



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

JOSÉ HENRIQUE VALLIM

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO DIMETOATO
E DIMETOATO NANOENCAPSULADO EM *Danio rerio*
(ZEBRAFISH)

EVALUATION OF THE TOXICOLOGICAL EFFECTS OF
DIMETHOATE AND DIMETHOATE NANOENCAPSULATED
ON *Danio rerio* (ZEBRAFISH)

CAMPINAS

(2019)

JOSÉ HENRIQUE VALLIM

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO DIMETOATO E
DIMETOATO NANOENCAPSULADO EM *Danio rerio* (ZEBRAFISH)

EVALUATION OF THE TOXICOLOGICAL EFFECTS OF DIMETHOATE
AND DIMETHOATE NANOENCAPSULATED ON *Danio rerio*
(ZEBRAFISH)

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para qualificação
no Título de Doutor em Biologia Funcional e
Molecular na área de Bioquímica.*

*Thesis Dissertation presented to the Institute of
Biology of the University of Campinas in partial
fulfillment of the requirements for the degree of
doctor in Functional and Molecular Biology in
the field of Biochemistry.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO JOSÉ HENRIQUE VALLIM E ORIENTADA
PELO PROFESSOR LEONARDO FERNANDES
FRACETO.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Co-Orientadora: Dra. Vera Lúcia Scherholz Salgado de Castro

CAMPINAS

(2019)

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

V244a Vallim, José Henrique, 1973-
Avaliação dos efeitos toxicológicos do dimetoato e dimetoato nanoencapsulado em *Danio rerio* (Zebrafish) / José Henrique Vallim. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto.
Coorientador: Vera Lúcia Scherholz Salgado de Castro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Nanopartículas. 2. Dimetoato. 3. Toxicologia ambiental. 4. Embrião. 5. Zebrafish. 6. Quitosana. 7. Tripolifosfato de sódio. I. Fraceto, Leonardo Fernandes. II. Castro, Vera Lúcia Scherholz Salgado de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the toxicological effects of dimethoate and dimethoate nanoencapsulated on *Danio rerio* (Zebrafish)

Palavras-chave em inglês:

Nanoparticles

Dimethoate

Environmental toxicology

Embryo

Zebrafish

Chitosan

Sodium tripolyphosphate

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Leonardo Fernandes Fraceto [Orientador]

Claudio Martin Jonsson

Jhones Luis de Oliveira

Julio Ferraz de Queiroz

Luíz Augusto Corrêa Passos

Data de defesa: 30-09-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5327-4158>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4624550097326832>

Campinas, 30 de agosto de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Dr. Claudio Martin Jonsson

Dr. Jhones Luiz de Oliveira

Dr. Julio Ferraz de Queiroz

Dr. Luíz Augusto Corrêa Passos

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas que já têm a forma do nosso corpo e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado para sempre, à margem de nós mesmos”. (Fernando Teixeira de Andrade)

Dedico esta Tese à minha filha *Alice*
e esposa *Bianca*.

“In memorian”

Dr. João Carlos Grigoli

Diretor e Professor da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Unoeste

Meu grande mestre!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Criador do Universo por mais esta oportunidade de crescimento e aprendizado ao lado de pessoas e Instituições ímpares.

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

À Unicamp/IB/PPG-Biologia Funcional e Molecular, Unesp de Sorocaba/Laboratório de Nanotecnologia Ambiental, à Embrapa Meio Ambiente/Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança (LEB), Rede AgroNano/Embrapa Instrumentação, Faculdade de Medicina/Unicamp/LabZeb e à CAPES pela oportunidade de crescimento profissional e científico, bem como pela realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto (Unesp/Sorocaba-SP), pelo aceite em me orientar, pelo apoio intelectual, pela capacidade, gentileza ímpar, paciência e por ter proporcionado a realização deste trabalho.

À Dra. Vera Lúcia Scherholz Salgado de Castro (Embrapa Meio Ambiente), minha co-orientadora, pelo apoio, paciência e conselhos em todas as fases do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leonardo Reis Silveira, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular (IB/Unicamp) pela oportunidade.

À Dra. Zaira Clemente, por me apoiar no desenvolvimento desta tese, principalmente com suas sugestões e observações, deixando muitas vezes seu convívio familiar para apoiar-me.

À Dra. Estefânia Vangelie Ramos Campos, por abrir mão de parte do seu tempo para realizar a síntese e caracterizações das nanopartículas de tripolifosfato/quitosana, demonstrando esmero, desprendimento em me ajudar e pelo apoio principalmente à época da qualificação.

Ao Dr. Anderson Espírito Santo Pereira, pelo importante auxílio nos ensaios de elaboração e caracterização das nanopartículas de alginato/quitosana, cedendo seu tempo para me ajudar, muitas vezes até o período noturno.

À doutoranda Patrícia Luiza de Freitas Proença, pelo apoio na produção e caracterização das nanopartículas de tripolifosfato/quitosana.

À doutoranda Angélica Iracema Sibaja pelo apoio na caracterização de nanopartículas com ativo não encapsulado.

À Dra. Márcia Assalin e à Técnica Rosângela Mauri Quintino do Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa Meio Ambiente, pelo apoio com os testes de $t_{1/2}$ do dimetoato.

À Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli (Faculdade de Medicina/Unicamp/LabZeb), Técnica Viviane Cristina Fais e os doutorandos Jonanthan Angel Araújo Fernandez e Thales Guimarães Parolari, pelo apoio na realização dos testes comportamentais com larvas de zebrafish.

Ao Dr. Claudio Martín Jonsson, pela revisão dos testes estatísticos.

Aos amigos Dr. Gabriel Moura Mascarin (Embrapa Meio Ambiente), doutorando Israel Luz Cardoso e Msc. Giovani Henrique Ferri, pelo apoio em diversos momentos. Vocês foram muito importantes para mim!

Ao Msc. Rodrigo Castanha do Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança (Embrapa Meio Ambiente), pelo apoio dividindo o trabalho e manutenção do laboratório e pela contribuição na retabulação das tabelas FET.

À Dra. Jaqueline Honório e Doutoranda Ana Paula Andrade Braga, pelo apoio em vários momentos durante o doutorado.

Ao corpo docente do IB/PPG-Biologia Funcional e Molecular que ministraram as disciplinas do doutorado, pela arte em transmitir conhecimentos e gentileza. Certamente o(a)s Sr(a)s. contribuíram muito para que eu me tornasse um ser humano melhor.

À Comissão de Qualificação e Defesa, pelo aceite do convite e pelo profissionalismo inspirador.

À Andréia Aparecida Vigilato e Beatriz Silva de Toledo (Secretaria IB/PPG-Biologia Funcional e Molecular), pelos esclarecimentos, apoio e simpatia.

Às estagiárias que passaram pelo LEB: Valery Alícia Assunção de Camargo, Rafaela Patrucci, Fernanda Sana Pertrini, Juliana Augusta Gil, Thaís Adhmann de Lima, Fernanda Smaniotto, Beatriz César de Castro, Júlia Lourenço do Nascimento, estagiário Matheus de Paula Santos e colaboradoras D. Rosemari Rodrigues da Silva, Márcia Godoi e D. Geni Vogado Guimarães de Moura, pelo apoio na limpeza e manutenção do laboratório.

À minha família e meus antepassados, pois sem estes, nada disso teria sido possível!

À Profa. Dra. Elenice Deffune, por ter sido minha orientadora no mestrado da Unesp - Faculdade de Medicina/Hemocentro de Botucatu, sem a Sra. como precursora não teria chegado até aqui!

Ao Prof. Dr. João Carlos Grigoli (*in memoriam*), meu mestre, por à época da faculdade, ter-me dado a oportunidade de ser seu monitor, me orientando e permitindo que eu fizesse parte de seu convívio fraterno.

Aos Professores de minha Graduação, Especialização, MBA e Mestrado, pelo conhecimento e atenção que me proporcionaram. O(a)s Senhore(a)s nunca serão esquecidos!

Aos amigos e amigas de todas as fases de minha vida, que sempre serão um grande presente do Alto.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra me apoiaram cedendo aquilo que possuem de mais precioso: o tempo! Que ecoe eternamente no Universo minha gratidão por vosso empenho e desprendimento!

RESUMO

Os inseticidas organofosforados como o dimetoato são o grupo de inseticidas mais amplamente usado no mundo, sendo também bastante utilizado no Brasil. Devido ao elevado potencial de contaminação dos corpos d'água e de promoção de efeitos neurotóxicos, o dimetoato representa ameaça à saúde humana e ao meio ambiente. O uso de nanocarreadores biocompatíveis e biodegradáveis na formulação de pesticidas pode melhorar a proteção ambiental. O desenvolvimento de formulações com liberação sustentada de agrotóxicos apresenta-se como uma alternativa inovadora no controle de pragas agrícolas, aumentando a sua eficácia e reduzindo seu impacto ambiental. Neste estudo, o inseticida organofosforado dimetoato foi encapsulado usando o sistema tripolifosfato de sódio/quitosana (TPP/CS) e alginato de sódio/quitosana (ALG/CS). As nanopartículas foram caracterizadas por diferentes técnicas. A eficiência de encapsulação também foi verificada. Também foi avaliada a toxicidade das nanopartículas em comparação com formulações técnica (DMT) e comercial (DMC) em embriões e larvas de peixes. Para isso, foram avaliados parâmetros de letalidade, comportamento e atividade enzimática em embriões da espécie *Danio rerio* (zebrafish) expostos às formulações de dimetoato nanoencapsulado, comercial e técnico. O sistema TPP/CS apresentou boas características coloidais e físico-químicas. A eficiência de encapsulação do dimetoato foi de $99,3 \pm 0,32 \%$, permanecendo estável por pelo menos 90 dias. Os resultados obtidos indicam que, apesar da associação de dimetoato com nanopartículas de TPP/CS ser uma boa alternativa para o uso deste ingrediente ativo, ela provocou a morte de embriões de zebrafish mesmo na ausência do inseticida. Embora a nanoencapsulação do dimetoato tenha potencial para melhorar a produtividade das culturas, a formulação com nanopartículas TPP/CS terá que ser reavaliada para se tornar ambientalmente segura. Diante destes fatos, foram sintetizadas e caracterizadas nanopartículas poliméricas de ALG/CS pelo método de gelificação iônica para liberação sustentada do inseticida dimetoato. O sistema nanocarreador ALG/CS apresentou boa estabilidade coloidal e eficiência de encapsulação de $74,8 \%$. Os ensaios realizados com embriões e larvas de zebrafish indicaram que a incorporação do dimetoato em nanopartículas de ALG/CS aumentou em $61,5 \%$ a sua $CL_{50-96 \text{ h}}$ (mg.L^{-1}), indicando diminuição de sua toxicidade quando comparado com a formulação técnica. Os efeitos tóxicos no desenvolvimento embriolarval ocorreram predominantemente nas maiores concentrações testadas após a exposição ao DMC, seguido do DMT. A nanopartícula de ALG/CS não afetou o comportamento das larvas, mas aumentou a inibição da AChE em relação às formulações técnica e comercial do dimetoato. Neste

trabalho, o zebrafish mostrou ser um bom modelo para estudo de exposições ambientais a nanopesticidas e pode ser usado como ferramenta de triagem para determinar os riscos associados à exposição destes compostos, em especial, nos estágios iniciais de desenvolvimento. Apesar das nanopartículas apresentarem potencialidade de uso em culturas agrícolas, é importante que mais trabalhos sejam desenvolvidos sob condições ambientais relevantes para que esse sistema possa ser comercialmente utilizado com segurança e com a adequada relação custo-benefício.

Palavras-chave

Nanopartículas, quitosana, tripolifosfato de sódio, alginato de sódio, ecotoxicologia, embrião, zebrafish, dimetoato, neurotoxicidade.

ABSTRACT

Organophosphate insecticides such as dimethoate are the most widely used insecticide group in the world and are also widely used in Brazil. Due to the high potential for contamination of water bodies and the promotion of neurotoxic effects, dimethoate poses a threat to human health and the environment. The use of biocompatible and biodegradable nanocarriers in pesticide formulation can improve environmental protection. The development of formulations with sustained release of pesticides is an innovative alternative in the control of agricultural pests, increasing their effectiveness and reducing their environmental impact. In this study, the organophosphate dimethoate insecticide was encapsulated using the sodium/chitosan tripolyphosphate (TPP/CS) and sodium/chitosan alginate (ALG/CS) system. Nanoparticles were characterized by different techniques. Encapsulation efficiency was also verified. Nanoparticle toxicity was also evaluated in comparison with technical (DMT) and commercial (DMC) formulations in embryos and fish larvae. For this, lethality, behavior and enzymatic activity parameters were evaluated in *Danio rerio* (zebrafish) embryos exposed to commercial and technical nanoencapsulated dimethoate formulations. The TPP/CS system presented good colloidal and physicochemical characteristics. The encapsulation efficiency of dimethoate was $99.3 \pm 0.32 \%$, remaining stable for at least 90 days. The results indicate that, although the association of dimethoate with TPP/CS nanoparticles is a good alternative for the use of this active ingredient, it caused the death of zebrafish embryos even in the absence of insecticide. While dimethoate nanoencapsulation has the potential to improve crop productivity, the TPP/CS nanoparticle formulation will need to be re-evaluated to be environmentally safe. In view of these facts, ALG/CS polymeric nanoparticles were synthesized and characterized by the ionic gelation method for sustained release of the insecticide dimethoate. The ALG/CS nanocarrier system showed good colloidal stability and encapsulation efficiency of 74.8% . Tests performed with zebrafish embryos and larvae indicated that incorporation of dimethoate into ALG/CS nanoparticles increased their LC50-96 h (mg.L^{-1}) by 61.5% , indicating a decrease in their toxicity when compared to the formulation. Toxic effects on embryolarval development occurred predominantly at the highest concentrations tested after exposure to DMC, followed by DMT. ALG/CS nanoparticle did not affect larvae behavior, but increased AChE inhibition in relation to the technical and commercial dimethoate formulations. In this paper, zebrafish has been shown to be a good model for studying environmental exposures to nanopesticides and can be used as a screening tool to determine the risks associated with exposure of these compounds, especially

in the early stages of development. Although nanoparticles have potential use in agricultural crops, it is important that more work be done under relevant environmental conditions so that this system can be commercially used safely and cost-effectively.

Keywords

Nanoparticles, chitosan, sodium tripolyphosphate, sodium alginate, ecotoxicology, embryo, zebrafish, dimethoate, neurotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura química do inseticida e acaricida organofosforado dimetoato.....	21
CAPÍTULO I	
Figura 1. Estrutura química da quitosana. Esta figura representa o número de unidades monoméricas que se repetem de acordo com o tamanho da cadeia.....	26
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de síntese das nanopartículas.....	28
Figura 3. Caracterização das nanopartículas de tripolifosfato de sódio/quitosana sem (NP) e com dimetoato (NPDM) em função do tempo de armazenamento (0 a 90 dias).....	33
Figura 4. Curva de estabilidade do dimetoato P.A. nas concentrações de 0,5 a 12 µg/mL em meio para embrião de zebrafish.....	34
Figura 5. Alterações morfológicas embrionárias e larvais encontradas na avaliação da toxicidade de dimetoato grau técnico (DMT) em embriões de zebrafish - <i>FET Test</i>	35
CAPÍTULO II	
Figura 1. Representação do modelo “egg box” (caixa de ovo).	45
Figura 2. Representação da interação entre o alginato com íons Ca ²⁺ (A) e quitosana B).....	45
Figura 3. Estabilidade das nanopartículas de alginato de sódio/quitosana com (NP) e sem dimetoato (NPDM) avaliadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) nos tempos 0, 15 e 30 dias. São apresentados os dados obtidos em função do tempo: A) tamanho (nm); B) índice de polidispersão (PDI); C) potencial zeta (mV); D) % intensidade (PDI) para NP e (E) % intensidade (PDI) para NPDM.....	50
Figura 4. Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM).....	51
Figura 5. Valores do tamanho (nm) e concentração de nanopartículas (partículas.mL ⁻¹) com dimetoato (NPDM) em meio para embrião de zebrafish (U.S.EPA, 2002) em 0 e 24 h (Figura A) e 24 e 96 h (Figura. B).....	52

Figura 6.	Valores do tamanho (nm) das nanopartículas de alginato de sódio/quitosana com dimetoato não encapsulado (NP_DM) em meio para embrião de zebrafish (U.S.EPA, 2002), obtidos pela técnica NTA nos tempos 0, 2 e 4 h.	53
Figura 7.	Ensaio de cinética de liberação (%) do ativo pelas nanopartículas. A) Perfil de liberação das nanopartículas com dimetoato (n=3, pH 4,9, 25 °C). B) Perfil de liberação das nanopartículas com dimetoato ajustado pelo modelo matemático de Korsmeyer-Peppas.....	54
Figura 8.	Concentração letal média CL ₅₀ (mg.L ⁻¹) para 50 % dos organismos expostos a diferentes tratamentos durante 96 h. Os grupos avaliados foram: nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM); nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM); dimetoato técnico (DMT) e dimetoato comercial (DMC). (n=24/concentração testada).....	55
Figura 9.	Comprimento das larvas (mm) após 96 h de exposição em diferentes concentrações: 0, CL ₁₀ , CL ₂₀ , CL ₃₀ , CL ₄₀ e CL ₅₀ – mg.L ⁻¹) de nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM); nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM); dimetoato técnico (DMT) e dimetoato comercial (DMC).....	57
Figura 10.	Alterações morfológicas embrionárias e larvais encontradas na avaliação da toxicidade de zebrafish - FET <i>Test</i> (OECD 236, 2013). São expostas fotografias representativas de alguns dos efeitos observados nos organismos de cada grupo testado.....	60
Figura 11.	Avaliação da atividade específica da enzima acetilcolinesterase (AChE) de larvas de zebrafish após 96 h de exposição a diferentes concentrações: 0, CL ₁₀ , CL ₂₀ , CL ₃₀ , CL ₄₀ e CL ₅₀ – mg.L ⁻¹) de nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM); nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM); dimetoato técnico (DMT) e dimetoato comercial (DMC).....	61
Figura 12.	Avaliação de velocidade (mm/s) de natação de larvas de zebrafish após 96 h de exposição a diferentes concentrações: 0, CL ₁₀ , CL ₂₀ , CL ₃₀ , CL ₄₀ e CL ₅₀ – mg.L ⁻¹) de nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM); nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM); dimetoato técnico (DMT) e dimetoato comercial (DMC).....	62

Figura 13. Avaliação de distância percorrida (mm) de larvas de zebrafish após 96 h de exposição a diferentes concentrações: 0, CL₁₀, CL₂₀, CL₃₀, CL₄₀ e CL₅₀ – mg.L⁻¹) de nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM); nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM); dimetoato técnico (DMT) e dimetoato comercial (DMC).....

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Valores do tamanho (nm), PDI e potencial zeta (mV) nos tempos 0, 15 e 30 dias para as nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM)..... 30
- Tabela 2.** Valores do tamanho (nm) e concentrações de partículas (partículas.mL⁻¹) para NPDM nos tempos 0 e 96 h em meio para embrião de zebrafish (U.S.EPA, 2002)..... 35

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Valores do tamanho (nm), PDI e potencial zeta (mV) nos tempos 0, 15 e 30 dias para as nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM)..... 51
- Tabela 2.** Valores do tamanho (nm) e concentrações de partículas (partículas.mL⁻¹) para NPDM nos tempos 0 e 96 h em meio para embrião de zebrafish (U.S.EPA, 2002)..... 52
- Tabela 3.** Valores do tamanho (nm) e concentração (partículas.mL⁻¹) obtidos pela técnica NTA para NP_DM, bem como valores de PDI (técnica DLS) em meio para embrião de zebrafish (U.S.EPA, 2002)..... 54
- Tabela 4.** Concentração letal média CL₅₀ (mg.L⁻¹) para 50, 40, 30 20 e 10 % dos organismos expostos a diferentes tratamentos durante 96 h para os grupos: nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM); nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM); dimetoato técnico (DMT) e dimetoato comercial (DMC)..... 56
- Tabela 5.** Avaliação da toxicidade aguda em embriões de zebrafish (% de taxa de eclosão, mortalidade e alterações morfológicas) após 4 dias de exposição (96 h). Os grupos expostos foram NP, NPDM, NP_DM, DMT e DMC nas concentrações CL₁₀, CL₂₀, CL₃₀, CL₄₀ e CL₅₀ – mg.L⁻¹..... 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- DM:** Dimetoato
ACh: Acetilcolina
AChE: Enzima acetilcolinesterase
ACR: razão aguda-crônica
AFM: Microscopia de Força Atômica
ALG/CS: Nanopartículas de alginato de sódio/quitosana
BChE: Butirilcolinesterase
CAT: Enzima Catalase
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CL₁₀: Concentração letal 10 %
CL₂₀: Concentração letal 20 %
CL₃₀: Concentração letal 30 %
CL₄₀: Concentração letal 40 %
CL₅₀: Concentração letal média
DLS: *Dynamics Light Scattering*
DMC: Dimetoato comercial
DMT: Dimetoato grau técnico
dpf: dias após a fertilização
FET: *Fish Embryo Acute Toxicity Test*
GABA: Ácido Gama-Aminobutírico
GST: Enzima Glutathione S-Transferase
HPI: Eixo hipotálamo-hipófise-interrenal
hpf: horas após a fertilização
KW: Kruskal-Wallis
LPO: Enzima Lipoperoxidase
NM: Nanomaterial
NP (Capítulo I): Nanopartículas de tripolifosfato de sódio/quitosana sem dimetoato
NP (Capítulo II): Nanopartículas de alginato de sódio/quitosana sem dimetoato
NPDM (Capítulo I): Nanopartículas de tripolifosfato de sódio/quitosana com dimetoato
NPDM (Capítulo II): Nanopartículas de alginato de sódio/quitosana com dimetoato
NTA: *Nanoparticle Tracking Analysis*
OECD: *Organisation for Economic Co-operation and Development*
PDI: Índice de polidispersão
t_{1/2}: Meia-vida
TPP/CS: Nanopartículas de tripolifosfato de sódio/quitosana
TPP: Tripolifosfato de sódio

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	22
1.1 Contaminação ambiental por agroquímicos.....	22
1.2 Inseticida e acaricida organofosforado dimetoato (DM).....	23
1.2.a Efeitos adversos em organismos aquáticos.....	24
1.2.b Efeitos adversos em organismos de solo.....	26
1.2.c Efeitos adversos na saúde humana.....	27
1.3 Relação entre OP – dimetoato e enzima acetilcolinesterase.....	28
1.4 Nanoencapsulação: sistemas de liberação sustentada para agroquímicos.....	32
1.5 Modelo zebrafish.....	35
1.5a Teste em embriões de zebrafish – <i>Fish Embryo Acute toxicity</i> (FET) <i>Test</i>	36
2. OBJETIVOS.....	41
CAPÍTULO I. Preparo e avaliação de sistema nanocarreador de tripolifosfato de sódio/quitosana para dimetoato.....	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1 Materiais.....	48
2.2 Manutenção dos animais.....	48
2.3 Preparo das nanopartículas de tripolifosfato de sódio/quitosana.....	48
2.4 Caracterização e estabilidade das formulações.....	49
2.5 Determinação de dimetoato em meio salino de embrião de zebrafish por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV).....	50

2.6	Ensaio com embriões de zebrafish – <i>Fish Embryo Acute toxicity</i> (FET) <i>Test</i>	51
3.	RESULTADOS.....	52
3.1	Caracterização físico-química e estabilidade das nanopartículas de tripolifosfato de sódio/quitosana.....	52
3.2	Determinação da estabilidade do dimetoato P.A. e técnico em meio salino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV).....	54
3.3	Ensaio de toxicidade com embriões de zebrafish – <i>Fish Embryo Acute toxicity</i> (FET) <i>Test</i>	55
4.	DISCUSSÃO.....	57
	CAPÍTULO II. Avaliação toxicológica de sistema nanocarreador de alginato de sódio/ para dimetoato em embriões de zebrafish	59
	RESUMO.....	60
	ABSTRACT.....	61
1.	INTRODUÇÃO.....	62
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.1	Materiais.....	65
2.2	Manutenção dos animais.....	65
2.3	Preparo e caracterização das nanopartículas de alginato de sódio/quitosana sem (NP) e com dimetoato (NPDM).....	65
2.4	Caracterização físico-química das nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM) em meio de embrião.....	67
2.4.1	Análise de rastreamento - <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (NTA).....	67
2.4.2	Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta.....	67
2.4.3	Acompanhamento da estabilidade de sistemas nanoparticulados (pH).....	67
2.4.4	Eficiência de encapsulação.....	67
2.4.5	Microscopia de força atômica (AFM)	68
2.5	Bioensaios.....	68

2.5.1	Tamanho e concentração das nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM) em meio de embrião.....	68
2.5.2	Ensaio com embriões de zebrafish – <i>Fish Embryo Acute toxicity</i> (FET) <i>Test</i>	68
2.5.3	Análise de atividade específica da enzima acetilcolinesterase (AChE).....	69
2.5.4	Ensaio para avaliação de biomarcadores comportamentais em larvas de zebrafish (velocidade e distância percorrida).....	70
2.5.5	Análise estatística.....	70
3.	RESULTADOS.....	70
3.1	Caracterização das nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM) em meio de embrião.....	70
3.2	Tamanho e concentração das nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM) em meio de embrião.....	73
3.3	Ensaio de cinética de liberação.....	75
3.4	Ensaio com embriões de zebrafish – <i>Fish Embryo Acute toxicity</i> (FET) <i>Test</i>	76
3.4.1	Avaliação da mortalidade de cálculo da CL ₅₀	76
3.4.2	Alterações no comprimento da larva.....	77
3.4.3	Alterações morfológicas e na taxa de eclosão.....	78
3.4.4	Avaliação da atividade específica da enzima acetilcolinesterase (AChE).....	82
3.4.5	Ensaio para avaliação de biomarcadores comportamentais em larvas de zebrafish (velocidade de natação e distância percorrida).....	82
4.	DISCUSSÃO.....	84
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	89
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
	ANEXO I.....	111
	ANEXO II.....	112

DECLARAÇÃO DE QUE A DISSERTAÇÃO OU TESE NÃO INFRINGE
OS DISPOSITIVOS DA LEI Nº 9610/98, NEM O DIREITO AUTORAL
DE QUALQUER EDITORA.....

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Contaminação ambiental por agroquímicos

A água é um recurso natural vital para os seres humanos, sendo também indispensável para todos os ecossistemas. Além disso, as inúmeras fontes de produção, uso e descarte de numerosos produtos químicos comumente empregados em diversas atividades como medicina, indústria e agricultura levaram à ocorrência generalizada de poluentes orgânicos. A descarga descontrolada de tais compostos no ambiente contribui para o seu acúmulo nos compartimentos aquáticos (Souza et al., 2018).

A contaminação ambiental originada por agrotóxicos, que pode decorrer de sistemas intensivos agrícolas, pode causar efeitos negativos aos recursos naturais, à saúde humana, além de trazer problemas para a exploração agrícola. Vários inseticidas, herbicidas, fungicidas, etc. estão sendo usados intensivamente na agricultura que podem atingir e contaminar fontes de água. Os resíduos destes produtos chegam ao meio aquático por escoamento superficial. Este fato leva à preocupação quanto ao seu impacto nas populações e na qualidade ambiental (Guilherme et al., 2014; Xu et al., 2016). A exposição de organismos não-alvo pode ocorrer diretamente, quando o pesticida está na água ou indiretamente, quando o seu escoamento causa pulsos de contaminação (Rosa et al., 2017). Os peixes servem como bioindicadores importantes para a contaminação aquática, uma vez que respondem rapidamente à contaminação ambiental. A exposição a longo prazo de peixes induz vários distúrbios fisiológicos e disfunções comportamentais (Srivastava et al., 2016). Os riscos devido às perturbações ambientais são de difícil predição devido à complexidade das interações e variabilidade dos ecossistemas e seus organismos, sendo necessária a compreensão da interação entre os insumos agrícolas como os agrotóxicos e os ecossistemas para assegurar o uso sustentável destes compostos no ambiente (Cruzeiro et al., 2016). Neste sentido, experimentos realizados em condições de laboratório podem simular diferentes cenários da poluição para o entendimento de mecanismos de toxicidade para estes compostos.

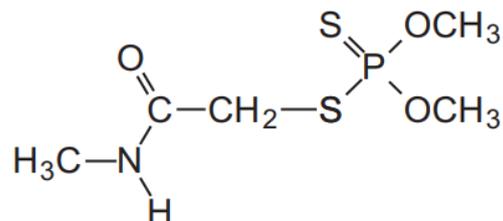
A poluição aquática por vários contaminantes, como os pesticidas, é especialmente preocupante no Brasil, que é um dos principais produtores agrícolas do mundo. O mercado brasileiro de agrotóxicos expandiu-se em um forte ritmo de crescimento, com progressivo aumento do consumo e intensificação do uso de agrotóxicos no país, o que coloca o Brasil como maior consumidor mundial desde 2008 (Santana et al., 2013; Rigotto et al., 2014).

1.2 Inseticida e acaricida organofosforado dimetoato (DM)

No Brasil, uma das classes de agrotóxicos as quais os humanos estão expostos através da dieta é a dos inseticidas organofosforados (OP) e, entre eles, o dimetoato é um dos compostos organofosforados mais detectados em programas de monitoramento de avaliação de risco dietético (Jardim et al., 2018). Além disso, devido à persistência do dimetoato nas culturas e no solo, a maior parte da população está exposta cronicamente a baixas doses de dimetoato através de, por exemplo, alimentos e água potável (Mesallam et al., 2018). O dimetoato é também frequentemente encontrado em diferentes regiões do mundo como Espanha e na região marítima do Canadá (Souza et al., 2018). No ambiente, as diferenças na sua meia-vida ($t_{1/2}$) dependem da matriz da cultura, das condições agrícolas e do clima (Pan et al., 2015).

O inseticida e acaricida sistêmico do grupo químico organofosforado dimetoato (O,O-dimethyl S-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate), pertence à classe dos inseticidas, age por contato e via sistêmica, sendo muito utilizado em culturas de algodão, citrus, maçã, rosa, tomate e trigo. A estrutura química do dimetoato é mostrada na Figura 1.

Figura 1. Estrutura química do inseticida e acaricida organofosforado dimetoato.



O dimetoato é bastante utilizado em cultivos semi-perenes como, por exemplo, na bacia hidrográfica do igarapé Cumarú. Este composto possui elevado potencial de contaminação da água subterrânea, devido principalmente, à sua mobilidade e baixa retenção (Lima et al., 2007). A meia-vida do dimetoato foi de até 74 dias em águas superficiais da bacia do rio Danúbio, em pH 8 a 25 °C. Embora a meia-vida dependa da fonte de água e das condições experimentais, a degradação dos organofosforados geralmente é maior em pH elevado e temperatura mais alta (Druzina e Stegu, 2007). Em campos de arroz, o transporte pelo solo é rápido, atingindo profundidades de 20 a 40 cm cerca de 6 h após a aplicação (Anyusheva et al., 2016). No ambiente, a hidrólise representa a principal via de degradação do

dimetoato em condições alcalinas. Ele é degradado por microrganismos em condições anaeróbias e tem como principal produto de degradação o ometoato (Van Scoy et al., 2016).

Em organismos-alvo como os afídeos, já foi observada a desintoxicação de inseticidas organofosforados como o dimetoato pelo mecanismo de resistência metabólica das enzimas esterase e pelo mecanismo de modificação da enzima acetilcolinesterase (AChE). O desenvolvimento da resistência a estes inseticidas foi causado pela sua aplicação prolongada em pomares convencionais (Tamaš et al., 2015). Múltiplas mutações localizadas no sítio ativo da enzima são responsáveis pela insensibilidade da AChE ao dimetoato em populações de campo de *Aphis Gossypii* que apresentam resistência ao dimetoato (Lokeshwari et al., 2016).

1.2.a Efeitos adversos em organismos aquáticos

Características ambientais como a presença de matéria orgânica e cálcio, são capazes de alterar a capacidade de reabsorção e toxicidade de organofosforados em sistemas aquáticos. Por exemplo, Meinelt et al. (2004) mostraram aumento na sobrevivência de peixes expostos ao triclorfom em altas concentrações de cálcio que foi diminuída na presença conjunta com a matéria orgânica. O dimetoato também pode se ligar a outros compostos presentes no ambiente como nano-ZnO e apresentar alterações em sua toxicidade. Nesse contexto, as albuminas de soro desempenham um papel importante na toxicidade sinérgica de nano-ZnO e dimetoato em mamíferos (Yan et al., 2017).

Os organofosforados podem ocasionar vários efeitos em organismos não-alvo, os quais podem levar a problemas na reprodução e na sobrevivência destas espécies. Assim, por exemplo, eles promovem desregulação endócrina (Santos da Rosa et al., 2017). De fato, o monocrotofós (inseticida organofosforado) é um potencial estrogênio ambiental e afeta a síntese e a conversão de esteróides sexuais em peixes dourados machos (Tian et al., 2017).

Alterações na histopatologia e no nível de Acetilcolinesterase (AChE) são bons biomarcadores e podem ser usados com sucesso para detectar a exposição a pesticidas organofosforados em peixes (Doherty et al., 2016). Organismos aquáticos como o salmão *Oncorhynchus kisutch*, apresentaram inibição da AChE cerebral sob exposição à mistura de pesticidas organofosforados e um aumento na neurotoxicidade a temperaturas elevadas da água (Laetz et al., 2014).

O dimetoato também pode contaminar tanques de piscicultura. Assim, este composto foi encontrado em amostras de fígado de Tilápia-do-Nilo (*Oreochomis niloticus*), coletadas em frigoríficos de dois municípios do Estado do Paraná (Rodrigues et al., 2009), alterando o comportamento de organismos aquáticos (Qayoom et al., 2016; Van Scoy et al., 2016).

Também em caracóis de água doce, o dimetoato induziu estresse oxidativo e alterou parâmetros bioquímicos (Banaee et al., 2019).

Dogan e Can (2011) avaliaram os efeitos do dimetoato em parâmetros bioquímicos, hematológicos e comportamentais. Foram avaliados em *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) expostos às concentrações subletais de 0,0735, 0,3675 e 0,7350 mg.L⁻¹, para 5, 15 e 30 dias. O peixe mostrou anormalidades comportamentais tais como perda de equilíbrio, natação errática e convulsão. Por sua vez, a exposição aguda experimental ao dimetoato de *Heteropneustes fossilis*, bagre de água doce, causou alterações comportamentais com aumento dos movimentos operculares, natação lenta, apática e anormal, perda de fluabilidade e tetania muscular. As CL₅₀ de dimetoato para o *H. fossilis* em vários períodos de exposição foram 15,92 mg.L⁻¹ em 24 h; 13,42 mg.L⁻¹ em 48 h; 12,39 mg.L⁻¹ em 72 h e 11,34 mg.L⁻¹ em 96 h de exposição (Srivastava et al., 2010).

O dimetoato é altamente tóxico para a carpa *Cyprinus carpio*, afetando gravemente sua fisiologia e comportamento (Singh et al., 2010). Dogan et al. (2011) relataram efeitos clastogênicos no fígado e nas células cerebrais da truta arco-íris exposta ao dimetoato. Ele também tem efeitos adversos sobre os parâmetros bioquímicos e a atividade enzimática em órgãos vitais, incluindo fígado, brânquias e rins em *Cyprinus carpio*. Os peixes que foram expostos ao dimetoato em concentrações subletais (16 e 32 mg.L⁻¹) apresentaram danos oxidativos e alteração nas atividades de outras enzimas do fígado e rim (Shadegan et al., 2018).

O dimetoato também predispõe à geração de estresse oxidativo, diminuindo a capacidade antioxidante total dos tecidos e aumentando a oxidação de proteínas e lipídios (Astiz et al., 2009; Jallouli et al., 2016). Nesse sentido, foi observado que o dimetoato induz a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células nervosas *in vitro* (Astiz et al., 2014). Em testes em cultura celular (Martínez-Morcillo et al., 2019), o dimetoato induziu diminuição na viabilidade celular após 96 h de incubação. O agrotóxico induziu um aumento leve, mas estatisticamente significativo, na produção de ROS na mitocôndria. Este inseticida ainda afeta a atividade enzimática pela redução da atividade da catalase e dos níveis de glutatona e aumenta a peroxidação lipídica nas brânquias e fígado de zebrafish (Ansari e Ansari, 2014).

Além da inibição da AChE, o dimetoato induz a danos oxidativos em peixes (Shadegan e Banaee, 2018). Estudos dos efeitos nas brânquias e no fígado de zebrafish, mostrou efeitos dependentes da dose e do tempo de exposição do dimetoato na atividade da catalase, glutatona e peroxidação lipídica (Ansari et al., 2014). Além da AChE, o dimetoato

inibe enzimas das fases I e II de biotransformação de xenobióticos que impacta potencialmente a função fisiológica e a capacidade dos animais de biotransformar outros contaminantes, cuja expressão estaria sujeita a variações sazonais (Gunderson et al., 2018) e a influência de fatores, como a idade do peixe, o impacto do uso de solventes orgânicos e o tempo de exposição (Anselmo et al., 2018; Kühnert et al., 2017).

De acordo com o Serviço Nacional de Pesca Marítima Americano (*American National Fisheries Service*) o dimetoato, entre outros OP, estaria afetando populações reprodutivamente isoladas de salmão do Pacífico através da inibição da atividade da acetilcolinesterase cerebral e poderiam comprometer a existência de mais espécies ou ainda modificar o seu habitat por afetar a disponibilidade de invertebrados aquáticos usados como alimento pelos peixes (Aslund et al., 2017).

Embora a maioria dos testes de toxicidade aquática com o dimetoato concentre-se em organismos como peixes, caracóis e caranguejos, há alguns dados em outros organismos. Assim, o dimetoato pode afetar o comportamento reprodutivo e de alimentação de rotíferos tanto durante quanto após a exposição (Guo et al., 2012; Chen et al., 2014; Chen e Guo, 2015; Guo e Chen, 2015). Em *Artemia salina*, os náuplios são sensíveis à inibição da AChE pelo dimetoato por 24 h em doses de 1 a 6 mg.L⁻¹ e a eclosão foi prejudicada em doses de 3 a 6 mg.L⁻¹ (Baek et al., 2015).

1.2.b Efeitos adversos em organismos de solo

Por sua vez, os resultados obtidos em *Porcellionides pruinosus* também mostraram que a exposição ao dimetoato provoca toxicidade, não só pela inibição da enzima AChE, como também através de estresse oxidativo, devido à alteração dos níveis de GST, CAT ou LPO (Ferreira et al., 2015), bem como alteração das atividades de algumas enzimas biomarcadoras tanto em minhocas (Velki et al., 2014), quanto em gafanhotos (Augustyniak et al., 2005). Interessantemente, em testes com collembolas, a sobrevivência após a exposição ao dimetoato foi maior à temperatura de 26 °C do que em 20 °C (Jegade et al., 2017). Estudos recentes também têm focado os efeitos subletais em anfíbios em diferentes fases do desenvolvimento. Assim, foram observados letargia e falta geral de movimento em rãs macho e fêmea (Fort et al., 2018).

1.2.c Efeitos adversos na saúde humana

A avaliação da exposição a pesticidas é uma questão importante de saúde ocupacional e pública (Aprea, 2012). Avaliações indicam que a exposição da dieta a curto prazo aos OP como o dimetoato e ometoato podem apresentar um problema de saúde pública (Sieke et al., 2018). As crianças são particularmente vulneráveis à absorção e efeitos adversos de pesticidas devido a fatores de desenvolvimento, dieta e fisiologia. A exposição pode ocorrer por ingestão, inalação ou contato cutâneo e pode ocorrer em doses mais altas que os adultos devido à maior ingestão de alimentos ou líquidos em relação ao peso. Em particular, os efeitos potenciais da exposição a pesticidas no feto e nas crianças em desenvolvimento são de interesse da sociedade e das agências reguladoras. Sinha e Banda (2018) observaram que apesar da concentração de metabólitos de pesticidas em crianças do sexo masculino não ter sido significativamente diferente daquela do sexo feminino na faixa etária de 6 a 10 anos, na faixa de 11 a 15 anos as crianças do sexo feminino exibiam níveis significativamente mais altos de metabólitos de pesticidas.

Evidências indicam que a exposição pré-natal em níveis baixos está colocando as crianças em risco de déficits cognitivos e comportamentais e de distúrbios do neurodesenvolvimento. Vários estudos relatam que a exposição a OPs está ligada a problemas comportamentais e desenvolvimento mental em crianças, duração da gestação, desenvolvimento infantil, alterações hormonais, redução da qualidade espermática, obesidade e saúde cardíaca. Nesse sentido, um estudo recente indica que a prevalência de epilepsia diagnosticada em hospitais foi mais alta em áreas onde foi feito um maior uso de pesticidas na agricultura intensiva em estufas (Requena et al., 2018).

Os estudos epidemiológicos em diferentes países, abrangendo diversas populações em ambientes urbanos e agrícolas, associaram a exposição do OP durante o desenvolvimento fetal ao menor desenvolvimento cognitivo, comportamental e social das crianças. Geralmente, os níveis de exposição nesses estudos são muito baixos para induzir depressão mensurável da colinesterase em adultos. As associações mais fortes ocorrem após exposições pré-natais e os resultados associados à exposição de pesticidas OP ao feto incluem reflexos primitivos anormais em recém-nascidos, atrasos mentais e motores entre pré-escolares e diminuições na memória operacional e visual, velocidade de processamento, compreensão verbal, raciocínio perceptivo e QI entre crianças em idade escolar. Consistente com a ampla gama de resultados relatados em estudos em humanos, a toxicidade dos pesticidas OP no início da vida do desenvolvimento neurológico foi confirmada em estudos experimentais em animais (Hertz-Picciotto et al., 2018; Katsikantami et al., 2019).

Mais ainda, entre trabalhadores agrícolas com atividade enzimática (AChE) inibida, pode ocorrer quadros de depressão com atitudes suicidas, ansiedade generalizada e depressão-ansiedade combinadas (Serrano-Medina et al., 2019). Por sua vez, os restos de pesticidas contidos em resíduos de embalagens agroquímicas mesmo após uma limpeza padronizada também são uma fonte de risco não controlado para a saúde humana, uma vez que são matéria-prima para a indústria de reciclagem de plásticos (Eras et al., 2017).

Assim, a exposição ocupacional e ambiental a pesticidas pode induzir efeitos nocivos à saúde humana, promovendo o desenvolvimento de uma ampla gama de distúrbios. A alta toxicidade dos OP para espécies de mamíferos continua sendo uma grande preocupação. Existem 2 tipos principais de neurotoxicidade associados à exposição aguda ao OP: toxicidade colinérgica aguda e, em alguns casos, atraso na neurotoxicidade. Outro tipo de toxicidade, a síndrome intermediária, foi descrita em humanos após envenenamento grave por OP. Esta síndrome consiste principalmente em fraqueza muscular e se desenvolve quando os sintomas colinérgicos agudos desaparecem, seu mecanismo exato não é conhecido (Costa et al., 2018; Casida, 2017). Alguns dos mecanismos hipotéticos mais recentes são estresse oxidativo e modificações epigenéticas, porém os efeitos biológicos parecem ser modulados principalmente pela ocorrência de polimorfismos genéticos (Teodoro et al., 2019).

Portanto, a avaliação de risco do impacto dos pesticidas na saúde humana ou no ambiente não é um processo fácil e particularmente preciso devido a vários fatores como diferenças nos períodos e níveis de exposição, tipos de pesticidas usados, características ambientais das áreas onde os pesticidas são geralmente aplicados, diferentes critérios utilizados e o método de sua implementação (Damalas e Eleftherohorinos, 2011).

1.3 Relação entre OP - dimetoato e enzima acetilcolinesterase

O sistema colinérgico pode modular cognição, emoção e atividade elétrica cerebral (Cousin et al., 2005; Drews, 1975; Soreq et al., 2001; Zhang et al., 2002; Graef et al., 2011). A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor envolvido no movimento e um importante modulador de funções cognitivas, como aprendizagem e memória (Janeczek et al., 2017; Roy et al., 2017; Mladenović et al., 2018).

A ACh desempenha um papel crucial nas sinapses centrais e neuromusculares do sistema colinérgico. Ela é um importante modulador da migração neuronal durante o desenvolvimento embrionário já que muitos neurônios migram em estágios morfológicamente distintos, exigindo regulações espaciais rígidas (Theisen et al., 2018).

Na atividade muscular, a ACh é normalmente liberada dos terminais do motoneurônio e migra através da junção neuromuscular para se ligar aos receptores de ACh na membrana muscular para produzir contração muscular e, a ACh em excesso, é degradada pela AChE. A inativação dessa enzima provoca acúmulo de ACh em sinapse de nervo e junção neuromuscular, resultando em hiperativação de receptores nicotínicos e muscarínicos.

A AChE é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor ACh formando colina e ácido acético. A atividade da AChE é necessária para o correto desenvolvimento do aparelho muscular e para a proteção contra danos nas fases subsequentes (Behra et al., 2002). Teixidó et al. (2013) encontraram uma correlação moderada entre a atividade da AChE e os parâmetros morfométricos para o atraso do desenvolvimento em embriões de zebrafish. De acordo com os autores, a atividade de AChE é um marcador sensível para detectar atraso no desenvolvimento na ausência de malformação.

A inibição da AChE é o mecanismo de ação de diversos agentes tóxicos, mais especificamente organofosforados e carbamatos. A reação entre o sítio ativo da AChE e compostos organofosforados resulta na inibição da enzima, interrompendo a hidrólise da ACh, o que pode conduzir a uma inibição irreversível desta enzima (Cavalcanti et al., 2016). A inibição química da AChE resulta em hiperestimulação de receptores pós-sinápticos de ACh, o que leva a aberrações fisiológicas que vão desde comprometimento comportamental até a morte (Tilton et al., 2011).

Após a inibição da AChE por OP, podem ocorrer o envelhecimento ou a reativação espontânea da enzima, que pode ser acelerada pela adição de um nucleófilo forte como uma oxima. No entanto, a reação de reativação espontânea para a maioria dos complexos AChE-OP ocorre em pequena taxa (Hörnberg et al., 2007). A reação de reativação espontânea ocorre com carbamatos e alguns compostos organofosforados. A velocidade da reativação espontânea da AChE é variável, o que contribui para as diferenças nas toxicidades agudas entre OPs, pois o tempo de meia-vida de envelhecimento dos complexos AChE-OP é variável de minutos a horas (Cavalcanti et al., 2016).

Os OPs são considerados inibidores indiretos da colinesterase, exigindo uma biotransformação prévia. O maior grupo destes inibidores são os fosforotionatos como o dimetoato, que são convertidos em inibidores de colinesterase (isto é, ativados) por conversão no seu análogo de oxigênio (Pope, 1999). Os inseticidas fosforotionatos, após sua entrada no corpo, passam por uma reação de biotransformação, na qual o enxofre do grupo $P = S$ é substituído por oxigênio. Isso resulta na conversão dos fosforotionatos em análogos de

oxigênio (ou oxon). Os metabólitos oxon dos fosforotionatos têm sido envolvidos na neurotoxicidade colinérgica aguda associada ao envenenamento por OP.

Além disso, os metabólitos oxônicos também podem ser diretamente responsáveis pela neurotoxicidade específica destes inseticidas no organismo em desenvolvimento (Flaskos, 2012). O dimetoato tem efeitos tóxicos em organismos não-alvo após a aplicação quando é metabolizado em ometanato em animais e plantas que é aproximadamente 4 vezes mais tóxico que o dimetoato (Pan et al., 2015). Também em testes *in vitro*, pode-se supor que a biotransformação do dimetoato ocorra nas células em cultura, a fim de induzir seus efeitos nas vias intracelulares (Martínez-Morcillo et al., 2019).

O mecanismo clássico de intoxicação induzida pelo dimetoato é a inibição da AChE com um subsequente acúmulo de ACh na fenda sináptica e estimulação de receptores colinérgicos (Mesallam et al., 2018). O dimetoato provavelmente se comporta como um inibidor covalente da AChE devido às interações de seus grupos amida com a enzima (Mladenović et al., 2018). Contudo, os compostos tóxicos podem modular as atividades da acetilcolinesterase não apenas pela interação direta com a enzima, mas também pela manipulação da expressão e biossíntese da acetilcolinesterase ou degeneração das células neuronais (Kais et al., 2015).

Em peixes, estudos demonstraram mais frequentemente a presença de AChE como a isoenzima predominante entre todas as colinesterases, esta forma está localizada principalmente na membrana das células nervosas pós-sinápticas, estando envolvida no controle da neurotransmissão através da hidrólise do neurotransmissor ACh, substrato pelo qual apresenta maior afinidade. No entanto, a AChE também atua no processo de diferenciação neuronal. A butirilcolinesterase (BChE) é outra forma comum de colinesterase encontrada em peixes e pode ser encontrada principalmente no plasma sanguíneo. Sua função ainda é pouco elucidada, mas parece estar envolvida na proliferação celular. Outra isoenzima que pode ser encontrada na maioria dos organismos é a propionilcolinesterase, uma pseudocolinesterase com maior afinidade para o substrato propionilcolina (Leticia e Gerardo, 2008; Monteiro et al., 2005; Nunes, 2011; Pereira et al., 2019).

Em ensaios *in vitro*, o dimetoato foi capaz de alterar a atividade da acetilcolinesterase de homogenatos de cérebro de peixe na concentração de 190 μM (Mdegela et al., 2010). Ele produziu uma inibição de 9,3 % da atividade da AChE purificada de *Pangacius pangacius* (catfish) (Tham et al., 2014). Em *Astyanax altiparanae* (lambari), o dimetoato inibiu as atividades da AChE em amostras de cérebro e em homogeneizados musculares na concentração de 400 μM . Já em *Pterygoplichthys Pardalis (cascudo)*, o dimetoato *in vitro*

inibiu a atividade da colinesterase em amostras de cérebro na concentração de 200 μM e, em homogeneizados musculares, foi observado efeito semelhante nas concentrações de 25 e 100 Mm .

O dimetoato pode ainda causar inibição da acetilcolinesterase cerebral de 37 % (0,063 mg.L^{-1} de dimetoato) a 73 % (1 mg.L^{-1}), após 96 h de exposição em lebistes adultos (*Poeciliareticulata*), sem levar à mortalidade. Ele também ocasiona inibição dose-dependente da atividade da GST, mas não altera a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (Frasco e Guilhermino, 2002). Ainda, de acordo com Pereira et al. (2019) em *Phalloceros Harpagos* (guaru), o dimetoato não alterou a atividade colinesterásica *in vitro* do homogeneizado muscular, mas aumentou a sua atividade no homogeneizado cerebral.

Alguns estudos demonstraram que a inibição da atividade da AChE pode estar envolvida na diminuição da locomoção após exposição ao clorpirifós em larvas de zebrafish com 5 dias após a fertilização (dpf) (Richendrfer e Creton, 2015; Watson et al., 2014) e a 96 horas após a fertilização (hpf) (Jin et al., 2015). Este OP pode ocasionar redução da sobrevivência e da frequência cardíaca e ocasionar um desenvolvimento anormal, levando à curvatura da coluna e ao encurtamento das caudas nos embriões (Jeon et al., 2016). A curvatura da cauda dos peixes pode ser devida a um desenvolvimento muscular anormal induzida pela falta de hidrólise da ACh e inibição da atividade da acetilcolinesterase (Pamanji et al., 2015; Roy et al., 2017), afetando as junções neuromusculares (Couch et al., 1977).

O tempo e a duração da exposição ao desenvolvimento de inibidores de colinesterase podem influenciar a natureza dos perfis de resposta comportamental. Uma exposição precoce de organofosforados no desenvolvimento de zebrafish também pode ter consequências posteriores na vida, uma vez que observações comportamentais em adultos podem diferir das da larva. Assim é que a resposta de sobressalto de peixes adultos que foram expostos a organofosforados durante a fase de desenvolvimento, parece mais sensível do que os não expostos (Eddins et al., 2010).

Embora os OPs exerçam seus efeitos através do aumento da sinalização via receptores nicotínicos de ACh, deve-se observar que os OP mostraram ser capazes de ocasionar efeitos neurocomportamentais em baixas concentrações, as quais não reduzem significativamente a atividade da AChE (Aldridge et al., 2005; Eddins et al., 2010). Nesse sentido, Glazer et al. (2018) observaram que a exposição de embriões de zebrafish a baixas concentrações do pesticida organofosforado clorpirifós causou deficiências comportamentais a curto e a longo prazo, já que em concentrações de exposição muito baixas onde não havia efeitos visíveis na atividade larval, o comportamento do adulto ainda era fortemente afetado.

Diante do exposto, a análise da inibição da AChE é uma ferramenta útil para avaliar seu efeito na biota aquática, mesmo quando os compostos químicos não são mais detectáveis no ambiente (Nunes e Resende, 2017; Vieira et al., 2017).

1.4 Nanoencapsulação: sistemas de liberação sustentada para agroquímicos

A agricultura, a alimentação e os recursos naturais fazem parte de desafios como a sustentabilidade. Contudo, ao redor de 90 % dos pesticidas escoam para o meio ambiente no processo de aplicação e permanecem em produtos agrícolas como resultado do uso da formulação convencional de pesticidas e suas desvantagens - uso de solventes, baixa dispersão, etc. Por outro lado, nos últimos anos, o uso da nanotecnologia para criar novas formulações mostrou um grande potencial para melhorar a eficácia e a segurança dos pesticidas (Zhao et al., 2018).

Os interesses do uso da nanotecnologia na agricultura incluem aplicações específicas como nanofertilizantes e nanopesticidas (Prasad et al., 2017). Fórmulas nanoencapsuladas utilizam a grande diversidade de nanomateriais (NM) disponíveis, incluindo polímeros, lipídios, sílica mesoporosa, argila e outros materiais. Além da composição, o tamanho é outro fator relevante nas formulações de pesticidas, dado que o tamanho das nanopartículas é um fator determinante em seu comportamento coloidal e aumento da área superficial relativa (Kah et al., 2013; Nuruzzaman et al., 2016; Slattery et al., 2019).

Os produtos agrícolas que contêm NM que alteram o perfil de risco dos ingredientes ativos prometem muitos benefícios em relação aos produtos convencionais. Esses benefícios podem incluir características aprimoradas de formulação, facilidade de aplicação, melhor direcionamento a espécies de pragas, maior eficácia, menores taxas de aplicação e maior segurança ambiental (Walker et al., 2018; Yan et al., 2018).

Os nanopesticidas também podem diminuir as perdas de ingredientes ativos por melhorar a absorção e/ou biodisponibilidade e, em consequência, a sua permeação nos tecidos dos organismos-alvo entre outros. Estas propriedades permitem diminuir a dose de pesticidas e alcançar maior controle de pragas sem tratamentos repetidos (Kumar et al., 2017). Desta forma, a nanotecnologia pode melhorar a produtividade das culturas e diminuir os efeitos prejudiciais ao ambiente (Khandelwal et al., 2016).

Contudo, os possíveis efeitos prejudiciais sobre o ambiente destes NM ainda não estão bem compreendidos. A avaliação do destino e do comportamento dos pesticidas durante e após a sua aplicação no ambiente é importante para conhecer o seu potencial impacto nos ecossistemas (Kah et al., 2018). Por exemplo, uma maior biodisponibilidade poderia envolver

um efeito maior sobre os organismos não-alvo. Da mesma forma, uma menor degradação dos nanopesticidas e/ou efeitos sinérgicos também podem resultar em toxicidade inesperada e/ou danos a organismos não-alvo (Villaverde et al., 2018). Considerando a complexidade e a variabilidade da química da água natural, ainda não estão adequadamente estabelecidas as implicações de dados obtidos em laboratório em relação aos sistemas ambientais reais. A dissolução das partículas no meio aquático é dependente das propriedades físico-químicas intrínsecas do material (tamanho de partícula, área superficial, composição química, etc), e dos parâmetros ambientais (pH, temperatura, matéria orgânica, etc.). Assim, existe uma grande demanda de estudos que avaliem os possíveis efeitos tóxicos e ambientais – especialmente o aquático, da exposição aos NM (Chowdhury et al., 2013; Hu e Zhou, 2013; Hou et al., 2015). Em relação aos peixes, a sensibilidade aos efeitos de um nanomaterial (NM) pode ser consideravelmente maior para certas espécies e fases da vida (Monikha et al., 2018).

Muitos nanopesticidas podem entrar no mercado em um futuro próximo. Tal como para qualquer outro produto regulamentado, os requerentes que solicitam a aprovação do mercado têm de demonstrar a utilização segura desses novos produtos sem representar riscos de segurança indevidos para o consumidor e o ambiente. Desta forma, marcos regulatórios estão se tornando cada vez mais importantes a fim de abordar e gerenciar adequadamente os riscos potenciais da nanotecnologia. Estes marcos devem ser discutidos em colaboração entre países de todo o mundo para trocar informações e assegurar um elevado nível de proteção dos seres humanos e do ambiente (Amenta et al., 2015). Portanto, há necessidade do desenvolvimento de melhores abordagens alternativas para facilitar o estudo dos possíveis perigos para o desenvolvimento responsável de nanotecnologias já que os riscos para o meio ambiente e à saúde humana de muitos NM não são totalmente conhecidos (Arora et al., 2012; Beddoes et al., 2015; Sharifi et al., 2012; Schultz et al., 2014).

É preciso disponibilizar aos legisladores um conjunto de ferramentas para a tomada de decisão quanto à segurança ambiental a curto e médio prazo, através da análise de dados, além de desenvolver novas estratégias de ensaio adaptadas às características dos NM (Hristozov et al., 2012). Os agentes regulatórios estão cada vez mais interessados no potencial de toxicidade e em outros riscos associados aos NM ao longo das diferentes fases do ciclo de vida de um produto. Neste cenário, os testes de ecotoxicidade são instrumentos utilizados na avaliação de riscos ambientais para responder a perguntas sobre os potenciais perigos intrínsecos e os riscos que possam ser caracterizados pela comparação de avaliações de perigo e de exposição.

As autoridades reguladoras de NM precisam de dados e resultados experimentais sistemáticos e consistentes, juntamente com protocolos experimentais bem definidos.

Considerando que um melhor entendimento e refinamento no estágio de formulação do problema de avaliação de risco, o desenvolvimento de indicadores de risco de NM pode ser um aliado no processo decisório para sua liberação para consumo humano ou aplicação ao ambiente. No caso ambiental, os indicadores a serem utilizados estão relacionados aos potenciais riscos associados à persistência e bioacumulação do nanomaterial no meio ambiente, contaminação do solo e da água devido à sua dispersão quando aplicados na agricultura (Miller e Wickson, 2015). Levando em conta que os dados de pesquisa de NM que estão sendo obtidos usando diferentes procedimentos experimentais, os requisitos atuais para construir conjuntos de dados confiáveis deverão incluir dados obtidos usando protocolos padrão que permitam examinar a sua precisão e adequação (Villaverde et al., 2018).

Para avaliação de risco, geralmente segue-se os procedimentos estabelecidos para os produtos químicos convencionais. Contudo, em laboratório, a monitorização da estabilidade e consistência dos NMs durante o teste é um dos maiores desafios nas avaliações de nanoecotoxicidade, pois depende de maior número de parâmetros físico-químicos que os agroquímicos convencionais. Para a interpretação e comparabilidade dos dados é necessária uma padronização dos métodos de dispersão e conhecimento da cinética de dissolução dos NM. Conforme recomendado pela OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*), a concentração da solução teste deve ser mantida dentro de $\pm 20\%$ das concentrações nominais. A orientação da OECD descreve que a variação na concentração de substância superior a $\pm 20\%$ deve ser abordada usando procedimentos experimentais modificados, como uma pequena mudança no pH ou estratégias de monitoramento (Hund-Rinke et al., 2015; OECD 210, 2013; Petersen et al., 2015; Steinhäuser e Sayre, 2017). Em um regime de renovação semi-estática, a exposição pode ser mantida dentro de 80-120% dos valores nominais, renovando os meios de teste em intervalos regulares (OECD 23, 2000).

Na avaliação de risco de um produto químico, assume-se que os riscos da exposição aguda podem ser mitigados quando os contaminantes são aplicados em ambientes aquáticos em concentrações de 10 a 50% da concentração letal 50% (CL_{50}). Assim, concentrações como 10% da CL_{50} podem ser exploradas através de biomarcadores bioquímicos para prever o comprometimento de uma espécie nos diversos níveis de organização (Rand e Clark, 2000; Touart 1995). Historicamente, para a avaliação da sensibilidade de todas as espécies relevantes, eram considerados os dados de três espécies de peixes e duas espécies de crustáceos. As algas foram subsequentemente adicionadas como um terceiro grupo. O fator de razão aguda-crônica (ACR) foi estabelecido em 10 com base em um estudo estatístico de 95 produtos químicos (Hjorth et al., 2017).

Nesse cenário, deve ser realizado o desenvolvimento de abordagens menos tóxicas para o controle de pragas e que garantam a segurança dos trabalhadores além de fornecer alimentos saudáveis e prover sustentabilidade econômica para os agricultores. Uma vez que várias questões toxicológicas em relação aos OP ainda permanecem e precisam de mais investigações (Damalas e Eleftherohorinos, 2011; Hertz-Picciotto et al., 2018), o aprimoramento das formulações de pesticidas já usadas para outras mais seguras, poderia entre outras soluções, reduzir os efeitos adversos da agricultura e, em particular, os efeitos tóxicos dos pesticidas. Em consequência, o uso da nanotecnologia na formulação de OPs comerciais, poderá auxiliar no uso mais seguro destes compostos.

1.5 Modelo zebrafish

Os biomarcadores são instrumentos promissores para identificar impactos ambientais (Vieira et al., 2016) e fornecem informações a respeito do efeito metabólico de contaminantes, entre outras (Frasco e Guilhermino, 2002; Nascimento et al., 2008). Na nanoecotoxicologia, o estabelecimento de possíveis biomarcadores de exposição e efeitos é alvo de intensa discussão. Biomarcadores são respostas biológicas aos poluentes ambientais que podem ser mensuradas indicando a presença, efeitos e, em alguns casos, o grau de contaminação. A análise de biomarcadores é um instrumento básico para avaliação de riscos, em vista das muitas vantagens decorrentes de seu uso na prevenção da poluição: possibilitam respostas biológicas à exposição em curto prazo, baixos custos de análise em relação à técnicas convencionais indicativas da exposição a poluentes, fornecimento de informações a respeito do efeito metabólico de contaminantes, entre outras (Ballesteros et al., 2017).

Nesse sentido, os estudos com protocolos adotados pelas agências de regulamentação com animais proporcionam dados úteis para avaliação do perigo de exposição a vários compostos, mas são muito custosos e exigem o uso de grande número de animais. Limitações e restrições na pesquisa biomédica incluem o alto custo de modelos animais e questões bioéticas em relação ao uso de mamíferos para estudos toxicológicos. Por esta razão, modelos de vertebrados não-mamíferos com semelhanças genéticas para humanos têm sido utilizados como modelos animais alternativos, e o zebrafish tem se tornado um dos modelos mais frequentemente utilizados (Vargas e Ponce-Canchihuamán, 2017).

O zebrafish (*Danio rerio*) emergiu rapidamente como um importante organismo-modelo na toxicologia aquática (Basu e Sachidanandan, 2013; Strähle et al., 2012) e uma alternativa particularmente interessante para estudos de neurotoxicidade (Selderslaghs et al., 2013). O modelo experimental com zebrafish possui várias características é considerado

robusto uma vez que tem baixo custo, porte pequeno e alta taxa de fecundidade, alto grau de homologia com genomas humanos, função conservada de áreas cerebrais e sistemas de neurotransmissores e a presença de um homólogo do eixo HHI (eixo hipotálamo-hipófise-interrenal) (Howe et al., 2013; Del Santo, 2014; Kalueff et al., 2014; Linney et al., 2004; Stewart et al., 2015). Tal fato aumenta o potencial de entendimento dos efeitos de poluentes ambientais sobre comportamentos das populações aquáticas além de potencial para substituir os modelos clássicos de mamíferos, e ainda, refinar os modelos aquáticos existentes (Parker, 2016; Sloman e McNeil, 2012).

Este organismo modelo tem sido utilizado em ecotoxicologia e outras áreas para medir os efeitos dos poluentes sobre a comunidade de peixes e a biodiversidade uma vez que ele geralmente reage com grande sensibilidade às mudanças no ambiente e seu comportamento pode ser influenciado por fatores ambientais (Kopp et al., 2018). Nos últimos anos, ocorreram vários avanços na compreensão do comportamento dos organismos aquáticos, o que levantou possibilidades para a investigação toxicológica em termos do entendimento de processos fisiológicos e bioquímicos vinculados à alteração do comportamento. O zebrafish exibe estratégias cognitivas complexas de processamento e tomada de decisão (Mezzomo et al., 2019). Assim, foram desenvolvidos vários métodos para teste (Melvin e Wilson, 2013; Parker, 2016).

1.5.a Teste em embriões de zebrafish – *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*

A fim de incorporar o princípio de redução, refinamento e substituição (3Rs – reduction, refinement, replacement) em testes de toxicidade aguda de peixes, foi desenvolvido o teste de toxicidade aguda de embriões de peixe (FET Test) como uma alternativa ao teste de toxicidade aguda em animais em peixes adultos/juvenis. Este teste destina-se a determinar a toxicidade aguda de substâncias químicas em estágios embrionários de peixes (OECD 236, 2013), onde devido ao estágio primordial do desenvolvimento do sistema nervoso, considera-se que nem dor nem desconforto possam ser percebidos, e o organismo poderia ser considerado como um substituto a organismos juvenis e adultos para estes testes. A análise de correlação dos dados do FET em comparação aos dados dos testes com peixes adultos/juvenis foi feita por diferentes grupos e mostra que são altamente correlacionados (Braunbeck et al., 2015; Dang et al., 2017). Alguns estudos mostram que há efeitos toxicológicos semelhantes em embriões de zebrafish e em humanos (Yao et al., 2018).

Comparado ao teste convencional de mamíferos, este teste oferece várias vantagens experimentais como o menor período de teste, menor custo, menor quantidade de composto

necessário, manipulação mais fácil, entre outras. O desenvolvimento do zebrafish é rápido, com a embriogênese completa em 72 hpf e a maioria dos órgãos totalmente desenvolvidos em 96 hpf, permitindo que atinjam a idade adulta em torno de 3 meses (Chakraborty et al., 2016; Haque e Ward, 2018; He et al., 2014; Johnston et al., 2018). O zebrafish tem córion transparente que permite a observação atenta de seu desenvolvimento e por isso é frequentemente usado em testes que investigam os efeitos diretos ou indiretos da substância no desenvolvimento embrionário (Schweizer et al., 2017). A duração de 96 horas do FET inclui vários estágios embrionários que podem permitir maior captação de uma substância para a qual o córion pode representar uma barreira e cobre fases de desenvolvimento onde pode ocorrer ativação metabólica do composto (Sobanska et al., 2017).

O córion é uma membrana acelular que reveste e protege o ovo até a eclosão da larva que ocorre após 48 h da fertilização (Bonsignorio et al., 1996; Pelka et al., 2017; Rawson et al., 2000; Feng et al., 2013; Souder e Gorelick, 2017). A penetração de NM no interior do ovo está fortemente relacionada ao tamanho dos poros do córion que são uniformemente distribuídos e variam de tamanho nos óvulos não fertilizado e fertilizados (Lin et al., 2013). A permeabilidade e estrutura do córion mudam ao longo do desenvolvimento embrionário (Kristofco et al. 2018) e podem ser alteradas pela exposição a xenobióticos (Kais et al., 2013). Características lipofílicas, carga e conformação molecular específica, além da presença de solventes, podem desempenhar um papel importante na definição da absorção de substâncias químicas através do córion do embrião de zebrafish (Braunbeck et al., 2015; Pelka et al., 2017). Já nas larvas de zebrafish, partículas de pelo menos 700 nm podem ser ingeridas após 72 hpf quando a exposição oral é possível (van Pomeran et al., 2017).

Os testes de toxicidade com os primeiros estágios de vida de peixes são de elevada importância no que se refere ao comprometimento das fases de crescimento, reprodução e sobrevivência dos organismos em ambientes poluídos, constituindo uma ferramenta importante para um adequado monitoramento ambiental. Alguns produtos químicos podem afetar o desenvolvimento de embriões e larvas de zebrafish. A mortalidade, o edema, a taxa de eclosão, a frequência cardíaca entre outros são parâmetros úteis no teste de toxicidade embrionária (Yao et al., 2018). Devido a barreira imposta pelo córion na penetração do composto em estudo, o teste FET está por vezes sendo conduzido em embriões cujo córion foi removido (Pelka et al., 2017).

Os testes com zebrafish fornecem informações valiosas sobre a mortalidade e os efeitos subliminares tardios como diminuição do comprimento padrão, efeitos sobre a bexiga

natatória, etc., devido exposição a produtos químicos e amostras ambientais (Di Paolo et al., 2015).

Alguns dos parâmetros que podem ser avaliados durante o teste FET são:

Eclosão - A taxa de eclosão é um dos parâmetros importantes para identificar o efeito de NM expostos em embriões de zebrafish, uma vez que o atraso pode ser considerado como um sinal de resposta ao estresse ou uma interferência na interação com as enzimas incubadoras. De fato, muitos trabalhos associam diferentes alvos relacionados à eclosão e ao desenvolvimento embrionário (Asharani et al., 2010; Xu et al., 2012) como atrasos na embriogênese do zebrafish entre vários mecanismos de ação (Shaw et al., 2016; Zou et al., 2017). Além disso, os NM que induzem o entupimento dos poros do córion podem afetar o desenvolvimento embrionário (Manjunatha et al., 2018). Os OP malation, monocrotofós e paration metílico podem inibir as taxas de eclosão embrionária e reduzir o tempo de eclosão dos ovos de peixes (Zhao et al. 2017).

Saco vitelino - O saco vitelino desempenha um papel importante durante o estágio inicial do desenvolvimento, já que é a única fonte de nutrição para os embriões de zebrafish e influencia o desenvolvimento embrionário. A diminuição do comprimento do corpo é então um importante indicador do crescimento embrionário que é induzido pela perda de nutrientes ou um efeito tóxico causado pela má absorção dos nutrientes do saco vitelino necessários para o desenvolvimento normal (Qiang et al., 2016).

Edema pericárdico - O edema pericárdico pode ser uma consequência da anormalidade cardiovascular, possivelmente devido a um aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos (Hill et al., 2004). Na primeira semana de desenvolvimento, o zebrafish pode sobreviver sem circulação, porque o consumo de oxigênio no embrião independe da função cardíaca e seus tecidos podem satisfazer suas necessidades através da difusão simples de oxigênio do ambiente (Barrionuevo e Burggren, 1999). Em relação ao balanço simpato-vagal no sistema cardiovascular das larvas de zebrafish, a resposta aos estímulos adrenérgicos aparece aos 4 dpf e a resposta colinérgica aparece aos 5 dpf, embora nem sempre seja consistente na primeira semana (Schwerte et al., 2006).

Locomoção - Durante a embriogênese, os embriões de zebrafish exibem movimentos espontâneos, chamados de enrolamentos. O repertório locomotor da larva do zebrafish é relativamente estereotipado (Airhart et al., 2007; Drapeau et al., 2002), com algumas possíveis categorias de manobras incluindo 'natação lenta', 'natação rápida', 'captura de presas' e 'fuga' (Knafo e Wyart, 2018). Em larvas de zebrafish, a atividade motora é gerada principalmente no rombencéfalo e na medula espinhal (Drapeau et al., 2002). Acredita-se que

vários tipos de células neuronais estejam envolvidos no controle do comportamento de locomoção, e os motoneurônios são responsáveis pela atividade sináptica excitatória, bem como pelos padrões de disparo com relação à natação (Brustein et al., 2003).

Natação - A natação se mantém quando a modulação serotoninérgica é integrada. Além disso, cada movimento requer uma coordenação neuromuscular funcional. Após 24 hpf de morfogênese, o cérebro é dividido em prosencéfalo (incluindo o diencéfalo e o telencéfalo), o mesencéfalo, o rombencéfalo e a medula espinhal, enquanto os primeiros grupos de neurônios estão interconectados por axônios (Esch et al., 2012). Em 4 dpf, a atividade larval pode ser bastante variável porque as larvas estão na transição de uma bexiga natatória inativa para uma totalmente inflada (Colwill e Creton, 2011). Aos 5 dpf, quando a bexiga natatória e os sistemas sensoriais como a visão são funcionais, as larvas começam a mover-se e a nadar espontaneamente (Colwill e Creton, 2011; Drapeau et al., 2002). A bexiga natatória é um saco cheio de ar localizado na cavidade abdominal que ajuda os peixes a equilibrar a pressão hidrostática e reduzir o custo energético da natação (Johnson et al., 2007).

Além destes parâmetros, o teste FET é usado para avaliar os efeitos letais e subletais de compostos ambientais em organismos aquáticos (Horie et al., 2017), sendo então uma alternativa útil e econômica para estudar a neurotoxicidade de diferentes produtos (Sobanska et al., 2017; Vargas e Ponce-Canchihuamán, 2017), incluindo NMs (Calienni et al., 2017; Pecoraro et al., 2017) já que as larvas de zebrafish são sensíveis aos compostos neuroativos e sua resposta locomotora é semelhante à dos mamíferos (Irons et al., 2010).

O cérebro de zebrafish mostra cognição complexa e funcionalidade bioquímica comparável a mamíferos (Dale et al., 2017; Meshalkina et al., 2017; Strungaru et al., 2018). A barreira hematoencefálica do zebrafish compartilha semelhanças estruturais e funcionais com a dos mamíferos e sua maturação ocorre entre 3 e 10 dpf (Fleming et al., 2013). As larvas de zebrafish exibem tanto a memória de curto prazo quanto em longo prazo, bem como a aprendizagem associativa e social (Roberts et al., 2013). Larvas de zebrafish alinham sua atividade locomotora a fatores de arrastamento circadiano (Kopp et al., 2018).

O zebrafish compartilha os principais sistemas de neurotransmissores com mamíferos, incluindo glutamato, GABA, glicina, dopamina, norepinefrina, epinefrina, serotonina, ACh e histamina (Horzmann e Freeman, 2016; Rico et al., 2011). Isto é importante para avaliações do desenvolvimento, já que distúrbios na síntese, transporte ou metabolismo de neurotransmissores induzidos por fatores ambientais durante o desenvolvimento cerebral, podem levar a manifestações neurológicas. Em especial, os embriões de zebrafish representam um modelo adequado para estudar a inibição da acetilcolinesterase e investigar

vários modos de ação neurotóxica (Kais et al., 2015; Koenig et al., 2016). A atividade da AChE é expressa em zebrafish desde 14 hpf (Valim Brigante et al., 2018) e a inibição da acetilcolinesterase pode ser analisada em embriões de 72 e 96 h expostos a compostos neurotóxicos (Stengel et al., 2018).

2. OBJETIVOS

O objetivo desta tese foi desenvolver uma formulação de dimetoato com liberação modificada (nanoencapsulada) em partículas de quitosana e avaliar a toxicidade do dimetoato nanoencapsulado e comparar com formulações convencionais de dimetoato (técnico e comercial) durante o desenvolvimento embriolarval de *Danio rerio* (zebrafish), através da avaliação de biomarcadores bioquímicos e comportamentais em zebrafish decorrente da exposição ao dimetoato nanoencapsulado e comparar com formulações convencionais de dimetoato (técnico e comercial).

CAPÍTULO I

Preparo e avaliação de sistema nanocarreador de tripolifosfato de sódio/quitosana para dimetoato

José Henrique Vallim¹; Zaira Clemente¹; Estefânia V. R. Campos²; Márcia Assalim³;
Patrícia Luiza de Freitas Proença²; Vera Lúcia de Castro¹; Leonardo Fernandes Fraceto²

¹ Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança, Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP-340, Km 127,5, CEP 13918-110, Jaguariúna, SP, Brasil

² Departamento de Engenharia Ambiental, Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba (ICTS), Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Avenida Três de Março, 511, CEP 18087-180, Sorocaba, SP, Brasil

³ Laboratório de Resíduos e Contaminantes, Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP-340, Km 127,5, CEP 13918-110, Jaguariúna, SP, Brasil

* **Autor correspondente:** Leonardo Fernandes Fraceto - leonardo.fraceto@unesp.br

RESUMO

O uso de nanocarreadores biocompatíveis e biodegradáveis na formulação de pesticidas pode melhorar a proteção ambiental. Neste estudo, o inseticida organofosforado dimetoato foi encapsulado usando o sistema tripolifosfato de sódio/quitosana (TPP/CS). As nanopartículas foram caracterizadas por diferentes técnicas e também tiveram a eficiência de encapsulação avaliada. A toxicidade do sistema TPP/CS foi estudada em embriões de zebrafish. O sistema TPP/CS apresentou boas características coloidais e a eficiência de encapsulação do dimetoato foi de $99,3 \pm 0,32$ %, permanecendo estável por pelo menos 90 dias. Assim, o sistema apresentou uma boa estabilidade físico-química ao longo do tempo. Contudo, o sistema TPP/CS mesmo na ausência do ativo provocou a morte de embriões de zebrafish. Os resultados obtidos indicam que, apesar da associação de dimetoato com nanopartículas de TPP/CS ter potencial para melhorar a produtividade das culturas, a formulação com nanopartículas TPP/CS terá que ser reavaliada para se tornar ambientalmente segura.

Palavras chave: nanopartículas, dimetoato, agricultura, quitosana, toxicidade

ABSTRACT

The use of biocompatible and biodegradable nanocarriers in pesticide formulation can improve environmental protection. In this study, the organophosphate dimethoate insecticide was encapsulated using the sodium/chitosan tripolyphosphate system (TPP/CS). The nanoparticles were characterized by different techniques and also had the encapsulation efficiency evaluated. The toxicity of the TPP/CS system has been studied in zebrafish embryos. The TPP/CS system presented good colloidal characteristics and dimethoate encapsulation efficiency was 99.3 ± 0.32 %, remaining stable for at least 90 days. Thus, the system showed good physical and chemical stability over time. However, the TPP/CS system even in the absence of the active caused the death of zebrafish embryos. The results indicate that, although the association of dimethoate with TPP/CS nanoparticles has the potential to improve crop yield, the TPP/CS nanoparticle formulation will need to be re-evaluated to be environmentally safe.

Keywords: nanoparticles, dimethoate, agriculture, chitosan, toxicity

1. INTRODUÇÃO

Um produto químico ideal para a proteção de culturas deve ter várias propriedades, incluindo a capacidade de permanecer ativo sob sol e calor, resistir à defesa da praga e do patógeno e não ser tóxico para plantas e animais além de fornecer retorno econômico. Contudo, a formulação convencional de pesticidas possui desvantagens como o uso de solventes, baixa dispersão, etc. Visando melhorar a eficácia e a segurança dos pesticidas, o uso da nanotecnologia para a criação de novas formulações mostrou um grande potencial nos últimos anos (Zhao et al., 2018).

De acordo com a literatura disponível, alguns pesticidas nanoencapsulados exibem uma melhor eficácia de controle de pragas do que aqueles comercialmente disponíveis, já que os materiais de nanoencapsulação permitem a liberação de ingredientes ativos de forma controlada, permitindo a liberação lenta e constante do ingrediente ativo (Kah et al., 2016; Kumar et al., 2015). Algumas das vantagens destas formulações incluem dissolução mais rápida, melhor penetração na folha, redução da quantidade usada do princípio ativo ou melhor distribuição de pequenas quantidades de substâncias ativas sobre áreas maiores (Hack et al., 2012). Assim, os agrotóxicos nanoencapsulados mantêm sua eficácia de controle de pragas por mais tempo. Como resultado, a aplicação frequente de pesticidas não é necessária e isso reduz a sua quantidade no ambiente, bem como os custos dos insumos, da mão-de-obra e de possíveis problemas de saúde, o que beneficia os agricultores e consumidores dos produtos (Kumar et al., 2014; Nuruzzaman et al., 2016).

Nesse contexto, pode ser citado como exemplo de diminuição de toxicidade, o inseticida OP acefato nanoencapsulado que não mostrou qualquer tipo de anormalidade nos estudos toxicológicos realizados em cultura de células e em camundongos expostos agudamente e, portanto, pode ser considerado uma alternativa econômica e ambientalmente amigável (Pradhan et al., 2013). Também a nanopermetrina apresenta menor toxicidade para os eritrócitos/linfócitos humanos em comparação à permetrina de uma forma dependente da dose (Sundaramoorthy et al., 2016). Portanto, o pesticida em forma nanométrica poderia ser usado em concentrações mais baixas que na forma convencional, o que seria vantajoso na redução de preocupações ambientais. Outras nanoformulações de agrotóxicos também foram consideradas mais seguras e mais eficazes comparativamente ao produto convencional sem afetar o ambiente, como a nanodeltametrina no controle de insetos (Balaji et al., 2017) e a nanoimidacloprida para combater a lepidóptera *Glyphodes pyloalis Walker* em amoreiras (Memarizadeh et al., 2014). A nanoencapsulação pode também diminuir a perda por

fotodegradação de inseticidas, a exemplo da deltametrina com o uso de nanopartículas de quitosana (Nguyen et al., 2012).

Contudo, o crescente interesse no uso de nanopesticidas levanta questões sobre como o risco ambiental desses materiais deve ser avaliado para fins regulatórios já que os fatores e processos que afetam o seu comportamento e seus efeitos ambientais podem diferir dos produtos convencionais e, conseqüentemente, as abordagens de avaliação necessitam adaptações para lidarem com essas diferenças (Kookana et al., 2014). Para avaliação de riscos ambientais de nanopesticidas é essencial compreender o impacto de uma nanoformulação em processos que incluem o transporte do ingrediente ativo e a sua biodisponibilidade (Kah e Hofmann, 2014; Kah et al., 2018).

A necessidade de regulamentação apropriada para garantir a nanosseguurança vem crescendo já que contínuos avanços nessa área são rapidamente traduzidos em novas aplicações industriais e produtos comerciais. O advento das nanotecnologias agroambientais traz tanto maior necessidade quanto oportunidade de mudar essa situação por introduzir questões significativas de interseccionalidade de segurança ambiental e a saúde humana. O risco decorrente do uso de nanopesticidas vem da possível toxicidade para organismos não-alvo, bioacumulação e de interações com outros poluentes no ambiente. Nesse contexto, as questões e incertezas a respeito de nanoproductos agroalimentares usados no ambiente sugerem que o conhecimento e a regulamentação atual de nanoagroquímicos possam ser ainda insuficientes, sendo necessária a regulamentação e avaliação ambiental de nanopesticidas (Li et al., 2019; Lombi et al., 2019).

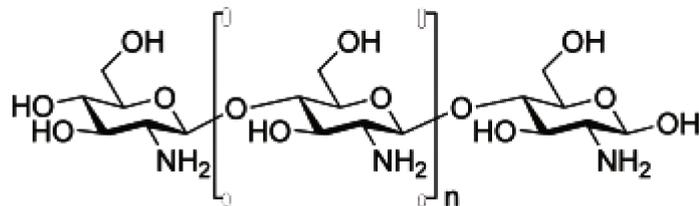
Nesse sentido, os estudos com protocolos adotados pelas agências de regulamentação com animais proporcionam dados úteis para avaliação do perigo de exposição a vários compostos, mas são muito custosos e exigem o uso de grande número de animais. O zebrafish (*Danio rerio*) então tem sido frequentemente utilizado para a avaliação dos efeitos decorrentes da exposição a xenobióticos e é empregado em diferentes estágios de desenvolvimento embriolarval até a fase adulta (Basu e Sachidanandan, 2013; Strähle et al., 2012; Vargas e Ponce-Canchihuamán, 2017).

Uma técnica que tem se mostrado promissora são os sistemas nanoestruturados, que podem ser produzidos a partir de matrizes poliméricas biodegradáveis como a quitosana. Os polissacarídeos são bastante empregados em formulações de liberação sustentada, sendo empregadas em diversas áreas, inclusive na agricultura. São moléculas amplamente distribuídas na natureza e formados por monossacarídeos através de ligações glicosídicas. A quitosana (Figura 1) possui natureza atóxica e biocompatibilidade além de ser biodegradável.

Ela é um biopolímero natural catiônico obtido através da desacetilação parcial da quitina e é composto por resíduos de D-glucosamina unidos por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). Ela apresenta propriedades estruturais e funcionais únicas como, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e boa miscibilidade com outros polímeros e apresenta uma estrutura bastante reativa quimicamente devido a suas amins primárias. É encontrada predominantemente nas cascas de crustáceos, na cutícula de insetos e nas paredes celulares fúngicas (Garcia-Fuentes e Alonso, 2012).

As vantagens destes compostos são o baixo custo e disponibilidade que facilita em alguns casos a produção em larga escala em vários tipos de aplicações (Zargar et al., 2015). Alguns trabalhos na literatura apontam que nanopartículas de polímeros de quitosana podem ser usadas como carreadoras de agrotóxicos lipofílicos, a fim de diminuir a perda do composto para o ambiente e melhorar o controle da liberação dos agentes (Perez-de-Luque e Rubiales, 2009).

Figura 1. Estrutura química da quitosana. Esta figura representa o número de unidades monoméricas que se repetem de acordo com o tamanho da cadeia.



No Brasil, os inseticidas organofosforados são bastante utilizados. Entre estes inseticidas, o dimetoato é um dos compostos mais detectados em programas de monitoramento de avaliação de risco dietético (Jardim et al., 2018). Além disso, devido à persistência do dimetoato nas culturas e no solo, a população também está exposta cronicamente a baixas doses de dimetoato através da água potável (Mesallam et al., 2018). Portanto, nesse trabalho, a fim de estabelecer uma formulação potencialmente menos tóxica, foi formulado o dimetoato nanoencapsulado em tripolifosfato de sódio/quitosana e comparada a toxicidade dele com o do dimetoato técnico em embriões de zebrafish.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Foram utilizados o organofosforado dimetoato (O,O-dimetil-S-metilcarboilmetil fosforoditioato) grau técnico (98,2 %), Nortox[®], Dimethoate PESTANAL[®], analytical standard, CAS 60-61-5, 45449-100mg (99,9 %), Sigma-Aldrich[®], alginato de sódio, CAS 9005-38-3, W201502, Sigma-Aldrich[®] e quitosana com 80 % de acetilação, CAS 9012-76-4, 448869-250G, Sigma-Aldrich[®]. Os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] ou JT Baker[®].

2.2 Manutenção dos animais

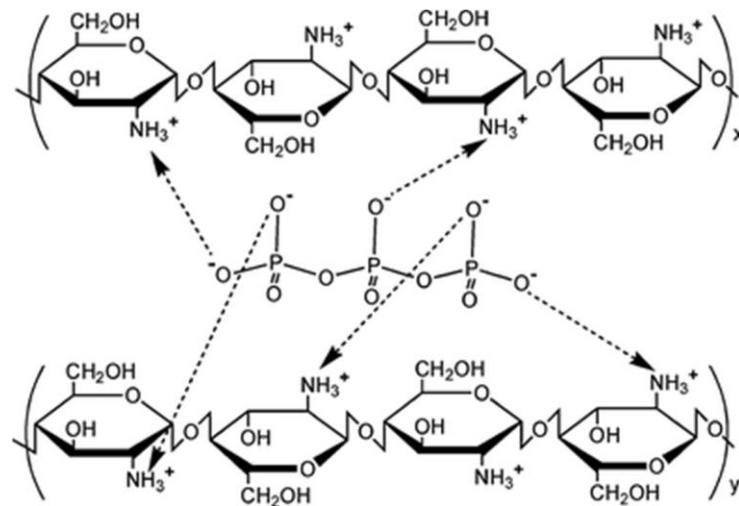
Os peixes reprodutores (*Danio rerio* – wild-type line) foram mantidos em condições de laboratório (Rack Hydrus, modelo ZEB-40, Alesco[®]). Os parâmetros para peixes foram: condutividade $400 \pm 0,2 \mu\text{S}$, temperatura $28 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH $7,0 \pm 0,2$. A condutividade foi mantida com uso de Red Sea Salt[®] e o pH controlado com tampão ácido (Acid BufferTM) e alcalino (Alkaline BufferTM), Seachem[®]. Os embriões de *Dano rerio* foram mantidos em água reconstituída, preparada de acordo com U.S.EPA (2002). Os procedimentos utilizados neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente (CEUA-Embrapa Meio Ambiente, protocolo nº 003/2015) (Anexo D).

2.3 Preparo das nanopartículas de tripolifosfato de sódio/quitosana

A formulação nanopesticida de dimetoato foi desenvolvida usando quitosana e tripolifosfato de sódio (TPP) como agente de reticulação. As nanopartículas foram preparadas pelo método de gelificação iônica descrito inicialmente por Calvo et al. (1997a) por ser um processo atóxico (livre de solventes orgânicos), prático e controlável (Agnihotri et al., 2004; Fan et al., 2012). A gelificação iônica ocorre pela interação eletrostática entre os grupamentos amino (NH_3^+) da quitosana com poliânions, tais como, o tripolifosfato de sódio (Figura 2) (Dyer et al., 2002; Yang et al., 2011). Utilizamos uma solução de quitosana a 0,1 % em ácido acético a 0,2 %, mantida sob agitação magnética por 12 h e pH 4,7. Uma solução aquosa de TPP a 0,1 % foi preparada e refrigerada a 4 °C. Ambas as soluções foram filtradas através de uma membrana (0,45 μm , Millipore[®]) para remover materiais insolúveis. Foi adicionado 5 mL da solução TPP (4 °C) a 20 mL da solução de quitosana sob agitação magnética. A mistura permaneceu em agitação por mais 10 minutos. As nanopartículas de tripolifosfato de

sódio/quitosana (NP) foram armazenadas à temperatura ambiente (25 °C). Para obtenção das nanopartículas com dimetoato, este foi incorporado (12 mg) à solução de quitosana antes da preparação das nanopartículas (NPDM), tendo como concentração final do inseticida e acaricida 0,48 mg/mL.

Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de síntese das nanopartículas. Em pH baixo, grupamentos das moléculas quitosana ionizam-se e interagem a exemplo do ânion tripolifosfato de sódio formando nanopartículas (Yang et al., 2009a).



2.4 Caracterização e estabilidade das formulações

A fim de avaliar a estabilidade das formulações, algumas propriedades físico-química como, pH, tamanho (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação, foram estudadas em função do tempo (0, 7, 15, 30 60 e 90 dias).

A técnica de espectroscopia de correlação de fótons foi empregada para avaliação do diâmetro médio das nanopartículas, onde o movimento aleatório das nanopartículas (movimento browniano) é analisado através da interação entre o feixe de luz e a suspensão coloidal (Guterres et al., 1995; Patty; Frisken, 2006; R. Guterres et al., 2014).

As avaliações do diâmetro médio e da distribuição de tamanho das nanopartículas (polidispersão) foram realizadas sem diluição, utilizando-se um analisador de partículas ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern) a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25 °C. Cada resultado foi expresso como média de três determinações (Moraes et al., 2011; Venkatraman et al., 2005).

O potencial zeta reflete a carga superficial das nanopartículas na presença de um solvente. Sistemas que apresentam potencial zeta em torno de ± 30 mV (superiores a +30 mV

ou inferiores a -30 mV) são estáveis em solução (Mohanraj; Chen, 2007; Schaffazick et al., 2003). O valor do potencial zeta, dado em mV foi determinado por meio de equipamento ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments[®], UK). As análises foram realizadas sem diluição e os resultados foram expressos como média de três determinações.

Medidas de estabilidade química do polímero foram realizadas através do monitoramento do pH das suspensões de nanopartículas em função do tempo, empregando-se um potenciômetro (Jenway[®]) calibrado com solução tampão padrão de pH 4,0 e 7,0.

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas e a concentração destas no sistema coloidal foi medido por Nanoparticles Tracking Analysis (NTA) (Filipe; Hawe; Jiskoot, 2010; Nanosight, 2014). As análises foram realizadas em uma célula volumétrica do equipamento NanoSight LM10, empregando um laser com comprimento de onda de 532 nm (verde), câmera CMOS e *software* NanoSight (versão 3.1). As suspensões de nanopartículas foram diluídas 1000 vezes. As análises foram realizadas em triplicata com cinco medições de 60 segundos. A fim de garantir que diferentes partículas fossem analisadas por replicata, foi injetado na cela um volume superior à sua capacidade desprezando assim o conteúdo analisado anteriormente (Anderson et al., 2004). O diâmetro hidrodinâmico das partículas foi calculado através da Equação de Stokes- Einstein (Anderson; Coats, 2012; Filipe; Hawe; Jiskoot, 2010; Nanosight, 2014).

2.5 Determinação da concentração de dimetoato em meio salino de embrião de zebrafish por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV)

A quantificação do dimetoato das nanopartículas poliméricas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a construção da curva analítica foram preparadas soluções estoque de dimetoato na faixa de concentração de 10 a 60 $\mu\text{g/mL}$ e cada concentração foi submetida à análise por CLAE, de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas (Tabela 1). Determinou-se a concentração do inseticida e acaricida dimetoato por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta em dimetoato grau técnico. As análises cromatográficas foram executadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLASS-VP, Shimadzu). Os ensaios de quantificação foram realizados utilizando-se uma curva analítica concentrações de 0,25 a 12 $\mu\text{g/mL}$.

Para estudos da avaliação da degradação do dimetoato nos meios utilizados nos ensaios, foram analisadas soluções com o produto técnico (200 mg/mL) em amostras previamente congeladas correspondentes aos tempos 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. A solução de padrão analítico foi preparada em meio salino para embrião, de concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Foram colocados 10 mL desta solução em frascos de vidro, tampadas e mantidas em incubadora a temperatura de 26 °C.

Tabela 1. Condições cromatográficas utilizadas para quantificação do dimetoato.

Dimetoato	
Amostra	DM na fase móvel
Fase Móvel (v:v)	Acetonitrila: água (50:50)
Fluxo	1 mL/min
Temperatura (°C)	25°C
Detector (λ)	227 nm
Coluna	Gemini Phenomenex; C ₁₈ fase reversa; 2,6 μm 110 A; 250 x 4,60 mm

2.6 Ensaios com embriões de zebrafish – *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*

Os embriões de *D. rerio* (3 h pós-fertilização - hpf) foram expostos durante 96 h às condições teste, de acordo com o protocolo OECD 236 (2013). Realizou-se testes preliminares para determinar a faixa de concentração letal para 50 % dos organismos expostos (CL₅₀). Os organismos foram divididos em grupos experimentais: controle (meio embrião); nanopartículas de quitosana sem (NP) e com dimetoato (NPDM) e dimetoato grau técnico (DMT).

As concentrações utilizadas para obtenção da CL₅₀ foram 0, 12, 62, 125, 250, 500 e 750 mg/L. O controle positivo foi realizado com exposição a 4 mg/L de dicloroanilina (3,5-Dichloroaniline ≥98 %, Sigma Aldrich® D55792). A toxicidade da quitosana foi avaliada, não demonstrando toxicidade em concentrações até 100 mg/L.

Os efeitos subletais foram avaliados expondo embriões de *D. rerio* (3 hpf) durante 96 h. A exposição foi realizada em placas de poliestireno de 24 poços (n=24 organismos/grupo), sendo os embriões mantidos individualmente em 2 mL de solução teste, sob um ciclo claro/escuro de 14/10 h a 26,0 ± 0,2 °C em incubadora BOD (Incubadora BOD com fotoperíodo, SL-224, Solab®). Os embriões e larvas foram avaliados a cada 24 h através de estereomicroscópio (*Model SMZ 2 LED, software Optika View Version 7.1.1.5, Optika®*), para determinação da ocorrência de mortalidade. As soluções não foram renovadas. A concentração letal média (CL₅₀) e seus intervalos de confiança 95 % foram determinados

através do módulo “Probit Analysis” do programa *Statgraphics Centurion XVII Version 1.17.04* (Stat Point Technologies®, 2014).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização físico-química e estabilidade das nanopartículas de tripolifosfato de sódio/quitosana

Pela técnica DLS, as nanopartículas controle de tripolifosfato de sódio/quitosana (NP) (Figura 3A) apresentaram diâmetro médio inicial de $176,4 \pm 0,71$ nm. Após 7 dias de preparo, observa-se uma queda do diâmetro destas nanopartículas para $156,5 \pm 0,31$ nm e permanecendo sem grandes alterações até os 90 dias de armazenamento. Já as nanopartículas contendo dimetoato (NPDM) (Figura 3A) apresentaram diâmetro inicial de $161,1 \pm 1,19$ nm e assim como observado para as NP, houve uma redução no diâmetro médio destas nanopartículas após sete dias de armazenamento ($154,8 \pm 0,85$ nm) quando comparadas com o tempo inicial, permanecendo sem grandes alterações até 30 dias de armazenamento. Com 60 dias, houve um novo aumento no diâmetro médio destas nanopartículas $162,7 \pm 1,99$ nm e permanecendo sem alterações até 90 dias de armazenamento.

Com a técnica de rastreamento de nanopartícula (*Nanoparticle Tracking Analysis – NTA*), o diâmetro médio inicial de NP foi de $284,2 \pm 16$ nm e não foram observadas alterações significativas em função do tempo de armazenamento (Figura 3F). Já as nanopartículas NPDM, apresentaram diâmetro médio em torno de $246,9 \pm 8,3$ nm e, assim como observados para as NP, não houve alterações significativas em função do tempo de armazenamento. O diâmetro médio determinado pela técnica de DLS (*Dynamics Light Scattering*) (Figura 3A) foi menor quando comparado com a técnica de NTA (Figura 3F). Além da avaliação do diâmetro médio, a técnica de NTA foi empregada para determinar a concentração das nanopartículas. Para NP foi observado uma concentração de $1,58 \times 10^8 \pm 5,29 \times 10^7$ nanopartículas.mL⁻¹ e para as nanopartículas NPDM a concentração foi de $1,25 \times 10^8 \pm 2,71 \times 10^7$ nanopartículas.mL⁻¹.

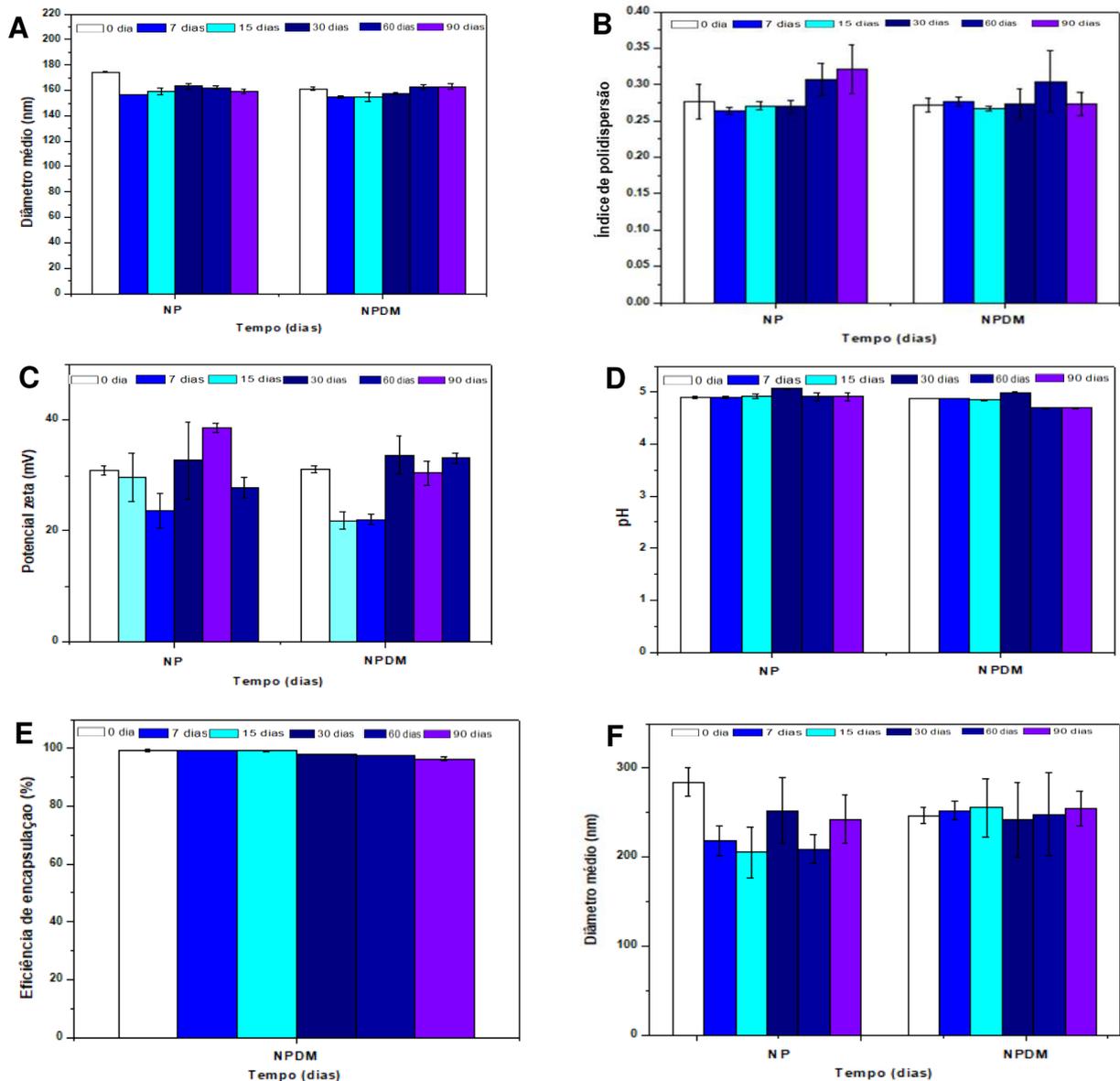
A Figura 3B apresenta a variação do índice de polidispersão em função do tempo para as formulações. No tempo inicial, a formulação NP apresentou índice de polidispersão (PDI) de $0,276 \pm 0,02$ e não foram observadas alterações significativas para este parâmetro em função dos 90 dias de armazenamento. Já as NPDM apresentaram inicialmente PDI de $0,272 \pm 0,01$ e, assim como observado para NP, não foram observadas alterações significativas no índice de polidispersão em função do tempo de armazenamento.

O potencial zeta é um parâmetro que mensura a carga superficial das nanopartículas em solução, e pode ser influenciado por mudanças no meio dispersante. A Figura 3C apresenta o valor de potencial zeta para as formulações estudadas em função do tempo para o período entre zero e 90 dias. As NP (Figura 3C) apresentaram potencial zeta de $30,9 \pm 0,75$ mV e algumas alterações em função do tempo, porém, não significativas quando comparadas com o tempo inicial. As NPDM (Figura 3C) apresentaram potencial zeta de $31,1 \pm 0,67$ mV e após sete dias de armazenamento, observa-se uma redução do potencial zeta para $21,9 \pm 1,66$ mV. Após 30 dias houve um novo aumento no valor deste parâmetro para $33,6 \pm 3,41$ mV e não foram observadas alterações significativas após este período.

A Figura 3D apresenta o comportamento do pH das formulações de nanopartículas em função do tempo. Observa-se que NP (Figura 3D) apresentaram pH de $4,9 \pm 0,01$, o qual manteve-se praticamente constante até 60 dias de análise. Já as nanopartículas NPDM apresentaram um pH em torno de $4,8 \pm 0,01$ e, após 60 dias de armazenamento, observou-se uma redução do pH para $4,69 \pm 0,01$.

A eficiência de encapsulação do dimetoato nas nanopartículas de TPP/CS é mostrada na Figura 3E. No tempo inicial houve uma eficiência de encapsulação do dimetoato (NPDM) de $99,3 \pm 0,32$ % e foi observada uma redução em torno de 3 % na encapsulação após 90 dias de armazenamento.

Figura 3. Caracterização das nanopartículas de tripolifosfato de sódio/quitosana sem (NP) e com dimetoato (NPDM) em função do tempo de armazenamento (0 a 90 dias). A) diâmetro médio pela técnica de DLS (nm), B) índice de polidispersão, C) potencial zeta (mV), D) pH, E) eficiência de encapsulação, F) diâmetro médio pela técnica de NTA (nm). Valores representam a média de três determinações em pH 4,7 a 25 °C.

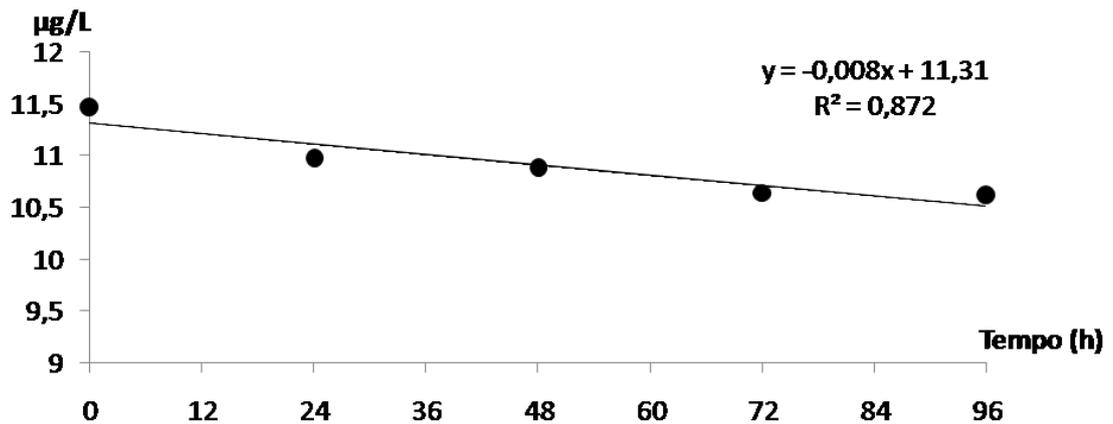


3.2 Determinação da estabilidade do dimetoato P.A. e técnico em meio salino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV)

Determinou-se a concentração do dimetoato por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta em dimetoato P.A. A Figura 4 mostra a curva de estabilidade do dimetoato P.A. em meio para embrião, apresentando meia vida ($t_{1/2}$) de

697,20 h e percentagem de degradação de 7,4 %. O dimetoato grau técnico (DMT) teve 5 % de degradação em 96 h.

Figura 4. Curva de estabilidade do dimetoato P.A. nas concentrações de 0,5 a 12 µg/mL em meio para embrião de zebrafish (U.S.EPA, 2002). Os dados de estabilidade do dimetoato técnico no meio de exposição do embrião indicaram que não houve degradação significativa (5 %) do mesmo ao longo de 96 h. Testes realizados em triplicata.



3.3 Ensaio de toxicidade em embriões de zebrafish - *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*

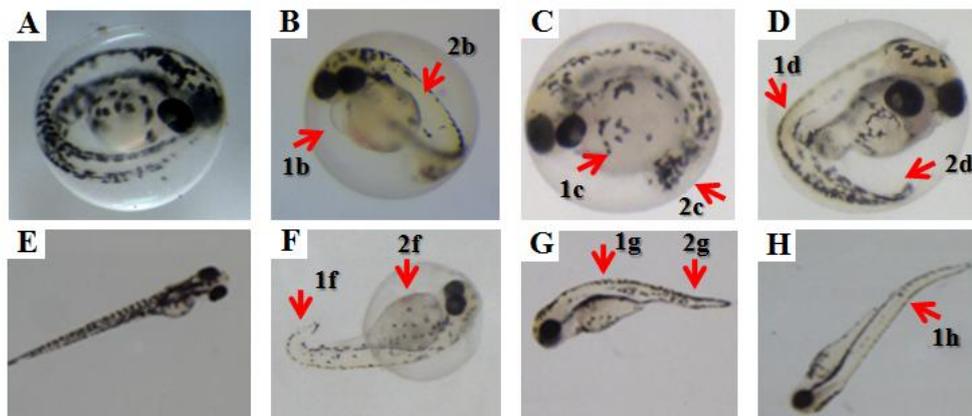
Apesar dos organismos do grupo controle não apresentarem mortalidade, as nanopartículas de TPP/CS sem e com ativo causaram toxicidade aos embriões de zebrafish já nas primeiras 24 h e ao final do teste (96 h), impossibilitando o uso destas para avaliações de CL_{50} . A CL_{50} (96 h) do dimetoato grau técnico foi de 155,02 mg.L⁻¹. A Tabela 2 e a Figura 5 demonstram as alterações morfológicas embrionárias encontradas no *FET Test* (96 h) com DMT nas concentrações 0, 12, 62 e 125 mg.L⁻¹ de DMT. A menor concentração de DMT capaz de provocar malformação foi 62 mg.L⁻¹, apesar da mortalidade neste grupo não ter sido significativa (4 %). A concentração de 250 mg.L⁻¹ causou 87,5 % de mortalidade dos organismos em 72 hpf. Os organismos expostos a 100 mg.L⁻¹ de quitosana ou tripolifosfato de sódio não apresentaram alterações.

Tabela 2. Alterações morfológicas embrionárias (%) encontradas na avaliação da toxicidade de DMT em embriões de zebrafish (n=24 organismos/grupo) durante o FET Test (OECD 236, 2013) após 96 h. Teste realizado sem troca do meio de cultivo.

Alterações (%) - 96 h / Concentração (mg.L ⁻¹)	Controle 0	12	DMT 62	125	Quitosana 100	TPP 100
taxa de eclosão	100	100	8	25	100	100
mortalidade	0	0	4	16	0	0
contrações tônico-clônicas	0	0	4	9	0	0
edema de pericárdio	0	0	8	13	0	0
edema de vitelo	0	0	4	4	0	0
hipopigmentação	0	0	16	35	0	0
alteração na coluna	0	0	4	4	0	0
alteração na coluna/cauda	0	0	4	4	0	0
bradicardia	0	0	4	4	0	0
malformação geral	0	0	4	4	0	0

DMT: dimetoato grau técnico; TPP: tripolifosfato de sódio

Figura 5. Alterações morfológicas embrionárias e larvais encontradas na avaliação da toxicidade de dimetoato grau técnico (DMT) em embriões de zebrafish - FET Test (OECD 236, 2013). São expostas fotografias representativas dos efeitos observados nos organismos de cada grupo testado. Figura A: embrião de 48 h (controle sem alterações). Figura B: embrião de 48 h (DMT 62 mg.L⁻¹); 1b) edema de pericárdio; 2b) hipocromia. Figura C: embrião de 72 h (DMT 125 mg.L⁻¹); 1c) edema de vitelo; 2c) alteração de cauda. Figura D: embrião de 96 h (DMT 125 mg.L⁻¹); 1d) alteração na coluna; 2d) alteração na cauda. Figura E: larva de 96 h (controle sem alterações). Figura F: larva de 96 h (DMT 125 mg.L⁻¹); 1f) alteração cauda; 2f) edema de vitelo. Figura G: larva de 96 h (DMT 125 mg.L⁻¹); 1g) alteração coluna; 2g) alteração na cauda; larva também apresenta diminuição de tamanho. Figura H: larva de 96 h (DMT 62 mg.L⁻¹); 1h) alteração coluna.



4. DISCUSSÃO

Estudos sobre o desenvolvimento de nanocompósitos de quitosana-pesticida para controle de pragas na agricultura têm recebido maior atenção nos últimos anos.

Na literatura, alguns trabalhos têm estudado a aplicação de nanopartículas de quitosana para a liberação sustentada de herbicidas (Silva et al., 2010, 2011; Wen et al., 2011; Grillo et al., 2014, 2015; Maruyama et al., 2016; Oliveira et al., 2016), hormônio de crescimento (Pereira et al., 2017a, 2017b), inseticida (Kumar et al., 2015) e fungicidas (Chauhan et al., 2017). Entretanto, este é o primeiro estudo que relata o preparo e caracteriza a estabilidade em função do tempo de nanopartículas de quitosana carregando dimetoato.

A nanoencapsulação do dimetoato tem potencial para melhorar a produtividade das culturas e a produção de alimentos. O encapsulamento e a liberação lenta do dimetoato usando nanopartículas pode ser considerado uma maneira eficaz de tornar o uso do inseticida mais seguro ambientalmente. A quitosana apresenta vantagens tais como estabilidade da molécula, biocompatibilidade e procedimentos simplificados (Graily Moradi e Hejazi, 2019).

A variação de diâmetro observada nas nanopartículas sem e com ativo pode estar relacionada com o rearranjo das cadeias poliméricas das nanopartículas. Variações no diâmetro médio das nanopartículas entre as diferentes técnicas de medição são esperadas, devido à particularidade de cada técnica (DLS e NTA). Na técnica de DLS (Figura 3A) as nanopartículas são analisadas em conjunto através de dispersão de luz, enquanto que na técnica de NTA (Figura 3F) cada partícula é focalizada e avaliada o seu coeficiente de difusão no meio e, na sequência, é calculada a distribuição de tamanho do conjunto de partículas. O grupo controle (NP) pela técnica DLS apresentou tamanho médio inicial de $176,4 \pm 0,71$ nm e $161,1 \pm 1,19$ nm para NPDM. Pela técnica NTA, o tamanho médio inicial foi de $284,2 \pm 16$ nm para NP e $246,9 \pm 8,3$ nm para NPDM.

A formulação NP apresentou índice de polidispersão (PDI) inicial de $0,276 \pm 0,02$ e $0,272 \pm 0,01$ para NPDM (Figura 3B). Não foram observadas alterações significativas no PDI em função do tempo de armazenamento (90 dias).

Embora tenha havido uma diminuição no valor de pH (Figura 3D) para NPDM (inicial $4,8 \pm 0,01$ e após 60 dias de armazenamento $4,69 \pm 0,01$, permanecendo até 90 dias), esta alteração não foi suficiente para desestabilizar o sistema, uma vez que não foram observados aumentos significativos do diâmetro médio e índice de polidispersão que seriam indicativos da formação de agregados.

O grupo NP apresentou potencial zeta médio de $30,9 \pm 0,75$ mv e NPDM inicial de $31,1 \pm 6,67$ mv e, após 90 dias $33,6 \pm 3,41$ mv (Figura 3C). Quanto maior o potencial zeta,

mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera as forças de van der Waals que promovem a agregação. Potencial zeta mais elevado implica em dispersão mais estável, valores baixos podem indicar instabilidade coloidal que pode levar à agregação. Os valores do potencial zeta variando de -30 mV a $+30$ mV refletem a carga superficial necessária de partículas que impede sua agregação e contribui para sua estabilidade em longo prazo em soluções com baixo teor de sal. Assim, suspensões com valores de potencial zeta superiores a $+30$ mV ou inferiores a -30 mV são estáveis, enquanto aquelas cujo valor se situa acima de -30 mV e abaixo de $+30$ mV são instáveis e podem flocular (Piotrowski et al., 2015).

A metodologia utilizada para a nanoencapsulação do DMT foi adequada. O sistema tripolifosfato de sódio/quitosana apresentou boas características coloidais e também uma eficiência de encapsulação do DMT bastante alta ($99,3 \pm 0,32$ %) (Figura 3E). Outro aspecto importante é que o sistema apresentou uma boa estabilidade físico-química ao longo do tempo e no caso da eficiência de encapsulação foi observada uma redução em torno de 3 % neste parâmetro após 90 dias de armazenamento. Pode-se, portanto, considerar que as nanopartículas de tripolifosfato de sódio/quitosana (TPP/CS) permaneceram estáveis por pelo menos 90 dias.

Em relação aos testes de toxicidade em embriões de zebrafish, o dimetoato técnico mostrou-se estável no meio de cultivo por 96 h (tempo do ensaio de FET *Test*) avaliado por CLAE, apresentando apenas 5 % de degradação. Os resultados apresentados neste trabalho da associação de dimetoato com nanopartículas de tripolifosfato de sódio/quitosana (NPDM) pode ser uma boa alternativa para o uso deste ingrediente ativo na agricultura devido a sua estabilidade. Por outro lado, os resultados obtidos mostraram que a nanoformulação pode ser tóxica para embriões de *Danio rerio*, já que mesmo as nanopartículas sem ativo (NP) apresentaram toxicidade aos embriões de zebrafish, invalidando os testes ecotoxicológicos com esse modelo animal. O seu uso poderá ser reavaliado em testes futuros, uma vez que possui excelentes características físico-químicas para uso na agricultura.

CAPÍTULO II

Avaliação toxicológica de sistema nanocarreador de alginato de sódio/quitosana para dimetoato em embriões de zebrafish

José Henrique Vallim ¹; Zaira Clemente ¹; Anderson do Espírito Santo Pereira ²; Cláudia Viana Maurer Morelli ³; Vera Lúcia de Castro ¹; Leonardo Fernandes Fraceto ²

¹ Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança, Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP-340, Km 127,5, CEP 13918-110, Jaguariúna, SP, Brasil

² Departamento de Engenharia Ambiental, Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba (ICTS), Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Avenida Três de Março, 511, CEP 18087-180, Sorocaba, SP, Brasil

³ Departamento de Genética Médica, Faculdade de Medicina, Laboratório de Zebrafish, Unicamp, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil

***Autor correspondente:** Leonardo Fernandes Fraceto - leonardo.fraceto@unesp.br

RESUMO

Os inseticidas organofosforados como o dimetoato são o grupo de inseticidas mais amplamente usado no mundo, sendo também bastante utilizado no Brasil. Devido ao elevado potencial de contaminação dos corpos d'água e de promoção de efeitos neurotóxicos, o dimetoato representa ameaça à saúde humana e ao meio ambiente. O desenvolvimento de formulações com liberação sustentada de agrotóxicos apresenta-se como uma alternativa inovadora no controle de pragas agrícolas, aumentando a sua eficácia e reduzindo seu impacto ambiental. Baseado nestas premissas, este estudo teve por objetivo principal desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas de alginato de sódio/quitosana (ALG/CS) pelo método de gelificação iônica para liberação sustentada do inseticida dimetoato, bem como avaliar a sua toxicidade em comparação com formulações técnica e comercial em embriões e larvas de zebrafish. Para isso, foram avaliados parâmetros de letalidade, comportamento e atividade enzimática em embriões da espécie *Danio rerio* (zebrafish) expostos às formulações de nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM), nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM), técnico (DMT) e comercial (DMC). O sistema nanocarreador ALG/CS apresentou boa estabilidade coloidal e eficiência de encapsulação de 74,8 % (NPDM). Os ensaios realizados com embriões e larvas de zebrafish indicaram que a incorporação do dimetoato em nanopartículas de ALG/CS aumentou em 61,5 % a sua CL₅₀, indicando diminuição de sua toxicidade quando comparado com a formulação técnica. Os efeitos tóxicos no desenvolvimento embriolarval ocorreram predominantemente nas maiores concentrações testadas após a exposição ao DMC, seguido do DMT. A nanopartícula NPDM não afetou o comportamento e tamanho das larvas, mas aumentou a inibição da acetilcolinesterase (AChE) em relação às formulações técnica e comercial do dimetoato. Neste trabalho, o zebrafish mostrou ser um bom modelo para estudo de exposições ambientais a nanopesticidas e pode ser usado como ferramenta de triagem para determinar os riscos associados à exposição destes compostos, em especial, nos estágios iniciais de desenvolvimento. Com os resultados obtidos, espera-se contribuir para os critérios de segurança do sistema de liberação modificado do dimetoato nanoencapsulado. Apesar das nanopartículas NPDM apresentarem potencialidade de uso em culturas agrícolas, é importante que mais trabalhos sejam desenvolvidos sob condições ambientais relevantes para que esse sistema possa ser comercialmente utilizado com segurança e com a adequada relação custo-benefício.

Palavras chave: dimetoato nanoencapsulado, zebrafish, toxicidade, comportamento, acetilcolinesterase

ABSTRACT

Organophosphate insecticides such as dimethoate are the most widely used insecticide group in the world and are also widely used in Brazil. Due to the high potential for contamination of water bodies and the promotion of neurotoxic effects, dimethoate poses a threat to human health and the environment. The development of formulations with sustained release of pesticides is an innovative alternative in the control of agricultural pests, increasing their effectiveness and reducing their environmental impact. Based on these assumptions, this study aimed to develop and characterize sodium alginate/chitosan (ALG/CS) polymeric nanoparticles by the ionic gelation method for sustained release of the insecticide dimethoate, as well as to evaluate its toxicity in comparison with technical formulations and in embryos and zebrafish larvae. For this, lethality, behavior and enzymatic parameters were evaluated in *Danio rerio* (zebrafish) embryos exposed to ALG/CS without (NP) and dimethoate (NPDM) nanoparticles, non-dimethoate ALG/CS nanoparticles encapsulated (NP_DM), technical (DMT), and commercial (DMC). The ALG/CS nanocarrier system showed good colloidal stability and encapsulation efficiency of 74.8 % (NPDM). Tests carried out with zebrafish embryos and larvae indicated that incorporation of dimethoate into ALG/CS nanoparticles increased their LC50 by 61.5 %, indicating a reduction in their toxicity when compared to the technical formulation. Toxic effects on embryolarval development occurred predominantly at the highest concentrations tested after exposure to DMC, followed by DMT. NPDM nanoparticle did not affect larval behavior and size, but increased inhibition of acetylcholinesterase (AChE) in relation to the technical and commercial dimethoate formulations. In this paper, zebrafish has been shown to be a good model for studying environmental exposures to nanopesticides and can be used as a screening tool to determine the risks associated with exposure of these compounds, especially in the early stages of development. With the results obtained, it is expected to contribute to the safety criteria of the modified nanoencapsulated dimethoate release system. Although NPDM nanoparticles have potential use in agricultural crops, it is important that more work be done under relevant environmental conditions so that this system can be used safely and cost-effectively.

Keywords: nanoencapsulated dimethoate, zebrafish, toxicity, behavior, acetylcholinesterase

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o uso da nanotecnologia mostrou um grande potencial para criar novas formulações e com isso melhorar a eficácia e a segurança dos pesticidas (Zhao et al., 2018). Desta forma, a nanotecnologia pode melhorar a produtividade das culturas e diminuir os efeitos prejudiciais ao ambiente (Khandelwal et al., 2016; Kumar et al., 2017; Walker et al., 2018).

Fórmulas nanoencapsuladas utilizam uma grande diversidade de nanomateriais (NM) (Slattery et al., 2019). A nanoencapsulação de pesticidas pode prover cinética de liberação controlada do ingrediente ativo enquanto aumentam eficientemente a sua permeabilidade, estabilidade e solubilidade. A entrega controlada de pesticidas é essencial para reduzir a dosagem de ingredientes ativos com maior eficácia e para superar a perda de pesticidas devido à lixiviação e evaporação (Kumar et al., 2019; Vurro et al., 2019).

Embora muito se discuta os possíveis benefícios das formulações de nanopesticidas (Duhan et al., 2017), surgiram preocupações relativas à sua aplicação agrícola particularmente quanto à sua biossegurança (Iavicoli et al., 2017). Em alguns casos, os nanopesticidas podem ter propriedades físico-químicas e toxicológicas desconhecidas. Além disso, um aumento na solubilidade dos nanopesticidas aumenta seu potencial para contaminar fontes naturais de água (Villaverde et al., 2018). Assim, existe uma grande demanda de estudos que avaliem os possíveis efeitos tóxicos e ambientais – especialmente o aquático, da exposição aos NM (Chowdhury et al., 2013; Hou et al., 2015). Em consequência, a falta de informação sobre o destino e comportamento no ambiente dos nanopesticidas e os seus efeitos na saúde humana e animal pode estar inibindo a sua incorporação na agricultura. Diante de tais observações, para promover estratégias de desenvolvimento de produtos mais seguros e avaliar os riscos ambientais dos NM, é essencial entender o seu destino no ambiente e nos organismos (Pandey et al., 2018).

Os organofosforados são uma classe comum de inseticidas que contaminam as águas superficiais globalmente devido às extensas aplicações em paisagens urbanas e agrícolas. O uso desses inseticidas levou ao aumento da produção agrícola, no entanto, a lixiviação de pesticidas nos ecossistemas aquáticos vizinhos pode representar um risco significativo para organismos não-alvo, incluindo seres humanos e peixes (Schmitt et al., 2019).

Entre os organofosforados, o dimetoato é frequentemente encontrado em diferentes regiões do mundo (Souza et al., 2018). No ambiente, devido à persistência do dimetoato nas culturas e no solo, a maior parte da população está exposta cronicamente a baixas doses deste composto através de, por exemplo, alimentos e água potável (Mesallam et al., 2018). O

dimetoato possui elevado potencial de contaminação da água subterrânea, devido principalmente à sua mobilidade e baixa retenção (Lima et al., 2007). No ambiente, a hidrólise representa a principal via de degradação do dimetoato e tem como principal produto de degradação o ometoato (Van Scoy et al., 2016).

Em organismos, a promoção da intoxicação pelo dimetoato ocorre pela interferência com a atividade enzimática, especialmente a inibição da acetilcolinesterase (AChE) (Mesallam et al., 2018). Outra ação do dimetoato é a geração de estresse oxidativo, diminuindo a capacidade antioxidante total dos tecidos e aumentando a oxidação de proteínas e lipídios (Astiz et al., 2009; Jallouli et al., 2016; Martínez-Morcillo et al., 2019; Shadegan et al., 2018).

A inibição da AChE provoca um subsequente acúmulo de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica e estimulação de receptores colinérgicos (Mesallam et al., 2018). A ACh é um neurotransmissor envolvido no movimento e um importante modulador de funções cognitivas, como aprendizagem e memória (Janeczek et al., 2017; Roy et al., 2017). Alterações na histopatologia e no nível de acetilcolinesterase (AChE) são bons biomarcadores e podem ser usados com sucesso para detectar a exposição a pesticidas organofosforados em peixes (Doherty et al., 2016).

Em peixes, a AChE é considerada a isoenzima predominante entre todas as colinesterases e está localizada principalmente na membrana das células nervosas pós-sinápticas, estando envolvida no controle da neurotransmissão através da hidrólise do neurotransmissor ACh. A butirilcolinesterase (BChE) é outra forma comum de colinesterase em peixes e pode ser encontrada principalmente no plasma sanguíneo. Sua função ainda é pouco elucidada, mas parece estar envolvida na proliferação celular. Outra isoenzima que pode ser encontrada na maioria dos organismos é a propionilcolinesterase, uma pseudocolinesterase com maior afinidade para o substrato propionilcolina (Pereira et al., 2019). Segundo Marinho et al. (2019), a AChE é a principal colinesterase presente no cérebro de *Danio rerio* adulto, enquanto que em seu tecido muscular, parecem estar presentes AChE e BChE e, possivelmente, haja diferença molecular entre as colinesterases presentes no cérebro e nos tecidos musculares.

Por outro lado, o comportamento larval de zebrafish após exposição ao organofosforado pode ser determinado por fatores além da inibição da AChE (Schmitt et al., 2019). Deve-se observar que eles podem ocasionar efeitos neurocomportamentais em baixas concentrações, as quais não reduzem significativamente a atividade da AChE (Aldridge et al., 2005; Eddins et al., 2010). Portanto, os seus mecanismos de ação não são totalmente claros.

De acordo com Kais et al. (2015), os embriões de zebrafish representam um modelo adequado para investigar vários modos de ação neurotóxicos como a inibição da AChE. Ele pode ser usado como modelo de exposição ao organofosforado devido à fácil visualização dos processos de desenvolvimento e a expressão de AChE que se presta à modelagem da inibição e reativação da enzima (Koenig et al., 2016). O zebrafish é um organismo modelo que tem sido utilizado em ecotoxicologia e outras áreas para medir os efeitos dos poluentes sobre a comunidade de peixes (Kopp et al., 2018), cujos efeitos toxicológicos são semelhantes em humanos (Dale et al., 2017; Meshalkina et al., 2017; Strungaru et al., 2018; Yao et al., 2018; Mezzomo et al., 2019).

Embora as formulações comerciais de diferentes países possam variar em relação aos ingredientes desconhecidos, os estudos de comparação de efeitos adversos provocados pela sua comercialização e as formulações de nível técnico dos organofosforados parecem ser necessárias para uma avaliação de risco mais precisa e adequada (Mossa e Abbassy, 2012). Puglis e Boone (2011) sugerem que é necessário testar os efeitos de ingredientes ativos em formulações comerciais de pesticidas, já que em alguns casos, os outros ingredientes têm efeitos prejudiciais sobre espécies não-alvo. Eles encontraram uma diferença significativa na sobrevivência de girinos *Rana clamitans* (sapo verde) em 96 h com ingredientes ativos de nível técnico versus formulações comerciais dos pesticidas testados. Por outro lado, testes de toxicidade realizados com os ingredientes ativos e suas formulações comerciais não apresentaram diferenças na toxicidade para a alga *Raphidocelis subcapitata* (Mansano et al., 2017). De acordo com o exposto e visando a produção de um sistema de liberação modificada de quitosana para o inseticida dimetoato que seja menos tóxica ao ambiente, realizou-se a produção de nanopartículas de alginato de sódio/quitosana com dimetoato (NPDM). O alginato de sódio foi combinado à quitosana para fornecer proteção à matriz polimérica (Bhattarai et al., 2011; Tønnesen e Karlsen, 2002). A fim de avaliar a segurança da nanoformulação, foi avaliada a toxicidade do dimetoato nanoencapsulado em parâmetros alterações morfológicas e mortalidade, bem como possíveis alterações comportamentais de embriões/larvas de zebrafish e relacionando-os à atividade específica da enzima AChE. Também foram avaliadas as formulações técnica e comercial do dimetoato para fins de comparação com a formulação nanoencapsulada. Por fim, apesar de ter baixa toxicidade (Mohammed et al., 2017), foram avaliados os possíveis efeitos tóxicos da quitosana no embrião.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Foram utilizados o organofosforado dimetoato (O,O-dimetil-S-metilcarboilmetil fosforoditioato) grau técnico Nortox[®] (98,2 %) – DMT; dimetoato comercial utilizado foi o Dimetoato 500 EC Nortox[®] (500 g/L – 50,0 % m/v) – DMC; alginato de sódio, CAS 9005-38-3, W201502, Sigma-Aldrich[®] e quitosana com 80 % de acetilação, CAS 9012-76-4, 448869-250G, Sigma-Aldrich[®] e 3,5-Dichloroaniline ≥ 98 %, D55792, Sigma-Aldrich[®]. Os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] ou JT Baker[®].

2.2 Manutenção dos animais

Os peixes reprodutores (*Danio rerio* – *wild-type line*) foram mantidos em condições de laboratório (Rack Hydrus, modelo ZEB-40, Alesco[®]). Os parâmetros para peixes foram: condutividade $400 \pm 0,2$ μ S, temperatura 28 °C $\pm 0,2$ e pH $7,0 \pm 0,2$. A condutividade foi mantida com uso de Red Sea Salt[®] e o pH controlado com tampão ácido (Acid Buffer[™]) e alcalino (Alkaline Buffer[™]), Seachem[®]. Os embriões de *Danio rerio* foram mantidos em água reconstituída, preparada de acordo com U.S.EPA (2002). Os procedimentos utilizados neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente (CEUA-Embrapa Meio Ambiente, protocolo n° 003/2015) (Anexo I) e da Unicamp (protocolo n° 5186-1/2019) (Anexo II).

2.3 Preparo e caracterização das nanopartículas de alginato de sódio/quitosana sem (NP) e com dimetoato (NPDM)

As nanopartículas de alginato de sódio/quitosana foram produzidas usando o método de gelificação ionotrópica proposto por Sarmiento, et al. (2006), com modificações. Para produção das nanopartículas sem ativo (NP), foi preparado 8 mL uma solução aquosa de alginato de sódio a $0,6$ mg.mL⁻¹/12 h agitação e o pH final corrigido para 4,9. As nanopartículas com o ativo (NPDM) foram produzidas adicionando-se 12 mg de DMT à solução de NP. Foi adicionado 2 mL de solução aquosa de cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O/0,24 mg/mL) à primeira solução. O pré-gel de alginato de cálcio resultante foi mantido sob agitação durante 60 minutos. Nesta fase do processo ocorre a gelificação do alginato (reticulação do cloreto de cálcio sobre o alginato de sódio através de interações), formando uma estrutura conhecida por “eggbox” (Figura 1). Posteriormente, 2 mL de uma solução de quitosana (0,24 mg/mL em ácido acético a 1% e pH ajustado para 4,5 –

previamente preparada e mantida em agitação por 12 h para solubilizar e filtrada em membrana filtrante de 0,45 μm) foi adicionada ao polímero de alginato de cálcio (formação do complexo alginato-quitosana – Figura 2) e a mistura foi mantida sob agitação (500 RPM) por 30 minutos . A concentração final de DMT na formulação foi de 1 mg/mL.

Para a produção da solução estoque de NP_DM, adicionou-se 100 mg de DMT em balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume q.s.p. 100 mL com nanopartículas puras de NP (concentração final 1 mg/L).

Figura 1. Representação do modelo “egg box” (caixa de ovo). Átomos de O_2 envolvidos na coordenação com os íons Ca^{2+} são representados pelos pontos negros (Braccini e Pérez, 2001).

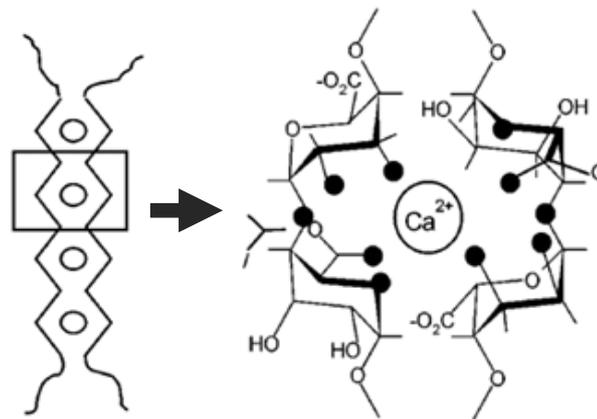
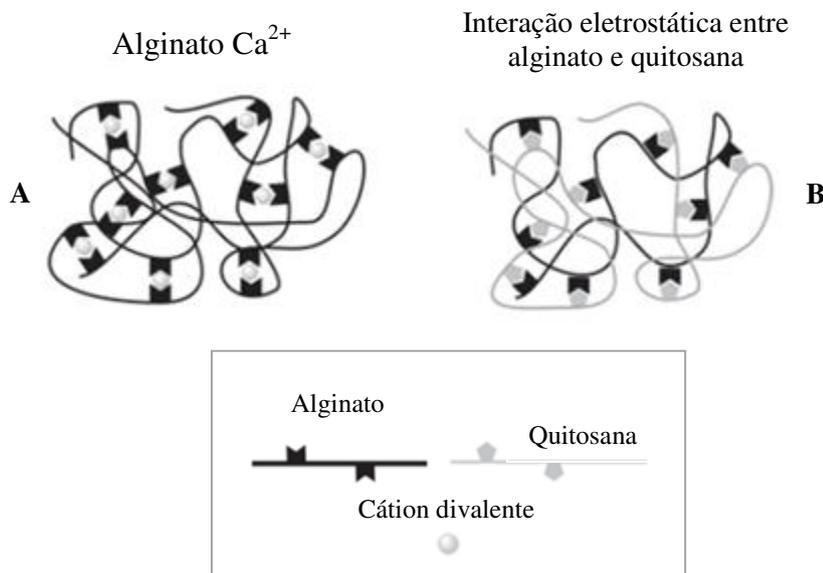


Figura 2. Representação da interação entre o alginato com íons Ca^{2+} (A) e quitosana (B) (Lawrie et al., 2007).



2.4 Caracterização físico-química das nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM) em meio de embrião

2.4.1 Análise de Rastreamento - *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA)

Para avaliação da distribuição de tamanho e determinação da concentração de nanopartículas nas formulações, foi utilizada a técnica de NTA (modelo ZS90, Malvern Instruments[®], UK). Para as análises de NTA, 10 µL da formulação de nanopartículas ALG/CS foram diluídas em água deionizada (volume final 1 mL). Cada amostra foi medida 10 vezes, sendo contadas aproximadamente 4000 partículas em média. As medidas foram realizadas em triplicata a 25 °C.

2.4.2 Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

A distribuição do tamanho das nanopartículas e índice de polidispersão foram medidos pela técnica *Dynamics Light Scattering* (DLS). Tanto para avaliação do tamanho (nm) e o índice de polidispersão (PDI), quanto para o valor do potencial zeta (mV), as medidas foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments[®], UK). As amostras foram analisadas em triplicata, sem diluição, com espalhamento de luz para detecção a um ângulo de 90°, a 25 °C.

2.4.3 Acompanhamento da estabilidade de sistemas nanoparticulados (pH)

Como forma de avaliar possível degradação (hidrólise) dos polímeros e componentes da formulação de sistemas nanoparticulados, foram realizadas medidas de pH em função do tempo. Os valores de pH foram determinados através do equipamento pHmetro (Tecnal[®]), previamente calibrado com solução tampão padrão de pH 4,0 e 7,0. As amostras foram avaliadas em triplicata, a 25°C.

2.4.4 Eficiência de encapsulação

As nanopartículas de ALG/CS com dimetoato (NPDM) foram centrifugadas por 30 minutos a 200 xg e filtradas em sistema Microcon–Millipore[®] com poro de 30 kDA. O filtrado foi separado para quantificação do dimetoato não associado às nanopartículas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O mecanismo de liberação do DMT foi investigado pela aplicação do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas (Korsmeyer et al., 1983).

2.4.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As amostras de nanopartículas foram previamente dialisadas, sendo as soluções adicionadas em membrana de celulose com poro de exclusão molecular de 1200 Da (*Dialysis Tubing*, Sigma[®]) durante 1 hora. Para posteriores análises, prepararam-se soluções de nanopartículas em água na proporção 1:4 (v:v). Para obtenção das imagens por AFM, as nanopartículas foram previamente diluídas na proporção 1:10000 e as leituras feitas no equipamento Nanosurf Easy Scan 2 Basic AFM-pattem BT02217 (Nanosurf[®], Switzerland). Para o escaneamento das amostras, em módulo de contato, foram usados *catilevers* TapA1-G (Budget Sensors[®], Bulgária).

2.5 Bioensaios

2.5.1 Tamanho e concentração das nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM) em meio de embrião

O tamanho (nm) e concentração das nanopartículas (partículas.mL⁻¹) foram determinados por NTA durante 96 horas (tempo de duração do FET Test) em meio para embrião zebrafish (U.S.EPA, 2002) (Figura 5 e Tabela 2).

2.5.2 Ensaios com embriões de zebrafish – *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*

Os embriões de *Danio rerio* (3 h pós-fertilização - hpf) foram expostos durante 96 h às condições teste, de acordo com o protocolo OECD 236 (2013). Realizaram-se testes preliminares para determinar a faixa de concentração letal média (CL₅₀ – mg.mL⁻¹) para 50 % dos organismos expostos. Foram testados os seguintes grupos experimentais: controle (somente meio embrião), nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM), nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM), dimetoato técnico (DMT) e dimetoato comercial (DMC).

As concentrações utilizadas para obtenção da CL₅₀ do DMT foram 0; 12; 62; 125; 250; 500 e 750 mg.mL⁻¹ e DMC 0; 2,2; 5; 10; 20; 40 e 80 mg/L. O controle positivo foi realizado com exposição a 4 mg.mL⁻¹ de dicloroanilina (3,5-Dichloroaniline ≥98 %, Sigma Aldrich[®], D55792). A toxicidade da quitosana e do alginato também foram avaliadas, não demonstrando toxicidade em concentrações até 100 mg.mL⁻¹.

Os efeitos subletais foram avaliados expondo embriões de *Danio rerio* (3 hpf) durante 96 h às soluções controle (meio embrião), NP, NPDM, NP_DM, DMT e DMC, nas concentrações CL₁₀, CL₂₀, CL₃₀, CL₄₀ e CL₅₀.

A exposição foi realizada em placas de poliestireno de 24 poços (n=24 organismos/grupo), sendo os embriões mantidos individualmente em 2 mL de solução teste, sob um ciclo claro/escuro de 14/10 h a $26,0 \pm 0,2$ °C em incubadora BOD (Incubadora BOD com fotoperíodo, SL-224, Solab[®]). Os embriões e larvas foram avaliados a cada 24 h através de estereomicroscópio (Model SMZ 2 LED, *software* Optika View Version 7.1.1.5, Optika[®]), para determinação da ocorrência de malformação e/ou mortalidade. As soluções foram totalmente renovadas a cada 24 h. Ao final das 96 h de exposição, larvas vivas (n=10 organismos/grupo) foram fotografadas em aumento de 2x para medição do comprimento total das larvas através do *software* Optika View Version 7.1.1.5, previamente calibrado através de uma escala milimétrica.

2.5.3 Análise de atividade específica da enzima acetilcolinesterase (AChE)

Larvas vivas foram coletadas 96 h após o início da exposição para determinação da atividade da AChE. As larvas foram lavadas 3 vezes (4 °C) e armazenados em tampão fosfato (0,5 mol/L, pH 7,0) a -80°C em microtubos Eppendorf[®], mantendo a proporção de 10 larvas em 0,5 mL de tampão (n=6 pools de larvas/grupo).

As amostras em tampão fosfato foram homogeneizadas utilizando um ultra-turrax (T10 Basic, IKA[®]) e então centrifugadas (10 min, 10000 \times g, 4 °C). O sobrenadante foi utilizado para a análise da atividade de acetilcolinesterase (AChE). A concentração de proteína nas amostras foi analisada através do método de Bradford (1976). Cinco pools de larvas foram analisados para cada grupo, e todas as leituras foram realizadas em triplicata. As análises foram realizadas em espectrofotômetro de microplaca 96 poços (Sunrise, Tecan[®]).

A atividade da AChE foi determinada de acordo com o método de Ellman (1961), modificado para microplaca (Silva de Assis, 1998): 15 μ L de homogenato foram adicionados a 15 μ L de acetiltiocolina 9 mmol/L (Acetylthiocholine iodide, Sigma Aldrich[®], A5751) e 70 μ L de DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), Sigma Aldrich[®], D218200), 0,75 mmol/L. A absorbância foi monitorada durante 5 min a 412 nm, 30 °C (11 ciclos/30 segundos de intervalo entre leituras).

2.5.4 Ensaio para avaliação de biomarcadores comportamentais em larvas de zebrafish (velocidade e distância percorrida)

Os testes para avaliação comportamental em larvas de zebrafish, foram realizados em equipamento DanioVision e analisado pelo *software* EthovisionXT, Noldus®. Os grupos controle, NP, NPDM, NP_DM, DMT e DMC foram avaliados após 96 h de exposição nas concentrações subletais CL₁₀, CL₂₀ e CL₃₀. Em placas de poliestireno de 96 poços, 36 larvas/grupo foram distribuídas individualmente por poço numa solução de 100 µL de meio embrião e 100 µL do meio/concentração a ser testado (volume total 200 µL). Foram avaliados parâmetros de velocidade (mm/s) e distância percorrida (mm) durante 10 minutos a 28 °C (n=36/grupo).

2.5.5 Análise estatística

A concentração letal média para ocasionar efeito nos parâmetros avaliados em 50 % dos organismos durante o período do teste (CL₅₀), e seus intervalos de confiança 95 %, foram determinados pelo módulo “Probit Analysis” do programa Statgraphics Centurion XVII Version 1.17.04 (Stat Point Technologies 2014), Anova de 1 via, seguido de Bonferroni. Os valores de CL₅₀ foram considerados diferentes estatisticamente quando não houve sobreposição dos intervalos de confiança.

O comprimento total das larvas, atividade de AChE, velocidade e distância percorrida foram analisados através de Kruskal-Wallis (KW), seguido do teste de Bonferroni, considerando o efeito dos fatores tempo de exposição e concentração, bem como a interação entre eles. Foi adotado o nível de significância de 5 % para todas as análises

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização das nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM) em meio de embrião

O tamanho das nanopartículas foi determinado por NTA e DLS, com valores médios no tempo 0 de $282,9 \pm 3,7$ nm para NP e $301,5 \pm 6,8$ nm para NPDM (Figura 3A). A média do tamanho em análise nos tempos 0, 15 e 30 dias foi de 392,32 nm para NP e 303,1 nm para NPDM. Ambas as técnicas demonstraram os mesmos resultados para os tamanhos médios para as nanopartículas com e sem dimetoato.

A técnica de DLS foi usada para determinar os valores de PDI (Figura 3B). O valor médio (tempo 0) para as nanopartículas sem ativo (NP) foi de $0,574 \pm 0,05$ e $0,456 \pm 0,02$

para NPDM. A média nos tempos 0, 15 e 30 dias foi de 0,425 para NP e 0,491 NPDM. A média nos tempos 0, 15 e 30 dias foi de 0,425 para NP e 0,491 para NPDM. A Tabela 1 demonstra os dados obtidos para tamanho (Figura 3A), PDI (Figura 3B) e potencial zeta (Figura 3C) nos tempos 0, 15 e 30 dias. Tanto as nanopartículas NP (Figura 4A), quanto NPDM (Figura 4B) apresentaram formato esférico irregular de acordo com a técnica AFM utilizada que, junto às técnicas NTA e DLS, corroboraram para a validação e caracterização do tamanho das nanopartículas.

Figura 3. Estabilidade das nanopartículas de alginato de sódio/quitosana com (NP) e sem dimetoato (NPDM) avaliadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) nos tempos 0, 15 e 30 dias. São apresentados os dados obtidos em função do tempo: A) tamanho (nm); B) índice de polidispersão (PDI); C) potencial zeta (mV); D) % intensidade (PDI) para NP e (E) % intensidade (PDI) para NPDM. As amostras foram analisadas em triplicata, a 25 °C.

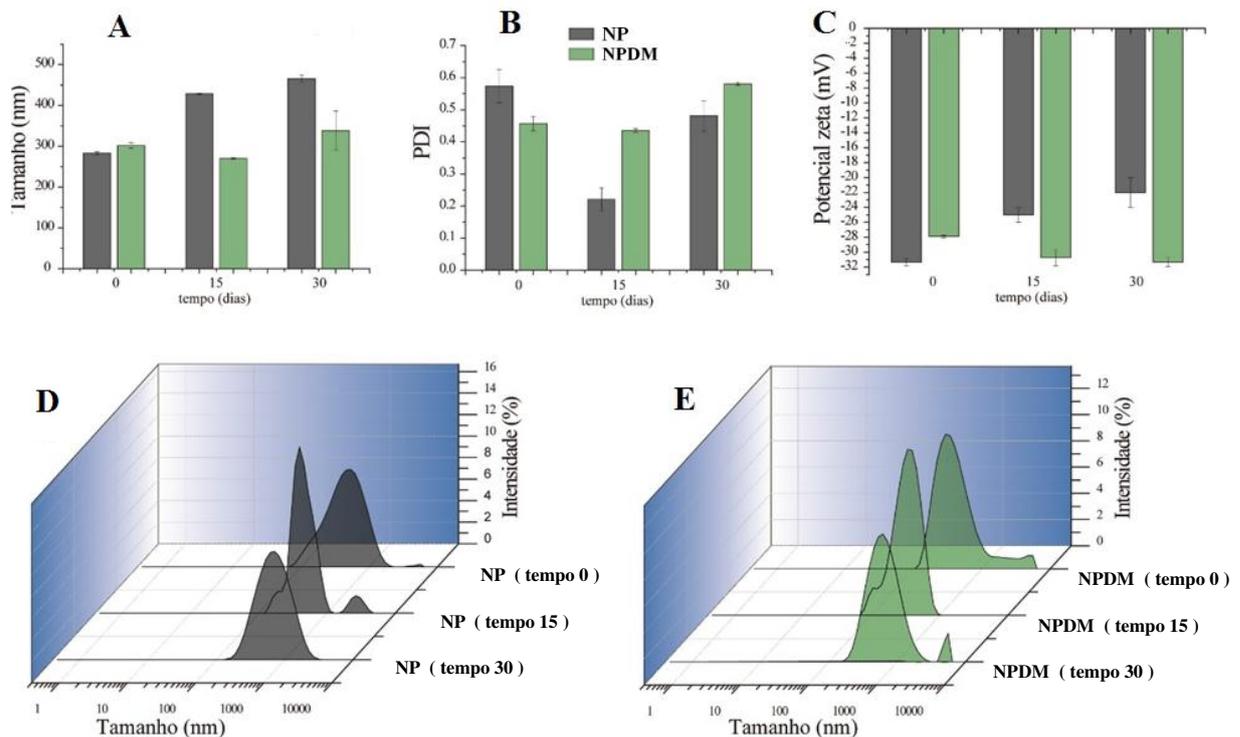
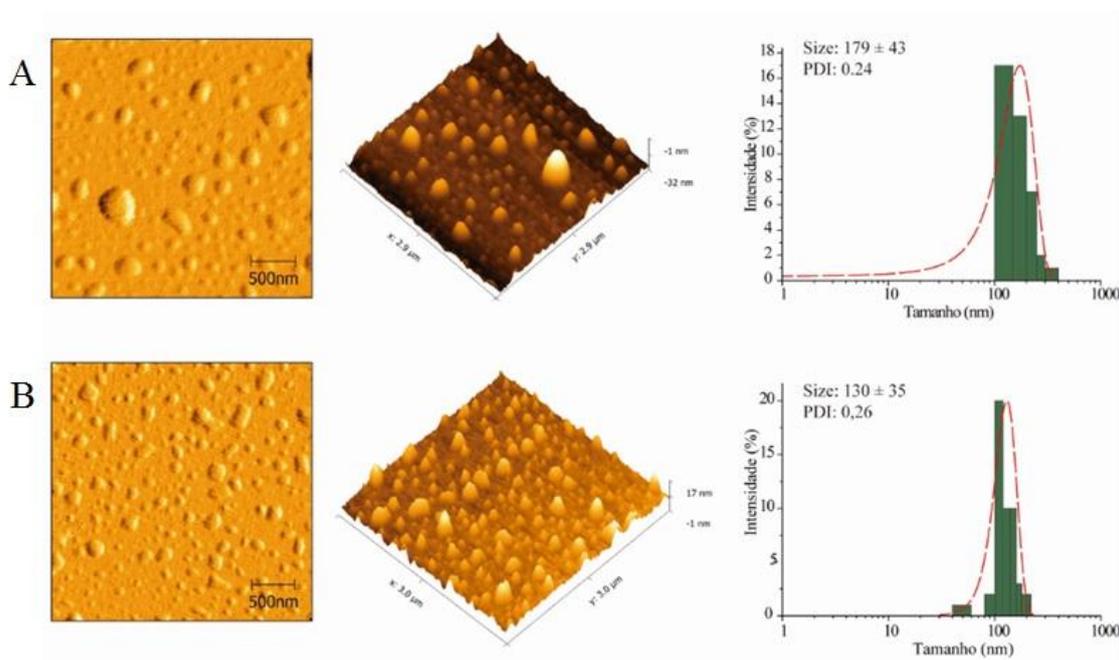


Tabela 1. Valores do tamanho (nm), PDI e potencial zeta (mV) nos tempos 0, 15 e 30 dias para as nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM). As amostras foram analisadas em triplicata, pH 4,9 a 25°C.

Tempo (dias)	pH	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NP (tempo 0)	4,9	282,9 ± 3,7	0,574 ± 0,051	-31,3 ± 0,4
NPDM (tempo 0)	4,9	301,5 ± 6,8	0,456 ± 0,022	-27,9 ± 0,2
NP (tempo 15)	4,9	428,3 ± 1,3	0,220 ± 0,036	-25,0 ± 1,0
NPDM (tempo 15)	4,9	269,8 ± 1,7	0,435 ± 0,006	-30,7 ± 1,0
NP (tempo 30)	4,9	465,6 ± 8,4	0,481 ± 0,047	-22,0 ± 2,0
NPDM (tempo 30)	4,9	337,9 ± 48,4	0,581 ± 0,005	-31,3 ± 0,5

Figura 4. Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM). As imagens mostram as nanopartículas sem (A) e com dimetoato (B) com um formato esférico irregular e de diversos tamanhos. O tamanho médio para o controle é de 179 nm e para nanopartículas com dimetoato de 130 nm. Os histogramas foram obtidos a partir da contagem de 50 partículas. Diluição 1:10000. Tratamento das imagens *software* Gwyddion (64 bit).



3.2 Tamanho e concentração das nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM) em meio de embrião

As Figuras 5A e 5B representam os valores do tamanho (nm) e concentração (partículas.mL⁻¹) das nanopartículas NPDM após determinação por NTA em meio de embrião

Figura 5. Valores do tamanho (nm) e concentração de nanopartículas (partículas.mL⁻¹) com dimetoato (NPDM) em meio para embrião de zebrafish (U.S.EPA, 2002) em 0 e 24 h (Figura A) e 24 e 96 h (Figura. B). Ambas as figuras demonstram que em função do tempo (0 e 96 h) não houve alteração significativa no tamanho das partículas, entretanto, ocorreu uma queda na concentração de partículas, notadamente nas primeiras 24 h. As amostras foram analisadas em triplicata, pH 4,9 a 25 °C.

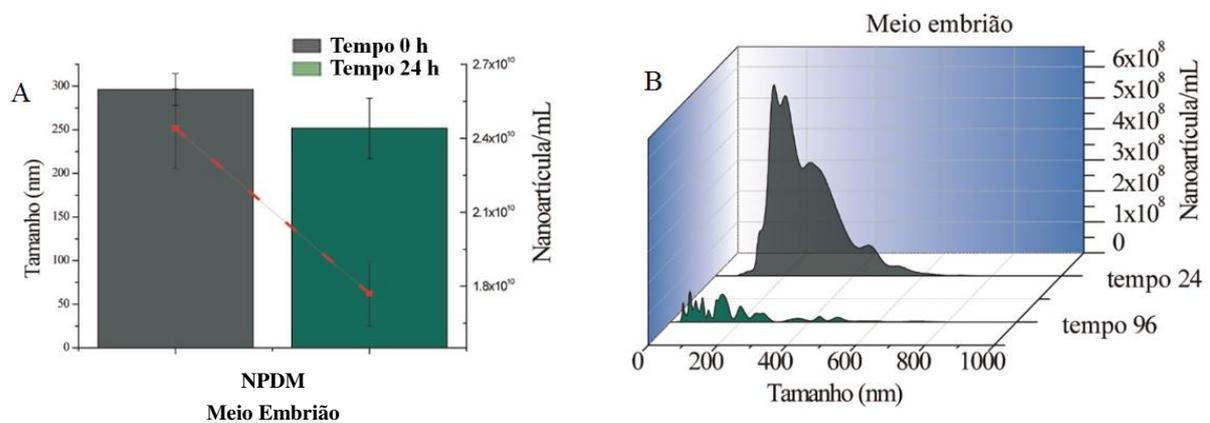


Tabela 2. Valores do tamanho (nm) e concentrações de partículas (partículas.mL⁻¹) para NPDM nos tempos 0 e 96 h em meio para embrião de zebrafish (U.S.EPA, 2002). As amostras foram analisadas em triplicata, pH 4,9 a 25 °C.

Tempo (horas)	pH	Tamanho (nm)	Concentração (partículas.mL ⁻¹)
NPDM (tempo 0)	4,9	296,2 ± 18,1	2,44 x 10 ¹⁰ ± 1,62 x 10 ¹⁰
NPDM (tempo 96)	4,9	251,8 ± 34,4	1,77 x 10 ¹⁰ ± 1,31 x 10 ¹⁰

Sugere-se que, por não ter havido diferença significativa no tamanho das nanopartículas no meio, a adição do DMT às nanopartículas de ALG/CS não alterou a estrutura das nanopartículas. Todavia, a queda na concentração das nanopartículas pode ser atribuída à degradação do ativo em função do tempo.

As técnicas NTA e DLS analisam o tamanho das nanopartículas pelo seu movimento browniano. Enquanto que o NTA avalia a distribuição do tamanho contando nanopartículas individualmente, o DLS avalia a granel (Filipe et al., 2010).

Outro parâmetro avaliado no meio de embrião foi o pH final das formulações. Em ambos os casos (nanopartículas com e sem ativo), o pH foi em torno de 4,9 não indicando alterações significativas ao longo do tempo e provável ausência de hidrólise do sistema NPDM no meio de embrião.

Avaliou-se também o tamanho, concentração e valores de PDI para nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM) (Tabela 3). Em dados obtidos pela técnica NTA (Figura 6), observou-se que o sistema inicialmente (tempo 0 h) apresentou tamanho de $248,4 \pm 0,4$ nm, havendo um aumento em 2 h ($297,6 \pm 0,3$ nm) e diminuição em 4 h ($277,7 \pm 0,2$ nm).

Figura 6. Valores do tamanho (nm) das nanopartículas de alginato de sódio/quitosana com dimetoato não encapsulado (NP_DM) em meio para embrião de zebrafish (U.S.EPA, 2002), obtidos pela técnica NTA nos tempos 0, 2 e 4 h. As amostras foram analisadas em triplicata, pH 4,9 a 25 °C.

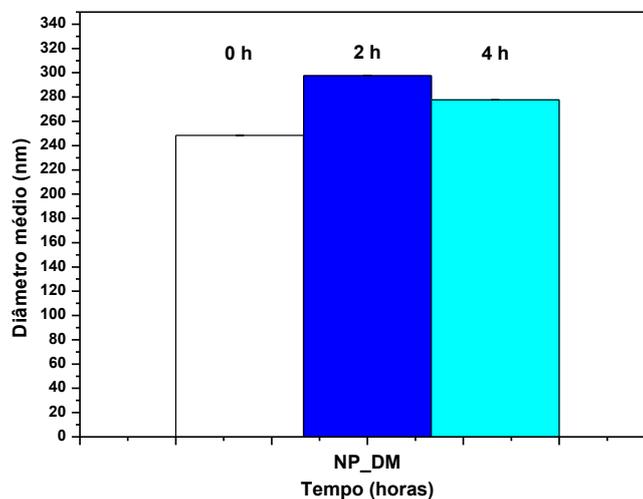


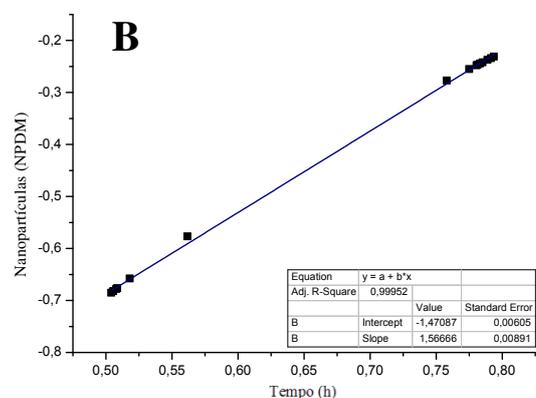
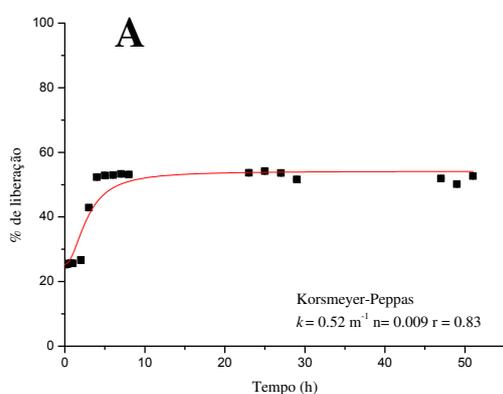
Tabela 3. Valores do tamanho (nm) e concentração (partículas.mL⁻¹) obtidos pela técnica NTA para NP_DM, bem como valores de PDI (técnica DLS) em meio para embrião de zebrafish (U.S.EPA, 2002). As amostras foram analisadas em triplicata, pH 4,9 a 25 °C.

Tempo (horas)	pH	Tamanho (nm)	PDI	Concentração (partículas.mL ⁻¹)
NP_DM (tempo 0)	4,9	248,4 ± 0,4	0,329 ± 0,03	1,63 x 10 ⁸ ± 3,40 x 10 ⁷
NP_DM (tempo 2)	4,9	297,6 ± 0,3	0,383 ± 0,002	5,75 x 10 ⁸ ± 1,51 x 10 ⁷
NP_DM (tempo 4)	4,9	277,7 ± 0,2	0,421 ± 0,005	8,78 x 10 ⁸ ± 6,15 x 10 ⁷

3.3 Ensaios de cinética de liberação

Os ensaios de cinética de liberação demonstram em % a liberação das nanopartículas em função do tempo (Figura 7A e 7B). O mecanismo de liberação do DMT pelas nanopartículas foi investigado pela aplicação do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas (Korsmeyer et al., 1983). A porcentagem de encapsulação foi de 74,8 % e o sistema NPDM apresentou 54,4% de liberação após 24 h. Análises realizadas por HPLC não demonstraram alterações no tempo de retenção ou picos adicionais para o DMT durante o ensaio de cinética, indicando que o DMT permaneceu estável após a preparação das nanopartículas de NPDM.

Figura 7. Ensaio de cinética de liberação (%) do ativo pelas nanopartículas. A) Perfil de liberação das nanopartículas com dimetoato (n=3; pH 4,9; 25 °C). B) Perfil de liberação das nanopartículas com dimetoato ajustado pelo modelo matemático de Korsmeyer-Peppas. O sistema apresentou liberação de 25,2 % em 190 minutos.

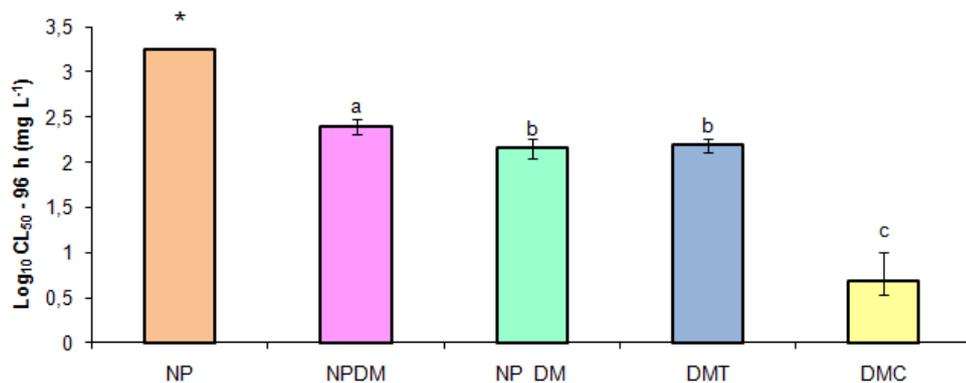


3.4 Ensaios com embriões de zebrafish – *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*

3.4.1 Avaliação da mortalidade e cálculo da CL_{50}

A mortalidade nos grupos controle foi menor que 10 % em todos os bioensaios realizados. A mortalidade no grupo exposto a dicloroanilina (controle positivo embriões) foi de 100 % após 24 h de exposição. Estes dados validam os testes realizados (OECD 1992, 2013). Os valores de CL_{50} ($mg.L^{-1}$) obtidos para NP, NPDM, NP_DM, DMT e DMC foram, respectivamente 1758,62; 251,80; 143,28; 155,02 e 4,83 $mg.L^{-1}$. A (Figura 8) expressa os valores de CL_{50} como Log_{10} . Teste estatístico determinado pelo módulo “Probit Analysis” do programa Statgraphics Centurion XVII Version 1.17.04 (Stat Point Technologies, 2014).

Figura 8. Concentração letal média CL_{50} ($mg.L^{-1}$) para 50 % dos organismos expostos a diferentes tratamentos durante 96 h. Os grupos avaliados foram: nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM); nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM); dimetoato técnico (DMT) e dimetoato comercial (DMC). (n=24/concentração testada). As barras verticais representam o intervalo de confiança 95 %. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p<0,05$) dos valores de CL_{50} -96 h. *Intervalo de confiança 95 % não determinado. Teste estatístico determinado pelo módulo “Probit Analysis” do programa Statgraphics Centurion XVII Version 1.17.04 (Stat Point Technologies, 2014).



Devido à ausência de uma apropriada correlação dose-resposta em consequência da baixíssima toxicidade de NP, não foi possível determinar os intervalos de confiança 95 % referente à CL_{50} deste tratamento. Por este motivo não foi possível comparar o valor deste parâmetro com os valores dos demais tratamentos. Apesar de não se constatar diferença significativa ($p<0,05$) entre os valores CL_{50} de NP e dos outros tratamentos, a toxicidade variou de 7 vezes (em relação a NPDM) a 361 vezes maior (em relação a DMC) para estes

com relação a NP. Isto demonstra a inocuidade das nanopartículas de ALG/CS na ausência de DMT.

Constatou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de CL_{50-96} h de NPDM e os de NP_DM, DMT e DMC, o que indica a menor toxicidade de NPDM. A incorporação do dimetoato em nanopartículas de ALG/CS (NPDM) aumentou em 62 % sua CL_{50-96} h, indicando sua menor toxicidade em relação ao produto técnico (DMT). NPDM apresentou CL_{50-96} h 52 vezes maior em relação a DMC. O DMT quando comparado ao produto comercial (DMC), apresentou CL_{50-96} h 32 vezes maior. As nanopartículas de ALG/CS (NP) apresentaram CL_{50} de $1758,6 \text{ mg.L}^{-1}$, demonstrando serem um bom nanocarreador pela ausência de toxicidade. A Tabela 4 expressa os valores obtidos para CL_{50-96} h (mg.L^{-1}) 50, 40, 30 20 e 10 % dos organismos expostos aos diferentes tratamentos durante 96 h.

Tabela 4. Concentração letal média CL_{50} (mg.L^{-1}) para 50, 40, 30 20 e 10 % dos organismos expostos a diferentes tratamentos durante 96 h para os grupos: nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM); nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM); dimetoato técnico (DMT) e dimetoato comercial (DMC). ($n=24$ /concentração testada). Intervalo de confiança 95 %. Teste estatístico determinado pelo módulo “Probit Analysis” do programa Statgraphics Centurion XVII Version 1.17.04 (Stat Point Technologies, 2014). $p < 0,05$.

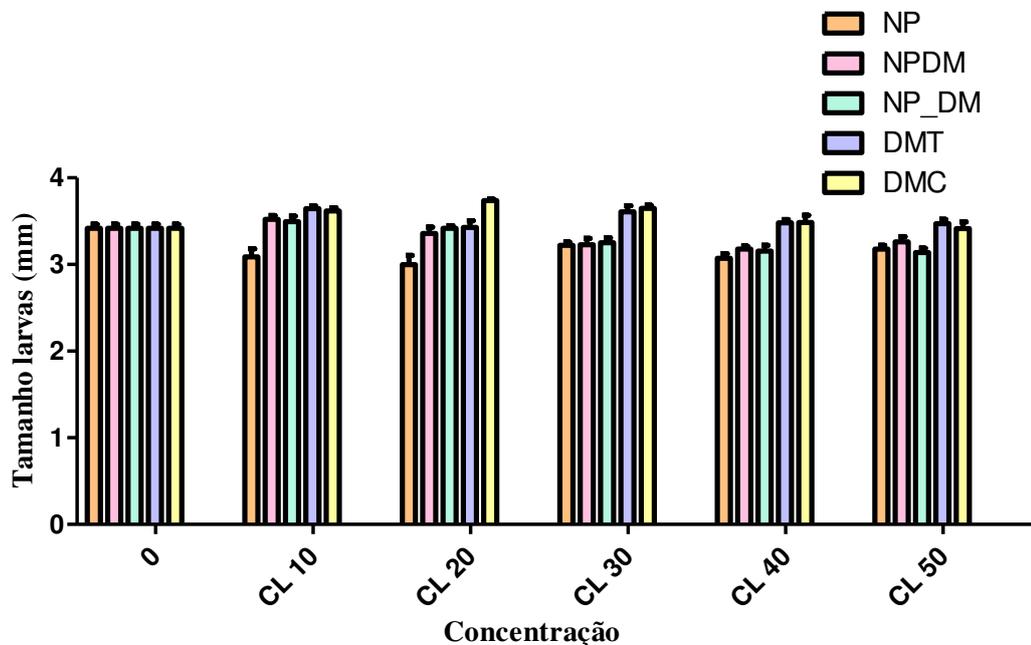
CL_{50-96} h (mg.L^{-1})	NP	NPDM	NP_DM	DMT	DMC
CL_{50}	1758,62	251,806	143,281	155,02	4,83
CL_{40}	1376,37	207,503	114,385	138,74	2,56
CL_{30}	967,406	160,103	83,468	121,32	1,61
CL_{20}	488,781	104,63	47,286	100,93	1,21
CL_{10}	351,724	27,698	28,66	72,66	0,966

3.4.2 Alterações no comprimento da larva

Quanto ao tamanho (mm), analisando-se os dados pelo Centurion XVII Version 1.17.04 (Stat Point Technologies, 2014), ANOVA de 1 via seguida do teste de Bonferroni, não houve diferença significativa entre os desvios padrões. Não houve diferença significativa entre o controle (meio embrião) e nenhum dos tratamentos na sua concentração mais alta. Detectou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre NPDM CL_{30} com relação a DMT CL_{30} e

DMC CL₃₀, e também entre NPDM CL₂₀ com relação a DMT CL₂₀. As diferenças só foram detectadas para estas concentrações, não se detectando para CL₅₀, CL₄₀ e CL₁₀. O comprimento das larvas é ilustrado na Figura 9.

Figura 9. Comprimento das larvas (mm) após 96 h de exposição em diferentes concentrações: 0, CL₁₀, CL₂₀, CL₃₀, CL₄₀ e CL₅₀ – mg.L⁻¹) de nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM); nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM); dimetoato técnico (DMT) e dimetoato comercial (DMC). Leitura de imagens capturadas em estereomicroscópio (Model SMZ 2 LED – *software* View Version 7.1.1.5), Optika®, aumento 2x. n=10. Teste estatístico determinado pelo módulo “Probit Analysis” do programa Statgraphics Centurion XVII Version 1.17.04 (Stat Point Technologies, 2014), ANOVA de 1 via seguida do teste de Bonferroni, p<0,05. n=10.



3.4.3 Alterações morfológicas e na taxa de eclosão

Os organismos expostos às NP e os do grupo controle (meio embrião) não apresentaram alterações morfológicas nem na taxa de eclosão após 4 dias (96 h) de exposição. Por outro lado, observa-se que os organismos dos grupos expostos a NPDM, NP_DM, DMT e DMC apresentaram redução na taxa de eclosão e/ou aumento da mortalidade além de alterações na porcentagem de alterações morfológicas. Os dados quanto às alterações encontradas nos organismos dos grupos NPDM, NP_DM, DMT e DMC em 96 h de exposição são mostrados na Tabela 5.

Quando expostos a NPDM, os organismos apresentaram malformação apenas após 4 dias (96 h) de exposição a CL₄₀ e CL₅₀ (edema de pericárdio e opacidade de vitelo) (Tabela 5).

Para NP_DM, os organismos apresentaram alterações morfológicas a partir do dia 2 de exposição (48 h) nas concentrações CL₃₀ (hipopigmentação, edema de pericárdio, edema de saco vitelino), CL₄₀ e CL₅₀ (hipopigmentação, edema de pericárdio, edema de saco vitelino, alteração na coluna e bradicardia). No dia 3 (72 h), observou-se ocorrência de malformações nas concentrações CL₄₀ (hipopigmentação e edema de pericárdio) e CL₅₀ (hipopigmentação e absorção de saco vitelino). As alterações observadas no dia 4 (96 h) são expressas na Tabela 5.

Os organismos já no dia 1 (24 h) da exposição ao DMT apresentaram edema de pericárdio na concentração CL₄₀. No dia 2 (48 h) houve alterações morfológicas naqueles expostos à concentração CL₃₀ (hipopigmentação, edema de pericárdio, edema de saco vitelino e alteração de coluna). No dia 3 (72 h) de exposição, houve alterações morfológicas dos organismos em todas as concentrações avaliadas conforme: CL₁₀ e CL₂₀ (contrações tônico-clônicas); CL₃₀ (contrações tônico-clônicas, alteração de coluna/cauda e edema de pericárdio); CL₄₀ (edema de pericárdio e bradicardia); CL₅₀ (contrações tônico-clônicas e deformidade de coluna). As alterações observadas no dia 4 (96 h) são expressas na Tabela 5.

No dia 1 (24 h) da exposição ao DMC, os organismos apresentaram alterações morfológicas nas concentrações CL₄₀ (edema de pericárdio) e CL₅₀ (contrações tônico-clônicas). A partir do dia 2 (48 h) de exposição houve alterações morfológicas dos organismos expostos às concentrações CL₁₀ (alteração de coluna), CL₄₀ (alteração na formação de somitos, não destacamento da cauda, hipopigmentação do olho) e CL₅₀ (edema de pericárdio e de saco vitelino). No dia 3 (72 h), os organismos expostos a todas as concentrações testadas apresentaram alterações: CL₁₀ (alteração de coluna/cauda e edema de pericárdio); CL₂₀ (hipopigmentação dos olhos); CL₃₀ (alteração de coluna/cauda); CL₄₀ (alteração de coluna/cauda e edema de pericárdio) e CL₅₀ (alteração de coluna/cauda). As alterações observadas no dia 4 (96 h) são expressas na Tabela 5.

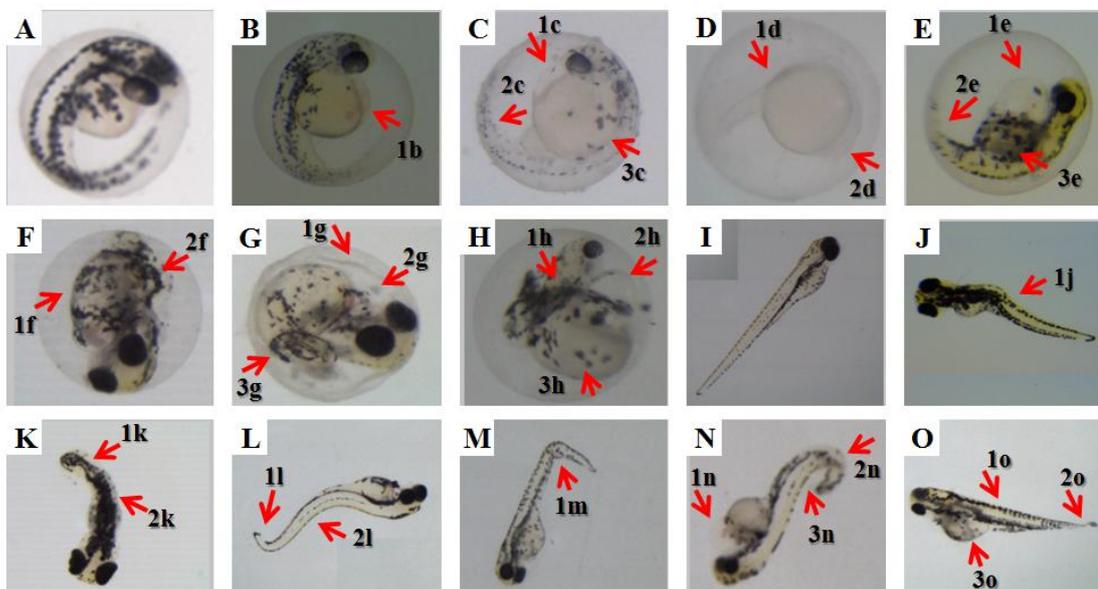
A Figura 10 demonstra exemplos de alterações morfológicas embrionárias e larvais encontradas na avaliação da toxicidade de zebrafish - FET *Test* (OECD 236, 2013) dos grupos controle, NP, NPDM, NP_DM, DMT e DMC.

Tabela 5. Avaliação da toxicidade aguda em embriões de zebrafish após 4 dias de exposição (96 h). São apresentadas as % de taxa de eclosão, mortalidade e alterações morfológicas. Os grupos expostos foram NP, NPDM, NP_DM, DMT e DMC nas concentrações CL₁₀, CL₂₀, CL₃₀, CL₄₀ e CL₅₀ – mg.L⁻¹. Para quantificação das alterações embrionárias (% dos organismos vivos), foram considerados todos os grupos onde a mortalidade foi < 95 % após 4 dias de exposição, p<0,05.

Alterações (%) / grupos	Con-trole	NP					NPDM					NP_DM					DMT					DMC				
		0	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50	10	20	30	40
CL – 96 h (mg.L ⁻¹)	0	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50
taxa de eclosão	100	100	100	100	100	100	93	20	9	6	18	87	36	13	0	0	26	26	11	27	0	94	90	87	27	13
mortalidade	4	4	4	4	4	4	11	16	8	37	54	11	20	8	37	16	20	20	25	25	33	25	16	25	12	20
edema de pericárdio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	25	-	-	-	-	-	-	-	4	8	8	-	-	-	8	8
opacidade de vitelo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	17	-	-	-	21	-	-	-	-	-	4	-	-	-	4	-
absorção vitelo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hipopigmentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29
alteração na coluna/cauda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	8	-	-	-	8	8
bradicardia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	11	21
contrações tônico-clônicas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	11

NP: nanopartículas de alginato de sódio/quitosana sem dimetoato; NPDM: nanopartículas de alginato de sódio/quitosana com dimetoato; NP_DM: nanopartículas de alginato de sódio/quitosana com dimetoato não encapsulado; DMT: dimetoato técnico; DMC: dimetoato comercial

Figura 10. Alterações morfológicas embrionárias e larvais encontradas na avaliação da toxicidade de zebrafish - FET *Test* (OECD 236, 2013). São expostas fotografias representativas de alguns dos efeitos observados nos organismos de cada grupo testado. Figura A: embrião de 48 h (controle sem alterações). Figura B: embrião de 48 h (NPDM – CL₅₀); 1b) edema de pericárdio (discreto). Figura C: embrião de 72 h (NP_DM – CL₅₀); 1c) edema de pericárdio; 2c) alteração de cauda; 3c) edema de vitelo. Figura D: embrião de 24 h (DMT – CL₅₀); 1d) hipocromia; 2d) alteração na formação cabeça. Figura E: embrião de 72 h (NP_DM – CL₅₀); 1e) edema de pericárdio; 2e) alteração de coluna/cauda; 3e) opacidade de vitelo. Figura F: embrião de 72 h (DMT – CL₅₀); 1f) edema e escurecimento de vitelo; 2f) alteração de coluna/cauda. Figura G: embrião de 72 h (DMC – CL₅₀); 1g) alteração de córion; 2g) edema de pericárdio; 3g) alteração de coluna/cauda. Figura H: embrião de 96 h (DMC – CL₄₀); 1h) alteração coluna/cauda; 2h) edema de pericárdio; 3h) edema de vitelo. Figura I: larva de 96 h (controle sem alterações) Figura J: larva de 96 h (DMT – CL₄₀); 1j) alteração de coluna e diminuição tamanho. Figura K: larva de 96 h (DMT – CL₅₀); 1k) alteração de cauda; 2k) alteração de coluna e diminuição de tamanho. Figura L: larva de 96 h (DMC – CL₄₀); 1l) alteração de cauda; 2l) alteração de coluna. Figura M: larva de 96 h (DMC – CL₄₀); 1m) alteração de coluna/cauda. Figura N: larva de 96 h (DMC – CL₅₀); 1n) edema de pericárdio; 2n) alteração de cauda; 3n) alteração de coluna. Figura O: larva de 96 h (DMC – CL₄₀); 1o) alteração de coluna/tamanho; 2o) alteração de cauda; 3o) edema vitelo.

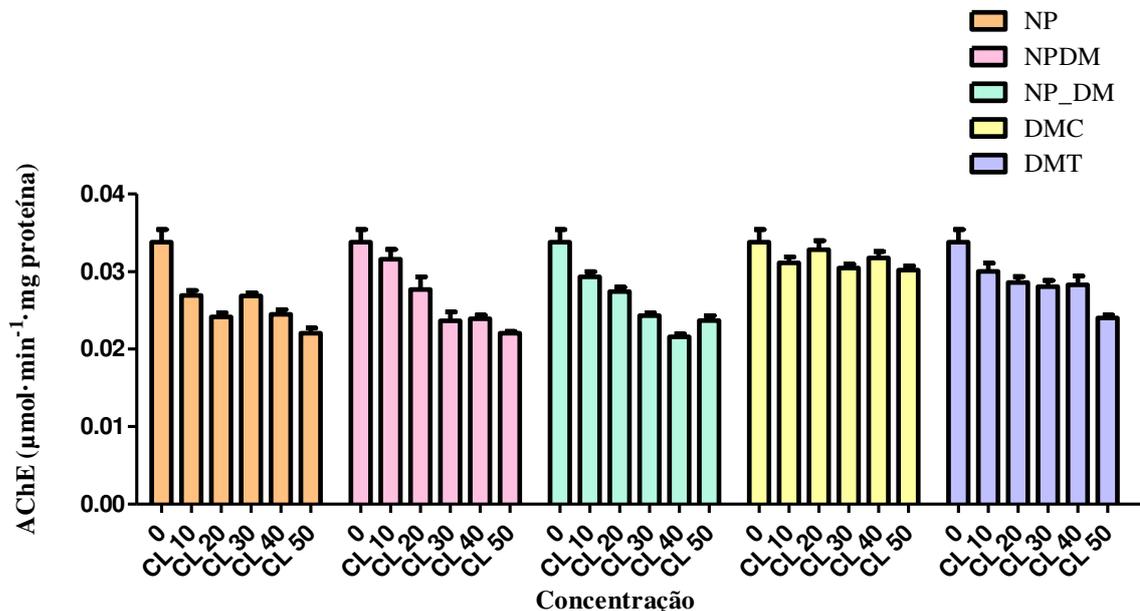


NP: nanopartículas de alginato de sódio/quitosana sem dimetoato; NPDM: nanopartículas de alginato de sódio/quitosana com dimetoato; NP_DM: nanopartículas de alginato de sódio/quitosana com dimetoato não encapsulado; DMT: dimetoato técnico; DMC: dimetoato comercial

3.4.4 Avaliação da atividade específica da enzima acetilcolinesterase (AChE)

Com relação à avaliação da atividade específica da enzima AChE (Figura 11), procedeu-se ao teste de Kruskal-Wallis (KW), Bonferroni. Não houve diferença significativa entre os organismos do grupo controle (meio embrião) e NPDM, NP_DM, DMT e DMC para a maior concentração testada. Não se constatou diferença significativa entre os organismos expostos a NPDM e DMT ou DMC para todas as concentrações testadas, com exceção entre NPDM CL₄₀ e DMC CL₄₀. Evidenciou-se uma relação concentração-resposta para todos os tratamentos, entretanto, ao contrário do esperado, esta relação se mostrou com menor intensidade para DMT e DMC.

Figura 11. Avaliação da atividade específica da enzima acetilcolinesterase (AChE) de larvas de zebrafish após 96 h de exposição a diferentes concentrações: 0, CL₁₀, CL₂₀, CL₃₀, CL₄₀ e CL₅₀ – mg.L⁻¹) de nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM); nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM); dimetoato técnico (DMT) e dimetoato comercial (DMC). n=60 larvas/concentração. Teste estatístico determinado por Kruskal-Wallis (KW) seguido pelo teste de Bonferroni, p<0,05.



3.4.5 Ensaio para avaliação de biomarcadores comportamentais em larvas de zebrafish (velocidade de natação e distância percorrida)

A avaliação comportamental em larvas de zebrafish de 96 h de vida foi realizada no equipamento DanioVision e analisado pelo software EthovisionXT, Noldus[®]. Aplicou-se análise para ambos os biomarcadores comportamentais (velocidade de natação e distância percorrida) por Kruskal-Wallis, teste de Bonferroni. Para o biomarcador comportamental

velocidade (mm/s) (Figura 12), não se constatou diferença significativa entre o desempenho das larvas do grupo controle (meio embrião) e os diversos tratamentos, exceto com relação a NP_DM CL₁₀. Comparativamente aos efeitos observados nas larvas expostas às NPDM, houve diferença significativa em relação às larvas expostas ao DMT, ambos na concentração CL₃₀. Entretanto, este fato não foi observado para outras concentrações.

Não houve diferença significativa entre a distância percorrida (mm) em 10 minutos a 28 °C pelas larvas do grupo controle (meio embrião) e os demais tratamentos (Figura 13), com exceção de NP_DM CL₁₀. Não se constatou diferença significativa entre NPDM e DMMT e DMC, porém, houve diferença significativa entre NPDM CL₃₀ e DMT CL₃₀. Foi utilizado um total de 36 larvas em cada grupo testado.

Figura 12. Avaliação de velocidade (mm/s) de natação de larvas de zebrafish após 96 h de exposição a diferentes concentrações: 0, CL₁₀, CL₂₀, CL₃₀, CL₄₀ e CL₅₀ – mg.L⁻¹) de nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM); nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM); dimetoato técnico (DMT) e dimetoato comercial (DMC). Teste realizado em equipamento DanioVision e analisado pelo software EthovisionXT, Noldus[®] durante 10 minutos, 28 °C, n=36 larvas/concentração. Teste estatístico determinado por Kruskal-Wallis (KW), teste de Bonferroni. p<0,05.

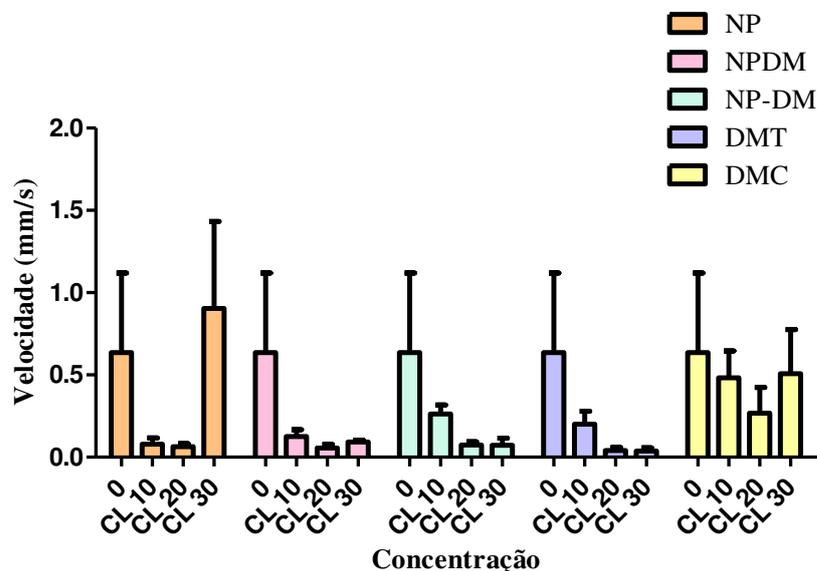
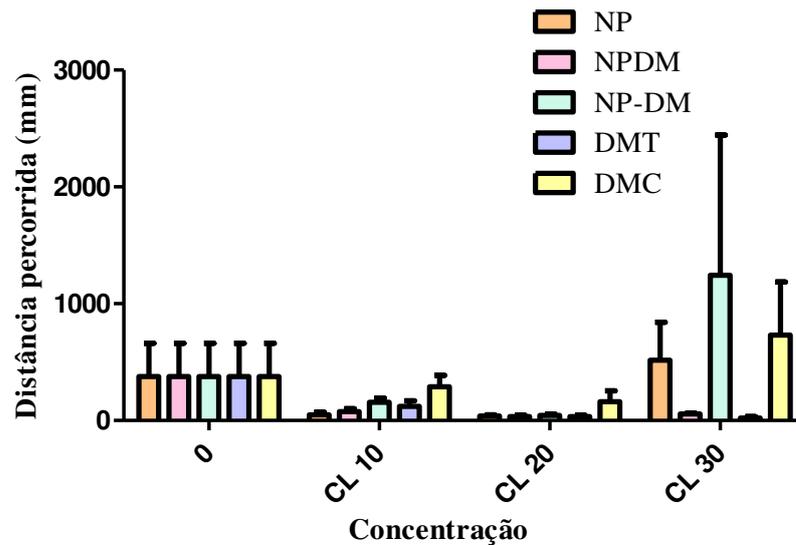


Figura 13. Avaliação de distância percorrida (mm) de larvas de zebrafish após 96 h de exposição a diferentes concentrações: 0, CL₁₀, CL₂₀, CL₃₀, CL₄₀ e CL₅₀ (mg.L⁻¹) de nanopartículas de ALG/CS sem (NP) e com dimetoato (NPDM); nanopartículas de ALG/CS com dimetoato não encapsulado (NP_DM); dimetoato técnico (DMT) e dimetoato comercial (DMC). Teste realizado em equipamento DanioVision e analisado pelo software EthovisionXT, Noldus[®] durante 10 minutos, 28 °C, n=36 larvas/concentração. Teste estatístico determinado por Kruskal-Wallis (KW) seguido do teste de Bonferroni, p<0,05.



4. DISCUSSÃO

Quando comparadas ao uso de ativos livres, as formulações de sistemas micro e nanoparticulados são capazes de fornecer perfis de liberação prolongada, mantendo a atividade biológica por mais tempo e aumentando a eficácia do ativo (Fernández-Pérez et al., 2011). Ao aumentar a biodisponibilidade do ativo nestas formulações de liberação sustentada, a contaminação ambiental é diminuída (Khot et al., 2012). Contudo, a falta de informação sobre o destino e comportamento no ambiente dos nanopesticidas e os seus efeitos na saúde humana e animal pode estar inibindo a sua incorporação na agricultura.

Os resultados apresentados neste trabalho fornecem informações importantes sobre o uso de sistemas nanocarreadores para o organofosforado dimetoato. No presente trabalho foi usado o complexo polimérico alginato de sódio/quitosana (ALG/CS) que é biodegradável e biocompatível, sendo mecanicamente forte em pH baixo no qual a quitosana é solúvel. O alginato tende a produzir poros em sua estrutura e, portanto, a formação de uma membrana de quitosana na superfície da nanopartícula favorece a diminuição da taxa de liberação do ativo presente em seu interior (Bhattarai et al., 2011), sendo então utilizada para reforçar a

nanopartícula de alginato (Tønnesen e Karlsen, 2002; Ribeiro et al., 2005; Lucinda-Silva et al., 2010). O complexo alginato-quitosana tem sua estabilidade influenciada por parâmetros como pH e força iônica, devido a protonação do grupo amino da quitosana e ionização do grupo ácido carboxílico do alginato (Li et al., 2002).

O potencial zeta negativo das nanopartículas de alginato de sódio/quitosana é devido aos grupos carboxila do alginato de sódio que são ionizados em pH 4,9 (COO^-) (Costa et al., 2015). Os grupos ácido carboxílico do alginato de sódio devido à interação dos íons Ca^{2+} induzem a formação de uma malha polimérica com o CaCl_2 (Melo et al., 2013; Woitiski et al., 2009). Segundo Arulmozhi et al. (2013), a encapsulação das nanopartículas de alginato de sódio/quitosana pode ocorrer devido a interações envolvendo grupos amino livres.

A eficiência de encapsulação de DMT no sistema de ALG/CS foi de 74,8 %, demonstrando forte interação do DMT com os carreadores produzidos e caracterizados no presente trabalho. O sistema apresentou 54,4 % de liberação após 24 h e após 8 h o sistema libera o dimetoato lentamente (após 8 h houve um aumento na concentração de DMT para 53 %, não havendo alteração na concentração do ativo nas próximas horas). Tal comportamento indica que o sistema ao ser usado em aplicações, de imediato teria 25,2 % de ativo para ir agindo sobre os sítios de ação (insetos e ácaros), com mais de 50 % de ativo nanoencapsulado para ser liberado de forma lenta ao longo do tempo. Aouada et al. (2010), afirma que os diferentes tempos de liberação podem ocorrer devido a natureza das interações químicas entre o ativo e os polímeros, hidrofobicidade das nanopartículas e o fechamento da rede polimérica. Portanto, a metodologia utilizada para a produção das nanopartículas poliméricas de alginato de sódio/quitosana para liberação modificada do dimetoato foi adequada. Pode-se supor que, por não ter havido diferença significativa no tamanho das nanopartículas no meio, a adição do dimetoato às nanopartículas de ALG/CS não alterou a estrutura das nanopartículas. Todavia, a queda na concentração das nanopartículas pode ser atribuída à degradação do ativo em função do tempo.

Esta variação do tamanho das nanopartículas (NP) pode estar relacionada à instabilidade devido degradação por acréscimo do ativo (DMT). Estes dados corroboram com a importância do nanoencapsulamento de materiais, levando a um composto mais estável por um período de tempo maior, a exemplo dos dados obtidos no presente trabalho com a produção dos sistemas alginato de sódio/quitosana (pelo menos 30 dias de estabilidade para nanopartículas com ativo) e do sistema tripolifosfato de sódio/quitosana (nanopartículas com ativo estáveis por pelo menos 90 dias – Capítulo I). Tamanhos obtidos pela técnica DLS apresentaram resultados similares à técnica NTA. A Tabela 3 expressa os valores do tamanho

(nm) e concentração (partículas.mL⁻¹) obtidos pela técnica NTA e PDI (técnica DLS) em meio para embrião de zebrafish (U.S.EPA, 2002).

O desenvolvimento do *Danio rerio* proporciona uma abordagem rápida para avaliar o risco ambiental de compostos e de NM. A morfometria pode ser considerada como uma avaliação útil para o estudo dos efeitos subletais de poluentes ambientais como os NM (Shaw et al., 2016). Os parâmetros avaliados toxicológicos como mortalidade, eclosão, edema do pericárdio entre outros foram úteis para demonstrar o efeito do dimetoato no ambiente. Os efeitos tóxicos ocorreram predominantemente nas maiores concentrações testadas com aumento da taxa de mortalidade após a exposição ao DMC, seguido do DMT e após pela formulação de nanopartículas com dimetoato não encapsulado (NP_DM).

A exposição ao DMC ainda resultou em diminuição da taxa de eclosão ao final dos 4 dias de exposição. A eclosão normal de uma larva ocorre entre 48 a 72 horas e é consequência da atividade de enzimas e movimentos realizados pelo embrião. A diminuição da taxa de eclosão mostra que o embrião provavelmente está mais susceptível a uma situação de estresse no ambiente. Apesar dos mecanismos não serem claros ainda, alterações na expressão de enzimas de eclosão, bloqueio dos poros do córion e consequente hipóxia, ou mesmo dano direto à membrana podem estar relacionados às alterações na eclosão (Cheng et al., 2015). De fato, muitos trabalhos relatam diferentes mecanismos de ação quanto a relação entre eclosão e desenvolvimento embrionário (Asharani et al., 2010; Xu et al., 2012; Shaw et al., 2016; Zou et al., 2017). Outros organofosforados como malation, monocrotofos e paration metílico também podem inibir as taxas de eclosão embrionária e reduzir o tempo de eclosão dos ovos de peixes (Zhao et al. 2017).

Além de alterações na taxa de eclosão foram observadas alterações morfométricas nos embriões expostos principalmente ao DMC e DMT. Quanto ao tamanho das larvas, o DMT e o DMC causaram diferença significativa em concentrações menores do que as nanopartículas. A diminuição do comprimento do corpo é um importante indicador do crescimento embrionário que é induzida pela perda de nutrientes ou por um efeito tóxico causado pela má absorção dos nutrientes do saco vitelino necessários para o desenvolvimento normal (Qiang et al., 2016). Já o edema pericárdico pode ser uma consequência da anormalidade cardiovascular, possivelmente devido a um aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos (Hill et al., 2004).

Por outro lado, a liberação do dimetoato pelo sistema carreador NPDM diminuiu a observação de alterações morfológicas em embriões de zebrafish quando comparado às outras formulações avaliadas neste trabalho, bem como foi a formulação que apresentou

concentração letal média ($CL_{50-96\text{ h}}$) maior (251,8 mg.L^{-1}), sendo 52 vezes maior que a do dimetoato comercial (DMC) e 62 % maior em relação ao dimetoato técnico (DMT). O grupo NPDM apresentou menores danos em relação às alterações morfológicas, menor taxa de mortalidade e maior taxa de eclosão de larvas. Pode-se, então, verificar que a nanoformulação diminuiu a toxicidade do DM nesta fase do desenvolvimento do zebrafish.

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor ACh. Os pesticidas organofosforados inibem a atividade catalítica da acetilcolinesterase (AChE), resultando em sintomas de toxicidade hipercolinérgica (Hörnberg et al., 2007). A exposição ao DMC resultou em inibição inibição de AChE nas doses mais altas (a partir da CL_{40}), enquanto que a exposição ao DMT foi capaz de alterar os níveis da enzima a partir da CL_{50} . O estudo do agrotóxico em grau técnico é útil para elucidar os seus mecanismos de ação tóxica, no entanto, os veículos de suas formulações comerciais podem contribuir para a sua toxicidade. Assim, estudos toxicológicos de formulações comerciais podem fornecer informações adicionais para realizar avaliações de risco mais completas de agrotóxicos (Di Paolo et al., 2015). Os dados obtidos suportam a importância da avaliação de risco tanto em exposições a agrotóxicos quanto a suas formulações comerciais devido à presença de outros ingredientes desconhecidos uma vez que o DMC se mostrou mais tóxico que o DMT.

Contrariamente, as nanopartículas com dimetoato encapsulado (NPDM) apresentam maior inibição da AChE em relação ao produto comercial, visto que inibem a AChE a partir da CL_{10} . Uma hipótese é que a mucoadesividade do NPDM possa melhorar a permeabilidade ao OP na larva. Além disso, foi relatado que a quitosana é capaz de abrir transitoriamente as junções estreitas entre as células epiteliais, aumentando assim a permeação do xenobiótico. Outra possibilidade é que a interação do OP com a nanocápsula de alginato de sódio/quitosana possa alterar a ligação do OP à enzima AChE por meio de algum mecanismo; afetando o perfil toxicológico do dimetoato (Hanafy et al., 2016, Mohammed et al., 2017). Uma vez que, em geral a nanoencapsulação do DM foi menos tóxica que o DMC e o DMT, futuras avaliações devem ser realizadas com a investigação de vários biomarcadores para entender melhor as relações entre a resposta comportamental e bioquímica à exposição das formulações de DM aqui estudadas no desenvolvimento do zebrafish.

O comportamento locomotor em organismos terrestres é crucial para evitar predadores, buscar alimentos, migração e reprodução, portanto, é um parâmetro de relevância ecológica. É então importante vincular as respostas bioquímicas como a atividade da AChE ao comportamento locomotor (Engenheiro et al., 2005). A avaliação estatística dos parâmetros

comportamentais não demonstrou variações relevantes entre os grupos analisados. Desta forma, a nanopartícula parece não ter afetado o desenvolvimento motor da larva. Seria esperado, entretanto, que a alteração da atividade da AChE levasse ao comprometimento da função motora do zebrafish já que uma alteração nos níveis de ACh na junção neuromuscular pode afetar o desenvolvimento muscular (Bertuzzi e Ampatzis, 2018). Contudo, a atividade parcial da AChE durante os primeiros dias do desenvolvimento do zebrafish é suficiente para o desenvolvimento da fibra muscular e o desenvolvimento de nAChR (Jacobson et al., 2010). De acordo com Richendrfer e Creton (2015), nem todas as alterações observadas em zebrafish devido a ação dos OP estão relacionadas à atividade da AChE. Nesse sentido, a inibição da AChE pode não ser o biomarcador mais sensível da exposição aos organofosforados em zebrafish (Schmitt et al., 2019).

Os testes de ecotoxicidade são instrumentos utilizados na avaliação de riscos ambientais e respondem a perguntas sobre os potenciais perigos decorrentes da exposição aos NM. No geral, o presente trabalho forneceu informações sobre os meios pelos quais o organofosforado dimetoato pode ter sua toxicidade diminuída durante o desenvolvimento embrionário e, em consequência, ter seu uso na agricultura otimizado devido ao uso de sistemas nanocarreadores que dispensam o uso de adjuvantes e veículos que podem potencializar a toxicidade do ativo de interesse.

As NPDM apresentam potencialidade de uso em culturas agrícolas auxiliando na segurança ambiental e alimentar devido à baixa toxicidade ocasionada em embriões de zebrafish. Contudo, é importante destacar que mais trabalhos devem ser desenvolvidos sob condições ambientais relevantes para que esse sistema possa ser comercialmente utilizado com segurança e com a adequada relação custo-benefício.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os produtos que contêm NM que alteram o perfil de risco dos ingredientes ativos prometem muitos benefícios em relação aos produtos convencionais como maior direcionamento a espécies de pragas, maior eficácia, menores taxas de aplicação e maior segurança ambiental. Em consequência, a nanotecnologia pode melhorar a produtividade das culturas e diminuir os efeitos prejudiciais ao ambiente. Nos últimos anos, a utilização da nanotecnologia para criar novas formulações mostrou grande potencial para diminuir o uso indiscriminado de pesticidas e fornecer alternativas ambientalmente mais seguras. Os pesticidas formulados com o emprego de nanosistemas de liberação controlada são projetados para fornecer eficientemente quantidades suficientes e direcionadas de ingredientes ativos em resposta a estressores bióticos e/ou abióticos.

Apesar das vantagens do uso de sistemas nanotecnológicos, o seu desenvolvimento requer cuidado, uma vez que é necessária a compreensão do comportamento destes no ambiente além de seus efeitos em organismos não-alvos. A introdução da nanotecnologia em aplicações agrícolas é afetada por vários fatores, incluindo viabilidade tecnológica, relação custo-benefício, requisitos regulatórios e aceitação do consumidor. Estes produtos, para entrarem no mercado, precisam demonstrar a segurança de seu uso para o consumidor e para o ambiente.

O conhecimento dos riscos que os nanomateriais em estudo poderão causar ao ambiente é importante para que a sua produção, comercialização e descarte sejam feitos de forma adequada e sustentável. O uso de nanopesticidas requer então uma avaliação de risco, para a qual é necessário definir suas características toxicológicas e ecotoxicológicas, bem como sua exposição a diferentes compartimentos ambientais. O uso da nanotecnologia na agricultura levanta uma série de questões para os órgãos regulamentadores, incluindo como a avaliação do risco ecológico de nanopesticidas difere da dos produtos convencionais. Assim como para os produtos convencionais, há um risco potencial para os ambientes aquáticos devido a liberação do ingrediente ativo do nanopesticida. A avaliação de risco ambiental do nanopesticida, portanto, precisará estabelecer que o padrão de uso proposto e a taxa de aplicação não resultarão em níveis de princípios ativos nos ecossistemas aquáticos além dos valores das diretrizes de qualidade da água aplicáveis localmente para este composto (Walker et al., 2018). Em consequência, o estudo e monitoramento dos riscos ambientais de nanomateriais requerem modelos para estimar o fluxo, destino e transporte destes materiais, bem como da absorção/biodisponibilidade e perigo para os diversos organismos. Apesar de iniciativas e estratégias orientadas para um maior desenvolvimento nessa direção, ainda não

existem leis específicas de regulamentação nacionais e internacionais que forneçam os requisitos de regulamentação e validação de metodologias de teste (Cerillo et al., 2017). Os esforços para a governança da nanotecnologia demandam, portanto, maneiras mais integradoras de avaliar a segurança, incluindo abordagens como avaliação do ciclo de vida e análise de decisão com vários critérios, além de melhorar o compartilhamento de dados e a comunicação de riscos (Jantunen et al., 2018; Oomen et al., 2018).

Os testes de ecotoxicidade são instrumentos utilizados na avaliação de riscos ambientais para responder a perguntas sobre os potenciais perigos decorrentes de sua exposição. Nesse sentido, o desenvolvimento de indicadores pode ser um aliado no processo decisório para sua liberação para consumo humano ou aplicação ao ambiente. Assim, foram avaliadas as características do nanopesticida com dimetoato e seus efeitos potenciais em zebrafish.

Os resultados apresentados neste trabalho forneceram informações importantes sobre o uso de sistemas nanocarreadores para o organofosforado dimetoato. As nanopartículas de tripolifosfato de sódio/quitosana (TPP/CS) mostraram excelente eficiência de encapsulação (93,3 %) e permaneceram estáveis por pelo menos 90 dias. Todavia, as nanopartículas de TPP/CS sem ativo apresentaram toxicidade aos embriões de zebrafish, impossibilitando o uso destas para avaliações subletais, agudas e comportamentais. Apesar de não poderem ser utilizadas em testes ecotoxicológicos para embriões de zebrafish, o seu uso na agricultura poderá ser reavaliado para uma situação específica devido às suas excelentes características físico-químicas.

A metodologia utilizada para a produção das nanopartículas poliméricas de alginato de sódio/quitosana para liberação modificada do dimetoato foi adequada e as nanopartículas foram devidamente caracterizadas. A liberação do dimetoato pelo sistema carreador ALG/CS diminuiu alterações morfológicas quando comparado às outras formulações avaliadas neste trabalho, bem como foi a formulação que apresentou concentração letal média (CL_{50-96} h) maior (251,8 mg.L⁻¹), sendo 52 vezes maior que a do dimetoato comercial (DMC) e 62 % maior em relação ao dimetoato técnico (DMT). As NPDM causaram baixa toxicidade aguda em embriões de zebrafish e, assim, apresentaram potencialidade de uso em culturas agrícolas auxiliando na segurança ambiental e alimentar. Contudo, é importante destacar que mais trabalhos devem ser desenvolvidos para que esse sistema possa ser comercialmente utilizado com segurança e com a adequada relação custo-benefício.

De forma geral, o dimetoato em formulação comercial mostrou-se mais tóxico do que o dimetoato técnico nos organismos testados. A atividade específica da enzima

acetilcolinesterase evidenciou alterações concentração-resposta nos embriões expostos ao DMC (CL₄₀). Contudo, apesar da avaliação comportamental das larvas de zebrafish não apresentar alterações após a exposição à NPDM, os organismos expostos à nanoformulação NPDM apresentaram inibição da enzima em CL₄₀. Com base nestes resultados, os parâmetros de desenvolvimento do *Danio rerio* avaliados mostraram ser adequados à avaliação do risco ambiental de compostos e de nanomateriais, evidenciando efeitos subletais.

O interesse do público em reduzir os riscos à saúde humana e ao meio ambiente associados ao uso de inseticidas pode pressionar ainda mais por políticas que incentivem o desenvolvimento de outras alternativas de manejo. O presente trabalho forneceu informações sobre meios pelos quais o organofosforado dimetoato pode ter sua toxicidade em organismos não-alvo diminuída por usar sistemas nanocarreadores que dispensam o uso de adjuvantes e veículos que podem potencializar a toxicidade do ativo de interesse. Em consequência, o seu uso agrícola pode ser otimizado, auxiliando na segurança ambiental e alimentar.

Para tanto, após a obtenção de dados laboratoriais, devem ser realizadas pesquisas em maior escala. As informações obtidas poderão ser usadas pelas agências regulamentadoras para a avaliação da toxicidade potencial e dos riscos associados aos nanomateriais ao longo das diferentes fases do ciclo de vida do produto. Elas apoiarão o desenvolvimento responsável da tecnologia e sua introdução no mercado. Em consequência, o conhecimento dos riscos que o nanopesticida em estudo poderá causar ao ambiente será importante para que a sua produção, comercialização e descarte sejam feitos de forma adequada e sustentável.

Também é importante que sejam estabelecidos padrões industriais para conformidade destes produtos e, que durante a aplicação, sejam usados adequadamente com a determinação das melhores práticas de aplicação, a fim de proteger todos os compartimentos ambientais. Por fim, a promoção do intercâmbio de informações entre todos os envolvidos desde a fabricação até o descarte, além das agências de regulamentação, irá contribuir para alcançar práticas agrícolas mais seguras e eficientes, pois o ambiente externo e a saúde humana estão intrinsecamente conectados. Todos esses esforços são vitais para o desenvolvimento de novos nanoproductos, competitivos e com potencial para tornar a agricultura mais sustentável. Há a expectativa que o seu uso possa então desempenhar um papel importante na consecução desse objetivo. Esperamos que nosso trabalho contribua para a discussão pela comunidade dos padrões de avaliação destes nanoproductos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRHART, M. J.; LEE, D. H.; WILSON, T. D.; MILLER, B. E.; MILLER, M. N.; SKALKO, R. G. Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). *Neurotoxicol. Teratol.*, v. 29, n. 6, p. 652-664, 2007.

ALDRIDGE, J. E.; LEVIN, E. D.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. *Environ. Health Perspect.*, v. 113, p. 527-531, 2005.

AMENTA, V.; ASCHBERGER, K.; ARENA, M.; BOUWMEESTER, H.; MONIZ, F. B.; BRANDHOFF, P.; GOTTARDO, S.; MARVIN, H. J. P.; MECH, A.; PESUDO, L. Q.; RAUSCHER, H.; SCHOONJANS, R.; VETTORI, M. V.; WEIGEL, S.; PETERS, R. J. Regulatory aspects of nanotechnology in the agri/feed/food sector in EU and non-EU countries. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 73, n. 1, p. 63-476, 2015.

ANDERSON, J. A.; COATS, J. R. Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 102, n. 2, p. 124-128, 2012.

ANDERSON, P. K.; CUNNINGHAM, A. A.; PATEL, N. G.; MORALES, F. J.; EPSTEIN, P. R.; DASZAK, P. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 19, n. 10, p. 535-544, 2004.

ANSARI, S.; ANSARI, B. A. Temporal variations of CAT, GSH, and LPO in gills and livers of zebrafish, *Danio rerio*, exposed to dimethoate. *Arch. Pol. Fish.*, v. 22, p. 101-109, 2014.

ANSELMO, C. S.; SARDELA, V. F.; DE SOUSA, V. P.; PEREIRA, H. M. G. Zebrafish (*Danio rerio*). A valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans? *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C. Toxicology and Pharmacology*, v. 212, p. 34-46, 2018.

APREA, M. C. Environmental and biological monitoring in the estimation of ab-sorbed doses of pesticides. *Toxicol. Lett.*, v. 210, p. 110-118, 2012.

ARORA, S.; GUPTA, S.; NARANG, R. K.; BUDHIRAJA, R. D. Amoxicillin Loaded Chitosan–Alginate Polyelectrolyte Complex Nanoparticles as Mucopenetrating Delivery System for H. Pylori. *Sci. Pharm.*, v. 79, p. 673-694. doi:10.3797/scipharm.1011-05, 2011.

ASHARANI, P. V., LIANWU, Y., GONG, Z., VALIYAVEETIL, S. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology*, v. 5, n. 1, p. 43-54, 2010.

ASTIZ, M.; ACAZ-FONSECA, E.; GARCIA-SEGURA, L. M. Sex differences and effects of estrogenic compounds on the expression of inflammatory molecules by astrocytes exposed to the insecticide dimethoate. *Neurotox. Res.*, v. 25, p. 271-285, 2014.

ASTIZ, M.; DE ALANIZ, M. J. T.; MARRA, C. A. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 28, p. 465-473, 2009.

BAEK, I.; CHOI, H. J.; R. H. E.; E, J. S. Inhibitory effects of biocides on hatching and acetylcholinesterase activity in the brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, v. 7, n. 5, p. 303-308, 2015.

- BALAJI, A. P. B.; SASTRY, T. P.; MANIGANDAN, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Environmental benignity of a pesticide in soft colloidal hydrodispersive nanometric form with improved toxic precision towards the target organisms than non-target organisms. *Science of the Total Environment*, v. 579, p. 190-01, 2017.
- BALLESTEROS, M. L.; RIVETTI, N. G.; MORILLO, D. O.; (...); AMÉ, M. V.; BISTONI, M. A. Multi-biomarker responses in fish (*Jenynsia multidentata*) to assess the impact of pollution in rivers with mixtures of environmental contaminants. *Science of the Total Environment*, v. 595, p. 711-722, 2017.
- BANAEI, M.; SUREDA, A.; TAHERI, S.; HEDAYATZADEH, F. Sub-lethal effects of dimethoate alone and in combination with cadmium on biochemical parameters in freshwater snail, *Galba truncatula*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, v. 220, p. 62-70, 2019.
- BARRIONUEVO, W. R.; BURGGREN, W. W. O₂ consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*), influence of temperature and ambient O₂. *Am. J. Physiol.*, v. 276, p. R505-R513, 1999.
- BASU, S.; SACHIDANANDAN, C. Zebrafish: a multifaceted tool for chemical biologists. *Chem Rev.*, v. 113, p. 7952-80, 2013.
- BEHRA, M.; COUSIN, X.; BERTRAND, C.; VONESH, J. L.; BIELLMAN, D.; CHATONNET, A.; STRAHLE, U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neuroscience*, v. 5, n. 2, p. 111-118, 2002.
- BERTUZZI, M.; AMPATZIS, K. Spinal cholinergic interneurons differentially control motoneuron excitability and alter the locomotor network operational range. *Sci. Rep.*, v. 8, p. 1988, 2018
- BHATTARAI, R. S.; DHANDAPANI, N. V.; SHRESTHA, A. Drug delivery using alginate and chitosan beads: An Overview. *Chronicles of Young Scientists*, v. 2, n. 2, p. 192-6, 2011.
- BONSIGNORIO, D.; PEREGO, L.; DEL GIACCO, L.; COTELLI, F. Structure and macromolecular composition of the zebrafish egg chorion. *Zygote*, v. 4, p. 101-108, 1996.
- BRADFORD, M. A. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, v. 72, p. 248-54, 1976.
- BRAUNBECK, T.; KAIS, B.; LAMMER, E.; OTTE, J.; SCHNEIDER, K.; STENGEL, D.; STRECKER, R. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 21, p. 16247-16261, 2015.
- BRUSTEIN, E.; SAINT-AMANT, L.; BUSS, R. R.; CHONG, M.; MCDEARMID, J. R.; DRAPEAU, P. Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J. Physiol. Paris*, v. 97, p. 77-86, 2003.
- CALIENNI, M. N.; FEAS, D. A.; IGARTÚA, D. E.; CHIARAMONI, N. S.; ALONSO, S. D. V.; PRIETO, M. J. Nanotoxicological and teratogenic effects, A linkage between dendrimer surface charge and zebrafish developmental stages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 337, p. 1-11, 2017.
- CALVO, P.; REMUÑAN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 10, p. 1431-1436, 1997.

- CASIDA, J. E. Organophosphorus xenobiotic toxicology. *Annu. Rev. Toxicol. Pharmacol.*, v. 57, p. 309-327, 2017.
- CAVALCANTI, L. P. A. N.; AGUIAR, A. P.; LIMA, J. A.; LIMA, A. L. S. Intoxicação por organofosforados: tratamento e metodologias analíticas empregadas na avaliação da reativação e inibição da acetilcolinesterase. *Rev. Virtual Quim.*, v. 8, n. 3, p. 739-766, 2016.
- CCANCCAPA, A.; MASIÁ, A.; ANDREU, V.; PICÓ, Y. Spatio-temporal patterns of pesticide residues in the Turia and Júcar Rivers (Spain). *Science of the Total Environment*, v. 540, p. 200-210, 2016.
- CERRILLO, C., BARANDIKA G., IGARTUA, A., AREITIOAURTENA, O., MENDOZA, G. Key challenges for nanotechnology: Standardization of ecotoxicity testing. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, v. 35, n. 2, p. 104-126, 2017.
- CHAKRABORTY, C.; SHARMA, A. R.; SHARMA, G.; LEE, S. S. Zebrafish, a complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *J. Nanobiotechnol.*, v. 14, p. 65, 2016.
- CHAUHAN, N.; DILBAGHI, N.; GOPAL, M.; KUMAR, R.; KIM, K. H.; KUMAR, S. Development of chitosan nanocapsules for the controlled release of hexaconazole. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 97, p. 616-624, 2017.
- CHEN, J.; GUO, R. The process-dependent impacts of dimethoate on the feeding behavior of rotifer. *Chemosphere*, v. 119, p. 318-325, 2015.
- CHEN, J.; WANG, Z.; LI, G.; GUO, R. The swimming speed alteration of two freshwater rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Asplanchna brightwelli* under dimethoate stress. *Chemosphere*, v. 95, p. 256-260, 2014.
- CHENG, Y.; REN, C.; OUYANG, S.; HU, X.; ZHOU, Q. Mitigation in multiple effects of graphene oxide toxicity in zebrafish embryogenesis driven by humic acid. *Environmental Science & Technology*, v. 49, n. 16, p. 10147-54, 2015.
- COSTA, L. G. Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, v. 162, n. 1, 24-35, 2018.
- COUCH, J. A.; WINSTEAD, J. T.; GOODMAN, L. R. Kepone-induced scoliosis and its histological consequences in fish. *Science*, v. 197, n. 4303, p. 585-587, 1977.
- COUSIN, X.; STRAHLE, U.; CHATONNET, A. Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases? Lessons from mutant animal models. *BioEssays*, v. 27, p. 189-200, 2005.
- CRUZEIRO, C.; PARDAL, M. A.; RODRIGUES-OLIVEIRA, N.; CASTRO, L. F. C.; ROCHA, E.; ROCHA, M. J. Multi-matrix quantification and risk assessment of pesticides in the longest river of the Iberian peninsula. *Science of the Total Environment*, v. 572, p. 263-272, 2016.
- DALE, K.; RASINGER, J. D.; THORSTENSEN, K. L.; PENGLASE, S.; ELLINGSEN, S. Vitamin E reduces endosulfan-induced toxic effects on morphology and behavior in early development of zebrafish (*Danio rerio*). *Food Chem. Toxicol.*, v. 101, p. 84-93, 2017.
- DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 8, n. 5, p. 1402-19, 2011. doi: 10.3390/ijerph8051402.

- DANG, Z.; VAN DER VEN, L. T. M.; KIENHUIS, A. S. Fish embryo toxicity test, threshold approach, and moribund as approaches to implement 3R principles to the acute fish toxicity test. *Chemosphere*, v. 186, p. 677-685, 2017.
- DI PAOLO, C.; GROH, K. J.; ZENNEGG, M.; VERMEIRSEN, E. L. M.; MURK, A. J.; EGGEN, R. I. L.; HOLLERT, H.; WERNER, I.; SCHIRMER, K. Early life exposure to PCB126 results in delayed mortality and growth impairment in the zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology*, v. 169, p. 168-178, 2015.
- DOGAN, D.; CAN, C.; KOCYIGIT, A.; DIKILITAS, M.; TASKIN, A.; BILINC, H. Dimethoate-induced oxidative stress and DNA damage in *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere*, v. 84, n. 1, p. 39-46, 2011.
- DOHERTY, V. F., LADIPO, M. K., ANEYO, I. A., ADEOLA, A., ODULELE, W. Y., Histopathological alterations, biochemical responses and acetylcholinesterase levels in *Clarias gariepinus* as biomarkers of exposure to organophosphates pesticides. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 188, n. 5, p. 312, 2016.
- DRAPEAU, P., SAINT-AMANT, L., BUSS, R. R., CHONG, M., MCDEARMID, J. R., BRUSTEIN, E. Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog. Neurobiol.*, v. 68, p. 85-111, 2002.
- DREWS, U. Cholinesterase in embryonic development. *Progr. Histochem. Cytochem.*, v. 7, p. 1-52, 1975.
- DUHAN, J. S., KUMAR, R., KUMAR, N., KAUR, P., NEHRA, K., DUHAN, S. Nanotechnology, the new perspective in precision agriculture. *Biotechnol. Rep.*, v. 15, p. 11-23, 2017.
- EDDINS, D.; CERUTTI, D.; WILLIAMS, P.; LINNEY, E.; LEVIN, E. Zebrafish provide a sensitive model of persisting neurobehavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure, comparison with nicotine and pilocarpine effects and relationship to dopamine deficits. *Neurotoxicol. Teratol.*, v. 32, p. 99-108, 2010.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.*, v. 7, p. 88-95, 1961.
- ENGENHEIRO, E. L., HANKARD, P. K., SOUSA, J. P., LEMOS, M. F., WEEKS, J. M., SOARES, A. M. V. M. Influence of dimethoate on acetylcholinesterase activity and locomotor function in terrestrial isopods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, n. 3, p. 603-609, 2005.
- ERAS, J., COSTA, J., VILARÓ, F., PELACHO, A. M., CANELA-GARAYOA, R., MARTIN-CLOSAS, L. Prevalence of pesticides in postconsumer agrochemical polymeric packaging. *Science of the Total Environment*, v. 580, p. 1530-1538, 2017.
- ESCH, C.; SLIEKER, R.; WOLTERBEEK, A.; WOUTERSEN, R.; GROOT, D. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing, a mini review. *Neurotoxicol. Teratol.*, v. 34, n. 6, p. 545-553, 2012.
- FENG, D. F.; WU, W. X.; HE, N. N.; CHEN, D. Y.; FENG, X. Z. Analysis of chorion changes in developmental toxicity induced by polymer microspheres in Zebrafish embryos. *RSC Advances*, v. 3, p. 17880-17886, 2013.

- FERREIRA, N. G. C.; MORGADO, R.; SANTOS, M. J. G.; SOARES, A. M. V. M.; LOUREIRO, S. Biomarkers and energy reserves in the isopod *Porcellionides pruinosus*: the effects of long-term exposure to dimethoate. *Science of the Total Environment*, v. 502, p. 91-102, 2015.
- FILIFE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (nta) by nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*, v. 27, n. 5, p. 796-810, 2010.
- FLASKOS, J. The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides. A direct role for the oxon metabolites. *Toxicology Letters*, v. 209, p. 86- 93, 2012.
- FLEMING, A.; DIEKMANN, H.; GOLDSMITH, P. Functional characterisation of the maturation of the blood-brain barrier in larval zebrafish. *PLoS One*, v. 8, n. 10, p. e77548, 2013.
- FORT, D. J.; MATHIS, M. B.; KEE, F.; WHATLING, P.; CLERKIN, D.; STAVELEY, J.; HABIG, C. Evaluation of an acute oral gavage method for assessment of pesticide toxicity in terrestrial amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 37, n. 2, p. 436-450, 2018.
- FRACETO, L. F.; GRILLO, R.; MEDEIROS, G. A.; SCOGNAMIGLIO, V.; REA, G.; BARTOLUCCI, C. Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does It Have? *Frontiers in Environmental Science*, v. 4, p. 1-5, 2016.
- GARCIA-FRANCO, M. Short-term fish toxicity. Updated 21 March 2011. Disponível em: <https://sites.google.com/a/euroecotox.eu/networkeuroecotox/HOME/alternative-ecotoxicity-testing/short-term-fish-toxicity>. Acesso em: 06 fev. 2017.
- GARCIA-FUENTES M., ALONSO, M. J. Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand?, *J. Control. Release*, v. 161, p. 496-504, 2012.
- GEORGE, M. E ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1-14, 2006.
- GIESE, B.; KLAESSIG, F.; PARK, B.; KAEGI, R.; STEINFELDT, M.; WIGGER, H.; VON GLEICH, A.; GOTTSCHALK, F. Risks, release and concentrations of engineered nanomaterial in the environment. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1565, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-19275-4.
- GLABERMAN, S.; PADILLA, S.; BARRON, M. G. Evaluating the zebrafish embryo toxicity test for pesticide hazard screening. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 36, n. 5, p. 1221-1226, 2017.
- GLAZER, L.; WELLS, C. N.; DRASTAL, M.; ODAMAH K. A.; GALAT R. E.; BEHL, M.; LEVIN, E. D. Developmental exposure to low concentrations of two brominated flame retardants, BDE-47 and BDE-99, causes life-long behavioral alterations in zebrafish. *NeuroToxicology*, v. 66, p. 221-232, 2018.
- GOLDSTONE, J. V.; MCARTHUR, A. G.; KUBOTA, A.; ZANETTE, J.; PARENTE, T.; JONSSON, M. E.; NELSON, D. R.; STEGEMAN, J. J. Identification and developmental expression of the full complement of cytochrome P450 genes in zebrafish. *BMC Genomics*, v. 11, p. 643, 2010.
- GRAEF, S.; SCHÖNKNECHT, P.; SABRI, O.; HEGERL, U. Cholinergic receptor subtypes and their role in cognition, emotion, and vigilance control, an overview of preclinical and clinical findings. *Psychopharmacology*, v. 215, p. 205-229, 2011.

- GRAILY MORADI, F.; HEJAZI, M. J.; HAMISHEHKAR, H.; ENAYATI, A. A. Co-encapsulation of imidacloprid and lambda-cyhalothrin using biocompatible nanocarriers: Characterization and application. *Ecotoxicol Environ Saf.*, v. 175, p. 155-163, 2019. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.02.092.
- GRILLO, R.; CLEMENTE, Z.; OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; CHALUPE, V. C.; JONSSON, C. M.; LIMA, R.; SANCHES, G.; NISHISAKA, C. S.; ROSA, A. H.; OEHLKE, K.; GREINER, R.; FRACETO, L. F. Chitosan Nanoparticles Loaded the Herbicide Paraquat: The Influence of the Aquatic Humic Substances on the Colloidal Stability and Toxicity. *Journal of Hazardous Materials*, v. 286, p. 562-572, 2015.
- GRILLO, R.; PEREIRA, A. E. S.; NISHISAKA, C. S.; DE LIMA, R.; OEHLKE, K.; GREINER, R.; FRACETO, L. F. Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: an environmentally safer alternative for weed control. *Journal of Hazardous Materials*, v. 278, p. 163-171, 2014.
- GUILHERME, S.; SANTOS, M. A.; GAIVÃO, I.; PACHECO, M. Are DNA-damaging effects induced by herbicide formulations (Roundup[®] and Garlon[®]) in fish transient and reversible upon cessation of exposure? *Aquat. Toxicol.* v. 155, p. 213-221, 2014.
- GUNDERSON, M. P.; NGUYEN, B. T.; REYES, J. C. C.; HOLDEN, L. L.; FRENCH, J. M. T.; SMITH, B. D.; LINEBERGER, C. Response of phase I and II detoxification enzymes, glutathione, metallothionein and acetylcholine esterase to mercury and dimethoate in signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Chemosphere*, v. 208, p. 749-756, 2018.
- GUO, R.; CHEN, J. Assessing the impacts of dimethoate on rotifers' reproduction through the pre-exposure history. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 111, p. 199-205, 2015.
- GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 113, n. 1, p. 57-63, 1995.
- HACK, B.; EGGER, H.; UHLEMANN, J.; HENRIET, M.; WIRTH, W.; VERMEER, A. W. P.; DUFF, D. Advanced agrochemical formulations through encapsulation strategies? *Chemie-Ingenieur-Technik*, v. 84, n. 3, p. 223-234, 2012.
- HANAFY, A. S., FARID, R. M., HELMY, M. W., ELGAMAL, S. S. Pharmacological, toxicological and neuronal localization assessment of galantamine/chitosan complex nanoparticles in rats: future potential contribution in Alzheimer's disease management. *Drug Delivery*, v. 23, n. 8, p. 3111-3122, 2016.
- HAQUE, E.; WARD, A. Zebrafish as a model to evaluate nanoparticle toxicity, *Nanomaterials*, v. 8, n. 7, p. 561, 2018.
- HE, J. H.; GAO, J. M.; HUANG, C. J.; LI, C. Q. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 42, p. 35-42, 2014.
- HE, X.; GAO, J.; DONG, T.; CHEN, M.; ZHOU, K.; CHANG, C.; LUO, J.; WANG, C.; WANG, S.; CHEN, D.; ZHOU, Z.; TIAN, Y.; XIA, Y.; WANG, X. Developmental neurotoxicity of methamidophos in the embryo-larval stages of zebrafish. *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, v. 14, n. 1, p. e23, 2016.
- HERTZ-PICCIOTTO, I., SASS, J. B., ENGEL, S., BENNETT, D. H., BRADMAN, A., ESKENAZI, B. AND WHYATT, R. Organophosphate exposures during pregnancy and child neurodevelopment: Recommendations for essential policy reforms. *PLoS Med.*, v. 15, n. 10 p. e1002671, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002671>

- HEYDARNEJAD, M. S.; KHOSRAVIAN-HEMAMI, M.; NEMATOLLAHI, A.; RAHNAMA, S. Effects of copper at sublethal concentrations on growth and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Review of Hydrobiology*, v. 98, n. 2, p. 71-79, 2013.
- HILL, A. J.; BELLO, S. M.; PRASCH, A. L.; PETERSON, R. E.; Heideman, W. Water permeability and TCDD-induced edema in zebrafish early-life stages. *Toxicol. Sci.*, v. 78, n. 1, p. 78-87, 2004.
- HJORTH, R.; HOLDEN, P. A.; HANSEN, S. F.; COLMAN, B. P.; GRIEGER, K.; HENDREN, C. O. The role of alternative testing strategies in environmental risk assessment of engineered nanomaterials. *Environmental Science Nano*, v. 4, n. 2, p. 292-301, 2017.
- HORIE, Y.; YAMAGISHI, T.; TAKAHASHI, H.; SHINTAKU, Y.; IGUCHI, T.; TATARAZAKO, N. Assessment of the lethal and sublethal effects of 20 environmental chemicals in zebrafish embryos and larvae by using OECD TG 212. *Journal of Applied Toxicology*, v. 37, n. 10, p. 1245-1253, 2017.
- HÖRNBERG, A.; TUNEMALM, A.; EKSTRÖM, F. Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with organophosphorus compounds suggest that the acyl pocket modulates the aging reaction by precluding the formation of the trigonal bipyramidal transition state. *Biochemistry*, v. 46, n. 16, p. 4815-4825, 2007.
- HORZMANN, K. A.; FREEMAN, J. L. Zebrafish get connected, investigating neurotransmission targets and alterations in chemical toxicity. *Toxics*, v. 4, n. 3, p. 19, 2016.
- HUND-RINKE, K.; HERRCHEN, M.; SCHLICH, K.; SCHWIRN, K.; VÖLKER, D. Test strategy for assessing the risks of nanomaterials in the environment considering general regulatory procedures. *Environ. Sci. Eur.*, v. 27, p. 24, 2015.
- HWANG, E.; KIM, G. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. *Toxicology*, v. 229, p. 1-10, 2007.
- Iavicoli, I.; LESO, V.; BEEZHOLD, D. H.; SHVEDOVA, A. A. Nanotechnology in agriculture, Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 329, p. 96-111, 2017.
- IRONS, T. D.; MACPHAIL, R. C.; HUNTER, D. L.; PADILLA S. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 32, p. 84-90, 2010.
- JACOBSON, S. M.; BIRKHOLZ, D. A.; McNAMARA, M. L.; BHARATE, S.B.; GEORGE, K. M. Subacute developmental exposure of zebrafish to the organophosphate pesticide metabolite, chlorpyrifos-oxon, results in defects in Rohon-Beard sensory neuron development. *Aquatic Toxicology*, v. 100, p. 101-111, 2010.
- JANECZEK, M.; GEFEN, T.; SAMIMI, M.; KIM, G.; WEINTRAUB, S.; BIGIO, E.; ROGALSKI, E.; MESULAM, M. M.; GEULA, C. Variations in acetylcholinesterase activity within human cortical pyramidal neurons across age and cognitive trajectories. *Cereb. Cortex*, v. 1, p. 1-9, 2017.
- JANTUNEN, A. P. K., GOTTARDO, S., RASMUSSEN, K., CRUTZEN, H. P. An inventory of ready-to-use and publicly available tools for the safety assessment of nanomaterials. *NanoImpact*, v. 12, p. 18-28, 2018.

- JARDIM, A. N. O.; BRITO, A. P.; VAN DONKERSGOED, G.; BOON, P. E.; CALDAS, E. D. Dietary cumulative acute risk assessment of organophosphorus, carbamates and pyrethroids insecticides for the Brazilian population. *Food and Chemical Toxicology*, v. 112, p. 108-117, 2018.
- JEON, H. J.; LEE, Y. H.; KIM, M. J.; CHOI, S. D.; PARK, B. J.; LEE, S. E. Integrated biomarkers induced by chlorpyrifos in two different lifestages of zebrafish (*Danio rerio*) for environmental risk assessment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 43, p. 166-174, 2016.
- JIN, Y.; LIU, Z.; PENG, T.; FU, Z. The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish, a survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. *Fish. Shellfish Immunol.*, v. 43, p. 405-414, 2015.
- JIN, Y.; ZHU, Z.; WANG, Y.; (...); FENG, X.; FU, Z. The fungicide imazalil induces developmental abnormalities and alters locomotor activity during early developmental stages in zebrafish. *Chemosphere*, v. 153, p. 455-461, 2016.
- JOHNSON, A.; CAREW, E.; SLOMAN, K. A. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.*, v. 84, p. 431-438, 2007.
- JOHNSTON, H. J.; VERDON, R.; GILLIES, S.; BROWN, D M.; FERNANDES, T. F.; HENRY, T. B.; ROSSI, A. G.; TRAN, L.; TUCKER, C.; TYLER, C. R.; STONE, V. Adoption of in vitro systems and zebrafish embryos as alternative models for reducing rodent use in assessments of immunological and oxidative stress responses to nanomaterials. *Crit. Rev. Toxicol.*, v. 48, n. 3, p. 252-271, 2018.
- JONASSEN, H.; KJØNIKSEN, A. L.; HIORTH, M. Stability of Chitosan Nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 11, p. 3747-3756, 2012.
- KAH, M.; BEULKE, S.; TIEDE, K.; HOFMANN, T. Nanopesticides, state of knowledge, environmental fate, and exposure modeling. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, v. 43, p. 1823-1867, 2013.
- KAH, M.; HOFMANN, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. v. 63, p. 224-235, 2014.
- KAH, M.; KOOKANA, R. S.; GOGOS, A.; BUCHELI, T. D. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature Nanotechnology*, v. 13, p. 677-684, 2018.
- KAH, M.; WENIGER, A. K.; HOFMANN, T. Impacts of (Nano)formulations on the fate of an insecticide in soil and consequences for environmental exposure assessment. *Environ. Sci. Technol.*, v. 50, n. 20, p. 10960-10967, 2016.
- KAIS, B.; SCHNEIDER, K. E.; KEITER, S.; HENN, K.; ACKERMANN, C.; BRAUNBECK, T. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-implications for the fish embryo test (FET). *Aquat. Toxicol.*, v. 140-141, p. 229-238, 2013.
- KAIS, B.; STENGEL, D.; BATEL, A.; BRAUNBECK, T. Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments. *Environ. Sci. Pollut Res.*, v. 22, p. 16329-16339, 2015.
- KALUEFF, A.V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 35, p. 63-75, 2014.

KATSIKANTAMI, I.; COLOSIO, C.; ALEGAKIS, A.; TZATZARAKIS, M. N.; VAKONAKI, E.; RIZOS, A. K.; SARIGIANNIS, D. A.; TSATSAKIS, A. M. Estimation of daily intake and risk assessment of organophosphorus pesticides based on biomonitoring data - The internal exposure approach. *Food Chem. Toxicol.*, v. 123, p. 57-71, 2019. doi: 10.1016/j.fct.2018.10.047.

KHANDELWAL, N.; BARBOLE, R. S.; BANERJEE, S. S.; CHATE, G. P.; BIRADAR, A. V.; KHANDARE, J. J.; GIRI, A. P. Budding trends in integrated pest management using advanced micro- and nano-materials, challenges and perspectives. *Journal of Environmental Management*, v. 184, p. 157-169, 2016.

KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.*, v. 575, p. 525-535, 2017. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.009.

KLAPER, R.; ARNDT, D.; BOZICH, J.; DOMINGUEZ, G. Molecular interactions of nanomaterials and organisms: defining biomarkers for toxicity and high-throughput screening using traditional and next-generation sequencing approaches. *Analyst.*, v. 139, p. 882-895, 2014.

KNAFO, S.; WYART, C. Active mechanosensory feedback during locomotion in the zebrafish spinal cord. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 52, p. 48-53, 2018.

KOENIG, J. A.; DAO, T. L.; KAN, R. K. Zebrafish as a model for acetylcholinesterase-inhibiting organophosphorus agent exposure and oxime reactivation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 1374, p. 68-77, 2016.

KOOKANA, R. S.; BOXALL, A. B. A.; REEVES, P. T.; ASHAUER, R.; BEULKE, S.; CHAUDHRY, Q.; CORNELIS, G.; FERNANDES, T. F.; GAN, J.; KAH, M.; LYNCH, I.; RANVILLE, J.; SINCLAIR, C.; SPURGEON, D.; TIEDE, K.; VAN DEN BRINK, P. J. Nanopesticides: guiding principles for regulatory evaluation of environmental risks. *J. Agric. Food Chem.*, v. 62, p. 4227-4240, 2014.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; & PEPPAS, N. A. Mechanisms of 111 solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9)

KRISTOFKO, L. A.; HADDAD, S. P.; CHAMBLISS, C. K.; BROOKS, B. W. Differential uptake of and sensitivity to diphenhydramine in embryonic and larval zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 37, n. 4, p. 1175-1181, 2018.

KRUSKAL, WILLIAM H; ALLEN WALLIS, W. "Use of ranks in one-criterion analysis of variance". *Journal of the American Statistical Association*, v. 47, n. 260, p. 583-621. 1952. doi:10.2307/2280779. JSTOR 2280779

KÜHNERT, A.; VOGS, C.; SEIWERT, B.; AULHORN, S.; ALTENBURGER, R.; HOLLERT, H.; KÜSTER, E.; BUSCH, W. Biotransformation in the zebrafish embryo - temporal gene transcription changes of cytochrome P450 enzymes and internal exposure dynamics of the AhR binding xenobiotic benz[a]anthracene. *Environ. Pollut.*, v. 230, p. 1-11, 2017.

KUMAR, S.; BHANJANA, G.; SHARMA, A.; DILBAGHI, N.; SIDHU, M. C.; KIM, K. H.; Development of nanoformulation approaches for the control of weeds. *Sci. Total Environ.*, v. 586, p. 1272-1278, 2017.

- KUMAR, S.; BHANJANA, G.; SHARMA, A.; SIDHU, M. C.; DILBAGHIA, N. Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v. 101, p. 1061-1067, 2014.
- KUMAR, S.; CHAUHAN, N.; GOPAL, M.; KUMAR, R.; DILBAGHI, N. Development and evaluation of alginate-chitosan nanocapsules for controlled release of acetamiprid. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p. 631-637, 2015.
- KUMAR, S.; NEHRA, M.; DILBAGHI, N.; MARRAZZA, G.; HASSAN, A.; KIM, K. H. Nano-based smart pesticide formulations, emerging opportunities for agriculture. *Journal of Controlled Release*, v. 294, p. 131-153, 2019.
- KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M. X.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Biomedical activity of chitin/chitosan based materials-influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation. *Polymers*, v. 3, n. 4, p. 1875-1901, 2011.
- LAETZ, C. A.; BALDWIN, D. H.; HEBERT, V. R.; STARK, J. D.; SCHOLZ, N. L. Elevated temperatures increase the toxicity of pesticide mixtures to juvenile coho salmon. *Aquat. Toxicol.*, v. 146, p. 38-44, 2014.
- LAMMER, E.; CARR, G. J.; WENDLER, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T. H. Refinement of the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*): Is it a real replacement of the acute fish toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 149, n. 2, p. 196-209, 2009.
- LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRØNDAHL, L. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 2533-2541, 2007.
- LEE, D. W.; POWERS, K.; BANEY, R. Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v. 58, n. 4, p. 371-377, 2004.
- LETICIA, A. G.; GERARDO, G. B. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumier*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 71, n. 3, p. 787-797, 2008.
- LI, L.; XU, Z.; KAH, M.; LIN, D.; FILSER, J. Nanopesticides: A comprehensive assessment of environmental risk is needed before widespread agricultural application. *Environ. Sci. Technol.*, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03146>
- LI, S.; WANG, X.; ZHANG, X.; YANG, R.; ZHANG, H.; ZHU, L.; HOU, X. Studies on alginate-chitosan microcapsules and renal arterial embolization in rabbits. *Journal of Controlled Release*, v. 84, p.87-98, 2002.
- LIN, S.; ZHAO, Y.; NEL, A. E.; LIN, S. Zebrafish, an in vivo model for nano EHS studies. *Small*, v. 27, n. 9-10, p.1608-1618, 2013.
- LIU, Z.; JIAO, Y.; WANG, Y.; ZHOU, C.; ZHANG, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008 Editors' Collection. v. 60, n. 15, p. 1650-1662, 2008.
- LOKESHWARI, D.; KRISHNA KUMAR, N. K.; MANJUNATHA, H. Multiple mutations on the second acetylcholinesterase gene associated with dimethoate resistance in the melon aphid, *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*. v. 109, n. 2, p. 887-897, 2016.

LOMBI, E.; DONNER, E.; DUSINSKA, M.; WICKSON, F. A One Health approach to managing the applications and implications of nanotechnologies in agriculture. *Nature Nanotechnology*, v. 14, p. 523-531, 2019.

LUCINDA-SILVA, R. M. Alginate–chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit. *Carbohydrate Polymers*, v. 81, p. 260-268, 2010.

MANJUNATHA, B.; PARK, S. H.; KIM, K.; KUNDAPUR, R. R.; LEE, S. J. In vivo toxicity evaluation of pristine graphene in developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, p. 12821-12829, 2018.

MANSANO, A. S.; MOREIRA, R. A.; DORNFELD, H. C.; FREITAS, E. C.; VIEIRA, E. M.; SARMENTO, H.; ROCHA, O.; SELEGHIM, M. H. R. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 142, p. 312-321, 2017.

MARINHO, C. S.; MATIAS, M. V. F.; BRANDÃO, I. G. F.; SANTOS, E. L.; MACHADO S. S.; ZANTA, C. L. P. S. Characterization and kinetic study of the brain and muscle acetylcholinesterase from *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 222, p. 11-18, 2019.

MARTÍNEZ, M.S.; PÉREZ, L.M.; SOLER, R.F.; GONZÁLEZ, A. The organophosphorus pesticide dimethoate decreases cell viability and induces changes in different biochemical parameters of rat pancreatic stellate cells. *Toxicology in Vitro*, v. 54, p. 89-97, 2019.

MARTINS, S.; SARMENTO, B.; SOUTO, E. B. FERREIRA, D. C. Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery – Effect of polysaccharide reinforcement on physicochemical properties and release profile. *Carbohydrate Polymers*, v. 69, p. 725-731, 2007.

MEINELT, T.; KÖRNER, O.; STÜBER, A.; STEINBERG, C. E. W. Influence of calcium and natural organic matter on the toxicity of an organophosphorus insecticide. *Fresenius Environmental Bulletin*, v. 1, n. 3 B, p. 262-267, 2004.

MELVIN, S. D.; WILSON, S. P. The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: a meta-analysis. *Chemosphere*, v. 93, p. 2217-2223, 2013.

MEMARIZADEH, N.; GHADAMYARI, M.; ADELI, M.; TALEBI, K. Preparation, characterization and efficiency of nanoencapsulated imidacloprid under laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 107, p. 77-83, 2014.

MESALLAM, D. I. A.; HAMID, O. I. A.; IBRAHEM, N. E. Ethanolic extract of fenugreek seeds moderates dimethoate-induced pancreatic damage in male rats. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, p. 3894-3904, 2018.

MESHALKINA, D. A.; KIZLYK, M. N.; KYSIL, E. V.; COLLIER, A. D.; ECHEVARRIA, D. J.; ABREU, M. S.; BARCELLOS, L. J. G.; SONG, C.; KALUEFF, A. V. Understanding zebrafish cognition. *Behav. Process.*, v. 141, p. 229-241, 2017.

MEZZOMO, N. J.; FONTANA, B. D.; MÜLLER, T. E.; DUARTE, T.; QUADROS, V. A.; CANZIAN, J.; POMPERMAIER, A.; SOARES, S. M.; KOAKOSKI, G.; LORO, V. L.; ROSEMBERG, D. B.; BARCELLOS, L. J. G. Taurine modulates the stress response in zebrafish. *Hormones and Behavior*, v. 109, p. 44-52, 2019.

MILLER, G.; WICKSON, F. Risk analysis of nanomaterials, exposing nanotechnology's naked emperor. *Rev. Policy Res.*, v. 32, p. 485-512, 2015.

MLADENović, M.; ARSIĆ, B. B.; STANKOVIĆ, N.; MIHOVIĆ, N.; RAGNO, R.; REGAN, A.; MILIĆEVIĆ, J. S.; TRTIĆ-PETROVIĆ, T. M.; MICIĆ, R. The targeted pesticides as acetylcholinesterase inhibitors, Comprehensive cross-organism molecular modelling studies performed to anticipate the pharmacology of harmfulness to humans in vitro. *Molecules*, v. 23, n. 9, p. e2192, 2018.

MOHAMMED, M. A.; SYEDA, J. T. M.; WASAN, K. M.; WASAN, E. K. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics*, v. 9, p. 53, 2017. doi:10.3390/pharmaceutics9040053

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2007.

MONIKH, F. A.; CHUPANI, L.; VIJVER, M. G.; VANCOVÁ, M.; PEIJNENBURG, W. J. G. M. Analytical approaches for characterizing and quantifying engineered nanoparticles in biological matrices from an (eco)toxicological perspective, old challenges, new methods and techniques. *Science of the Total Environment*, v. 660, p. 1283-1293, 2019.

MONIKH, F. A.; PRAETORIUS, A.; SCHMID, A.; KOZIN, P.; MEISTERJAHN, B.; MAKAROVA, E.; HOFMANN, T.; VON DER KAMMERA, F. Scientific rationale for the development of an OECD test guideline on engineered nanomaterial stability. *NanoImpact*, v. 11, p. 42-50, 2018.

MONTEIRO, M.; QUINTANEIRO, C.; MORGADO, F.; SOARES, A. M. V. M.; GUILHERMINO, F. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*, application to biomonitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 62, n. 3, p. 341-347, 2005.

MORAES, C. M.; DE MATOS, A. P.; GRILLO, R.; DE MELO, N. F. S.; DE PAULA, E.; DIAS FILHO, N. L.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Screening of Formulation Variables for the Preparation of Poly (epsilon-Caprolactone) Nanocapsules Containing the Local Anesthetic Benzocaine. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 11, n. 3, p. 2450-2457, 2011.

MOSSA, A. T., ABBASSY, M. Adverse haematological and biochemical effects of certain formulated insecticides in male rats. *Research Journal of Environmental Toxicology*, v. 6, n. 4, p. 160-168, 2012.

NANOSIGHT. Nanoparticle Tracking Analysis. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis/default.aspx>>. Acesso em: 16 mar. 2016.

NAZAM, N.; SHAIKH, S.; LONE, M. I.; SHARMA, M.; AHMAD, W. Combined in silico and in vivo studies shed insights into the acute acetylcholinesterase response in rat and human brain. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 62, n. 3, p. 407-415, 2015.

NGUYEN, H. M.; HWANG, I. C.; PARK, J. W.; PARK, H. J. Photoprotection for deltamethrin using chitosan-coated beeswax solid lipid nanoparticles. *Pest Management Science*, v. 68, n. 7, p. 1062-1068, 2012.

NUNES, B. The use of cholinesterases in ecotoxicology. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 212, p. 29-59, 2011.

NUNES, B.; RESENDE, S. T. Cholinesterase characterization of two autochthonous species of Ria de Aveiro (*Diopatra neapolitana* and *Solen marginatus*) and comparison of sensitivities towards a series of common contaminants. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 13, p. 12155-12167, 2017.

NURUZZAMAN, M. D.; MAHMUDUR M. R.; LIU, Y.; NAIDU, R. Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: a new window for safe application. *J. Agric. Food Chem.*, v. 64, p. 1447-1483, 2016.

OECD Test Guideline 203. Fish, acute toxicity test (FET), 1992.

OECD Test Guideline 210. OECD for testing of chemicals. Fish, early-life stage test. Paris, 2013.

OECD Test Guideline 236. Fish embryo acute toxicity (FET) test. DOI: 10.1787/9789264203709-en, 2013.

OECD, 2000. Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment n. 23. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Paris, 2011.

OOMEN, A. G.; STEINHÄUSER, K. G.; BLEEKER, E. A. J.; BROEKHUIZEN, F.; SIPS, A.; DEKKERS, S.; WIJNHOVEN, S. W. P.; SAYRE, P. G. Risk assessment frameworks for nanomaterials: Scope, link to regulations, applicability, and outline for future directions in view of needed increase in efficiency. *NanoImpact*, v. 9, p. 1-13, 2018.

PAMANJI, R.; YASHWANTH, B.; BETHU, M. S.; LEELAVATHI, S.; RAVINDER, K.; RAO, J. V. Toxicity effects of profenofos on embryonic and larval development of Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 39, p. 887-897, 2015.

PAN, R.; CHEN, H. P.; ZHANG, M. L.; WANG, Q. H.; JIANG, Y.; LIU, X. Dissipation pattern, processing factors, and safety evaluation for dimethoate and its metabolite (omethoate) in tea (*Camellia Sinensis*). *PLoS One*, v. 10, n. 9, p. e0138309, 2015.

PANDEY, S.; GIRI, K.; KUMAR, R.; MISHRA, G.; RISHI, R. Nanopesticides, opportunities in crop protection and associated environmental risks. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.*, v. 88, n. 4, p. 1287-1308, 2018.

PARKER, M. O. Adult vertebrate behavioural aquatic toxicology: Reliability and validity. *Aquatic Toxicology*, v. 170, p. 323-329, 2016.

PATTY, P. J.; FRISKEN, B. J. Direct determination of the number-weighted mean radius and polydispersity from dynamic light-scattering data. *Applied Optics*, v. 45, n. 10, p. 2209-2216, 2006.

PECORARO, R.; SALVAGGIO, A.; MARINO, F.; CARO, G. D.; CAPPARUCCI, F.; LOMBARDO, B. M.; MESSINA, G.; SCALISI, E. M.; TUMMINO, M.; LORETO, F.; D'AMANTE, G.; AVOLA, R.; TIBULLO, D.; BRUNDO, M. V. Metallic nano-composite toxicity evaluation by zebrafish embryo toxicity test with identification of specific exposure biomarkers. *Curr. Protoc. Toxicol.*, v. 74, n. 1, p. 1.14.1-14.1.13, 2017.

PELKA, K. E.; HENN, K.; KECK, A.; SAPEL, B.; BRAUNBECK, T. Size does matter - Determination of the critical molecular size for the uptake of chemicals across the chorion of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat. Toxicol.*, v. 185, p. 1-10, 2017.

PEREIRA, B. V. R.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; COSTA, M. J.; DOS SANTOS, A. C. A.; DO CARMO, J. B.; NUNES, B. Cholinesterases characterization of three tropical fish species, and their sensitivity towards specific contaminants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 173, p. 482-493, 2019.

PEREZ-DE-LUQUE A., RUBIALES, D. Nanotechnology for parasitic plant control. *Pest Manag. Sci.*, v. 65, p. 540-545, 2009.

PETERS, R. J. B.; BOUWMEESTER, H.; GOTTARDO, S.; AMENTA, V.; ARENA, M.; BRANDHOFF, P.; MARVIN, H. J. P.; MECH, A.; BOTELHO MONIZ, F.; QUIROS PESUDO, L.; RAUSCHER, H.; SCHOONJANS, R.; UNDAS, A. K.; VETTORI, M. V.; WEIGEL, S.; ASCHBERGER, K. Nanomaterials for products and application in agriculture, feed and food. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 54, p. 155-164, 2016.

PETERSEN, E. J.; DIAMOND, S. A.; KENNEDY, A. J.; GOSS, G. G.; HO, K.; LEAD, J. R.; HANNA, S. K.; HARTMANN, N. B.; HUND-RINKE, K.; MADER, B.; MANIER, N.; PANDARD, P.; SALINAS, E. R.; SAYRE, P. Adapting OECD aquatic toxicity tests for use with manufactured nanomaterials: key issues and consensus recommendations. *Environ. Sci. Technol.*, v. 49, p. 9532-9547, 2015.

PIOTROWSKI, M.; JANTAS, D.; SZCZEPANOWICZ, K.; ŁUKASIEWICZ, S.; LASOŃ, W.; WARSZYŃSKI, P. Polyelectrolyte-coated nanocapsules containing undecylenic acid: Synthesis, biocompatibility and neuroprotective properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 135, p. 8-17, 2015.

POPE, C. N. Organophosphorus pesticides, do they all have the same mechanism of toxicity? *J. Toxicol. Environ. Health, Part B*, v. 2, n. 2, p. 161-181, 1999.

PRADHAN, S.; ROY, I.; LODH, G.; PATRA, P.; CHOUDHURY, S. R.; SAMANTA, A.; GOSWAMI, A. Entomotoxicity and biosafety assessment of PEGylated acephate nanoparticles: A biologically safe alternative to neurotoxic pesticides *Journal of Environmental Science and Health, Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 48, n. 7, p. 559-569, 2013.

PRASAD, R.; BHATTACHARYYA, A.; NGUYEN Q. D. Nanotechnology in sustainable agriculture, recent developments, challenges, and perspectives. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1014, 2017.

PUGLIS, H. J.; BOONE, M. D. Effects of technical-grade active ingredient vs. commercial formulation of seven pesticides in the presence or absence of UV radiation on survival of green frog tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 60, n. 1, p. 145-155, 2011.

QAYOOM, I.; SHAH, F. A.; MUKHTAR, M.; BALKHI, M. H.; BHAT, F. A.; BHAT, B. A. Dimethoate Induced Behavioural Changes in Juveniles of *Cyprinus carpio var. communis* under temperate conditions of Kashmir, India. *The Scientific World Journal*, ID 4726126, p. 6, 2016.

QIANG, L.; CHENG, J.; YI, J.; ROTCHELL, J. M.; ZHU, X.; ZHOU, J. Environmental concentration of carbamazepine accelerates fish embryonic development and disturbs larvae behavior. *Ecotoxicology*, v. 25, p. 1426-1437, 2016.

R. GUTERRES, S.; VIDOR CONTRI, R.; ABRAHÃO FRANK, L.; KAISER, M.; R. POHLMANN, A. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. *International Journal of Nanomedicine*, p. 951, fev. 2014.

RAND, G. M.; Clark, J. R. Hazard risk assessment of pyridaben I. Aquatic toxicity and environmental chemistry. *Ecotoxicology*, v. 9, p. 157-168, 2000.

RAWSON, D. M.; ZHANG, T.; KALICHARAN, D.; JONGEBLOED, W. L. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*, a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. *Aqua. Res.*, v. 31, p. 325-336, 2000.

- REIS, C.P.; NEUFELD, R. J.; VILELA, S.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of Microencapsulation*, v. 23, n. 3, p. 245-257, 2006.
- REQUENA, M.; PARRÓN, T.; NAVARRO, A.; GARCÍA, J.; VENTURA, M. I.; HERNÁNDEZ, A. F.; ALARCÓN, R. Association between environmental exposure to pesticides and epilepsy. *Neurotoxicology*, v. 68, p. 13-18, 2018. doi: 10.1016/j.neuro.2018.07.002.
- RICHESTRFER, H.; CRETON, R. Chlorpyrifos and malathion have opposite effects on behaviors and brain size that are not correlated to changes in AChE activity. *NeuroToxicology*, v. 49, p. 50-58, 2015.
- RICO, E.; ROSEMBERG, D.; SEIBT, K.; CAPIOTTI, K.; DA SILVA, R.; BONAN, C. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets, *Neurotoxicol Teratol.*, v. 33, n. 6, p. 608-617, 2011.
- RIGOTTO, R. M.; PAIXÃO E VASCONCELOS, D.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. *Cad. Saúde Pública*, v. 30, n. 7, p. 1-3, 2014.
- ROBERTS, A. C.; BILL, B. R.; GLANZMAN, D. L. Learning and memory in zebrafish larvae. *Front. Neural Circuits*, v. 7, p. 126, 2013.
- ROSA, J. G. S.; ALCÂNTARA BARCELLOS, H. H. D.; FAGUNDES, M.; VARIANI, C., ROSSINI, M.; KALICHAK, F.; KOAKOSKI, G.; OLIVEIRA, T. A.; IDALENCIO, R.; FRANDOLOSO, R.; PIATO, A. L.; BARCELLOS, L. J. G. Muscarinic receptors mediate the endocrine-disrupting effects of an organophosphorus insecticide in zebrafish. *Environmental Toxicology*, v. 32, n. 7, p. 1964-1972, 2017.
- ROY, N. M.; ZAMBRZYCKA, E.; SANTANGELO, J. Butyl benzyl phthalate (BBP) induces caudal defects during embryonic development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 56, p. 129-135, 2017.
- SAMAEI, S. M.; RABBANI, S.; JOVANOVIĆ, B.; MOHAJERI-TEHRANI, M. R.; HAGHPANAH, V. Efficacy of the hatching event assessing the embryo toxicity of the nano-sized TiO₂ particles in zebrafish: a comparison between two different classes of hatching-derived variables. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 116, p. 121-128, 2015.
- SANTANA, V. S.; MOURA, M. C. P.; NOGUEIRA, F. F. Occupational pesticide poisoning, 2000–2009. *Brazil. Rev. Saúde Publ.*, v. 47, p. 598-606, 2013.
- SARMAH, S.; MARRS, J. A. Zebrafish as a vertebrate model system to evaluate effects of environmental toxicants on cardiac development and function. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, p. e2123, 2016.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SCHMITT, C.; McMANUS, M.; KUMAR, N.; AWOYEMI, O.; CRAGO, J. Comparative analyses of the neurobehavioral, molecular, and enzymatic effects of organophosphates on embryo-larval zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and Teratology*, v. 73, p. 67-75, 2019.
- SCHWEIZER, M.; DIETERICH, A.; TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H. R. Drifting Away of a FET endpoint: the heart rate in *Danio rerio* embryos is extremely sensitive to variation in ambient temperature. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 99, n. 6, p. 684-689, 2017.

SCHWERTE, T.; PREM, C.; MAIRÖSL, A.; PELSTER, B. Development of the sympatho-vagal balance in the cardiovascular system in zebrafish (*Danio rerio*) characterized by power spectrum and classical signal analysis. *J. Exp. Biol.*, v. 209, p. 1093-1100, 2006.

SERRANO-MEDINA, A., UGALDE-LIZÁRRAGA, A., BOJORQUEZ-CUEVAS, M. S., GARNICA-RUIZ, J., GONZÁLEZ-CORRAL M. A., GARCÍA-LEDEZMA A., PINEDA-GARCÍA, G., CORNEJO-BRAVO, J. M. Neuropsychiatric disorders in farmers associated with organophosphorus pesticide exposure in a rural village of Northwest Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 6, n. 5, p. 689, 2019.

SHADEGAN, M. R.; BANAEI, M. Effects of dimethoate alone and in combination with Bacilar fertilizer on oxidative stress in common carp, *Cyprinus carpio*. *Chemosphere*, v. 208, p. 101-107, 2018.

SHAW, B. J.; LIDDLE, C. C.; WINDEATT, K. M.; HANDY, R. D. A critical evaluation of the fish early-life stage toxicity test for engineered nanomaterials: experimental modifications and recommendations. *Arch. Toxicol.*, v. 90, p. 2077-2107, 2016.

SIEKE, C., MICHALSKI, B., KUHL, T. Probabilistic dietary risk assessment of pesticide residues in foods for the German population based on food monitoring data from 2009 to 2014. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, v. 28, p. 46-54, 2018.

SINGH, R. N.; PANDEY, R. K.; SINGH, N. N.; DAS, V. K. Acute toxicity and behavioral responses of common carp *Cyprinus carpio* (Linn.) to an organophosphate (dimethoate) *World J. Zool.*, v. 5, n. 3, p. 183-188, 2010.

SINHA, S. N., BANDA, V. R. Correlation of pesticide exposure from dietary intake and bio-monitoring: The different sex and socio-economic study of children. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 162, p. 170-177, 2018

SLATTERY, M.; HARPER, B.; HARPER, S. Pesticide encapsulation at the nanoscale drives changes to the hydrophobic partitioning and toxicity of an active ingredient. *Nanomaterials (Basel)*, v. 9, n. 1, p. 81, 2019.

SLOMAN, K.; MCNEIL, P. Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants. *J. Fish Biol.*, v. 81, p. 2175-2198, 2012.

SOBANSKA, M.; SCHOLZ, S.; NYMAN, A. M.; CESNAITIS, R.; ALONSO, S. G.; KLĚUVER, N.; KĚUHNE, R.; TYLE, H.; DE KNECHT, J.; DANG, Z.; LUNDBERGH, I.; CARLON, C.; DE COEN, W. Applicability of the fish embryo acute toxicity (FET) test (OECD 236) in the regulatory context of Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals (REACH). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 37, n. 3, p. 657-670, 2018.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nature Reviews. Neuroscience*, v. 2, n. 4, p. 294-302, 2001.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 2, n. 4, p. 294-302, 2001.

SOUDER, J. P.; GORELICK, D. A. Quantification of estradiol uptake in zebrafish embryos and larvae. *Toxicological Sciences*, v. 158, n. 2, p. 465-474, 2017.

SRIVASTAVA, P.; SINGH, A.; PANDEY, A. K. Pesticides toxicity in fishes: biochemical, physiological and genotoxic aspects. *Biochemical and Cellular Archives*, v. 16, n. 2. p. 199-218, 2016.

- STEINHÄUSER, K. G.; SAYRE, P. G. Reliability of methods and data for regulatory assessment of nanomaterial risks. *NanoImpact*, v. 7, p. 66-74, 2017.
- STENGEL, D.; WAHBY, S.; BRAUNBECK, T. In search of a comprehensible set of endpoints for the routine monitoring of neurotoxicity in vertebrates, sensory perception and nerve transmission in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 5, p. 4066-4084, 2018.
- STEWART, A. M.; KALUYEVA, A. A.; NGUYEN, M.; POUDEL, M. K.; SONG, C. Building zebrafish neurobehavioral phenomics: effects of common environmental factors on anxiety and locomotor activity. *Zebrafish*, v. 156, p. 269-273, 2015.
- STRÄHLE, U.; SCHOLZ, S.; GEISLER, R.; GREINER, P.; HOLLERT, H.; RASTEGAR, S.; *et al.* Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod Toxicol.*, v. 33, p. 128-132, 2012.
- STRUNGARU, S. A.; ROBEA, M. A.; PLAVAN, G.; TODIRASCU-CIORNEA, E.; CIOBICA, A.; NICOARA, M. Acute exposure to methylmercury chloride induces fast changes in swimming performance, cognitive processes and oxidative stress of zebrafish (*Danio rerio*) as reference model for fish community. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 47, p. 115-123, 2018.
- SUNDARAMOORTHY, R.; VELUSAMY, Y.; BALAJI, A. P. B.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Comparative cytotoxic and genotoxic effects of permethrin and its nanometric form on human erythrocytes and lymphocytes in vitro. *Chemico-Biological Interactions*, v. 257, p. 119-124, 2016.
- TAMAŠ, N.; DOJNOV, B.; MARGETIĆ, A.; VUJČIĆ, M.; ŠPIROVIĆ, B.; MILETIĆ, N.; STEVIĆ, M.; VUJČIĆ, Z. Resistance to common organophosphate and carbamate insecticides in *Aphis pomi* (Hemiptera: Aphididae). *Fruits*, v. 70, n. 3, p. 135-142, 2015.
- TEIXIDÓ, E.; PIQUÉ, E.; GÓMEZ-CATALÁN, J.; LLOBERT, J. M. Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. *Toxicol. in vitro*, v. 27, p. 469-478, 2013.
- TEODORO, M.; BRIGUGLIO, G.; FENGA, C.; COSTA, C. Genetic polymorphisms as determinants of pesticide toxicity: Recent Advances, *Toxicol., Rep.* 6, p. 564-570, 2019. doi: 10.1016/j.toxrep.2019.06.004.
- THAM, L. G.; HALMI, M. I. E.; SHARIF, M. S. A.; (...); SYED, M. A.; SHUKOR, M. Y. Sensitivity of crude and partially purified acetylcholinesterase from fish to carbamates and organophosphates. *Journal of Environmental Biology*, v. 35, n. 1, p. 285-287, 2014.
- THEISEN, U.; HENNIG, C.; RING, T.; SCHNABEL, R.; KOÈSTER, R.W. Neurotransmitter-mediated activity spatially controls neuronal migration in the zebrafish cerebellum. *PLoS Biol.*, v. 16, n. 1, p. e2002226, 2018.
- TIAN, H.; SUN, Y.; WANG, H.; BING X.; WANG, W.; RU, S. Monocrotophos pesticide affects synthesis and conversion of sex steroids through multiple targets in male goldfish (*Carassius auratus*). *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 2306, 2017.
- TILTON, F. A.; BAMMLER, T. K.; GALLAGHER, E. P. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, v. 153, p. 9-16, 2011.
- TØNNESEN, H. H. E.; KARLSEN, J. Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 28, 6, p. 621-630, 2002.

TOUART, L.W. The federal insecticide, fungicide, and rodenticide act. In, Rand GM (Ed), Fundamentals of aquatic toxicology. Boca Raton, FL, CRC Press, 3 ed., p. 657-668, 1995.

US.EPA, United State of Environmental Protection Agency. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, 6 ed., Washington, 2002.

VALIM BRIGANTE, T. A.; ABE, F. R.; ZUARDI, A. W.; HALLAK, J. E. C.; CRIPPA, J. A. S.; DE OLIVEIRA, D. P. Cannabidiol did not induce teratogenicity or neurotoxicity in exposed zebrafish embryos. *Chemico-Biological Interactions*, v. 291, p. 81-86, 2018.

VAN POMEREN, M.; BRUN, N. R.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; VIJVER, M. G. Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages. *Aquatic Toxicology*, v. 190, p. 40-45, 2017.

VARGAS, R.; PONCE-CANCHIHUAMÁN, J. Emerging various environmental threats to brain and overview of surveillance system with zebrafish model. *Toxicology Reports*, v. 4, p. 467-473, 2017.

VENKATRAMAN, S. S.; JIE, P.; MIN, F.; FREDDY, B. Y. C.; LEONG-HUAT, G. Micelle-like nanoparticles of PLA-PEG-PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 298, n. 1, p. 219-232, 2005.

VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; CABRERA, L. C.; (...); BIANCHINI, A.; MARTINEZ, C. B. R. A comparative approach using biomarkers in feral and caged neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. *Science of the Total Environment*, v. 586, p. 598-609, 2017.

VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; LUNARDELLI, B.; DE OLIVEIRA, L. F.; CABRERA, L. C.; RISSO, W. E.; PRIMEL, E. G.; MELETTI, P. C.; FILLMANN, G.; MARTINEZ, C. B. R. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 542, p. 44-56, 2016.

VILLAVERDE, J. J.; SEVILLA-MORÁN, B.; LÓPEZ-GOTI, C.; ALONSO-PRADOS, J. L.; SANDÍN-ESPAÑA, P. Considerations of nano-QSAR/QSPR models for nanopesticide risk assessment within the European legislative framework. *Science of the Total Environment*, v. 634, p. 1530-1539, 2018.

VURRO, M.; MIGUEL-ROJAS, C., PÉREZ-DE-LUQUE, A. Safe nanotechnologies for increasing the effectiveness of environmentally friendly natural agrochemicals. *Pest. Manag. Sci.*, DOI 10.1002, p. 5348, 2019.

WALKER, G. W.; KOOKANA, R. S.; SMITH, N. E.; KAH, M.; DOOLETTE, C. L.; REEVES, P. T.; LOVELL, W.; ANDERSON, D. J.; TURNEY, T. W.; NAVARRO, D. A. Ecological risk assessment of nano-enabled pesticides: A Perspective on problem formulation, *J. Agric. Food Chem.*, v. 66, n. 26, p. 6480-6486, 2018.

WALKER, G. W.; KOOKANA, R. S.; SMITH, N. E.; KAH, M.; DOOLETTE, C. L.; REEVES, P. T.; LOVELL, W.; ANDERSON, D. J.; TURNEY, T. W.; NAVARRO, D. A. Ecological risk assessment of nano-enabled pesticides: a perspective on problem formulation. *J. Agric. Food Chem.*, v. 66, n. 26, p. 6480-6486, 2018.

WATSON, F. L.; SCHMIDT, H.; TURMAN, Z. K.; HOLE, N.; GARCIA, H.; GREGG, J.; TILGHMAN, J.; FRADINGER, E. A. Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 33, n. 6, p. 1337-1345, 2014.

XU, E. G.; BUI, C.; LAMERDIN, C.; SCHLENK, D. Spatial and temporal assessment of environmental contaminants in water, sediments and fish of the Salton Sea and its two primary tributaries, California, USA, from 2002 to 2012. *Science of the Total Environment*, v. 559, p. 130-140, 2016.

XU, Z.; ZHANG, Y. L.; SONG, C.; WU, L. L.; GAO, H. W. Interactions of hydroxyapatite with proteins and its toxicological effect to zebraish embryos development. *PLoS One*, v. 7, n. 4, p. e32818, 2012.

YANG, D.; LAURIDSEN, H.; BUELS, K.; CHI, L. H.; LA DU, J.; BRUUN, D. A.; OLSON, J. R.; TANGUAY, R. L.; LEIN, P. J. Chlorpyrifos-oxon disrupts zebrafish axonal growth and motor behavior. *Toxicol. Sci.*, v. 121, p. 146-159, 2011.

YAO, H.; XU, X.; ZHOU, Y.; XU, C. Impacts of isopyrazam exposure on the development of early-life zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 24, p. 23799-23808, 2018.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *Chem Bio Eng Reviews*, v. 2, n. 3, p. 204-226, 2015.

ZHANG, X. J.; YANG, L.; ZHAO, Q.; *et al.* Induction of acetyl-cholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ*, v. 9, p. 790-800, 2002.

ZHAO, X. H.; BO, L. Y.; WANG, J.; LI, T. J. Survey of seven organophosphorus pesticides in drinking water, feedstuffs and raw milk from dairy farms in the Province Heilongjiang during 2008–2009. *Milchwiss-Milk Sci. Int.*, v. 67, p. 293-296, 2012.

ZHAO, X.; CUI, H.; WANG, Y.; SUN, C.; CUI, B.; ZENG Z. Development strategies and prospects of nano-based smart pesticide formulation. *J. Agric. Food Chem.*, v. 66, n. 26, p. 6504-6512, 2018.

ZOU, Y.; ZHANG, Y.; HAN, L.; HE, Q.; HOU, H.; HAN, J.; WANG, X.; LI, C.; CEN, J.; LIU, K. Oxidative stress-mediated developmental toxicity induced by isoniazide in zebrafish embryos and larvae. *Journal of Applied Toxicology*, v. 37, n. 7, p. 842-852, 2017.

ANEXO I



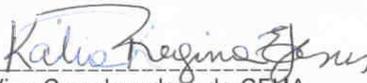
Meio Ambiente

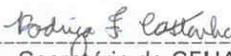
AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação diferencial dos efeitos toxicológicos do dimetoato nas formas comercial e nanoencapsulado no organismo *Danio rerio* (Zebrafish)", registrada com o nº 003/2015, sob a responsabilidade de Vera Lucia Scherholz Salgado de Castro que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e aprovada para o período de 08/2015 a 08/2017, foi renovada até 03/2019 pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente, em reunião de 21/06/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	08/2015 a 03/2019
Espécie/linhagem/raça	<i>Danio rerio</i>
Nº de animais	800
Peso/Idade	2 g para adultos/ larvas e adultos reprodutores (4 a 12 meses)
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério do Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da EMBRAPA Meio Ambiente

Jaguariúna, 21 de junho de 2017


Vice-Coordenadora da CEUA


Secretário da CEUA

ANEXO II

INTRANET IB

<https://intranet.ib.unicamp.br/intranet/formularioceua/certific...>

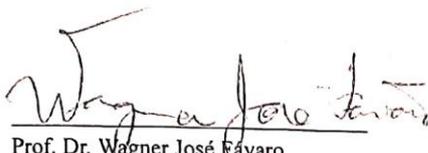
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **AVALIAÇÃO DIFERENCIAL DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO DIMETOATO NAS FORMAS COMERCIAL E NANOREVESTIDO EM Danio rerio (ZEBRAFISH)**, registrada com o nº **5186-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Cláudia Vianna Maurer Morelli e JOSÉ HENRIQUE VALLIM**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **11/04/2019**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/05/2015 a 01/08/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	11/04/2019 a 01/08/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Peixe** / Danio rerio
No. de animais:	12
Idade/Peso:	5.00 Dias / 0.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Peixe** / Danio rerio
No. de animais:	12
Idade/Peso:	5.00 Dias / 0.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Peixe** / Danio rerio
No. de animais:	12
Idade/Peso:	5.00 Dias / 0.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Peixe** / Danio rerio
No. de animais:	12
Idade/Peso:	5.00 Dias / 0.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Origem:	Biotério do Laboratório de Zebrafish, FCM / UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Zebrafish, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 29 de abril de 2019.



Prof. Dr. Wagner José Fávares
Presidente



Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

**DECLARAÇÃO DE QUE A DISSERTAÇÃO OU TESE NÃO
INFRINGE OS DISPOSITIVOS DA LEI Nº 9610/98, NEM O DIREITO
AUTORAL DE QUALQUER EDITORA**

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO DIMETOATO E DIMETOATO NANOENCAPSULADO EM Danio rerio (ZEBRAFISH)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30 de agosto de 2019



Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **José Henrique Vallim**

RG n.º 25.716.095-4

Assinatura : Leonardo Fernandes Fraceto

Nome do(a) orientador(a): **Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto**

RG n.º 26437190-2