha (Figura 7). O TEPP apesar de causar náuseas e dificuldades tóxicas, foi utilizado no combate de pulgões (Rosati *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 2007).

Figura 7 – Primeiros OPs de uso industrial: Scharadan e TEPP.



Fonte: Santos *et al.*, 2007.

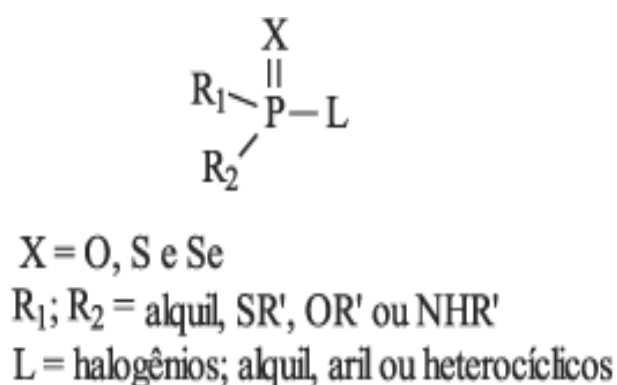
O TEPP, conhecido como pirofosfato de tetraetila, é um pesticida OP, altamente tóxico por inalação e absorção pela pele, conhecido como inibidor de colinesterases, principalmente a AChE. É um líquido higroscópico incolor, com leve odor frutado, possui solubilidade em água e é lentamente decomposto pela água. Possui ponto de ebulição de 137,78°C a 2,3 mmHg; densidade de 1.185 g/mL a 20°C; fórmula molecular $C_8H_{20}O_7P_2$ e peso molecular (PM) 290,19 g/mol (Merck, 1998).

Os OPs têm como principal sítio de ação o sistema nervoso na junção neuromuscular (Aspelin, 1997). São inibidores irreversíveis da AChE, uma glicoproteína que se divide em globular ou assimétrica (Abrasco, 2012), responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos e está presente no sistema nervoso central (SNC) e periférico (Nelson *et al.*, 2001; Dell'omo *et al.*, 2003; Heinzow; Andersen, 2006). A enzima é fosforilada pelo inseticida, ficando inativa e impedindo a hidrólise de ACh. O seu acúmulo nas fendas sinápticas interrompe a transmissão de

impulsos nervosos, ocasionando a hiperestimulação colinérgica (Moreira *et al.*, 2002) e perda do controle muscular, distúrbios cardiorrespiratórios, convulsões e depressão respiratória do SNC (Brasil, 1996). Ou seja, os OPs dessensibilizam o receptor da ACh responsável por interromper o impulso nervoso, levando a óbito (Eldefrawi, 1976; Eldefrawi, 1982; Sucen, 2001; Nelson *et al.*, 2001; Dell'omo *et al.*, 2003; Gonçalves, 2005; Heinzow; Andersen, 2006; Araújo, 2011; Cavalcanti *et al.*, 2016).

A inibição da AChE por OPs leva a reações de desalquilação que podem contribuir para o envelhecimento da molécula, ou seja, o resíduo é fosforilado e reage lentamente com a água. O radical L, ou grupo de saída, pode ser substituído por grupos halogênicos, alquilas, arilas ou heterocíclicos (Figura 8) (Hollingworth, 1976; Chambers; Carr, 1995).

Figura 8 - Estrutura química básica dos OPs.



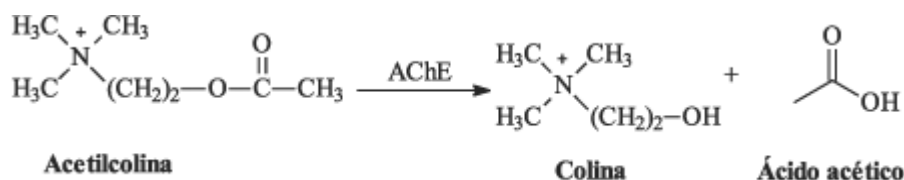
Fonte: Barboza *et al.*, 2018.

A ACh foi o primeiro neurotransmissor descoberto, conhecidamente agonista, colinérgico (Colovic *et al.*, 2013). Desempenha no SNC funções importantes relacionadas ao comportamento, aprendizado, memória, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral (Mesulam *et al.*, 2002; Moretto *et al.*, 2004).

Para realizar sua função, a ACh (C₇H₁₆NO₂) deve ser deslocada ou interrompida. A AChE cliva com a ACh, pela hidrólise resultando colina (Ch) e ácido acético (Figura 9). A liberação da ACh na fenda sináptica acontece por canais de cálcio dependentes de voltagem. A hidrólise da ACh pela AChE ocorre rapidamente em milissegundos, interrompendo a transmissão do impulso nervoso (Katzung, 2005).

Dessa maneira, para acontecer a reação inversa, a colina precisa ser reabsorvida pelos neurônios pós ganglionares (Petronilho; Pinto; Villar, 2011).

Figura 9 – Reação de hidrólise da ACh.



Fonte: Santos *et al.*, 2007.

Entretanto, é de extrema importância um mecanismo que limite o tempo de ação da ACh na transmissão rápida dos neurotransmissores, que é conhecido como degradação da ACh, realizado pelas colinesterases, responsáveis pela ativação indesejada dos neurônios e assegura o momento ideal de sinalização (Golan, 2009). A ACh é encontrada em células gliais, no plasma e no fígado (Katzung, 2005).

Produto de origem vegetal com poder adsorativo

A adsorção é uma metodologia de destaque e simboliza um processo fundamental no controle da disponibilidade e solubilidade de contaminantes no solo (Ford *et al.*, 2001). O carvão vegetal ativado é considerado um adsorvente para a retenção dos poluentes, mas, devido ao seu alto custo, inviabiliza o seu uso.

As macrófitas são plantas que migraram do ambiente terrestre para o meio aquático com propriedades de absorver nutrientes. Sugere-se para tanto, compostos naturais com funções adsorventes ou biossorventes, que apresentem eficiência na capacidade de remoção de contaminantes a um custo relativamente baixo (Notare, 1992; Esteves, 1998). Entre elas, destacam-se as plantas aquáticas aguapé, bananeira e papiro anão.

Os aguapés (*Eichhornia crassipes*), ficam submersos na água, é uma planta dioica com flores brancas e algumas ramificações. Possuem alta capacidade de absorver nutrientes, são utilizados como agente bioindicador de áreas pantanosas e eutrofizadas. Dessa maneira, é considerada de alto poder filtrante sendo eficiente

tanto na recuperação de ambientes poluídos como na remoção de substâncias tóxicas (Notare, 1992).

A banana (*Musa spp*), considerada o quarto alimento natural mais produzido no mundo (Cepa, 2009). A bananeira possui em sua composição a lignina, celulose e hemicelulose, além de contemplar os grupos funcionais como carbonila, carboxila e hidroxila, responsáveis pela biossorção (Bilba; Arsene; Ouensanga, 2007).

O papiro anão é outro exemplo de planta fitorremediadora de extrema relevância, por ser de fácil cultivo e boa adaptação em solos úmidos (Perbangkhem; Polprasert, 2010). Consiste em raios cilíndricos e aplanados, folheados, bractéolas sendo a principal superfície fotossintética da planta (Jones; Kamsiime; Sauders, 2018).

A cortiça é um recurso natural sustentável com distintas características morfológicas e químicas além de inúmeras aplicações na indústria, sendo a mais importante a fabricação de rolhas para a indústria vitivinícola (Pereira, 2007). Este processo gera como subprodutos o pó de cortiça, granulados de cortiça ou resíduos como condensado negro, entre outros (Graça, s.d). O país de Portugal representa 55% da produção e da transformação mundial da cortiça, conhecida pela casca externa espessa e homogênea, com células suberizadas, de tecido impermeável, elástico e homogêneo do *Quercus suber* L. (Fagaceae), o sobreiro que produz a cortiça virgem, que reproduz a cortiça da segunda decapagem e cortiça de reprodução de tiras subsequentes (Monteiro, 2019). Esta casca externa ao ser retirada da árvore sofre regeneração devido a presença de felogênio (Pereira, 2004; Gil, 1998; Mestre, 2011; Silva, 2005). O sobreiro é uma árvore de adaptabilidade esclerófila, encontrada principalmente na bacia do Mediterrâneo ocidental. Possui crescimento lento, perene e de folhas largas (Pereira, 2007; Gil, Varela, 2008; Pereira, 2011; Aroso *et al.*, 2017; Camilo-Alves *et al.*, 2020; Apcor, 2022). Os sobreiros, em condições ideais, chegam a viver 200 anos, atingem 25 m de altura, preferem a temperatura de 13-18°C e solos com valores de pH entre 4,8 e 7,0 (Silva, 2005, Pereira, 2011, Gil, Varela, 2008; Apcor, 2022).

A cortiça tem sido indicada como sorvente sustentável por ser de fácil acesso, de baixo custo, 100% natural, renovável, reciclável e biodegradável (Pintor *et al.*, 2012; Aguiar *et al.*, 2019). Esse potencial se deve à sua composição heterogênea (grupos CO, -OH e -CH), presença de lignina (17,1 a 36,4%), suberina (23,1 a 54,2%), celulose e hemicelulose (19%) e uma fração extrativa (16%) composta por

substâncias lipídicas e fenólicas e compostos inorgânicos (1%), que conferem hidrofobicidade e maior polaridade respectivamente (Hinz; Morés; Carasek, 2021).

A composição química e a estrutura da parede celular da cortiça apresentam como propriedades a de camada protetora dos tecidos internos e de resistência à célula representado pela suberina e lignina respectivamente considerados polímeros hidrofóbicos. Os demais componentes estruturais da parede celular são os polissacarídeos (20%), mais especificamente a celulose e a hemicelulose (Ferreira *et al.*, 2016; Mota *et al.*, 2016). A cortiça é composta também de componentes não estruturais (16%), solúveis em diferentes solventes (Mota *et al.*, 2016; Sen *et al.*, 2016). Além, da cinza (1 a 2%) que é resultado da combustão total. Representa um material inorgânico composto de cálcio, fósforo, sódio, potássio e magnésio (Ferreira *et al.*, 2016). A cortiça possui baixa densidade, impermeabilidade a líquidos e isolante térmico (Gil, 1998, Aronson, 2012). Os granulados de cortiça possuem em sua composição material de carbono orgânico (Monteiro, 2019).

Objetivos

Diante do contexto apresentado, o presente estudo com proposta inovadora, teve como objetivo geral avaliar o impacto do pesticida pirofosfato de tetraetila (TEPP) na atividade da acetilcolinesterase em enzima comercial de *Electrophorus electricus* (enguia elétrica) e secretada por células neuronais PC12 (*in vitro*). Para tanto, foi necessário comparar *in vivo*, a eficiência da remoção do pesticida da água com a utilização de grânulos de cortiça como adsorvente natural em uma espécie de peixe bem sensível às alterações e adversidades ambientais e, verificar os efeitos toxicológicos do TEPP como contaminante no desenvolvimento e comportamento dos embriões e juvenis de zebrafish.

Visto que o TEPP é um inseticida de potencial altamente tóxico, aqui ainda é proposto avaliar e desenvolver um controle para descontaminação da água contaminada com TEPP por meio de produtos de origem vegetal com capacidade adsorativa, o que permite elucidar e abrir novas possibilidades em pesquisas de descontaminantes aquáticos para a região do oeste paulista.

Justificativa

A temática deste trabalho tem como relevância a avaliação e minimização dos impactos ambientais das atividades agroindustriais causadas pelo uso do contaminante TEPP, utilizado nas culturas de café, feijão e soja, a partir do uso dos embriões de zebrafish. A avaliação da toxicidade de uma substância permite uma análise dos efeitos nocivos frente a uma exposição humana. Vale ressaltar ainda, que o uso de embriões *Danio rerio* vem se tornando um importante modelo para determinar a toxicidade de uma nova substância, pois apresentam características similares ao genoma humano. Além disso, permite elucidar sua aplicabilidade em diversas células, no estudo dos mecanismos moleculares e nas abordagens genéticas, além de apresentarem fácil manipulação quando comparada a outros modelos animais, como o camundongo, além de um baixo custo em seu uso (Cazarin; Corrêa; Zambrone, 2004; Escaleira, 2017).

A seguir será apresentado dois artigos relacionados aos objetivos do trabalho, sendo o capítulo 1 intitulado: *Eficiência na remoção do pesticida pirofosfato de tetraetila (TEPP) em água: utilização de grânulos de cortiça como adsorvente natural na atividade da acetilcolinesterase em células neuronais PC12* e o capítulo 2: *O impacto do pesticida pirofosfato de tetraetila (TEPP) no desenvolvimento e comportamento do Danio rerio: avaliando o potencial dos grânulos de cortiça como adsorvente natural para remoção de TEPP de ambientes aquosos*. Assim, este trabalho compreende a contextualização, dois artigos compondo os capítulos e as considerações finais.

CAPÍTULO I - EFICIÊNCIA NA REMOÇÃO DO PESTICIDA PIROFOSFATO DE TETRAETILA (TEPP) EM ÁGUA: UTILIZAÇÃO DE GRÂNULOS DE CORTIÇA COMO ADSORVENTE NATURAL NA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM CÉLULAS NEURONAIS PC12²

Fernanda Blini Marengo Malheiros¹, Eduardo Festozo Vicente², Angélica Gois Morales³, Carlos Alberto-Silva^{4*}

1 Pós-Graduação em Agronegócio e Desenvolvimento, Grupo de Pesquisa em Gestão e Educação Ambiental (PGEA), Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Tupã, 17602-496, SP, Brasil.

2 Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Engenharia, Tupã, 17602-496, SP, Brasil.

3 Grupo de Pesquisa em Gestão e Educação Ambiental (PGEA), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Gestão, Desenvolvimento e Tecnologia, Tupã, 17602-496, SP, Brasil.

4 Centro de Ciências Naturais e Humanas, Laboratório de Morfofisiologia Experimental Universidade Federal do ABC (UFABC), São Bernardo do Campo, 09606-070, SP, Brasil.

² Artigo científico publicado.

Blini Marengo Malheiros F, Vicente EF, Gois Morales A, Alberto-Silva C. Efficiency of the removal of tetraethyl pyrophosphate (TEPP) pesticide in water: use of cork granules as a natural adsorbent on acetylcholinesterase activity in neuronal PC12 cell. J Environ Sci Health B. 2022;57(7):554-560. doi: 10.1080/03601234.2022.2077608. Epub 2022 May 18. PMID: 35583269.

RESUMO

O pirofosfato de tetraetila (TEPP) é um pesticida organofosforado que inibe irreversivelmente a acetilcolinesterase (AChE). Uma técnica promissora para remover pesticidas da água é a utilização de materiais de baixo custo, e o pó ou grânulos de cortiça têm sido recomendados como sorventes sustentáveis. No presente estudo, avaliamos a eficácia da remoção do TEPP da água utilizando rolhas de vinho para obter grânulos de cortiça como adsorvente natural, analisando os efeitos do TEPP na atividade da AChE em enzima comercial de *Electrophorus electricus* e secretada por células neuronais PC12. O TEPP inibiu a atividade da AChE de maneira dependente da concentração. Pela primeira vez, mostramos que diferentes concentrações de TEPP diluído em água após experiências de adsorção utilizando grânulos de cortiça diminuíram os efeitos inibitórios do TEPP na atividade da AChE em enzima comercial e meio de cultura de células neuronais PC12. Globalmente, os resultados indicam que os grânulos de cortiça podem ser utilizados para remediar ambientes contaminados com pesticidas como uma alternativa às dispendiosas abordagens de remoção de pesticidas.

Palavras-chave: Pirofosfato de tetraetila. Organofosforado. Cortiça. Adsorvente; acetilcolinesterase. Células neuronais PC12.

*Endereço para correspondência: Carlos Alberto-Silva, Universidade Federal do ABC (UFABC), Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), R. Arcturus, 03, Bloco Delta, São Bernardo do Campo, 09606-070, SP, Brasil; Telefone/FAX: + 55(11)23206229. e-mail: carlos.asilva@ufabc.edu.br

1 Introdução

Os pesticidas são adotados para o controle, destruição ou prevenção de agentes patogênicos que inibem e interferem nas vias fisiológicas dos organismos, principalmente de carbono, hidrogênio e cloro (Fernandez-Cornejo *et al.*, 2014). Os organofosforados (OPs) representam uma ampla gama de produtos químicos estruturalmente relacionados que têm sido amplamente utilizados como inseticidas comerciais (Georg, 2015). Os OPs inibem irreversivelmente a acetilcolinesterase (AChE; EC3.1.1.7), a enzima que catalisa a quebra da acetilcolina (ACh) em acetato e colina nas fendas sinápticas (Abreu-Villaça; Levin, 2017), o que explica a estimulação excessiva do sistema nervoso central levando à insuficiência respiratória e morte.

O uso excessivo de agrotóxicos representa um risco ao meio ambiente, pois podem contaminar o solo, a água, o ar e os seres vivos por meio de derramamento

ou aplicação em regiões agrícolas (Àngels Olivella *et al.*, 2012). Os pesticidas foram removidos de soluções aquosas usando uma variedade de tratamentos químicos e físicos, como adsorção, oxidação avançada e filtragem por membrana, bem como tratamentos biológicos, como fitorremediação, biorremediação e processo de tanque de aeração (Mojiri *et al.*, 2019). Uma técnica promissora para remover pesticidas de soluções aquosas é a adsorção em materiais de baixo custo usando adsorventes naturais (Mojiri *et al.*, 2020).

A cortiça é um recurso natural sustentável com características morfológicas e químicas distintas. É uma importante matéria-prima industrial com uma ampla gama de aplicações, sendo a mais importante a fabricação de rolhas (Pereira, 2007; Pintor *et al.*, 2012). Além disso, os principais subprodutos da indústria da cortiça, pó de cortiça e granulados, podem ser valorizados através da utilização de tecnologias de adsorção ambiental, resultando em dois benefícios: reciclagem de resíduos e limpeza de água, águas residuais ou ar. O pó e os grânulos de cortiça, por exemplo, têm sido recomendados como sorventes sustentáveis para uma vasta gama de derrames de hidrocarbonetos, óleos, solventes e compostos orgânicos porque são 100% naturais, renováveis, recicláveis e biodegradáveis (Pereira, 2007; Pintor *et al.*, 2012). Esse potencial se deve à sua composição heterogênea (grupos CO, -OH e -CH), presença de lignina e suberina, que conferem hidrofobicidade, e presença de celulose e hemicelulose, que possuem maior polaridade (Hinz *et al.*, 2021).

A reutilização de rolhas como adsorventes naturais tem sido investigada porque apresenta propriedades apelativas como ser facilmente acessível, contribuir para o ambiente, ser barata, reduzir desperdícios e servir como alternativa aos materiais sintéticos. Como resultado da crescente necessidade de informação sobre a remoção de pesticidas utilizando sorventes naturais, avaliamos a eficácia da remoção de pesticidas pirofosfato de tetraetila (TEPP) da água utilizando grânulos de cortiça provenientes da reutilização de cortiça de vinho na atividade de AChE em enzima comercial de *Electrophorus electricus* (enguia elétrica) e enzima secretada por células neuronais PC12.

2 Materiais e métodos

2.1 Reagentes e soluções

O TEPP (Pestanal®) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) com pureza > 99,9%, e este pesticida foi escolhido por ser comumente utilizado na agricultura, produtos de limpeza, cosméticos, proteção ambiental, alimentos e bebidas e cuidados pessoais em todo o mundo. As soluções estoque de TEPP foram preparadas a 100 mmol·L⁻¹ em água ultrapura estéril e mantidas a -4 °C. As amostras de cortiça foram utilizadas como adsorventes naturais e obtidas a partir de uma rolha de vinho da mesma marca (São Paulo, Brasil), um material economicamente viável e que não polui o meio ambiente após a sua utilização. AChE de *E. electricus* (enguia elétrica) Tipo VI-S foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Outros produtos químicos utilizados no presente estudo foram de grau de reagente analítico (pureza superior a 95%) e adquiridos da Calbiochem-Novabiochem Corporation (San Diego, CA, EUA), Gibco BRL (Gibco-BRL, Waltham, MA, EUA) ou Sigma -Aldrich Corporation (St. Louis, MO, EUA).

2.2 Linhagem celular neuronal PC12

A linhagem celular PC12 foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC® CRL-1721TM, EUA) e é gerada a partir de um feocromocitoma de rato transplantável. As células foram cultivadas rotineiramente em meio DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Gibco, Waltham, EUA), 1% (v·v-1) de 10.000 U·mL⁻¹, 10 mg·mL⁻¹ de estreptomicina e 25 µg·mL⁻¹ de solução de anfotericina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 37°C em uma solução de 5% de CO₂ (Water Jacketed CO₂ Incubator, Thermo Científico). As células foram passadas utilizando uma solução de tripsina-EDTA [0,05% (m·v-1) tripsina e 0,02% (m·v-1) EDTA] a 80% de confluência. A cada 2-3 dias, o meio de cultura foi reabastecido.

2.3 Preparo dos grânulos de cortiça

As amostras de cortiça foram cortadas em formato de barra com 1,0 cm de comprimento e aproximadamente 3,0 mm de diâmetro e trituradas. A limpeza das rolhas foi realizada conforme descrito posteriormente (Dias *et al.*, 2015). Eles foram submetidos a etapas de lavagem em água ultrapura por 2 h, e a água foi renovada até que houvesse ausência de coloração amarela na água. As amostras foram filtradas

(Whatman 0,45 μm) antes da análise para minimizar a interferência dos finos adsorventes na análise. Em seguida, foram secos em estufa a 60 °C por 24 horas e armazenados em recipientes plásticos.

2.4 Experimentos de adsorção

Os testes de adsorção foram realizados num conjunto de microtubos de 2 mL contendo 5 ou 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (1 mL) de soluções TEPP, aplicando-se em cada amostra uma dose fixa de 0,10 g de granulado de cortiça, que foi coberta com folha de alumínio. para evitar a fotodegradação do pesticida. Todos os testes incluíram um grupo controle que refletiu a condição de tratamento de água ultrapura estéril sem TEPP. As soluções foram mantidas em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por um total de 24 horas de contato, com agitação periódica para atingir o equilíbrio. As amostras foram então centrifugadas durante 5 min a $16.000 \times g$ à temperatura ambiente. As soluções foram coletadas, esterilizadas por filtração com filtro de membrana com tamanho de poro de 0,22 μm e armazenadas a -4°C até o uso. De acordo com estudo preliminar, a dose de granulado de cortiça utilizada é a melhor no espectro de concentrações de pesticidas examinadas (dados não apresentados). Os ensaios bioquímicos para atividade de AChE obtidos comercialmente ou em culturas de células PC12 foram utilizados para analisar amostras de controle ou diferentes concentrações de TEPP.

2.5 Atividade de AChE em enzima comercial de *E. electricus*

A atividade da AChE foi avaliada espectrofotometricamente pela técnica de Ellman, conforme relatado anteriormente na literatura (Ellman *et al.*, 1961; Harry *et al.*, 2003), com pequenas modificações. TEPP (10 μL) em doses de concentrações variadas (1, 5, 10 e 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 10 μL de AChE comercial (0,5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 160 μL de ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB; reagente de Ellman) 0,33 mM (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em tampão fosfato (0,1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,0) foram colocados em triplicata em microplaca e incubados em temperatura ambiente por 10 min após adição de 10 μL de iodeto de acetiltiocolina (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (Sigma, St. Louis, MO, EUA). A hidrólise do iodeto de acetiltiocolina leva à produção de ácido acético e tiocolina, que reage com o DTNB produzindo o ânion ácido 5-tio-2-

nitrobenzóico, que foi monitorado a 412 nm durante 20 min em leitor de microplacas (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). A atividade da AChE foi expressa como concentração de substrato acetiltiocolina-iodo hidrolisado em nmol.min⁻¹. A atividade da AChE foi expressa como percentual de substrato acetiltiocolina iodo hidrolisado em relação ao controle.

2.6 Atividade AChE em cultura de células neuronais PC12

Inicialmente, um ensaio bioquímico para atividade de AChE em células PC12 foi realizado com alterações mínimas utilizando lisados de proteína bruta de células e meio de cultura (Schwartz *et al.*, 2007). As células foram semeadas a $1,0 \times 10^4$ células por poço em placas de 96 poços (Nest Biotechnology, Rahway, EUA) e tratadas com diferentes concentrações de TEPP (1 a 20 mM) diluídas em meio DMEM sem FBS num volume final de 0,10 mL. A placa foi incubada por 24 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Para obter lisados de proteína bruta, as células foram lavadas uma vez com 200 µL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4) e lisadas com tampão contendo NaCl 150 mM, Triton X-100 a 1%, Tris 50 mM, pH 8,0. Alíquotas de lisados de proteína bruta (10 µL) ou meio de cultura (15 µL) foram utilizadas para realizar o ensaio enzimático de AChE determinado por uma modificação do método espectrofotométrico de Ellman *et al.* (Ellman *et al.*, 1961), conforme descrito abaixo. A atividade da AChE foi expressa como concentração de substrato acetiltiocolina iodo hidrolisado em nmol.min⁻¹ ou uma porcentagem de substrato acetiltiocolina iodo hidrolisado em relação ao controle.

2.7 Estudos de toxicidade celular

Células PC12 também foram utilizadas para avaliar a toxicidade celular do TEPP *in vitro*. Células PC12 foram semeadas em placas de 96 poços (Nest Biotechnology, Rahway, EUA), a $2,0 \times 10^4$ células por poço, e foram tratadas com diferentes concentrações (0,3 a 10 mM) de TEPP em um volume final de 0,10 mL. A placa foi incubada a 37°C por 1, 6, 12, 24 e 48 horas. Para cada concentração e curso de tempo estudados, houve grupos controle e DMSO, que representam células não tratadas (apenas um volume igual do meio de cultura) e tratadas com DMSO 5% (v/v) diluído no meio de cultura, respectivamente. Os efeitos citotóxicos do TEPP foram

determinados usando ensaio de violeta cristal (Feoktistova *et al.*, 2016). Resumidamente, o meio foi aspirado e as células foram lavadas duas vezes num jato suave de água da torneira. Em seguida, 25 µL de uma solução de coloração cristal violeta a 0,5% (v/v) foram adicionados a cada poço e incubados por 20 min em temperatura ambiente em um agitador de bancada com uma frequência de 20 oscilações por min. A placa foi lavada quatro vezes e seca ao ar durante pelo menos 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, metanol (100 µL) foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada com a tampa colocada por 20 min em temperatura ambiente em um agitador de bancada com frequência de 20 oscilações por min. Após, a adsorvência da amostra foi medida a 570 nm utilizando um leitor SpectraMax (Molecular Devices, CA, EUA). A citotoxicidade foi expressa como percentagem (%) da integridade celular em relação às células de controle (100%).

3 Análise estatística

Todos os dados são mostrados em triplicata como a média $\pm$ DP de três experimentos diferentes ($n = 3$). Para comparações entre grupos, foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida de um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. A significância estatística foi definida como valor de $p < 0,05$. O GraphPad Prism 6.0 foi utilizado para conduzir a análise (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

4 Resultados

4.1 Grânulos de cortiça

Os grânulos de cortiça utilizados no nosso estudo foram obtidos após corte, trituração, lavagem, filtração e secagem das amostras de cortiça, conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1. Preparo dos grânulos de cortiça como adsorvente natural. As amostras de cortiça (A) foram cortadas (B), trituradas (C), lavadas, filtradas e secas (D).



Fonte: Elaborado pelos autores, 2022.

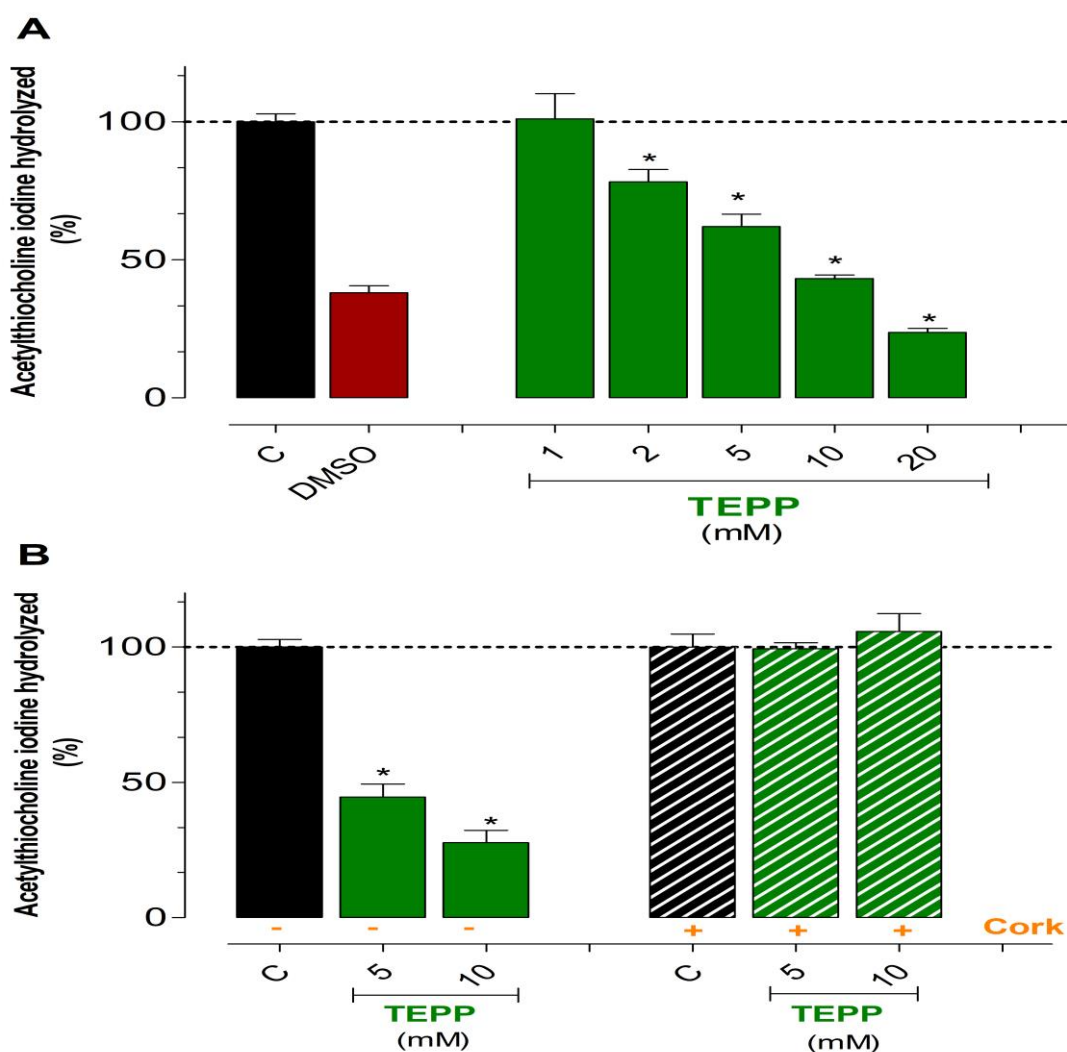
4.2 Efeitos do TEPP na atividade da AChE

Os efeitos inibitórios do TEPP na concentração de 1 a 20 mmol·L⁻¹ sobre a enzima AChE de *E. electricus* tipo VI-S obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) foram testados usando o método espectrofotométrico de Ellman *et al.* (Ellman *et al.*, 1961). O TEPP reduziu significativamente a atividade da AChE em concentrações superiores a 2 mM, sendo o efeito dependente da concentração (Fig. 2A). A atividade da AChE foi reduzida para $23,80 \pm 1,42\%$ quando TEPP a 20 mM foi utilizado no ensaio em comparação com o controle. O DMSO (5%) também reduziu a atividade da AChE com um percentual de inibição de $38,05 \pm 1,42\%$.

Pela primeira vez, mostramos que os grânulos de cortiça utilizados como

adsorventes naturais foram eficientes na remoção de mais de $94 \pm 5\%$ de TEPP diluído em água em comparação com ensaios de inibição de AChE na presença de 5 e 10 mM de TEPP não tratado com cortiça (Fig. 2B).

Figura 2. Efeitos do TEPP na atividade da AChE (A) e características dos grânulos de cortiça para adsorção de TEPP diluído em água (B). A inibição da AChE foi expressa como porcentagem de substrato acetiltiocolina iodo hidrolisado em relação ao controle (C; caixa preta). Os dados de dois experimentos independentes em triplicata são expressos como média $\pm$ DP e avaliados usando ANOVA unidirecional seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ para diferenças entre os grupos controle (C); Pirofosfato de tetraetila (TEPP).



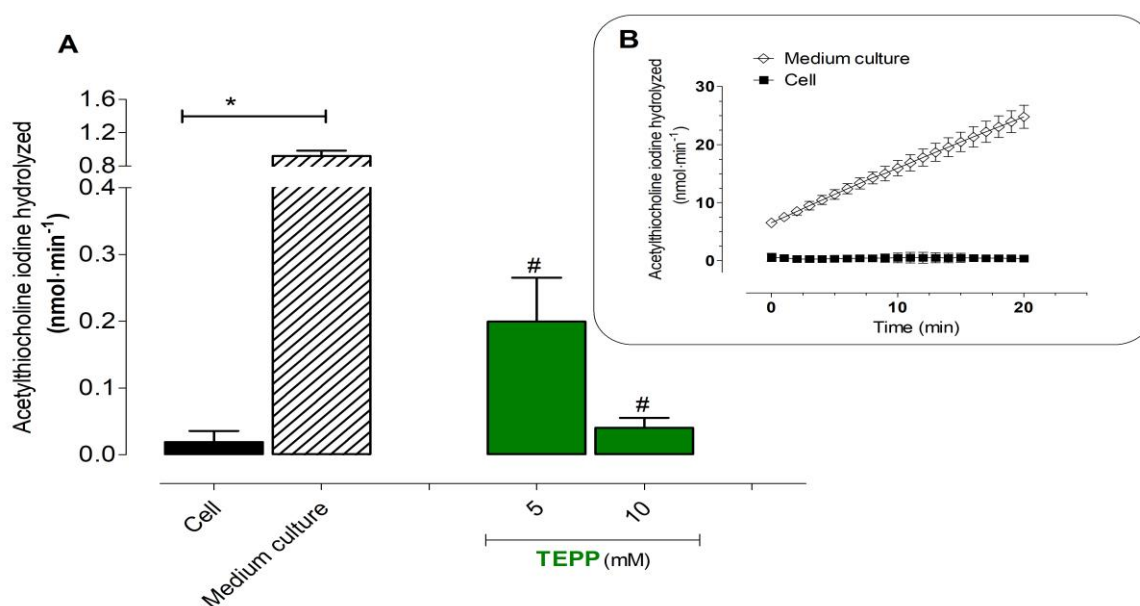
Fonte: Elaborado pelos autores, 2022.

4.3 Atividade de AChE em lisados celulares e meio de cultura da linhagem celular neuronal PC12

A atividade da AChE foi medida utilizando extrato proteico total e meio de cultura de células neuronais PC12. A velocidade de hidrolisação da acetiltiocolina-iodo no experimento cinético foi maior no meio de cultura ($0,92 \pm 0,06 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$) do que nos lisados de proteína bruta ($0,02 \pm 0,01 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$), indicando que a atividade da AChE é mais abundante no meio do que no extrato celular (Fig. 3). Por estas razões, os efeitos do TEPP na atividade da AChE foram investigados utilizando meio de cultura de células PC12. TEPP a 5 mM e 10 mM reduziu a atividade da AChE em $78,4 \pm 5,4$ e $95,7 \pm 2,3\%$, respectivamente, quando comparado à atividade medida no meio de cultura (Fig. 3).

Figura 3. Caracterização da atividade AChE na linhagem celular neuronal PC12.

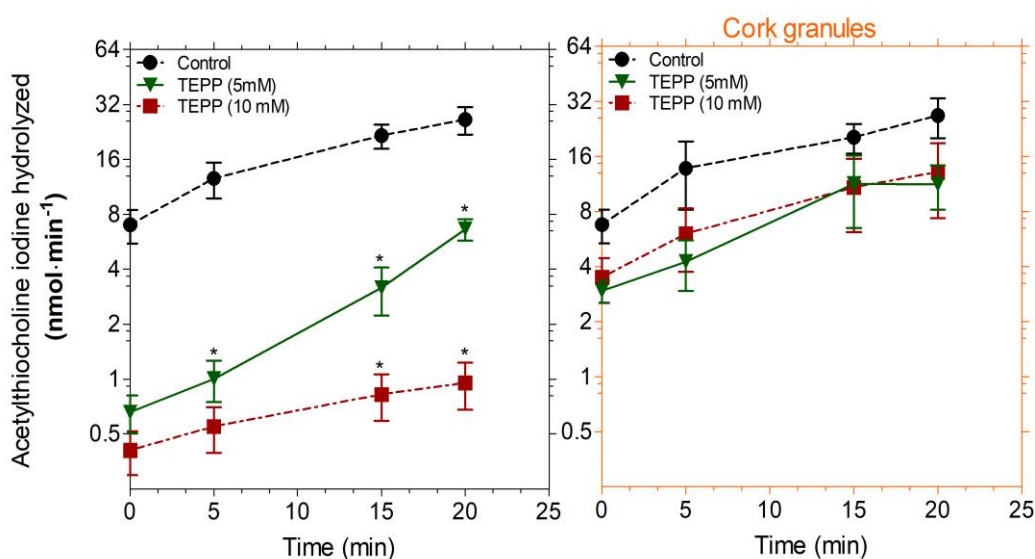
A inibição da AChE foi expressa como substrato acetiltiocolina-iodo hidrolisado por min ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$) em lisados celulares e meio de cultura (A). Cinética enzimática do substrato acetiltiocolina-iodo hidrolisado em lisados celulares e amostras de meio de cultura de cultura celular monitoradas durante 20 min (B). Os dados de dois experimentos independentes em triplicata foram expressos como média $\pm$ DP e analisados por ANOVA unidirecional seguido de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ para diferenças entre os grupos controle; Pirofosfato de tetraetila (TEPP).



4.4 Efeitos do TEPP na atividade da AChE no meio de cultura da linhagem celular neuronal PC12

A Figura 4 mostra que as células PC12 expostas a 5 ou 10 mmol·L⁻¹ de TEPP por 24 h diminuíram os níveis de atividade da AChE de maneira dependente da concentração quando comparadas às células controle. Os efeitos inibitórios do TEPP na atividade da AChE em meios de cultura da linhagem celular neuronal PC12 não foram detectáveis quando as células PC12 foram tratadas com amostras contendo 5 ou 10 mmol·L⁻¹ de TEPP e 0,10 g de grânulos de cortiça produzidos após as experiências de adsorção. Curiosamente, os nossos resultados indicaram que os grânulos de cortiça adsorveram mais de 95 ± 5% do TEPP diluído em água, reduzindo os efeitos inibitórios do TEPP na atividade da AChE nos meios de cultura.

Figura 4. Efeitos do TEPP na atividade da AChE no meio de cultura da linha celular neuronal PC12 (A) e na eficiência da utilização de resíduos de cortiça como adsorvente natural do TEPP em solução (B). Os dados foram expressos como média ± DP e avaliados utilizando ANOVA unidirecional seguido pelo pós-teste de Tukey de dois experimentos independentes em triplicata. * p < 0,05 para diferenças entre os grupos controle; Pirofosfato de tetraetila (TEPP).

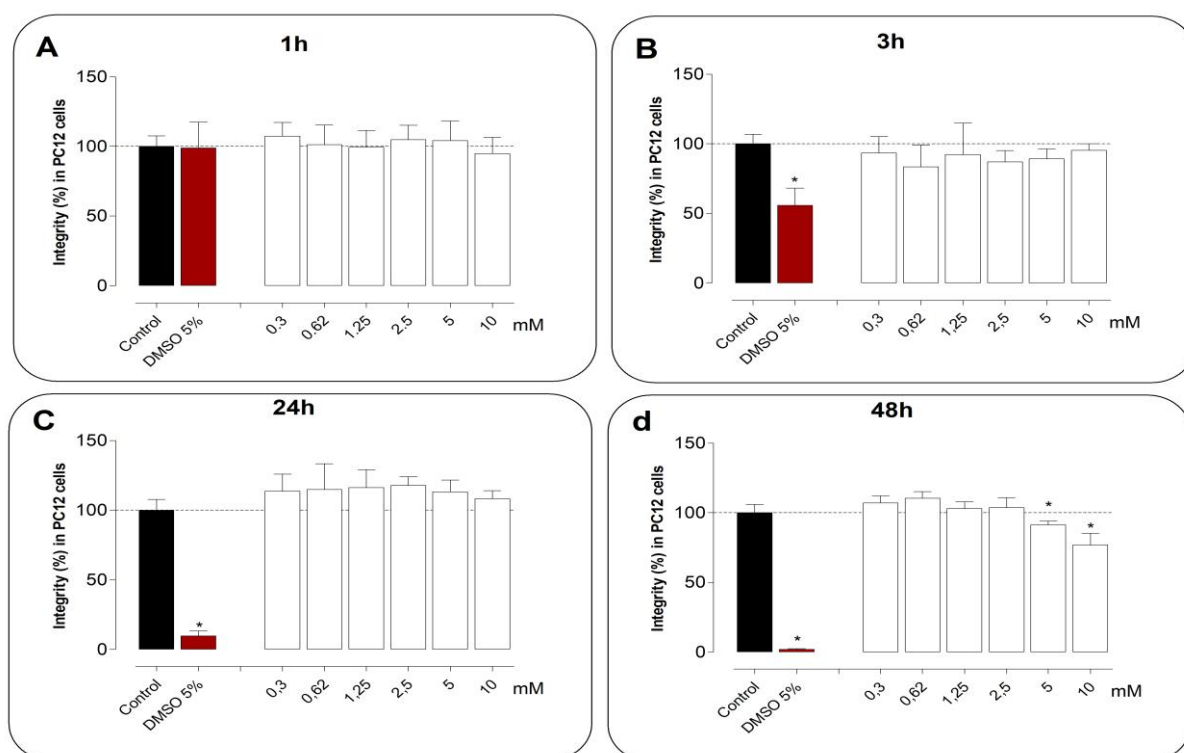


Fonte: Elaborado pelos autores, 2022.

4.5 Citotoxicidade do TEPP na linhagem celular neuronal PC12

Os efeitos citotóxicos de várias doses de TEPP foram investigados utilizando células PC12 com base na alteração da integridade da membrana neste estudo, conforme demonstrado na figura 5. Todas as concentrações testadas de TEPP não apresentaram citotoxicidade significativa ($p > 0,05$) após 1, 3 e 24 h de tratamentos (Fig. 5 A-C). Apesar disso, o TEPP apresentou efeitos citotóxicos a 5 mM ($p = 0,035$) e 10 mM ($p = 0,015$) após 48h de tratamento quando comparado à célula não tratada (controle) ou DMSO (Fig. 5D). O DMSO (controle positivo) diminuiu a integridade celular nas células PC12 após 3, 24 e 48 h em comparação ao grupo controle (Fig. 5 B-D).

Figura 5. Efeitos citotóxicos do TEPP nas células neuronais PC12. Durante 1 (A), 3 (B), 24 (C) e 48 (D) horas, as células foram tratadas com TEPP em doses variando de 0,3 a 10 mM. Os grupos Controle e DMSO indicam células não tratadas e células tratadas com DMSO 5%, respectivamente. Os valores são expressos como média $\pm$ DP de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados usando ANOVA unidirecional e pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Pirofosfato de tetraetila (TEPP).



Fonte: Elaborado pelos autores, 2022.

5 Discussão

A cortiça é um recurso natural sustentável com características morfológicas e químicas distintas. É uma importante matéria-prima industrial com um vasto leque de aplicações, das quais a mais importante é o fabrico de rolhas (Pereira, 2007). Além disso, os principais subprodutos da indústria da cortiça, pó de cortiça e grânulos, podem ser valorizados através da utilização de tecnologias de adsorção ambiental, resultando em dois benefícios: reciclagem de resíduos e purificação de água, águas residuais ou ar (Pintor *et al.*, 2012). Aqui, investigamos a reutilização de rolhas de vinho para obter grânulos de cortiça para serem utilizados como adsorventes naturais para TEPP em ambientes aquosos, utilizando um teste enzimático de AChE empregando enzima comercial ou segregada de cultura de células neuronais PC12 para avaliar a eficácia da remoção de TEPP de água.

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou espectrometria de massa (HPLC-MS/MS) ou cromatografia líquida de alta eficiência - espectrometria de massa de alta resolução (UPLC-HRMS) são métodos comumente usados para determinar resíduos pesticidas diluídos em amostras de água ou a eficiência da remoção de pesticidas usando compostos adsorventes naturais (De Aguiar *et al.*, 2019; Hinz *et al.*, 2021; Marzi Khosrowshahi *et al.*, 2021; Pan *et al.*, 2022). A eficácia das rolhas das *Quercus cerris* e *Quercus suber* na remoção de pesticidas da água foi investigada (De Aguiar *et al.*, 2019). Em ambientes aquosos, ambas as espécies de cortiça podem ser utilizadas como adsorventes de atrazina, clorpirifós, lambda-cialotrina, fluazifop-P-butilo e lactofeno, com eficiências médias de remoção de 80 e 70% para os pesticidas examinados, utilizando espectrometria de massa para analisar a concentração de pesticidas em solução (De Aguiar *et al.*, 2019). Pela primeira vez, mostramos a eficiência na remoção significativa de mais de $91,4 \pm 4,0\%$ de TEPP diluído em água quando sua atividade inibitória de AChE foi testada por ensaios bioquímicos. Estes resultados demonstraram que diferentes concentrações de TEPP diluídas em água após experimentos de adsorção não inibiram a atividade da AChE em comparação com TEPP sem adsorção. Reforça a ideia de que os grânulos de cortiça podem ser utilizados para estabelecer um tratamento econômico e eficiente para ambientes afetados por pesticidas, como os contaminados por pesticidas organofosforados.

A enzima AChE, encontrada em neurônios colinérgicos, regula o desenvolvimento, a diferenciação e a plasticidade dos neurônios em desenvolvimento do sistema nervoso central (Grisaru *et al.*, 1999) e alterações na sua atividade têm sido associadas aos distúrbios e intoxicações, incluindo toxicidade induzida por TEPP (Maxwell *et al.*, 2006). TEPP induz estimulação excessiva do sistema nervoso central ao inibir irreversivelmente a AChE. A inibição do sítio catalítico da enzima é amplamente aceita como o principal mecanismo de ação (Maxwell *et al.*, 2006), embora existam outros mecanismos não relacionados à inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), como inibição da esterase neurotóxica ou ligação à albumina sérica (Glaros *et al.*, 2020). Estudos anteriores também relataram os efeitos inibitórios do TEPP na AChE comercial (Maxwell *et al.*, 2006) e AChE cerebral em diferentes peixes tropicais (Assis *et al.*, 2012). Nos outros, o TEPP também inibiu significativamente a enzima AChE comercial da enguia elétrica (*E. electricus*) tipo VI-S de maneira dependente da concentração, incluindo concentrações superiores a 20 mM com inibição > 90% da cinética enzimática.

A cortiça é um material poroso de biomassa constituído por células prismáticas empilhadas em forma de favo de mel que pode ser utilizado como meio de adsorção (Pereira, 2007). Propõe-se que a água seja adsorvida na cortiça num processo de duas etapas: primeiro, a água forma aglomerados em torno de locais hidrofílicos na superfície; e então, a água se difunde na parede celular, levando ao inchaço do material. Esta transformação da estrutura da parede leva a um ciclo de histerese nas isotermas de adsorção de vapor de água (Lequin *et al.*, 2010). Este fenômeno, associado às interações físico-químicas e aos importantes sítios de ligação entre as moléculas dos pesticidas e da cortiça, especialmente o seu domínio aromático de suberina e lignina, (Domingues *et al.*, 2007) pode fornecer informações importantes para compreender a dinâmica dos processos de retenção e expressar sua capacidade de adsorção (Pintor *et al.*, 2012). Neste estudo, a utilização de grânulos de cortiça como substrato de adsorção para a remoção de TEPP diluído em água foi eficiente quando comparado com ensaios de inibição de AChE na presença de TEPP diluído em água. É importante realçar que as experiências de adsorção foram realizadas em soluções preparadas com água ultrapura estéril (pH ~7,0) à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 24 horas de contato com grânulos de cortiça. Porém, como o pH, a temperatura e a presença de nutrientes e outros metais podem afetar o mecanismo de adsorção e, conseqüentemente, a eficácia e

seletividade do processo (De Aguiar *et al.*, 2019). Para compreender totalmente o impacto das influências externas no processo de adsorção do TEPP nestas descobertas, mais estudos serão necessários.

A liberação de AChE enzimaticamente ativa em células neuronais PC12 foi previamente relatada na literatura (Deschênes-Furry *et al.*, 2003; Lucas; Kreutzberg, 1985). Estas descobertas também mostraram que essas células liberam AChE no meio extracelular porque sua atividade foi maior no meio de cultura do que nos lisados de proteína bruta. Além disso, a adição de TEPP ao meio de cultura reduziu bastante a atividade da AChE. Curiosamente, estes resultados indicaram que os grânulos de cortiça adsorveram mais de $95 \pm 5\%$ do TEPP diluído em água, reduzindo os efeitos inibitórios do TEPP na atividade da AChE nos meios de cultura. Estas descobertas mostram que culturas de células cerebrais *in vitro* podem ser usadas para determinar os processos subjacentes à neurotoxicidade do desenvolvimento de pesticidas, bem como fornecer um método de triagem rápido.

A neurotoxicidade do azametifós e do clorpirifós, ambos pesticidas organofosforados, também foi investigada em células PC12, e o crescimento neuronal mostrou-se inibido de forma dependente da dose (Christen *et al.*, 2017). Os testes de citotoxicidade avaliam os efeitos de um composto numa linhagem celular humana específica e fornecem informações cruciais sobre as propriedades biológicas de uma nova molécula, concentrando-se na sua tolerabilidade fundamental (Bácskay *et al.*, 2018). Os efeitos citotóxicos de várias doses de TEPP foram investigados utilizando células PC12 com base na alteração da integridade da membrana neste estudo. Quando comparado com a célula não tratada, o TEPP só apresentou efeitos citotóxicos em doses mais elevadas e após 48 horas de tratamento.

Estas descobertas indicam que os grânulos de cortiça para vinho podem ser utilizados como adsorvente natural para TEPP em ambientes aquáticos, com eficiências de remoção consideráveis. Mostrou-se que os grânulos de cortiça adsorveram mais de 95% do TEPP diluído em água, diminuindo os efeitos inibitórios do TEPP na atividade da AChE em enzima comercial de enguia eléctrica (*E. electricus*) e meio de cultura de células neuronais PC12. Estes resultados sugerem que culturas de células neuronais *in vitro* podem ser utilizadas para determinar os processos subjacentes à neurotoxicidade do desenvolvimento de pesticidas, bem como fornecer um método de rastreio rápido. Globalmente, os resultados demonstraram que os grânulos de cortiça podem ser utilizados para limpar cursos de

água contaminados com pesticidas como uma alternativa às dispendiosas abordagens de remoção de pesticidas atualmente empregues.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados que apoiam as conclusões deste estudo estão disponíveis abertamente no figshare em <http://doi.org/10.6084/m9.figshare.19217001>.

Referências

ABREU-VILLAÇA, Y.; LEVIN, E. D. Developmental neurotoxicity of succeeding generations of insecticides. **Environment international**, [s. l.], v. 99, p. 55–77, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27908457/>. Acesso em: 9 fev. 2022.

ÀNGELS OLIVELLA, M.; CAIXACH, J.; PLANAS, C.; OLIVERAS, A.; JOVÉ, P. Concentrations of organochlorine pesticides and 2,4,6-trichloroanisole in cork bark. **Chemosphere**, [s. l.], v. 86, n. 7, p. 754–758, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22133910/>. Acesso em: 9 fev. 2022.

ASSIS, C. R. D.; LINHARES, A. G.; OLIVEIRA, V. M.; FRANÇA, R. C. P.; CARVALHO, E. V. M. M.; BEZERRA, R. S.; DE CARVALHO, L. B. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **The Science of the total environment**, [s. l.], v. 441, p. 141–150, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23137979/>. Acesso em: 11 fev. 2022.

BÁCSKAY, I.; NEMES, D.; FENYVESI, F.; VÁRADI, J.; VASVÁRI, G.; FEHÉR, P.; VECSENYÉS, M.; UJHELYI, Z. Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical Development. *Em: CYTOTOXICITY*. [S. l.: s. n.], 2018.

CHRISTEN, V.; RUSCONI, M.; CRETIAZ, P.; FENT, K. Developmental neurotoxicity of different pesticides in PC-12 cells in vitro. **Toxicology and applied pharmacology**, [s. l.], v. 325, p. 25–36, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28385489/>. Acesso em: 12 fev. 2022.

DE AGUIAR, T. R.; GUIMARÃES NETO, J. O. A.; ŞEN, U.; PEREIRA, H. Study of two cork species as natural biosorbents for five selected pesticides in water. **Heliyon**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30775578/>. Acesso em: 9 fev. 2022.

DESCHÊNES-FURRY, J.; BÉLANGER, G.; PERRONE-BIZZOZERO, N.; JASMIN, B. J. Post-transcriptional regulation of acetylcholinesterase mRNAs in nerve growth factor-treated PC12 cells by the RNA-binding protein HuD. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 8, p. 5710–5717, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12468554/>. Acesso em: 12 fev. 2022.

DIAS, A. N.; SIMÃO, V.; MERIB, J.; CARASEK, E. Use of green coating (cork) in solid-phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in water by gas chromatography-electron capture detection. **Talanta**, [s. l.], v. 134, p.

409–414, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25618687/>. Acesso em: 4 fev. 2022.

DOMINGUES, V. F.; PRIOLO, G.; ALVES, A. C.; CABRAL, M. F.; DELERUE-MATOS, C. Adsorption behavior of alpha -cypermethrin on cork and activated carbon. **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 649–654, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17701700/>. Acesso em: 20 abr. 2022.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961. Disponível em: Acesso em: 4 fev. 2022.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s. l.], v. 2016, n. 4, p. 343–346, 2016.

FERNANDEZ-CORNEJO, J.; RICHARD NEHRING; CRAIG OSTEEN; SETH WECHSLER; ANDREW MARTIN; ALEX VIALOU. **Pesticide Use in U.S. Agriculture: 21 Selected Crops, 1960-2008, EIB-124, U.S.** [S. l.: s. n.], 2014. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=43855>. Acesso em: 9 fev. 2022.

GEORG, P. HISTORY OF ORGANOPHOSPHORUS CHOLINESTERASE INHIBITORS & REACTIVATORS. **Military Medical Science Letters**, [s. l.], v. 84, p. 182–185, 2015. Disponível em: Acesso em: 9 fev. 2022.

GLAROS, T.; DHUMMAKUPT, E. S.; RIZZO, G. M.; MCBRIDE, E.; CARMANY, D. O.; WRIGHT, L. K. M.; FORSTER, J. S.; RENNER, J. A.; MORETZ, R. W.; DORSEY, R.; MARTEN, M. R.; HUSO, W.; DOAN, A.; DORSEY, C. D.; PHILLIPS, C.; BENTON, B.; MACH, P. M. Discovery of treatment for nerve agents targeting a new metabolic pathway. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 94, n. 9, p. 3249–3264, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-020-02820-4>. Acesso em: 10 fev. 2022.

GRISARU, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ, H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **European journal of biochemistry**, [s. l.], v. 264, n. 3, p. 672–686, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10491113/>. Acesso em: 12 fev. 2022.

HARRY, J.; TILSON, H. A.; PADILLA, S.; LASSITER, T. L.; HUNTER, D. Biochemical Measurement of Cholinesterase Activity. *Em: NEURODEGENERATION METHODS AND PROTOCOLS*. [S. l.: s. n.], 2003. p. 237–246.

HINZ, J. S.; MORÉS, L.; CARASEK, E. Exploring the use of cork pellets in bar adsorptive microextraction for the determination of organochloride pesticides in water samples with gas chromatography/electron capture detection quantification. **Journal of chromatography. A**, [s. l.], v. 1645, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33848658/>. Acesso em: 9 fev. 2022.

LEQUIN, S.; CHASSAGNE, D.; KARBOWIAK, T.; GOUGEON, R.; BRACHAIS, L.; BELLAT, J. P. Adsorption equilibria of water vapor on cork. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 3438–3445, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20192215/>. Acesso em: 20 abr. 2022.

LUCAS, C. A.; KREUTZBERG, G. W. Regulation of acetylcholinesterase secretion from neuronal cell cultures.--1. Actions of nerve growth factor, cytoskeletal inhibitors and tunicamycin. **Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 349–351, 1985. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2858069/>. Acesso em: 12 fev. 2022.

MARZI KHOSROWSHAHI, E.; FARAJZADEH, M. A.; TUZEN, M.; AFSHAR MOGADDAM, M. R.; NEMATI, M. Application of magnetic carbon nano-onions in dispersive solid-phase extraction combined with DLLME for extraction of pesticide residues from water and vegetable samples. **Analytical methods : advancing methods and applications**, [s. l.], v. 13, n. 32, p. 3592–3604, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34308461/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

MAXWELL, D. M.; BRECHT, K. M.; KOPLOVITZ, I.; SWEENEY, R. E. Acetylcholinesterase inhibition: does it explain the toxicity of organophosphorus compounds?. **Archives of toxicology**, [s. l.], v. 80, n. 11, p. 756–760, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16770629/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

MOJIRI, A.; KAZEROON, R. A.; GHOLAMI, A. Cross-Linked Magnetic Chitosan/Activated Biochar for Removal of Emerging Micropollutants from Water: Optimization by the Artificial Neural Network. **Water** **2019**, Vol. **11**, Page **551**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 551, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4441/11/3/551/htm>. Acesso em: 9 fev. 2022.

MOJIRI, A.; ZHOU, J. L.; ROBINSON, B.; OHASHI, A.; OZAKI, N.; KINDAICHI, T.; FARRAJI, H.; VAKILI, M. Pesticides in aquatic environments and their removal by adsorption methods. **Chemosphere**, [s. l.], v. 253, p. 126646, 2020. Disponível em: Acesso em: 9 fev. 2022.

PAN, S.; HUANG, Z.; SHANG, C.; WANG, L.; QIU, Q.; XU, Z.; ZHANG, D. Design and synthesis of amphiphilic carboxyl-functionalized magnetic polymer microspheres for fast determination of paraquat and its four metabolites in human urine samples prior to ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, [s. l.], v. 1670, p. 462998, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35366498/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

PEREIRA, Helena. Cork : biology, production and uses. [s. l.], p. 336, 2007. Disponível em: Acesso em: 10 fev. 2022.

PINTOR, A. M. A.; FERREIRA, C. I. A.; PEREIRA, J. C.; CORREIA, P.; SILVA, S. P.; VILAR, V. J. P.; BOTELHO, C. M. S.; BOAVENTURA, R. A. R. Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: a review. **Water research**, [s. l.], v. 46, n. 10, p. 3152–3166, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22534120/>. Acesso em: 9 fev. 2022.

SCHWARTZ, P. J.; BLUNDON, J. A.; ADLER, E. M. A biochemical assay for acetylcholinesterase activity in PC12 cells. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, [s. l.], v. 2007, n. 394, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17632879/>. Acesso em: 4 fev. 2022.

CAPÍTULO II - O IMPACTO DO PESTICIDA PIROFOSFATO DE TETRAETILA (TEPP) NO DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTO DO *Danio rerio*: AVALIANDO O POTENCIAL DOS GRÂNULOS DE CORTIÇA COMO ADSORVENTE NATURAL PARA REMOÇÃO DE TEPP DE AMBIENTES AQUOSOS³

Fernanda Blini Marengo Malheirosa, Angélica Gois Morales^b, Eduardo Festozo Vicentec, Paulo C Melettid e Carlos Alberto-Silvae*

a Curso de Pós-Graduação em Agronegócio e Desenvolvimento, Grupo de Pesquisa em Gestão e Educação Ambiental (PGEA), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Tupã, 17602-496, SP, Brasil.

b Grupo de Pesquisa em Gestão e Educação Ambiental (PGEA), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Gestão, Desenvolvimento e Tecnologia, Tupã, 17602-496, SP, Brasil.

c Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Engenharia, Tupã, 17602-496, SP, Brasil.

d Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86057-970, Londrina, PR, Brasil.

e Centro de Ciências Naturais e Humanas, Laboratório de Morfofisiologia Experimental Universidade Federal do ABC (UFABC), São Bernardo do Campo, 09606-070, SP, Brasil.

³Artigo científico submetido para o periódico: Journal of Environmental Science and Health, Part B. O Impacto do pesticida pirofosfato de tetraetila (TEPP) no desenvolvimento e comportamento do *Danio rerio*: Avaliando o potencial dos grânulos de cortiça como adsorvente natural para remoção de TEPP de ambientes aquosos. ID Submissão: 233280289. Aguardando avaliação.

RESUMO

Estudos toxicológicos de pesticidas em modelos animais podem melhorar a nossa compreensão dos seus mecanismos de ação em sistemas biológicos. Estratégias potenciais para removê-los de soluções aquosas poderiam ser usadas para tratar ambientes contaminados com pesticidas. No presente estudo, foram avaliados os efeitos toxicológicos induzidos pelo tetraetil pirofosfato (TEPP), um pesticida organofosforado descrito como inibidor da acetilcolinesterase (AChE), no desenvolvimento e comportamento do peixe-zebra (*Danio rerio*) e na possível descontaminação da água com grânulos da rolha de vinho como absorvente natural. A exposição ao TEPP diminuiu a taxa de viabilidade dos embriões, seguindo uma típica curva dose-resposta em forma de U invertido, sem alterar a velocidade de desenvolvimento ou a morfologia dos embriões viáveis. O TEPP também aumentou a preferência, passou mais tempo no ambiente escuro e a resistência à natação dos peixes-zebra juvenis, em contraste com o grupo de controle. Notavelmente, a água obtida a partir de grânulos de cortiça de vinho utilizados em abordagens de adsorção contém produtos químicos tóxicos que aumentam as taxas de mortalidade, atrasam o desenvolvimento embrionário e alteram o comportamento dos peixes-zebra juvenis, em contraste com as experiências *in vitro* relatadas na literatura. No geral, estas descobertas sugerem que o modelo de zebrafish em diferentes estágios de desenvolvimento foi capaz de detectar efeitos toxicológicos induzidos por TEPP em concentrações nanomolares, o que é mais sensato do que os experimentos *in vitro*.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Adsorção. Ensaio ZET. Organofosforados. Zebrafish.

1. Introdução

Organofosforados (OPs) são uma classe de compostos químicos que possuem propriedades estruturais comparáveis e têm sido amplamente utilizados como inseticidas comerciais (Georg, 2015). Os OPs inibem a acetilcolinesterase (AChE), uma enzima que catalisa a conversão de acetilcolina (ACh) em acetato e colina nas lacunas sinápticas (Abreu-Villaça; Levin, 2017), o que explica por que a estimulação excessiva do sistema nervoso central leva à insuficiência respiratória e à morte (Maxwell *et al.*, 2006).

O pirofosfato de tetraetila (TEPP) é um pesticida organofosforado usado na agricultura, alimentos e bebidas que são responsáveis por altas taxas de envenenamento acidental (Eddleston *et al.*, 2008). Relatórios sugerem que a toxicidade aguda do TEPP em humanos pode induzir efeitos sistêmicos, como náusea, fraqueza, tontura, perda de visão, aperto no peito, cólicas e vômitos (Faust, 1949). Os pesticidas colocam em risco o meio ambiente porque os derramamentos podem poluir o solo, a água, o ar e os organismos (Àngels Olivella *et al.*, 2012). Alguns

dos procedimentos químicos, físicos e biológicos usados para remover pesticidas de soluções aquosas incluem adsorção, oxidação avançada, filtração por membrana, fitorremediação, biorremediação e abordagem de tanque de aeração (Mojiri *et al.*, 2019).

Adsorventes naturais podem ser usados para remover pesticidas de soluções aquosas (Mojiri *et al.*, 2020). A cortiça, um produto natural, renovável e biodegradável, tem sido sugerida como um adsorvente sustentável para uma variedade de derrames de hidrocarbonetos, óleos, solventes e compostos orgânicos (De Aguiar *et al.*, 2019; Pintor *et al.*, 2012). A presença de lignina e suberina proporcionam hidrofobicidade, e a celulose e hemicelulose de alta polaridade, contribuem para o potencial de adsorção natural (Hinz *et al.*, 2021). A aplicação de derivados de cortiça é particularmente significativa do ponto de vista ambiental, uma vez que uma componente renovável é utilizada em produtos de longa duração, aumentando a fixação de CO₂ (Carriço *et al.*, 2023). A cortiça tem sido, portanto, utilizada como uma alternativa verde devido à sua estrutura porosa, além de ser uma matéria-prima natural com custo barato, fácil acesso, baixa densidade e características de biodegradabilidade (Carriço *et al.*, 2023; Mafra *et al.*, 2018; Pereira, 2007).

A eficácia das rolhas de *Quercus cerris* e *Quercus suber* na remoção de pesticidas da água também foi investigada (De Aguiar *et al.*, 2019), utilizando métodos bioquímicos para determinação de resíduos de pesticidas diluídos em amostras de água ou estudando a eficiência da remoção de pesticidas usando compostos adsorventes naturais (De Aguiar *et al.*, 2019; Hinz *et al.*, 2021; Marzi Khosrowshahi *et al.*, 2021; Pan *et al.*, 2022). Depois de investigar os efeitos do TEPP na atividade da AChE em enzimas comerciais da enguia elétrica (*Electrophorus electricus*) e liberadas por células neuronais PC12 em cultura (Blini Marengo Malheiros *et al.*, 2022), nosso grupo também explorou a eficácia da remoção do TEPP da água usando rolhas de vinho para criar grânulos de cortiça como um adsorvente natural (Blini Marengo Malheiros *et al.*, 2022). Os grânulos de cortiça foram significativos como adsorventes naturais para TEPP em ambientes aquáticos, com eficiências de remoção consideráveis ($95 \pm 5\%$ de TEPP diluído em água) (Blini Marengo Malheiros *et al.*, 2022). A solução TEPP após o procedimento adsorvente diminuiu os seus efeitos inibitórios na atividade da AChE em ensaios *in vitro* (Blini Marengo Malheiros *et al.*, 2022), sugerindo que os grânulos de cortiça podem ser utilizados para limpar cursos

de água contaminados com pesticidas. Pela primeira vez, relatou-se aqui os efeitos toxicológicos *in vivo* do TEPP no desenvolvimento, comportamento e morfologia de embriões e peixes-zebra juvenis (*Danio rerio*), bem como uma possível descontaminação da água utilizando grânulos de cortiça como absorvente natural em um modelo de estudo *in vivo*.

2. Materiais e métodos

2.1 Produtos químicos e soluções

O TEPP (Pestanal®; > 99,9% de pureza) foi obtido da Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EUA). Este pesticida foi escolhido porque é comumente usado na agricultura e em produtos de limpeza, cosméticos, proteção ambiental, alimentos e bebidas e cuidados pessoais em todo o mundo. Outros produtos químicos utilizados no presente estudo foram de grau de reagente analítico (pureza superior a 95%) e adquiridos da Calbiochem-Novabiochem Corporation (San Diego, CA, EUA), Gibco BRL (Gibco-BRL, Waltham, MA, EUA) ou Sigma -Aldrich Corporation (St. Louis, MO, EUA).

2.2 Solução de água reconstituída

A água reconstituída foi utilizada apenas em testes com embriões, e a base para sua formulação é a água ultrapura, à qual são adicionados sais. Para juvenis/adultos utilizamos água da torneira. Essa água passa por um filtro de carvão ativado e, na manutenção das matrizes e adultos destinados aos testes comportamentais, é recirculada, filtrada e tem os parâmetros mencionados monitorados. Os parâmetros da água foram medidos diariamente antes e depois dos experimentos, incluindo temperatura (28 °C), condutividade (56 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), oxigênio dissolvido (5,6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Hanna Instruments, Barueri, SP, Brasil) e pH (6,8) (Akso, São Leopoldo, RS, Brasil). A densidade de peixes em aquários não ultrapassou 1,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de água (Oikari, 2006).

2.3 Coleta e manutenção de zebrafish

Zebrfish adulto de tipo selvagem (*D. rerio*) ($n = 100$) de fornecedor comercial (Angelfish, Londrina-PR, Brasil) foram fornecidos ao Bioensaio do Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) do Departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (PR, Brasil). Na densidade máxima de 50 animais por saco, os peixes foram transportados em sacos plásticos transportando 15 L de água dos tanques da piscicultura. Os sacos plásticos continham 2/3 da quantidade de água e 1/3 do volume de ar para permitir as trocas gasosas durante o transporte. Durante pelo menos sete dias, os peixes foram aclimatados em tanques de 80 L com água sem cloro, filtro biológico, aeração constante e temperatura de 28° C mantida por fotoperíodo de 14h - 10h (claro-escuro). A renovação da água foi realizada a uma taxa de 70% a cada 72 horas, garantindo que os níveis de amônia ($0,01 \pm 0,01$ ppm) (teste colorimétrico Labcon-Alcon, Camboriú, SC, Brasil) fossem consistentes com a segurança dos animais. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (Alcon Basic® MEP 200 Complex), destinada ao desenvolvimento de peixes ornamentais. A alimentação dos adultos foi interrompida 24 horas antes dos estudos e mais uma vez durante os testes agudos. Após a desova em bandejas adequadas (Lawrence, 2007), os ovos fertilizados viáveis foram colhidos em placas de Petri contendo solução teste, selecionados e expostos em placas de 24 poços. Os embriões foram preservados individualmente em 2 mL de solução teste sob o ciclo claro/escuro (Oecd, 2013). O Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL; PR, Brasil) revisou e aprovou este trabalho sob protocolo número 041.2022.

2.4 Preparo dos grânulos de cortiça

As amostras de cortiça como adsorventes naturais foram adquiridas da mesma marca de rolhas para vinho (São Paulo, Brasil). As amostras de cortiça foram cortadas em geometria de barra com 1,0 cm de comprimento e aproximadamente 3,0 mm de diâmetro e depois trituradas até obter uma granulometria de 1,0 mm. As rolhas foram limpas da forma descrita a seguir (Dias *et al.*, 2015). Elas foram lavadas em água ultrapura e a água foi renovada até não haver mais coloração amarela na água. Para reduzir a influência da adsorção de partículas na análise, as amostras foram

filtradas (Whatman 0,45 m) antes da análise. Em seguida, os grânulos foram secos em estufa a 60 °C por 24 horas e armazenados em recipientes plásticos.

2.5 Experimentos de adsorção

Os estudos de adsorção foram conduzidos em um conjunto Erlenmeyer contendo diferentes quantidades de TEPP (0,02, 0,07 ou 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) com ou sem grânulos de cortiça a 5% numa solução aquosa reconstituída. Para evitar a fotodegradação do agrotóxico, os frascos foram cobertos com papel alumínio e mantidos em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por um total de 24 horas de contato, com agitação periódica para estabelecer o equilíbrio. Na mesma condição de tratamento mencionada acima, foram incluídos no nosso estudo grupos de controle com apenas solução de água reconstituída ou apenas grânulos de cortiça a 5% sem TEPP. Para os testes embrionários foram utilizadas amostras filtradas em filtro (PTFE/L 0,22 μm); para os juvenis as amostras não foram filtradas para replicar o ambiente.

2.6 Projeto experimental

Para ensaios de toxicidade embrionária em peixes (FET), os embriões foram escolhidos aleatoriamente e divididos em sete grupos (cada grupo contendo 20 embriões) e mantidos em placa de 24 poços (Nest Biotechnology, Rahway, EUA). Em cada poço, um embrião foi mantido em soluções teste (International Organization For Standardization, [s. d.]) em um volume final de 2 mL. Os grupos foram expostos a diferentes condições de tratamento: não tratado (controle negativo), tratado com 3,4-dicloroanilina (DCA; 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; controle positivo), Cortiça, TEPP (0,02, 0,07 ou 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ou Cortiça + TEPP (0,02, 0,07 ou 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Os embriões foram mantidos 24, 48, 72 e 96 horas pós-fertilização (hpf) a partir da fertilização a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ sob ciclos claro-escuro de 14-10 horas. Para os experimentos comportamentais, os peixes juvenis foram ($n = 9$ por tratamento) expostos a TEPP (0,02, 0,07 ou 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), Cortiça, Cortiça + TEPP (0,02, 0,07 ou 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ou sem tratamento em tanques de 2,5 L por 24 h. A alimentação foi interrompida 24 horas antes do início da exposição e não houve renovação do meio durante os tratamentos. Em seguida, os juvenis foram submetidos a testes comportamentais claro-escuro e de resistência à natação e, em

seguida, foram sacrificados por imersão em benzocaína ($0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e parâmetros biométricos analisados.

2.7 Ensaios de toxicidade embrionária de peixe (FET)

A avaliação do desenvolvimento larval foi realizada em momentos regulares (24, 48, 72 e 96 hpf) e os embriões foram classificados como normais, anormais ou mortos; eclodido/não eclodido; usando um microscópio óptico (Axiophot Zeiss Axiophot). Foram consideradas anormalidades embrião coagulado, ausência de batimentos cardíacos, falta de descolamento da cauda do saco vitelino e ausência de somitos. Parâmetros subletais analisados como desenvolvimento anormal da cabeça, eixo do corpo e saco vitelino, edemas e falta de pigmentação e fluxo sanguíneo (Oecd, 2013; Pinho *et al.*, 2013). Os dados foram expressos como a média $\pm$ SEM da porcentagem de viabilidade em relação ao controle.

2.8 Análises de parâmetros biométricos

Peso final do peixe, comprimento total (da extremidade anterior da cabeça até a final da nadadeira caudal), comprimento padrão (da extremidade anterior da cabeça até o início da inserção da nadadeira caudal) e taxa de sobrevivência (SURV) ([número final de peixes vivos/número inicial de peixes] $\times$ 100) foram todos medidos, conforme procedimento anterior (Oecd, 2013). Em seguida, os peixes mortos foram congelados e entregues ao sistema de descarte de animais da Universidade Estadual de Londrina (PR, Brasil). Os dados obtidos do peso final (g), comprimento total (cm) e comprimento padrão (cm) foram expressos como média $\pm$ EPM. A SURV foi representada como percentual do total.

2.9 Ensaio de preferência claro-escuro

Foram realizados os testes comportamentais claro-escuro, de acordo com a literatura (Cuenca *et al.*, 2022; Maximino *et al.*, 2010; Serra *et al.*, 1999). Resumidamente, o animal foi colocado em um compartimento central (5 cm de largura) dentro de um aquário retangular fixado com tinta preta ou branca ($49 \times 18 \times 9 \text{ cm}$). Após 5 min de aclimação no compartimento central, o peixe foi solto e filmado por

15 min pela câmera instalada acima do aquário, com os parâmetros tempo de permanência em cada ambiente e número de cruzamentos na linha média, bem como a primeira escolha de claro ou escuro, sendo avaliado. O GeoVision® Gv800 é um software de captura de imagens de alta resolução com resolução de 640 x 480 pixels. O tempo gasto em cada ambiente(s) e o número de cruzamentos na linha média foram representados como média $\pm$ SEM.

2.10 Teste de resistência à natação

O desempenho natatório dos peixes foi avaliado por meio de um instrumento adaptado contendo um sistema de tubo acrílico em forma de U (30 mm de diâmetro) conectado a uma bomba d'água, conforme literatura (Cuenca *et al.*, 2022; Vieira *et al.*, 2009). Esses experimentos foram realizados após a sequência de testes comportamentais claro-escuro. O peixe foi inserido através de uma abertura em forma de T para nadar contra a corrente de água gerada dentro do sistema. A vazão foi ajustada por uma válvula de água calibrada para uma vazão inicial de 2 L·min⁻¹ (16,5 cm·s⁻¹) para aclimação dos peixes. A cada minuto, a vazão foi aumentada em um litro por minuto até atingir a vazão máxima de 12 L·min⁻¹ ou até que os peixes se esgotassem e fossem expulsos do tubo para uma caixa plástica anexa, na qual os peixes pudessem ser resgatados. O índice de resistência à natação (SEI) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$SEI = \sum \text{resisted flow rates} + \left[\frac{\text{seconds resisted on last flow rate}}{60} \right] \times \text{last flow rate}$$

3 Análise estatística

Todos os dados são sempre apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Os parâmetros de múltiplos grupos foram analisados usando uma análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Tukey. Sempre que os dados não atendiam à normalidade, empregamos ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida pela análise post hoc de Dunn. As comparações entre dois grupos dependentes (teste claro-escuro) foram feitas pelo teste de McNemar. A significância estatística foi definida como valor de $p < 0,05$. O

GraphPad Prism 6.0 foi utilizado para conduzir a análise (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

4 Resultados

4.1 Grânulos de cortiça e adsorção TEPP

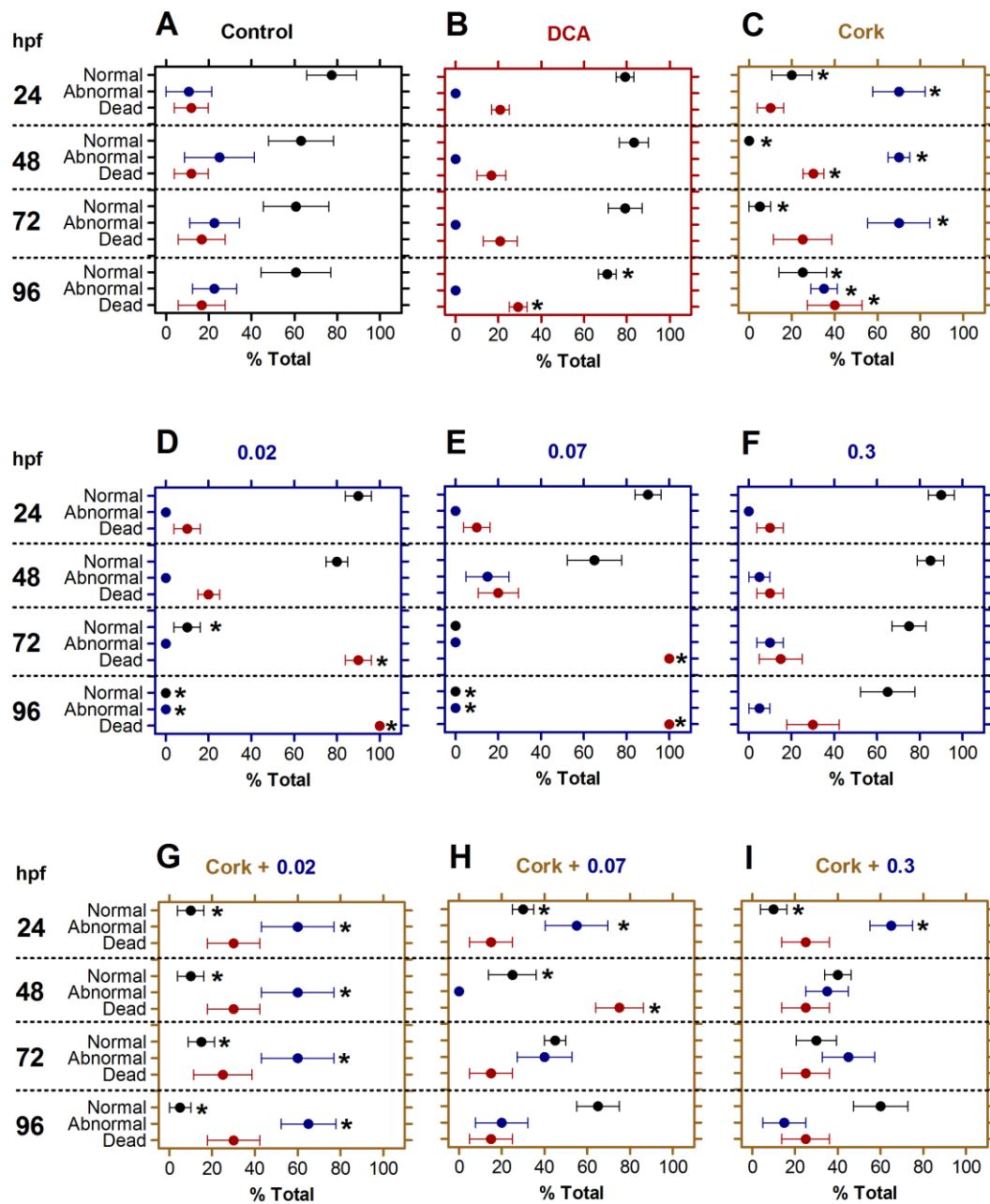
O grânulo de cortiça utilizado como adsorvente natural foi obtido após corte, trituração, lavagem, filtração e secagem de amostras de cortiça. Seguindo a abordagem de adsorção, tivemos os diferentes grupos experimentais: Controle, TEPP 0,02, TEPP 0,07, TEPP 0,3, Cortiça, Cortiça + TEPP 0,02, Cortiça + TEPP 0,07, Cortiça + TEPP 0,3.

4.2 Toxicidade do TEPP e Cortiça + TEPP na viabilidade de embriões

A fim de avaliar o impacto do TEPP durante o desenvolvimento do zebrafish, foi conduzido um estudo em que ovos fertilizados foram submetidos à exposição contínua a concentrações variadas de TEPP. Posteriormente, a sobrevivência dos embriões resultantes foi avaliada e quantificada, conforme visto na Figura 1. O TEPP reduziu significativamente a viabilidade dos embriões de 72 hpf a 0,02 e 0,07 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em comparação ao controle (comparar Figuras 1A, 1D, e 1E), mas curiosamente nenhuma alteração foi encontrada na dose de 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (comparar Figuras 1A e 1F). A aplicação do DCA resultou na diminuição da viabilidade dos embriões aos 96 hpf, com taxa de mortalidade de $26,05 \pm 0,72\%$, conforme descrito na literatura (Abe *et al.*, 2021). A água de cortiça derivada de grânulos de cortiça, que foi utilizada nos testes de absorção utilizando TEPP, apresentou elevadas taxas de anormalidade entre 24 e 96 hpf (comparar Figuras 1A e 1C). Cortiça + TEPP nas três concentrações testadas também aumentaram as taxas de anormalidade (comparar Figuras 1A, 1G, 1H e 1I).

Figura 1. Toxicidade do TEPP e cortiça + TEPP na viabilidade dos embriões. Os embriões não tratados (A) ou tratados com DCA (B), solução de cortiça (C), TEPP [0,02 (D), 0,07 (E) ou 0,3 (F) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$], ou Cortiça + TEPP [0,02 (G), 0,07 (H) ou 0,3 (I) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]. As taxas de viabilidade dos embriões foram classificadas como normais,

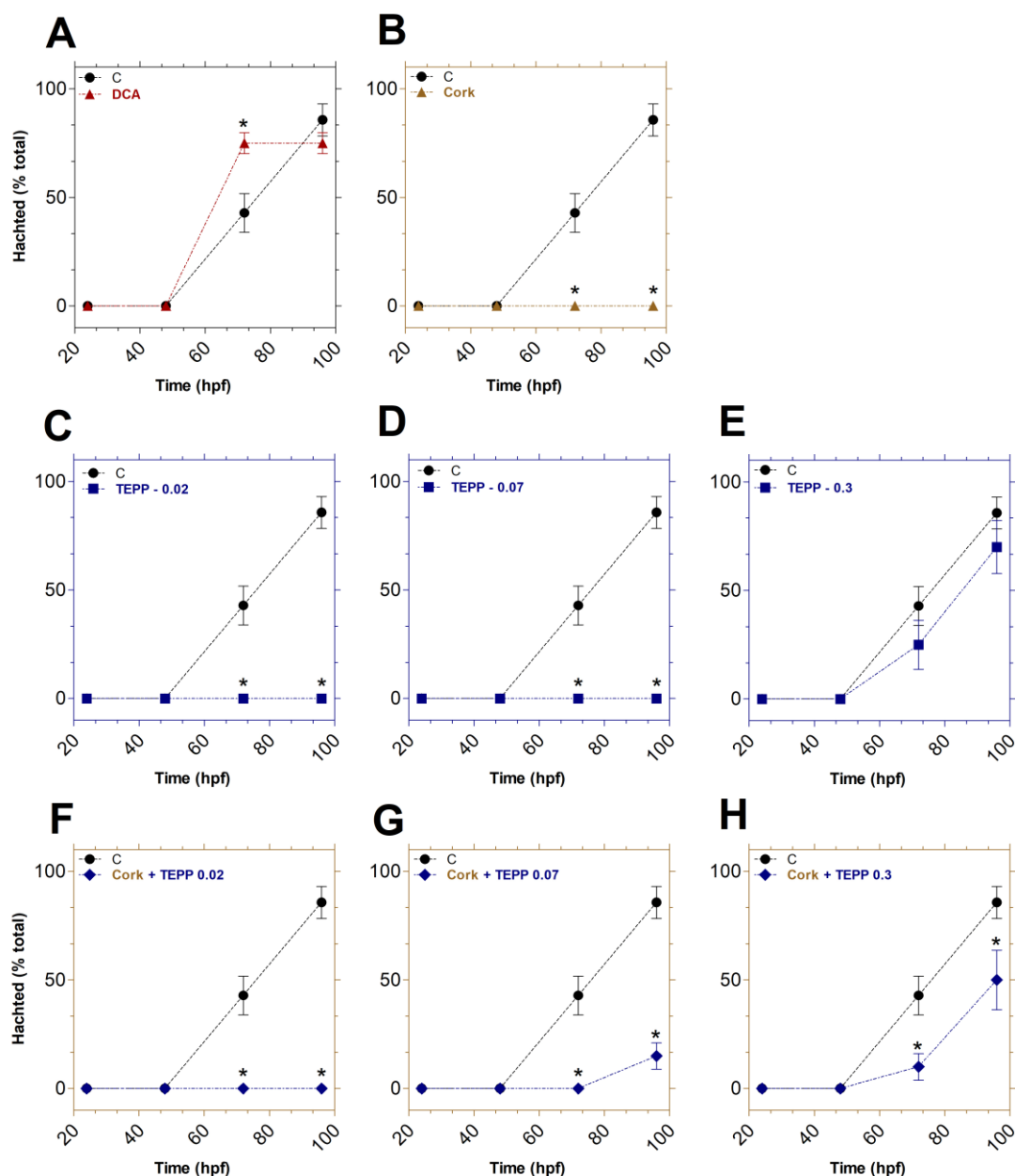
anormais ou mortas após 24, 48, 72 e 96 hpf de tratamento. Os valores foram expressos como média $\pm$ SEM (% total) e analisados por ANOVA unidirecional seguido de post hoc de Tukey. Diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo (não tratado) são indicadas por * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo. hpf: horas pós-fecundação; DCA: 3,4-dicloroanilina ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; controle positivo); TEPP: pirofosfato de tetraetila.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

Além disso, as taxas de eclosão foram verificadas quando os embriões foram expostos ao TEPP, cortiça ou cortiça + TEPP até 96 hpf de tratamento e comparou-os com um controle negativo (Figura 2). A exposição ao TEPP nas concentrações de 0,02 e 0,07 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ inibiu o pico de eclosão após 72 hpf em comparação ao controle (Figura 2C e 2D). Porém, na dose de 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 2E), a taxa de eclosão foi idêntica à do grupo controle. A exposição à solução de cortiça também resultou numa redução da taxa de eclosão para 96 hpf (Figura 2B). Por outro lado, pode observar-se que a combinação da cortiça e do TEPP parecem ter acentuado a toxicidade induzida pela cortiça de uma forma dependente da concentração, conforme representado nas Figuras 2F, G e H. O DCA (controle positivo) antecipou a ocorrência de eclosão do embrião a 72 hpf em comparação com o grupo não tratado (Figura 2A).

Figura 2. O impacto do TEPP e da cortiça + TEPP nas taxas de eclosão de embriões de zebrafish. Os embriões foram tratados com DCA (A), água de cortiça (B), TEPP [0,02 (C), 0,07 (D), ou 0,3 (E) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$], Cortiça + TEPP [0,02 (F), 0,07 (G), ou 0,3 (H) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]. Os valores foram expressos como média $\pm$ SEM (% total) e analisados por ANOVA unidirecional seguido de post hoc de Tukey. Diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo (não tratado) são indicadas por * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo. hpf: horas pós-fecundação; DCA: 3,4-dicloroanilina (2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; controle positivo); TEPP: pirofosfato de tetraetila.



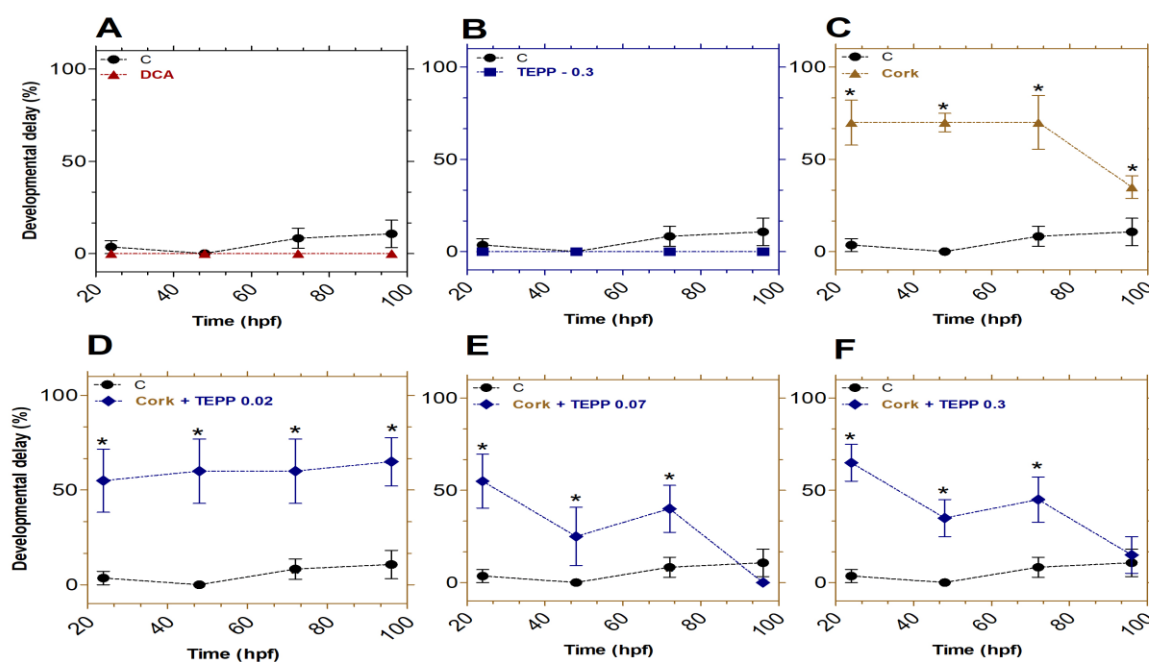
Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

4.3 Efeitos do TEPP e cortiça + TEPP nas anomalias do desenvolvimento

Os parâmetros de anormalidade no desenvolvimento do zebrafish foram avaliados (Oecd, 2013) nos expostos aos grupos TEPP a $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ou TEPP + cortiça em diversas concentrações, e essas análises foram realizadas em 24, 48, 72 e 96 hpf. Não descolamento da cauda, falta de formação de somitos ou batimentos cardíacos, edemas pericárdicos ou do saco vitelino, alterações cranianas/mandibulares/maxilares, ausência de olhos, curvatura espinhal (escoliose)

ou inflação da bexiga natatória foram detectados em todos os grupos estudados (dados não mostrados). Além disso, o impacto do TEPP em várias concentrações, DCA, Cortiça ou Cortiça + TEPP na taxa de desenvolvimento foi examinado aos 24, 48, 72 e 96 hpf de tratamento. Os resultados indicaram que nem o DCA nem o TEPP a $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ tiveram qualquer efeito significativo na velocidade de desenvolvimento (Figuras 3A e B). No entanto, importa referir que a utilização da solução de Cortiça e Cortiça + TEPP numa concentração de $0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ resultou num atraso significativo no crescimento das larvas do zebrafish (Figura 3C e D, respectivamente). Cortiça e TEPP, nas concentrações de $0,07$ e $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, apresentaram atraso no desenvolvimento até 72 hpf, mas foram comparáveis aos do grupo controle em 96 hpf (Figuras 3E e 3F, respectivamente).

Figura 3. Efeitos TEPP e cortiça + TEPP no desenvolvimento do zebrafish. Os embriões foram tratados com DCA (A), TEPP a $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (B), solução de cortiça (C) ou Cortiça + TEPP [$0,02$ (D), $0,07$ (E) ou $0,3$ (F) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]. Os valores foram expressos como média $\pm$ SEM (% total) e analisados por ANOVA unidirecional seguido de post hoc de Tukey. Diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo (não tratado) são indicadas por * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo. hpf: horas pós-fecundação; DCA: 3,4-dicloroanilina ($2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; controle positivo); TEPP: pirofosfato de tetraetila.

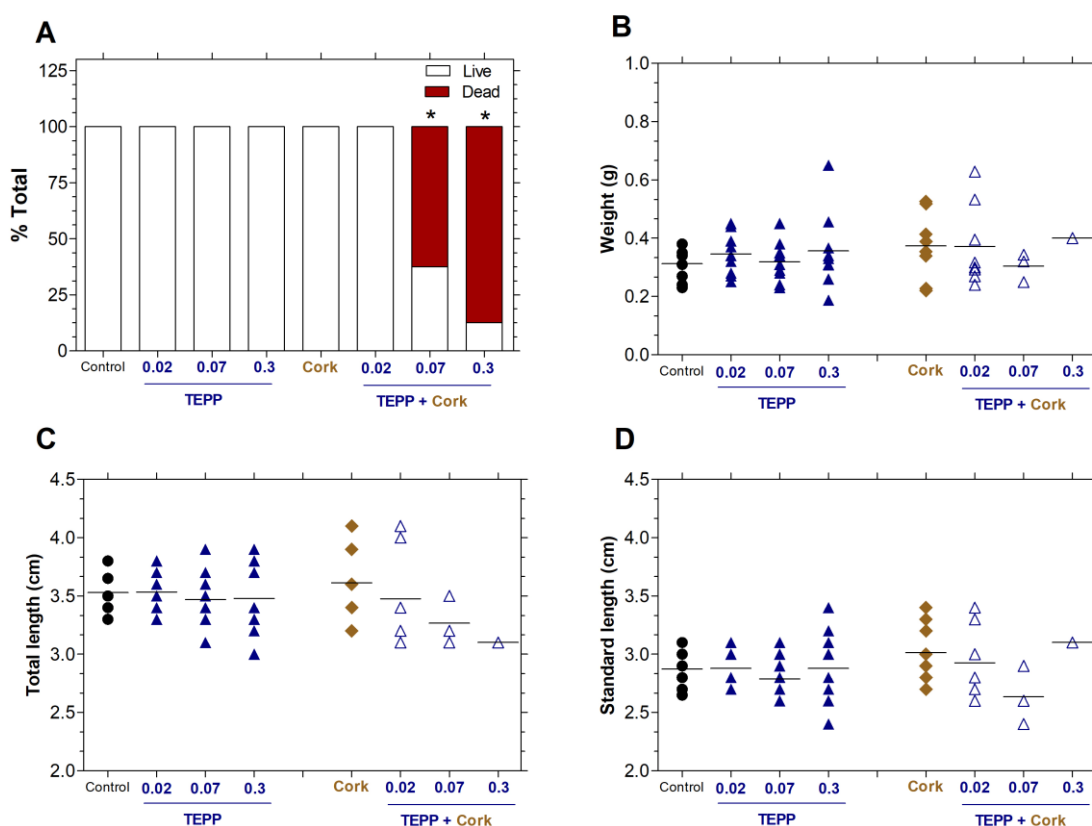


Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

4.4 Toxicidade do TEPP e cortiça + TEPP na viabilidade de juvenis de peixe-zebra

Em todas as concentrações testadas, a aplicação de TEPP e solução de cortiça não proporcionou alterações estatisticamente significativas nas taxas de sobrevivência em comparação ao grupo controle (Figura 4A). No entanto, as taxas de sobrevivência diminuíram de forma dependente da concentração quando a cortiça foi combinada com TEPP, como pode ser visto na Figura 4A. As taxas de sobrevivência dos juvenis diminuíram 62,5% e 87,5% quando expostos a concentrações de TEPP + cortiça de 0,07 e 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, em comparação com os grupos de controle ou cortiça. Os parâmetros biométricos do zebrafish vivo foram avaliados apenas nos grupos TEPP e cortiça, e posteriormente comparados com o grupo controle. Não houve alterações significativas observadas no peso (Figura 4B), comprimento total (Figura 4C) e comprimento padrão (Figura 4D) do zebrafish após a administração do tratamento TEPP e cortiça.

Figura 4. Exposição TEPP e cortiça + TEPP em juvenis de zebrafish. (A) Taxa de sobrevivência do zebrafish após 24h de diferentes exposições com TEPP (0,02, 0,07 ou 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), cortiça e cortiça + TEPP (0,02, 0,07 ou 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, expressa como uma percentagem de o total. Os peixes vivos foram sacrificados e (B) pesados, (C) comprimento total e (D) comprimento padrão foram medidos e expressos como média $\pm$ SEM (n = 9-10 por grupo). ANOVA unidirecional foi empregado para avaliação estatística, seguido de post hoc de Tukey. Diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo (não tratado) são indicadas por * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo. TEPP: Pirofosfato de tetraetila.



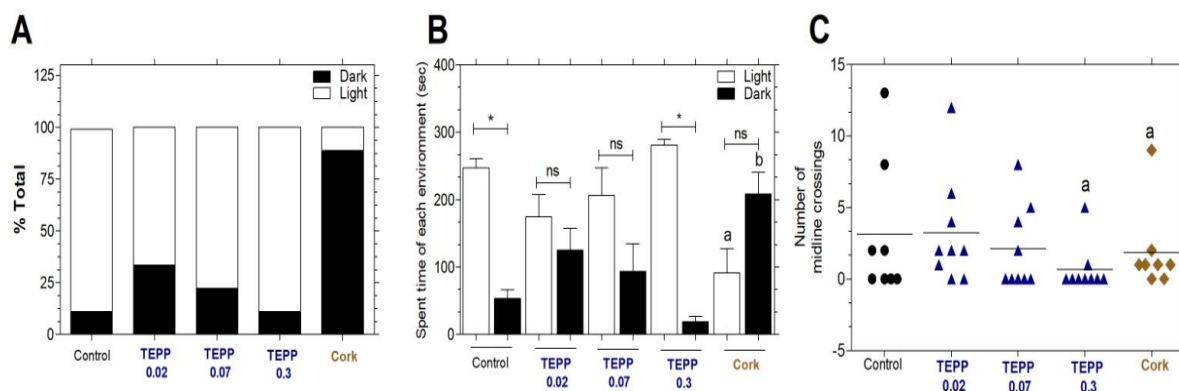
Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

4.5 Efeitos do TEPP e da cortiça no comportamento dos peixes (preferência por ambiente claro-escuro)

O TEPP aumentou a preferência e passou mais tempo no ambiente escuro em uma maneira dose dependente da concentração (Figuras 5A e B). TEPP a 0,02 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ mostrou 33% do zebrafish no ambiente escuro em contraste com o grupo controle que mostrou preferência pelo ambiente claro e 11% do zebrafish no ambiente escuro (Figuras 5A e B). Curiosamente, o zebrafish tratado com solução de cortiça preferiu significativamente e passou mais tempo no ambiente escuro (Figuras 5A e B). Além disso, apenas o TEPP a 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e a solução de cortiça reduziram significativamente o número de cruzamentos da linha média (Figura 5C).

Figura 5. Efeitos do TEPP e da cortiça no teste claro-escuro. (A) Primeira escolha de claro ou escuro. (B) Tempo gasto em cada ambiente. (C) Número de cruzamentos na linha média. O gasto em cada ambiente foi expresso como média $\pm$ SEM (n = 9-10 por grupo) e analisado por ANOVA unidirecional, seguido de post hoc de Tukey. As

letras representam diferenças no tempo gasto em ambientes claros nos grupos tratados versus controles de ambiente claro (a) e em ambientes escuros nos grupos tratados versus controles de ambiente escuro (b). Os asteriscos indicam uma diferença significativa no tempo gasto entre os dois ambientes. ns: não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. TEPP: pirofosfato de tetraetila.



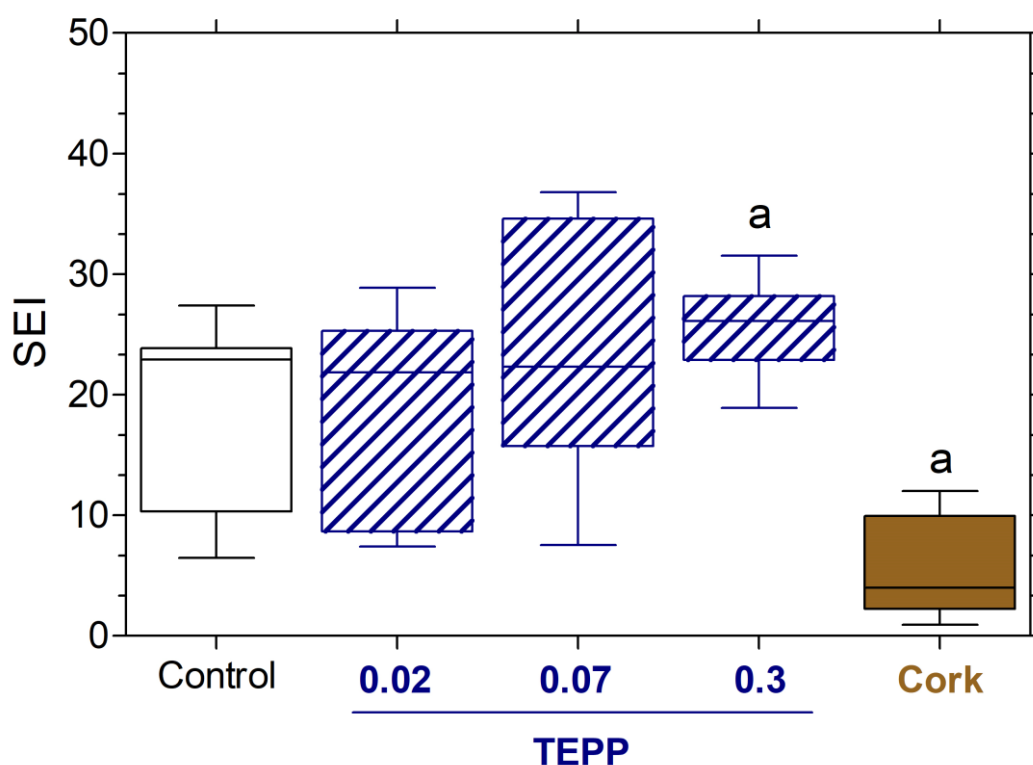
Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

4.6 Efeitos do TEPP e da cortiça no comportamento dos peixes (teste de resistência natatória)

A aplicação de TEPP na concentração de $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ resultou em aumento considerável no SEI quando comparado ao grupo controle. Este aumento no SEI foi observado de forma dependente da concentração, conforme mostrado na Figura 6. Em contrapartida, a utilização de uma solução de cortiça resultou numa notável redução na resistência à natação, com um valor médio de $5,5 \pm 1,5$, ao contrário do grupo controle que exibiu uma resistência substancialmente maior de $18,8 \pm 2,5$ (Figura 6).

Figura 6. Efeitos do TEPP e da cortiça no índice de resistência à natação (SEI).

Os juvenis *Danio rerio* ($n = 9-10$ por grupo) foram submetidos a um teste de resistência após 24 horas de exposição ao TEPP ($0,02$, $0,07$ ou $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e cortiça. Os valores foram apresentados como gráficos box-and-whisker e analisados por ANOVA unidirecional, seguido de post hoc de Mann-Whitney. a: $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (não tratado). TEPP: pirofosfato de tetraetila.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

5 Discussão

O zebrafish (*Danio rerio*) é amplamente reconhecido como um modelo extremamente eficaz para investigar muitas substâncias e ambientes que podem causar toxicidade (Ivantsova *et al.*, 2023; Toni *et al.*, 2023). Isto se deve à sua importância ecológica, uma vez que os poluentes tendem a fluir e acumular-se nos cursos de água e bacias, afetando assim as suas propriedades químicas e físicas (Toni *et al.*, 2023). O uso de zebrafish em estudos de toxicidade de pesticidas para capturar dados sobre os tipos de pesticidas usados, classes de pesticidas e estágios de vida do peixe associados a parâmetros de toxicidade e observações fenotípicas tem sido amplamente relatado na literatura (Gonçalves *et al.*, 2020). Neste trabalho, descobriu-se que o TEPP, um inseticida organofosforado extremamente tóxico utilizado na agricultura e no domicílio (Cassereau *et al.*, 2017; Eddleston *et al.*, 2008; Faust, 1949), diminuiu a taxa de viabilidade de embriões após 72 hpf de exposição de maneira dependente da concentração. No entanto, não afetou a velocidade de desenvolvimento ou a morfologia dos embriões viáveis. O TEPP também alterou as

características comportamentais dos peixes juvenis, incluindo a sua preferência por ambientes claros ou escuros e a resistência à natação. Adicionalmente, investigou-se também as propriedades dos grânulos de cortiça como absorvente natural para a remoção de TEPP diluído em água de zebrafish e avaliamos os efeitos toxicológicos induzidos por TEPP no desenvolvimento e comportamento de embriões e peixes juvenis. Surpreendentemente, a água derivada dos grânulos de cortiça utilizados nos procedimentos de adsorção apresentou viabilidade reduzida, atrasou o desenvolvimento dos embriões e alterações significativas nos parâmetros comportamentais dos juvenis.

TEPP em concentração $\leq 0,07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ após 72 hpf para exposição aumentou a taxa de mortalidade de embriões, mas curiosamente nenhuma alteração foi encontrada na dose de $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Da mesma forma, os zebrafish juvenis expostos ao TEPP em concentrações mais baixas aumentaram a preferência e passaram mais tempo no ambiente escuro em contraste com o grupo de controle. TEPP a $0,02$, $0,07$ e $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ gastou $125,0 \pm 32,3$, $93,5 \pm 40,9$ e $18,6 \pm 8,2$ segundos no ambiente escuro, em contraste com o controle, que mostrou $53,0 \pm 13,5$ segundos. Nossas descobertas sugerem que o TEPP exibiu um típico efeito dose-resposta em forma de U invertido, uma relação não linear que tem sido frequentemente relatada ao estudar as ações negativas ou positivas de tratamentos farmacológicos e não farmacológicos (Baldi; Bucherelli, 2005). O efeito dose-resposta em forma de U invertido também foi empregado para explicar os inibidores da colinesterase, como MF201, MF268 ou MF268, que melhoram o desempenho em doses baixas, mas são ineficazes em doses mais altas (Baldi; Bucherelli, 2005; Braida *et al.*, 1996, 1998; Grasing, 2016; Wanibuchi *et al.*, 1994). A toxicidade induzida por TEPP é explicada em parte pela estimulação excessiva do sistema nervoso central devido à inibição irreversível da atividade da AChE (Maxwell *et al.*, 2006). Dado que a inibição da AChE é amplamente aceita como o principal mecanismo de ação do TEPP, sugerimos que suas mudanças no desenvolvimento e comportamento do zebrafish seguem uma curva dose-resposta que aparece como uma forma de U invertido, semelhante a outros inibidores da colinesterase.

A toxicidade induzida por TEPP foi estudada *in vitro* utilizando a célula neuronal PC12 linha, e foi demonstrado que o TEPP reduziu a viabilidade celular em concentrações superiores a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ após 48 horas de tratamento (Blini Marengo Malheiros *et al.*, 2022). Além disso, estudos também relataram os efeitos inibitórios da

TEPP sobre a AChE comercial (Blini Marengo Malheiros *et al.*, 2022; Maxwell *et al.*, 2006) e a AChE cerebral em diferentes peixes tropicais apresentou IC50 (concentração capaz de inibir a enzima em 50% de sua atividade) superior a 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Assis *et al.*, 2012). Apesar disso, os efeitos toxicológicos do TEPP no desenvolvimento de embriões e no comportamento dos juvenis foram relatados em concentrações inferiores a 0,07 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, o que é pelo menos 25 vezes menor que os efeitos observados *in vitro*. Isto significa que o modelo de zebrafish utilizado para estudar os efeitos do TEPP *in vivo*, com larvas em diferentes estágios de desenvolvimento e juvenis, foi mais útil do que métodos *in vitro*. Na verdade, o modelo do zebrafish tem sido considerado uma importante plataforma biológica para avaliação de risco e uma estratégia sensata para testar a toxicidade das classes de pesticidas OP, piretróides, azóis e triazinas (Gonçalves *et al.*, 2020).

A eficácia dos grânulos de cortiça como adsorventes naturais na remoção de pesticidas da água foi examinado por abordagens bioquímicas e de cultura de células neuronais (Blini Marengo Malheiros *et al.*, 2022; De Aguiar *et al.*, 2019), no entanto, nenhum estudo de modelo *in vivo* foi relatado ainda. A cortiça é uma substância porosa composta por células prismáticas dispostas numa estrutura em favo de mel (Pereira, 2007). A água forma aglomerados em torno de locais hidrofílicos na superfície dos poros e se difunde na parede celular, levando ao inchaço do material (Lequin *et al.*, 2010). As interações físico-químicas e os principais locais de ligação entre as moléculas dos pesticidas e a cortiça determinam como os pesticidas são retidos e quão bem podem aderir à cortiça (Domingues *et al.*, 2007; Pintor *et al.*, 2012). Aqui, também tivemos a motivação de investigar a eficiência dos grânulos de cortiça na remoção de TEPP da água reconstituída para a manutenção no desenvolvimento de embriões e no comportamento dos juvenis do zebrafish. Infelizmente, a água derivada dos grânulos de cortiça após as experiências de adsorção induziu efeitos toxicológicos em embriões e juvenis de zebrafish. A utilização de água de cortiça levou a uma contagem elevada de larvas anormais e mortas de 24 para 96 hpf, a uma diminuição na taxa de eclosão e a um atraso no desenvolvimento das larvas. Nos peixes juvenis, a água da cortiça não alterou a viabilidade, o peso, o comprimento total ou o comprimento padrão do zebrafish; porém, estimulou a preferência e passou mais tempo no ambiente escuro, reduzindo o número de cruzamentos da linha média e a resistência natatória. Apesar disso, é importante realçar que a água de cortiça não alterou a viabilidade das células neuronais PC12 no estudo anterior (Blini Marengo

Malheiros *et al.*, 2022). Esses dados sugerem que o experimento do zebrafish, realizado em diferentes estágios de desenvolvimento, apresentou maior vulnerabilidade a substâncias tóxicas quando comparado aos estudos *in vitro*. É necessária investigação adicional para se ter uma compreensão abrangente dos impactos dos produtos químicos tóxicos incorporados na água de cortiça, que é gerada a partir de grânulos de cortiça obtidos a partir de rolhas de vinho disponíveis no mercado.

Os grânulos de cortiça adsorveram mais de 95% do TEPP diluído em água, diminuindo os efeitos inibitórios do TEPP na atividade da AChE em enzima comercial de enguia elétrica (*E. electricus*) e meio de cultura de células neuronais PC12 (Blini Marengo Malheiros *et al.*, 2022). Infelizmente, a presente investigação revelou que a utilização de grânulos de cortiça como substrato de adsorção para a remoção de TEPP diluído em água do zebrafish não teve sucesso porque foram observados efeitos toxicológicos em embriões e juvenis expostos à água de cortiça. Apesar disso, cortiça + TEPP em concentrações mais elevadas parecem aliviar os efeitos tóxicos induzidos pela cortiça, em particular as taxas de eclosão após 72 hpf e atraso no desenvolvimento a 96 hpf, de uma forma dependente da concentração. Por outro lado, cortiça + TEPP em concentrações mais elevadas aumentou significativamente as taxas de mortalidade de peixes juvenis. As diferenças subjacentes entre embriões e juvenis de zebrafish na sua resposta ao TEPP + cortiça permanecem obscuras e requerem investigação adicional.

Em conclusão, estas descobertas sugerem que o pesticida TEPP alterou o viabilidade dos embriões e o comportamento dos juvenis de forma dependente da concentração, assumindo uma típica curva dose-resposta em forma de U invertido. O TEPP também alterou a preferência por ambientes claros ou escuros e a resistência à natação dos juvenis sem alterar sua viabilidade ou parâmetros biométricos. Além disso, a utilização de grânulos de cortiça de vinho testados como adsorvente natural para TEPP em ambientes aquáticos não foi eficiente devido ao aumento das taxas de anormalidade e mortalidade, ao atraso no desenvolvimento das larvas ou à estimulação do stress comportamental em peixes-zebra juvenis. Além disso, a aplicação de grânulos de cortiça de vinho como adsorvente natural para TEPP em ambientes aquáticos revelou-se ineficaz devido a taxas elevadas de anormalidade e mortalidade, a um atraso no desenvolvimento das larvas ou à indução de stress

comportamental nos juvenis de zebrafish, em contraste com o que foi relatado em estudos *in vitro*.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao grupo técnico do Departamento de Ciências Fisiológicas (UEL) pelo auxílio nos procedimentos experimentais *in vivo*. Agradecemos também ao grupo técnico-administrativo do Centro de Ciências Naturais e Humanas (UFABC) pela assistência de secretariado.

Referências

- ABE, F. R.; ACCORONI, K. A. G.; GRAVATO, C.; DE OLIVEIRA, D. P. Early Life Stage Assays in Zebrafish. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 2240, p. 77–92, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33423228/>. Acesso em: 27 nov. 2023.
- ABREU-VILLAÇA, Y.; LEVIN, E. D. Developmental neurotoxicity of succeeding generations of insecticides. **Environment international**, [s. l.], v. 99, p. 55–77, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27908457/>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- ÀNGELS OLIVELLA, M.; CAIXACH, J.; PLANAS, C.; OLIVERAS, A.; JOVÉ, P. Concentrations of organochlorine pesticides and 2,4,6-trichloroanisole in cork bark. **Chemosphere**, [s. l.], v. 86, n. 7, p. 754–758, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22133910/>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- ASSIS, C. R. D.; LINHARES, A. G.; OLIVEIRA, V. M.; FRANÇA, R. C. P.; CARVALHO, E. V. M. M.; BEZERRA, R. S.; DE CARVALHO, L. B. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **The Science of the total environment**, [s. l.], v. 441, p. 141–150, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23137979/>. Acesso em: 11 fev. 2022.
- BALDI, E.; BUCHERELLI, C. The inverted “u-shaped” dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation. **Nonlinearity in biology, toxicology, medicine**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. nonlin.003.01.0, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19330154/>. Acesso em: 27 nov. 2023.
- BLINI MARENGO MALHEIROS, F.; VICENTE, E. F.; GOIS MORALES, A.; ALBERTO-SILVA, C. Efficiency of the removal of tetraethyl pyrophosphate (TEPP) pesticide in water: use of cork granules as a natural adsorbent on acetylcholinesterase activity in neuronal PC12 cell. **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, [s. l.], v. 57, n. 7, p. 554–560, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35583269/>. Acesso em: 8 set. 2023.

BRAIDA, D.; PALADINI, E.; GRIFFINI, P.; LAMPERTI, M.; COLIBRETTI, L.; SALA, M. Long-lasting antiamnesic effect of a novel anticholinesterase inhibitor (MF268). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 897–901, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9586846/>. Acesso em: 27 nov. 2023.

BRAIDA, D.; PALADINI, E.; GRIFFINI, P.; LAMPERTI, M.; MAGGI, A.; SALA, M. An inverted U-shaped curve for heptylphysostigmine on radial maze performance in rats: comparison with other cholinesterase inhibitors. **European journal of pharmacology**, [s. l.], v. 302, n. 1–3, p. 13–20, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8790986/>. Acesso em: 27 nov. 2023.

CARRIÇO, C. M.; TIRITAN, M. E.; CIDADE, H.; AFONSO, C.; SILVA, J. R. e.; ALMEIDA, I. F. Added-Value Compounds in Cork By-Products: Methods for Extraction, Identification, and Quantification of Compounds with Pharmaceutical and Cosmetic Interest. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 28, n. 8, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37110699/>. Acesso em: 19 jul. 2023.

CASSEREAU, J.; FERRÉ, M.; CHEVROLLIER, A.; CODRON, P.; VERNY, C.; HOMEDAN, C.; LENAERS, G.; PROCACCIO, V.; MAY-PANLOUP, P.; REYNIER, P. Neurotoxicity of Insecticides. **Current medicinal chemistry**, [s. l.], v. 24, n. 27, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28552054/>. Acesso em: 27 nov. 2023.

CUENCA, A. L. R.; SIMONATO, J. D.; MELETTI, P. C. Acute exposure of embryo, larvae and adults of *Danio rerio* to fipronil commercial formulation reveals effects on development and motor control. **Ecotoxicology (London, England)**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 114–123, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34748160/>. Acesso em: 17 jul. 2023.

DE AGUIAR, T. R.; GUIMARÃES NETO, J. O. A.; ŞEN, U.; PEREIRA, H. Study of two cork species as natural biosorbents for five selected pesticides in water. **Heliyon**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30775578/>. Acesso em: 9 fev. 2022.

DIAS, A. N.; SIMÃO, V.; MERIB, J.; CARASEK, E. Use of green coating (cork) in solid-phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in water by gas chromatography-electron capture detection. **Talanta**, [s. l.], v. 134, p. 409–414, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25618687/>. Acesso em: 4 fev. 2022.

DOMINGUES, V. F.; PRIOLO, G.; ALVES, A. C.; CABRAL, M. F.; DELERUE-MATOS, C. Adsorption behavior of alpha -cypermethrin on cork and activated carbon. **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 649–654, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17701700/>. Acesso em: 20 abr. 2022.

EDDLESTON, M.; BUCKLEY, N. A.; EYER, P.; DAWSON, A. H. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 371, n. 9612, p. 597–607, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17706760/>. Acesso em: 19 jul. 2023.

FAUST, J. Poisoning due to tetraethylpyrophosphate. **Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 141, n. 3, p. 192–193, 1949. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18139546/>. Acesso em: 27 nov. 2023.

GEORG, P. HISTORY OF ORGANOPHOSPHORUS CHOLINESTERASE INHIBITORS & REACTIVATORS. **Military Medical Science Letters**, [s. l.], v. 84, p. 182–185, 2015. Disponível em: Acesso em: 9 fev. 2022.

GONÇALVES, Í. F. S.; SOUZA, T. M.; VIEIRA, L. R.; MARCHI, F. C.; NASCIMENTO, A. P.; FARIAS, D. F. Toxicity testing of pesticides in zebrafish-a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. **Environmental science and pollution research international**, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 10185–10204, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32062774/>. Acesso em: 27 nov. 2023.

GRASING, K. A threshold model for opposing actions of acetylcholine on reward behavior: Molecular mechanisms and implications for treatment of substance abuse disorders. **Behavioural brain research**, [s. l.], v. 312, p. 148–162, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27316344/>. Acesso em: 27 nov. 2023.

HINZ, J. S.; MORÉS, L.; CARASEK, E. Exploring the use of cork pellets in bar adsorptive microextraction for the determination of organochloride pesticides in water samples with gas chromatography/electron capture detection quantification. **Journal of chromatography. A**, [s. l.], v. 1645, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33848658/>. Acesso em: 9 fev. 2022.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 15088:2007 - Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (Danio rerio)**. [S. l.: s. n.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/37368.html>. Acesso em: 17 jul. 2023.

IVANTSOVA, E.; KONIG, I.; SOUDERS, C. L.; MCNABNEY, D.; SIMMONS, D. D. B.; MARTYNIUK, C. J. Lipidomic, metabolomic, and behavior responses of zebrafish (Danio rerio) exposed to environmental levels of the beta blocker atenolol. **The Science of the total environment**, [s. l.], v. 866, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36587689/>. Acesso em: 27 nov. 2023.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review. **Aquaculture**, [s. l.], v. 269, n. 1–4, p. 1–20, 2007. Disponível em: Acesso em: 29 ago. 2023.

LEQUIN, S.; CHASSAGNE, D.; KARBOWIAK, T.; GOUGEON, R.; BRACHAIS, L.; BELLAT, J. P. Adsorption equilibria of water vapor on cork. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 3438–3445, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20192215/>. Acesso em: 20 abr. 2022.

MAFRA, G.; SPUDEIT, D.; BROGNOLI, R.; MERIB, J.; CARASEK, E. Expanding the applicability of cork as extraction phase for disposable pipette extraction in multiresidue analysis of pharmaceuticals in urine samples. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, [s. l.], v. 1102–1103, p. 159–166, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30391730/>. Acesso em: 19 jul. 2023.

MARZI KHOSROWSHAHI, E.; FARAJZADEH, M. A.; TUZEN, M.; AFSHAR MOGADDAM, M. R.; NEMATİ, M. Application of magnetic carbon nano-onions in dispersive solid-phase extraction combined with DLLME for extraction of pesticide residues from water and vegetable samples. **Analytical methods : advancing methods and applications**, [s. l.], v. 13, n. 32, p. 3592–3604, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34308461/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

MAXIMINO, C.; DE BRITO, T. M.; DA SILVA BATISTA, A. W.; HERCULANO, A. M.; MORATO, S.; GOUVEIA, A. Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. **Behavioural brain research**, [s. l.], v. 214, n. 2, p. 157–171, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20510300/>. Acesso em: 17 jul. 2023.

MAXWELL, D. M.; BRECHT, K. M.; KOPLOVITZ, I.; SWEENEY, R. E. Acetylcholinesterase inhibition: does it explain the toxicity of organophosphorus compounds?. **Archives of toxicology**, [s. l.], v. 80, n. 11, p. 756–760, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16770629/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

MOJIRI, A.; KAZEROON, R. A.; GHOLAMI, A. Cross-Linked Magnetic Chitosan/Activated Biochar for Removal of Emerging Micropollutants from Water: Optimization by the Artificial Neural Network. **Water** **2019**, Vol. **11**, Page **551**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 551, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4441/11/3/551/htm>. Acesso em: 9 fev. 2022.

MOJIRI, A.; ZHOU, J. L.; ROBINSON, B.; OHASHI, A.; OZAKI, N.; KINDAICHI, T.; FARRAJI, H.; VAKILI, M. Pesticides in aquatic environments and their removal by adsorption methods. **Chemosphere**, [s. l.], v. 253, p. 126646, 2020. Disponível em: Acesso em: 9 fev. 2022.

OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. [s. l.], OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, 2013. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en. Acesso em: 17 jul. 2023.

OIKARI, A. Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 370–381, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16750578/>. Acesso em: 17 jul. 2023.

PAN, S.; HUANG, Z.; SHANG, C.; WANG, L.; QIU, Q.; XU, Z.; ZHANG, D. Design and synthesis of amphiphilic carboxyl-functionalized magnetic polymer microspheres for fast determination of paraquat and its four metabolites in human urine samples prior to ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, [s. l.], v. 1670, p. 462998, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35366498/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

PEREIRA, Helena. Cork : biology, production and uses. [s. l.], p. 336, 2007. Disponível em: Acesso em: 10 fev. 2022.

PINHO, B. R.; SANTOS, M. M.; FONSECA-SILVA, A.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; OLIVEIRA, J. M. A. How mitochondrial dysfunction affects zebrafish development

and cardiovascular function: an in vivo model for testing mitochondria-targeted drugs. **British journal of pharmacology**, [s. l.], v. 169, n. 5, p. 1072–1090, 2013.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23758163/>. Acesso em: 26 jan. 2023.

PINTOR, A. M. A.; FERREIRA, C. I. A.; PEREIRA, J. C.; CORREIA, P.; SILVA, S. P.; VILAR, V. J. P.; BOTELHO, C. M. S.; BOAVENTURA, R. A. R. Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: a review. **Water research**, [s. l.], v. 46, n. 10, p. 3152–3166, 2012. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22534120/>. Acesso em: 9 fev. 2022.

SERRA, E. L.; MEDALHA, C. C.; MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, [s. l.], v. 32, n. 12, p. 1551–1553, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10585639/>. Acesso em: 17 jul. 2023.

TONI, M.; ARENA, C.; CIONI, C.; TEDESCHI, G. Temperature- and chemical-induced neurotoxicity in zebrafish. **Frontiers in physiology**, [s. l.], v. 14, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37854466/>. Acesso em: 27 nov. 2023.

VIEIRA, L. R.; GRAVATO, C.; SOARES, A. M. V. M.; MORGADO, F.; GUILHERMINO, L. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. **Chemosphere**, [s. l.], v. 76, n. 10, p. 1416–1427, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19628251/>. Acesso em: 17 jul. 2023.

WANIBUCHI, F.; NISHIDA, T.; YAMASHITA, H.; HIDAKA, K.; KOSHIYA, K.; TSUKAMOTO, S. ichi; USUDA, S. Characterization of a novel muscarinic receptor agonist, YM796: comparison with cholinesterase inhibitors in in vivo pharmacological studies. **European journal of pharmacology**, [s. l.], v. 265, n. 3, p. 151–158, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7875230/>. Acesso em: 27 nov. 2023.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, os resultados demonstraram que a utilização de grânulos de cortiça de vinho testados como propriedades adsorventes para TEPP em água não mostrou eficiência devido aos efeitos toxicológicos em embriões e alterações de comportamento em zebrafish juvenis. Estes dados contradizem o que foi observado nos testes *in vitro*, nos quais os grânulos de cortiça adsorveram mais de 95% do TEPP. As maiores e menores concentrações demonstraram nos peixes funções ansiolíticas e ansiogênicas, respectivamente, atribuindo uma curva dose-resposta em forma de parábola com concavidade para baixo.

REFERÊNCIAS

APCOR **Sobreiro**. 2022. Disponível em: <https://www.apcor.pt/montado/sobreiro/>. Acesso em: 11 nov 2023.

ARAÚJO, D. A. **Análise dos resultados dos planos de controle de resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal: anos 2007-2009**. 2011. 84 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa), Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2011. Disponível em: https://run.unl.pt/handle/10362/6113?locale=pt_PT. Acesso em 10 dez 2023.

ARONSON, J.; PEREIRA, J.S.; PAUSAS, J.G. **Montados de Sobreiro no Limite: Ecologia, Gestão Adaptativa e Restauração**; Island Press: Washington, DC, EUA, 2012.

AROSO, I.M. *et al.* Cork: Desenvolvimentos Tecnológicos Atuais e Perspectivas Futuras para Este Material Natural, Renovável e Sustentável. **Sustentação ACS. Química. Eng.** Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssuschemeng.7b00751>. Acesso em: 20 nov 2022.

ASPELIN, A. L. **Pesticides Industry sales and usage**, U. S. Environmental Protection Agency: Washington, DC., 1997. Disponível em: <https://onlinebooks.library.upenn.edu/webbin/book/lookupid?key=ha102347066>. Acesso em 07 out 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA (ABRASCO). **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde/ Organização: Fernando Ferreira Carneiro, Lia Giraldo da Silva Augusto, Raquel Maria Rigotto, Karen Friedrich e André Campo Búrigo. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. Disponível em: https://abrasco.org.br/wp-content/uploads/2016/11/DossieAbrasco_2015_web.pdf. Acesso em: 02 mar 2021.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO, 140p. (parte 1 – Agrotóxicos, Saúde, Ambiente e Sustentabilidade). 2012. Disponível em: <https://www.abrasco.org.br/site/wpcontent/> Acesso em: 18 fev 2020.

BALA, R. *et al.* Detection of organophosphorus pesticide–Malathion in environmental samples using peptide and aptamer based nanoprobos. **Chem. Eng. J.**, Chandigarh, India, v. 311, p. 111-116, nov. 2017.

BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. **Current Topics in Developmental Biology**, [s. l.], v. 124, p. 331–367, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/312277613_Zebrafish_in_Toxicology_and_Environmental_Health. Acesso em: 01 mar 2021.

BARBOZA, H. T. G. *et al.* Compostos Organofosforados e seu Papel na Agricultura. **Rev. Virtual Quim.**, 10 (1), 172-193, 2018. Disponível em: <http://rvq.s bq.org.br>. Acesso em: 18 fev 2021.

BARONIO, C. A. *et al.* Toxicidades de iscas tóxicas inseticidas para controle de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): Implicações para o manejo em campo. **J Econ Entomol** 112 (6): 2782 - 2789. 2019.

BEGUM, G. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. **Aquat Toxicol**. 66:83-92, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14687981>. Acesso em: 15 Jan 2022.

BILBA, K.; ARSENE, A. M.; OUENSANGA, A. Study of banana and coconut fibers: Botanical composition, thermal degradation and textural observation. **Bioresource technology**, v 98. p 58-68. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16442281>. Acesso em: 05 Ago 2021.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Rio de Janeiro, v. 16, p. 279-293, 2007b. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000400006. Acesso em: 09 out 2020.

BRASIL. Câmara dos Deputados. PL 3.200/2015: dispõe sobre a **Política Nacional de Defensivos Fitossanitários e de Produtos de Controle Ambiental**. Câmara dos Deputados. 2015a. Disponível em: https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra;jsessionid=76A0ECA52B265C21F55564A89EC6AC74.proposicoesWebExterno1?codteor=1412079&filename=PL+3200/2015. Acesso em: 22 mai 2021.

BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 8 jan. 2002. Disponível em: <https://bit.ly/2IGbNh7>. Acesso em: 05 dez. 2021.

BRASIL. Lei nº 11.936, de 14 de maio de 2009. **Proíbe a fabricação, a importação, a exportação, a manutenção em estoque, a comercialização e o uso de diclorodifeniltricloreto (ddt)**. Brasília, 2009. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009. Acesso em: 03 dez. 2021.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 12 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 jul. 1989. Disponível em: <https://bit.ly/1Lf8sTR>. Acesso em: 10 dez. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2017/18 a 2027/28 projeções de longo prazo. Secretaria de Política Agrícola.** Brasília (BR): MAPA/ACE. 112 p. Português. 2018. Disponível em: <https://repositorio-dspace.agricultura.gov.br/handle/1/28>. Acesso em: 18 jan 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Regulamentação. **Anvisa aprova novo marco regulatório para agrotóxicos.** Brasília, DF: ANVISA, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/anvisa-aprova-novo-marco-regulatorio-para-agrotoxicos>. Acesso em: 19 jan 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Agrotóxicos e Toxicologia. Monografias de Agrotóxicos.** 2014a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>. Acesso em: 19 set 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos.** 2019. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos/219201?p_p_auth=DepDKOBJ&inheritRedirect=false. Acesso em: 20 dez. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA).** Minuta de Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA, 2008. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Acesso em: 22 jul 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n.º 1 de 14/1/2011, **dispõe sobre Regulamento técnico para o ingrediente ativo Metamidofós em decorrência da reavaliação toxicológica.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 2011. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0001_14_01_2011.html. Acesso em: 13 nov 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n.º 37 16/8/2010, **dispõe sobre regulamento técnico para o ingrediente ativo Triclorfom em decorrência da reavaliação toxicológica.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0037_16_08_2010.html. Acesso em: 22 mar 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n.º 12 13/3/2015, **dispõe sobre regulamento técnico para o ingrediente ativo Forato em decorrência da**

reavaliação toxicológica. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 mar 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador.** – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos.pdf. Acesso em: 11 nov 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos.** Brasília, Organização Pan-Americana da Saúde, 1997. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos.pdf. Acesso em: 26 ago 2023.

BRASIL. Ministério Público Federal. Nota técnica: **análise do Projeto de Lei no 6.299/2002.** 2018b. Disponível em: https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/nota_tecnica_pl_agratocicos.pdf. Acesso em: 10 mai 2021.

CALDAS, E. D. *et al.* Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers. **Food Chem. Toxicol**, Brasília, Brasil, v. 42. p. 1877-1883, jul. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15350686>. Acesso em: 11 jun 2021.

CALDAS, L. Q. **Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bupiridílicos e piretróides.** 1 ed. Niterói-RJUFF, p. 5-25. 2000.

CAMILO-ALVES, C. *et al.* **Irrigação de Sobreiros Jovens em Condições de Campo** Melhor Volume de Água. *Florestas* 2020, 11, 88.

CARNEIRO, F. F. *et al.* **Dossiê Abrasco:** um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. São Paulo: Expressão Popular, 2015. Disponível em: <https://abrasco.org.br/wp-content/uploads/2016/11/Do>. Acesso em: 14 fev 2022.

CARSON, R. **Primavera Silenciosa.** São Paulo: Gaia, 305p, 2010.

CARVALHO, M. M. X.; NODARI, E. S.; NODARI, R. O. “Defensivos” ou “agrotóxicos”? História do uso e da percepção dos agrotóxicos no estado de Santa Catarina, Brasil, 1950-2002. **História, Ciências, Saúde**, Manguinhos, v. 24, n. 1, p. 75-91, 2017.

CARVAN, M. J. *et al.* Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution. **Ann N Y Acad Sci**. 919:133-47, 2000. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11083105>. Acesso em: 16 jul 2022.

CASTILHO, A. L. **Altas do agronegócio**: fatos e números sobre as corporações que controlam o que comemos. Maureen Santos, Verena Glass, organizadoras. – Rio de Janeiro: Fundação Heinrich Böll, 2018. Disponível em: <https://mst.org.br/download/atlas-do-agronegocio-fatos->. Acesso em: 14 set 2023.

CAVALCANTI, L. P. A. N. *et al.* Intoxicação por Organofosforados: tratamento e metodologias analíticas empregadas na avaliação da reativação e inibição da acetilcolinesterase. **Rev. Virtual Quim.** v. 8, n. 3, 2016. Disponível em: <http://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/1301>. Acesso em: 25 out. 2021.

CAVALIERE, M. J. *et al.* Miotoxicidade por organofosforados. **Revista de Saúde Pública**, v. 30, n. 3, p. 267-72, 1996.

CAZARIN, K.; CORRÊA, C.; ZAMBRONE, F. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n.3, p. 289-299, 1 set. 2004. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rbcf/article/view/43979/47600>. Acesso em: 25 jan 2021.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA / ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ” [CEPEA / ESALQ]. 2019. **PIB do Agronegócio Brasileiro**. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx> . Acesso em: 20 jan 2021.

CENTRO DE SOCIOECONOMIA E PLANEJAMENTO AGRÍCOLA (CEPA). **Banana**. Disponível em: http://cepa.epagri.sc.gov.br/Informativos_agropecuarios/banana/Banana_310709.pdf. 2009. Acesso em: 12 abr 2021.

CHAMBERS, J. E.; CARR, R. L. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. **Toxicology**. 105, 291, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(95\)03225-5](https://doi.org/10.1016/0300-483X(95)03225-5). Acesso em: 07 jan 2020.

CHEN, S. *et al.* Exposure to pyrethroid pesticides and the risk of childhood brain tumors in East China. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 1128–1134, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026>. Acesso em: 03 fev 2022.

CHENG, Z. *et al.* Simultaneous determination of organophosphorus pesticides in fruits and vegetables using atmospheric pressure gas chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Food Chem.**, Beijing, China, v. 231, p. 365-373, mar. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S03088>. Acesso em: 09 abri 2023.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Alimentarius** Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2012. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/about-codex/en/>. Acesso em: 07 out. 2021.

COLOVIC, M. B. *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, 11, 315, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24179466>. Acesso em: 07 mai 2023.

COPE, W. G.; LEIDY, R. B.; HODGSON, E. Classes of Toxicants: Use Classes. In ERNEST HODGSON(Ed.). **Textbook of Modern Toxicology**. 3 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, cap.5, p. 49-74, 2004.

DELL'OMO, G. *et al.* Comparative Effects of Exposure to an Organophosphate Pesticide on Locomotor Activity of Laboratory Mice and Five Species of Wild Rodents. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, p. 138–145, 2003. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00128-0>. Acesso em: 21 mai 2023.

DEROUICHE, A. *et al.* Simultaneous analysis of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in water by headspace solid phase microextraction with gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Zarzouna, Tunisia, v. 1138, p. 231-243, nov. 2007. Disponível em: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/chemically-related-groups-active-ingredients>. Acesso em: 18 Fev. 2021.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In CASARETT e DOULL'S. **Toxicology: the basic science of poisons**. 4 ed. New York: Pergamon Press, cap 22, p. 763-810, 1991. Disponível em: <https://accessbiomedicalscience.mhmedical.com/> Acesso em: 05 out 2022.

ELDEFRAWI, A. T. The acetylcholine receptor and its interaction with insecticide. **Insect Biochem Physiol.** (Wilkinson, C.F., ed.), 297-326. Plenum Press, New York. Eldefrawi, A.T., Mansour, N., 1976. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2212-0_8. Acesso em: 06 fev 2022.

ELDEFRAWI, M. E. Insecticides affecting acetylcholine receptor interactions. **Pharmac. Theor.** 16, 45-65, 1982. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6752971>. Acesso em: 10 abr 2023.

ESCALEIRA, R. C. O zebrafish (*Danio rerio*): contribuições para a pesquisa biomédica na Marinha do Brasil. **Arq Bras Med Naval**, v. 78, n. 1, p. 43-48, 2017. Disponível em: <http://www.redebim.dphdm.mar.mil.br/vinculos/00001a/00001a17.pdf>. Acesso: 19 jul 2021.

ESTEVES, F. D. A. **Fundamentos de Limnologia**. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **A farm to fork strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system**. Brussels, COM, 2020a. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/system/files/2020-05/f2f_action-plan_2020_strategy-info_en.pdf. Acesso em: 11 ago 2021.

FAßBENDER; C.; BRAUNBECK, T. Avaliação da genotoxicidade em gônadas, fígado e guelras de peixe-zebra (*Danio rerio*) pelo uso do ensaio do cometa e teste do

micronúcleo após exposição in vivo ao metanossulfonato de metila. **Bull Environ Contam Toxicol** 91 (1): 89 – 95, 2013.

FERNANDES, G. O POP do AGRO. In **Atlas do Agronegócio: fatos e números** sobre as corporações que controlam o que comemos. Maureen Santos, Verena Glass (Org.). Rio de Janeiro: Fundação Heinrich Böll, p. 22-23, 2018.

FERREIRA, J.P.A *et al.* **Caracterização Química da Cortiça e Floema da Casca Exterior** de Douglas Fir. *Holzforschung* 2016, 70, 475–483.

FERREIRA, M. L. P. C. A pulverização aérea de agrotóxicos no Brasil: cenário atual e desafios. **Revista de Direito Sanitário**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 18-45, 2015. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rdisan/article/view/>. Acesso em: 12 jul 2021.

FORD, R.G.; SCHEINOST, A.C. & SPARKS, D.L. Frontiers in metal sorption/precipitation mechanisms on soil mineral surfaces. **Adv. Agron.**, 74:41-62, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Moving forward on food loss and waste reduction**. 153p. 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/3/ca6030en/ca6030en.pdf>. Acesso em: 17 set 2020.

FREIRE, C.; KOIFMAN, S. Mini-Review Pesticides, depression and suicide: A systematic review of the epidemiological evidence. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, p. 445–460. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.12.003>. Acesso em: 21 ago 2023.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ/CENTRO DE INFORMAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA/SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS (FIOCRUZ). **Manual de Preenchimento da Ficha de Notificação e de Atendimento**. Centros de Assistência Toxicológica. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/CICT/SINITOX; 2001.

GIL, L.; VARELA, M. **Orientações Técnicas para a Conservação Genética do Sobreiro (*Quercus suber*)**; Bioversity International: Roma, Itália, 2008.

GIL, L. **Cortiça: Produção, Tecnologia e Aplicação**. Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial: Lisboa, Portugal, 1998. Disponível em: https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/8880/1/ulfc104385_tm_Silvia_Jose.pdf. Acesso em: 07 mai 2023.

GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GONÇALVES, A. S. **Estudo por dinâmica molecular das interações da pralidoxima e da deazapralidoxima com a Acetilcolinesterase humana inibida pelo agente neurotóxico Tabun**. 2005, 125f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2005.

GRALA, J. (s.d). **Os tipos de cortiça e os produtos da sua transformação industrial**. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

GRIGORI, P. **Afinal, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxico do mundo?** Agência Pública, 24 de junho de 2019. Disponível em: [https://apublica.org/2019/06/afinal-o-brasil-e-o-maior-consumidor-de-agrotóxico-do-mundo/](https://apublica.org/2019/06/afinal-o-brasil-e-o-maior-consumidor-de-agrotoxico-do-mundo/). Acesso em: 22 set. 2021.

GRUNWALD, D. J.; EISEN, J. S. Headwaters of the zebrafish--emergence of a new model vertebrate. **Nature reviews. Genetics**, v. 3, n. 9, p. 717, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12209146>. Acesso em: 20 nov 2022.

GUILHERME, S. *et al*. Differential genotoxicity of Roundup formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. **Ecotoxicology** 21, p. 1381–1390, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22526921>. Acesso em: 12 dez 2022.

HEINZOW, B.; ANDERSEN, H. R. Biocides and Pesticides. In DUFFUS, J. H. (Ed) & WORTH, H. G. J. (Ed). **Fundamental Toxicology**. Londres: The Royal Society of Chemistry, cap. 22. p.291-302, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/9781847552648>. Acesso em: 15 set 2020.

HESS, S. C.; NODARI, R. O.; LOPES-FERREIRA, M. Agrotóxicos: críticas à regulação que permite o envenenamento do país. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 57, 2021. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/>. Acesso em: 07 mar 2022.

HINZ, J. S.; MORÉS, L.; CARASEK, E. Exploring the use of cork pellets in bar adsorptive microextraction for the determination of organochloride pesticides in water samples with gas chromatography/electron capture detection quantification. **Journal of chromatography. A**, 1645, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33848658>. Acesso em: 11 mai 2022.

HOLLINGWORTH, R. M. Em **Insecticides biochemistry and physiology**; Wilkinson, C. F., ed.; New York: Plenum, p. 431, 1976. <https://doi.org/10.1002/ieam.4353>. Acesso em: 28 dez 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS (IBAMA). **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. 2019. Disponível em: <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 28 nov 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Boletim anual de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil** [Internet]. Brasília; 2013 [citado em 2014 mar 15]. Disponível em: <http://ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>. Acesso em: 15 out. 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Agrotóxicos**: Registro de N.A. 2016. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/registro-de-na>. Acesso 07 ago. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Exposição no trabalho e no ambiente**. Agrotóxico. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/>. Acesso em: 19 fev 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Nota pública acerca do posicionamento do Instituto Nacional de Câncer sobre o Projeto de Lei nº 6.299/2002**. Rio de Janeiro: INCA. 2018. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//nota-publica-inca--pl-6299-2002-11-de-maio-de-2018.pdf>. Acesso em: 25 mar 2021.

JESCHKE, P. *et al.* Visão geral do status e estratégia global para neonicotinóides. **J. Agric. Food Chem.**, 59, p. 2897 - 2908, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20565065/>. Acesso em 18 out 2022.

JOBIM, P. F. C. *et al.* Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 277- 288, jan. 2010. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta1/resource/pt/>. Acesso em: 05 mar 2022.

JONES, M. B.; KAMSIIME, F.; SAUDERS, M. J. The potential use of papyrus (*Cyperus papyrus* L.) wetlands as a source of biomass energy for sub-Saharan Africa. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 10, p.4-11, 2018. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/309216834>. Acesso em: 06 jun 2022.

KATZUNG, B. G. Farmacologia Básica e Clínica. In: **Agentes bloqueadores dos receptores colinérgicos**. 9.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 91-100, 2005.

KHALILI-ZANJANI, M. R. *et al.* Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction-gas chromatography-flame photometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 202-208, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18082651/>. Acesso em: 02 mai 2022.

KIM, J.; SHIN, D. H.; LEE, W. J. Suicidal ideation and occupational pesticide exposure among male farmers. **Environmental Research**, v.128, p. 52–56. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24268919/>. Acesso em: 10 fev 2022.

KMELLÁR, B. *et al.* Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1215, n. 1, p. 37-50, 2008a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.121>. Acesso em: 10 abr 2022.

KNIE, J. L. W.; LOPES, B. W. E. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, p. 289, 2004.

KOENIG, J. A. *et al.* Zebrafish as a model for acetylcholinesterase-inhibiting organophosphorus agent exposure and oxime reactivation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1374, n. 1, p. 68–77, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC>. Acesso em: 25 ago 2023.

LAYTON, R. *et al.* Building Better Environmental Risk Assessments. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 3, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26301217>. Acesso em: 14 mai 2022.

LEMO, H. M.; MUSAFIR, R. E. **Poluição do solo**. 2014. Disponível em: http://www.mecanica-ufrj.educacao.ws/util/b2evolution/media/blogs/ricardo/Apost_Pol_Solos_HML_REM-2014.pdf. Acesso em: 05 dez 2021.

LÓPEZ, R. *et al.* Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. **Journal of Chromatography B**, Bilbao, Spain, v. 846, p. 298-305, sept. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.009>. Acesso em: 13 jun 2023.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. Disponível em: <https://enagroecologia.org.br/download/agrotoxicos-no-brasil-um-guia-para-acao-em-defesa-da-vida-de-flavia-londres>. Acesso em: 07 jul 2022.

MANGAS, I. *et al.* Neurotoxic effects associated with current uses of Organophosphorus Compounds. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 27, n. 5, p. 809-825, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/Gymrhq8TkMmvjkfS38sSVvw/abstract/?lang=en>. Acesso em: 18 jan. 2022.

MARTINS, M. K. S. *et al.* Exposição Ocupacional aos Agrotóxicos: Um Estudo Transversal. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 5, n. 3, p. 6-27, out. 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/2675>. Acesso em: 14 jan 2023.

MERCK. **Ficha de informação de segurança de produto químico – TEPP**. 1998. Disponível em: www.sigmaaldrich.com. Acesso em: 26 jan 2021.

MESTRE, A.; GIL, L. Cork para design de produtos sustentáveis. **Ciência e Tecnologia. Dos Mater.** 2011, 23, 52–63. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/234015112>. Acesso em: 11 fev 2023.

MESULAM, M. M. *et al.* Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase hydrolyse acetylcholine. **Neuroscience**. 110:627-639, 2002. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/11432>. Acesso em: 22 set 2023.

MONTEIRO, M. K. S. *et al.* Novel cork-graphite electrochemical sensor for voltammetric determination of caffeine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 839, p. 283-289. 2019.

MOR, F.; OZMEN, O. Endosulfan-induced neurotoxicity and serum acetylcholinesterase inhibition in rabbits: The protective effect of Vit C. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, p. 108–112, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.10.004>. Acesso em: 07 abr 2023.

MOREIRA, J. C. *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, **Ciência & Saúde Coletiva**, São Paulo, v.7, n.2, p. 299-311, 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/6dhP7dyPDNVqfTrn>. Acesso em: 19 out 2023.

MOREIRA, R. J. **Críticas ambientalistas à Revolução Verde**. Estudos: Sociedade e Agricultura, Rio de Janeiro, v. 8, n. 2, p. 39-52, 2000. Disponível em: <https://revistaesa.com/ojs/index.php/esa/article/view/176>. Acesso em: 10 jun 2022.

MORETTO, M. B. *et al.* Effect of subchronic treatment with mercury chloride on NTPDase, 5' nucleotidase and acetylcholinesterase from cerebral cortex of rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and biology**. 17:256-260, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0>. Acesso em: 28 jan 2023.

MOTA, G.S. *et al.* Estrutura Celular e Composição Química da Cortiça de *Plathymenia Reticulata* Ocorrendo no Cerrado Brasileiro. **Ind. Culturas Prod.** 2016, 90, 65–75. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/30265>. Acesso em: 17 ago 2022.

MULLER, N. *et al.* Association between pesticide exposure and suicide rates in Brazil. **Neurotoxicology**, v. 45, p. 355–362. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24875485>. Acesso em: 22 fev 2022.

NELSON, L. S. *et al.* Aldicarb poisoning by an illicit rodenticide imported into the United States: Tres Pasitos. **Journal of toxicology**, v. 39, n. 5, p. 447-52, 2001.

NOTARE, M. **Plantas hidrófilas e seu cultivo em aquário**. Rio de Janeiro: Sulamérica, 1992.

OGASAWARA, N. *et al.* Modulation of immunological activity on macrophages induced by diazinon. **Toxicology**, Nagoya, Japan, v. 379, p. 22-30, jan. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28119078>. Acesso em: 29 set 2023.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OCDE). **Teste nº 236: Teste de toxicidade aguda (fet) de embriões de peixes**. OCDE; Paris, França: 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>. Acesso em: 15 jan 2022.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Ministério da Saúde, Secretaria

de Vigilância Sanitária. Brasília: Organização Pan-americana da Saúde/OMS. 1996. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livr>. Acesso em: 25 mar 2023.

PAUDYAL, B. P. Organophosphorus poisoning. **Journal of Nepal Medical Association**. 47(172):251 -8, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19079407>. Acesso em: 06 ago 2023.

PELAEZ, V; TERRA, F. H. B.; SILVA, L. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, Curitiba, 26p, 2010. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/bvsms/resource/pt/>. Acesso em: 13 abr 2022.

PERBANGKHEM, T.; POLPRASERT, C. Biomass production of papyrus (*Cyperus papyrus*) in constructed wetland treating low-strength domestic wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 833–835, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19758797>. Acesso em : 16 jun 2022.

PEREIRA, H. **Biologia, Produção e Utilizações da Cortiça**. Publicações da Elsevier: Amsterdã, Holanda, 2007.

PEREIRA, H. **Cork: Biologia, Produção e Utilizações**. Elsevier: Amsterdã, Holanda, 2011.

PEREIRA, H.; TOMÉ, M. Sobreiro. Na **Enciclopédia de Ciências Florestais**. Elsevier: Oxford, Reino Unido, 2004; págs. 613–620.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. **É veneno ou é remédio?: Agrotóxicos, saúde e ambiente**. [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 384 p., 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2005000100042>. Acesso em: 03 mar 2022.

PETRONILHO, E. C; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. ACETILCOLINESTERASE: ALZHEIMER E GUERRA QUÍMICA. **Instituto de Química**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: http://rmct.ime.eb.br/arquivos/RMCT_3_tri_2011/RMCT_067_E5A_11.pdf . Acesso em: 22 jan. 2022.

PIGNATI, W. *et al.* Acidente rural ampliado: o caso das “chuvas” de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde - MT. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 299-311, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/ZdzZ6QjTQsXXLdCq>. Acesso em: 27 out 2022.

PINTOR, A. M. A. *et al.* Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: a review. **Water research**, 46(10), 3152–3166, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22534120>. Acesso em: 10 set 2022.

PIRSAHEB H. *et al.* Uma revisão sistemática sobre o conteúdo de pesticidas organoclorados e organofosforados em recursos hídricos. **Toxina Rev** 36 (3): 210 -

221. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ieam.4353>. Acesso em: 28 dez 2021.

POPPENGA, R. H.; OEHME, F. W. Pesticide Use and Associated Morbidity and Mortality in Veterinary Medicine. In: ROBERT KRIEGER (Ed). **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology**. 3 ed. Londres: Academic Press – Elsevier, 2010. v. 1, cap. 7, 285-301, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii>. Acesso em: 18 jul 2023.

PORTO, M. F.; SOARES, W. L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Rev Bras Saude Ocup**; 37(125):17-50; 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbso/a/wWKHf9PQ3tscgZg5>. Acesso em 21 set 2023.

RASTOGI, L.; DASH, K.; BALLAL, A. Selective colorimetric/visual detection of Al³⁺ in ground water using ascorbic acid capped gold nanoparticles. **Sens. Actuators B Chem**, Telangana, India, v. 248, p.124-132, mar. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400517305634>. Acesso em: 23 nov 2022.

RICE, P. J.; ARTHUR, E. L.; BAREFOOT, A. C. Advances in pesticide environmental fate and exposure assessments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5367-5373, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17552539>. Acesso em 04 out 2023.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 7, p. 1-3, jul. 2014. Disponível em: <https://www.scielo.org/pdf/csp/2014.v30n7/1>. Acesso em: 02 jun 2022.

ROSATI, J. L. R. *et al.* Intoxicação por carbamatos e organofosforados. **Jornal Brasileiro de Medicina**, vol. 69, n. 3, p. 73-96, 1995.

SANTOS, V. M. R. *et al.* Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000100028; Acesso em: 16 out. 2021.

SEN, A. *et al.* Composição Química e Estrutura Celular das Rolhas de Árvores *Quercus suber* Plantadas na Bulgária e na Turquia. **Ciência da Madeira. Tecnologia**. 2016, 50, 1261–1276. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00226-016-0836-y>. Acesso em: 02 jun 2022.

SILVA, S. *et al.* Cork: Propriedades, capacidades e aplicações. **Internacional Matéria. Rev.** 2005, 50, 345–365. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/21544>. Acesso em 14 ago 2022.

SILVA, T. O. **"Impactos ambientais causados pelo agronegócio no Brasil"**; Brasil Escola. 2017. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/brasil/impactos-ambientais-causados-pelo-agronegocio-no-brasil.htm>. Acesso em: 11 jan 2021.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA (SINDAG). **Vendas de defensivos agrícolas por culturas de destinação e classes, 2010 e 2011**. São Paulo. 2012.

STORM, J. E.; ROZMAN, K. K.; DOULL, J. Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. **Toxicology**. Volume 150, Issues 1–3, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii>. Acesso em: 18 jun 2022.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE EPIDEMIAS (SUCEN). **Segurança em controle químico de vetores**. 2001. Disponível em: http://www.sucen.sp.gov.br/saude_trabalhador/texto_seguranca_e_controle_quimico.htm Acesso em: 18 fev 2021.

TENNAKON, D. A. S.; KARUNARATHNA, W. D. V; UDUGAMPALA, U. S. S. Carbofuran concentrations in blood, bile and tissues in fatal cases of homicide and suicide. **Forensic Science International**, v.227, p. 106–110. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23176810>. Acesso em: 16 jun 2022.

UNITED STATES. Environmental protection Agency. (USEPA). **Fatos do Propetaphos**. EPA 738-F-00-16 Agência de Proteção Ambiental dos EUA, Cincinnati, OH. 2000. Disponível em: <https://www.epa.gov>. Acesso em: 19 jan 2023.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency. (USEPA). **Integrated used in pesticide products. Chemically-related groups of active ingredients**. [Washington, DC]: EPA, 2016. Disponível em: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide>. Acesso em: 12 dez 2022

UNITED STATES. Environmental Protection Agency. (USEPA). **Pesticides**. Washington, DC: Environmental Protection Agency, 2017. Disponível em: <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>. Acesso em: 18 fev. 2021.

VALE, D. B. D. J. **A utilização de organofosforados na agricultura brasileira: riscos para a saúde humana e danos ambientais** - uma revisão bibliográfica. Convibra, 2017. Disponível em: <https://convibra.org/congresso/res/uploads/pdf>. Acesso em: 08 mar 2023.

VALENTE, N. I. P. **Análise de pesticidas organofosforados em Toxicologia Forense**. 2012. 148 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2012. Disponível em: <https://ria.ua.pt/handle/10773/10150>. Acesso em: 20 mar 2023.

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. **The Pesticide Book** - History of Pesticides, 6th ed.; Meister Publication, p. 335, 2004. Disponível em: <https://archive.org/details/pesticidebook00ware>. Acesso em: 20 jan 2023.

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book**: a guide for the laboratory use of the zebrafish (*Danio rerio*), University of Oregon Press, 2007. Disponível em: <https://zfin.org/ZDB-PUB-101222-53>. Acesso em: 10 mar 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chemical safety**: Pesticides. Geneva, 2009a. Disponível em: <http://www.who.int/topics/pesticides/en/>. Acesso em 23 dez 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). GEMS/Food Total Diet Studies. **Report of the 3rd International Total Diet Study Workshop on Total Diet Studies**, Paris, France, 14-21 May 2004. Disponível em: <http://www.who.int/foofsafety/chem/en/>. Acesso em 15 mar 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Pesticides**, Genebra, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail-redirect>. Acesso em: 05 mar 2023.

YU, R. *et al.* Concentrations of organophosphorus pesticides in fresh vegetables and related human health risk assessment in Changchun, Northeast China. **Food Control**, Changchun, China, v. 60, p. 353–360, aug. 2016. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.5772/17513>. Acesso em: 19 dez 2022.

ZACHARIA, J. T. Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides. Stoytcheva, M. (org). In: **Pesticides in the Modern World** – Trends in Pesticides Analysis. InTech, 2011. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.5772/17513>. Acesso em: 30 set 2022.

ZHANG, Y. *et al.* Developmental toxicity induced by PM2.5 through endoplasmic reticulum stress and autophagy pathway in zebrafish embryos. **Chemosphere**, v. 197, p. 611–621, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29407824> Acesso em: 30 set 2022.

ZHAO, H. *et al.* An ultra-sensitive acetylcholinesterase biosensor based on reduced graphene oxide-Au nanoparticles- β -cyclodextrin/Prussian blue-chitosan nanocomposites for organophosphorus pesticides detection. **Biosensors and Bioelectronics**, Shijiazhuang, China, v. 65, p.23 – 30, mar. 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/268526>. Acesso em: 30 set 2022.

ZUIN V. G.; VILEGAS, J. H. Y. Pesticides Residues in Medicinal Plants and Phytomedicines. **Phytotherapy Research**, São Carlos, Brasil, John Wiley & Sons, v. 14, p. 73-88, sept., 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10685102>. Acesso em: 07 set 2022.