

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

LÍLIAN RENATA ALVES FARIAS

**PROTOCOLO DE ANÁLISE TOXICOLÓGICA DE INSETICIDAS BOTÂNICOS:  
EFEITOS DA FORMULAÇÃO MICROENCAPSULADA DO EXTRATO  
ETANÓLICO DE *Annona muricata* L. (ANNONACEAE) EM TILÁPIA DO NILO**

Rio Largo – AL

2023

LÍLIAN RENATA ALVES FARIAS

**PROTOCOLO DE ANÁLISE TOXICOLÓGICA DE INSETICIDAS BOTÂNICOS:  
EFEITOS DA FORMULAÇÃO MICROENCAPSULADA DO EXTRATO  
ETANÓLICO DE *Annona muricata* L. (ANNONACEAE) EM TILÁPIA DO NILO**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roseane Cristina Predes Trindade

Coorientador: Prof. Dr. Elton Lima Santos

Rio Largo – AL

2023

**CATALOGAÇÃO NA FONTE**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**Biblioteca Campus de Engenharias e Ciências Agrárias**  
Bibliotecário Responsável: Erisson Rodrigues de Santana - CRB4 - 1512

F224p Farias, Lílian Renata Alves.

Protocolo de análise toxicológica de inseticidas botânicos: efeitos da formulação microencapsulada do extrato etanólico de *Annona muricata* L. (annonaceae) em tilápia do nilo. / Lílian Renata Alves Farias. – 2023.

66f.: il.

Orientador(a): Roseane Cristina Predes Trindade.  
Coorientador(a): Elton Lima Santos.

Dissertação (Mestrado em Proteção de plantas) – Programa de Pós -Graduação em Proteção de plantas, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2023.

Inclui bibliografia

1. Plantas inseticidas. 2 Microencapsulamento. 3. *Oreochromis niloticus*. 4. Ecotoxicologia. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

CDU: 632.5

## Folha de Aprovação

LÍLIAN RENATA ALVES FARIAS

PROTOCOLO DE ANÁLISE TOXICOLÓGICA DE INSETICIDAS BOTÂNICOS:  
EFEITOS DA FORMULAÇÃO MICROENCAPSULADA DO EXTRATO ETANÓLICO  
DE *Annona muricata* L. (ANNONACEAE) EM TILÁPIA DO NILO

Dissertação submetida à banca examinadora do  
Programa de Pós-graduação em Proteção de  
Plantas com Campus de Engenharias e Ciências  
Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas,  
e aprovada em 9 de agosto de 2023.

### Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 ROSEANE CRISTINA PREDES TRINDADE  
Data: 14/08/2023 09:55:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Orientadora – Dr<sup>a</sup>. Roseane Cristina Predes  
Trindade (*Campus* de Engenharias e Ciências  
Agrárias)

Documento assinado digitalmente  
 JERUSA MARIA DE OLIVEIRA AMORIM  
Data: 14/08/2023 14:47:08-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

(Examinador(a) Externo(a) – Dr<sup>a</sup>. Jerusa Maria de Oliveira  
(Pós doc do IF/UFAL)

Documento assinado digitalmente  
 MARIANA OLIVEIRA BREDA  
Data: 14/08/2023 12:45:14-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

(Examinador(a) Interno(a) – Dr<sup>a</sup>. Mariana Oliveira Breda  
(Professora permanente no PPGPP/ CECA/ UFAL)

A Deus, minha família e aos meus amigos, companheiros de todos os momentos da minha vida...

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder saúde, persistência, coragem, tranquilidade, uma família maravilhosa e amigos...

À minha família, meus pais Maria Do Ó Alves Farias e Franklin Roosevelt Vieira Farias e minha irmã Laryssa Roberta Farias, por acreditarem, investirem e me apoiarem. Obrigada, pelo amor incondicional, e por entenderem a minha ausência. O amor e apoio de vocês foram essenciais para conseguir finalizar esse desafio.

À Universidade Federal de Alagoas, juntamente com o programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas, do *Campus* de Engenharias e Ciências Agrárias, pela oportunidade de cursar o Mestrado e pela infraestrutura fornecida para a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento e Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos laboratórios de Entomologia: controle alternativo de pragas (LECAP), de Tecnologia e controle de medicamentos (LABTICOM), Aquicultura (LAQUA) e ao laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LMAA) da Universidade Federal de Alagoas pelos equipamentos, estrutura e reagentes.

Em especial, à minha equipe de laboratório e grandes amigos, Jessica Mariana Costa, Aleska Silva, Diego Jorge da Silva, Leonara Figueiroa, Janynne Rocha e Rafael Leite por toda ajuda, acolhimento e momentos de descontração.

À minha querida orientadora Dr<sup>a</sup>. Roseane Cristina Predes Trindade pela orientação, por todos os ensinamentos compartilhados, incentivo, confiança e empatia.

Ao meu coorientador Dr. Elton Lima pela esperança depositada, incentivos, orientações e indicação para realização desta pesquisa.

À professora Dr<sup>a</sup> Jerusa Maria de Oliveira, juntamente com Lúcio José Lima da Silva Júnior, que me acolheram e foram indispensáveis para obtenção final dos meus dados.

Gratidão!

Tudo tem seu tempo determinado. E há tempo para todo o propósito debaixo do céu.  
(Eclesiastes 3:1)

## RESUMO

Estudos toxicológicos, têm se tornado cada vez mais frequentes, devido à crescente preocupação com os efeitos no meio ambiente e em organismos não-alvo. Esse aumento na atenção, também está relacionado à adoção crescente de alternativas, como o uso de inseticidas botânicos na agricultura. Esta preocupação é acentuada pela ausência de uma legislação específica que estabeleça parâmetros para o uso desses produtos, o que implica na falta de limites toxicológicos definidos. Diante disso, objetivou-se avaliar possíveis efeitos tóxicos da formulação microencapsulada do extrato etanólico de *Annona muricata* L. (Annonaceae), um produto já com patente concedida (BR102018008313-9), em alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichiformes: Cichilidae). Foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica, utilizando alevinos de tilápia com aproximadamente 30 dias de idade medindo em média entre 1,5 e 3,0cm, os quais foram expostos às concentrações crescentes de 0,125; 0,250; 0,500; 1,0 e 2,0 g/L da formulação, por 24 e 96 horas, respectivamente. Como também, parâmetros bioquímicos com enzimas antioxidantes. Com bases nos resultados de mortalidade, foram estimados os valores da concentração que mata 50% da população avaliada (CL<sub>50</sub>), obtidos pela análise de Probit pelo SAS, resultando em 0,229 e 0,249 g/L em 24 e 96 horas, respectivamente. A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST), foram quantificadas no fígado e brânquias e acetilcolinesterase (AChE), quantificada no encéfalo de *O. niloticus*. A análise estatística ANOVA apresentou diferenças apenas para as atividades de SOD e GST no fígado. Apesar disso, quando os indivíduos foram expostos às duas maiores concentrações 1,0 e 2,0 g/L apresentaram mortalidade de 93,33 e 100,00%, respectivamente, após 24 horas de exposição. A mortalidade provavelmente teve origem na perturbação do animal e nas alterações em seu habitat natural. Isso ocorre porque os resultados da atividade enzimática e da análise de Acetil foram positivos quando comparados ao valor estimado na CL<sub>50</sub>. Portanto, visto que a toxicologia é um ponto de fraqueza na promoção de produtos alternativos, faz -se necessário mais estudos na área de produtos naturais, tais como extratos e óleos.

**Palavras-chave:** plantas inseticidas; microencapsulamento; *Oreochromis niloticus*; ecotoxicologia; estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Toxicological studies have become more and more frequent due to the growing concern about the effects on the environment and on non-target organisms. This increased attention is also related to the increased adoption of alternatives, such as the use of botanical insecticides in agriculture. This concern is accentuated by the absence of specific legislation that establishes parameters for the use of these products, which implies the lack of defined toxicological limits. In view of this, the objective was to evaluate possible toxic effects of the microencapsulated formulation of ethanolic extract of *Annona muricata* L (Annonaceae), a product with a patent already granted (BR102018008313-9), on fingerlings of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichiformes: Cichilidae). Acute and chronic toxicity tests were performed, with tilapia fingerlings approximately 30 days old with measuring on average between 1.5 and 3.0 cm, which were exposed to concentrations to increasing concentrations 0.125; 0.250; 0.500; 1.0 and 2.0 g/L of the formulation for 24 and 96 hours. As well as biochemical parameters with antioxidant enzymes. Based on the mortality results, the concentration values that kill 50% of the evaluated population ( $CL_{50}$ ), obtained by Probit analysis by SAS, resulting in 0.229 and 0.249 g/L in 24 and 96 hours, respectively. The enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST) was quantified in the liver and gills and acetylcholinesterase (AChE) was quantified in the brain of *O. niloticus*. ANOVA statistical analysis showed differences only for SOD and GST activities in the liver. Despite that, when individuals were exposed to the two highest concentrations 1.0 and 2.0 g/L, they showed mortality rates of 93.33 and 100%, respectively, after 24 hours of exposure. Mortality likely stemmed from disturbance of the animal and alterations to its natural habitat. This is because the results of enzymatic activity and Acetyl analysis were positive when compared to the estimated  $LC_{50}$  value. Therefore, since toxicology is a weakness in the promotion of alternative products, more studies are needed in the area of natural products, such as extracts and oils.

**Keywords:** insecticides plants; microencapsulation; *Oreochromis niloticus*; ecotoxicology; oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Processo de criação: (A) açude disponível para a piscicultura do CECA; (B) captura dos alevinos de tilápia; (C) transporte ao laboratório; (D) aclimação e (E) engorda dos animais até o peso ideal para os testes. .... 15
- Figura 2:** Elaboração do homogenato: (A) preparo do tampão fosfato 7,0; (B) trituração de amostras com homogeneizador elétrico; (C) separação das fases por centrifugação e (D) coleta do sobrenadante. .... 18
- Figura 3:** Mensuração da GST: (A) sobrenadante de tecidos de brânquias e fígado; (B) cubeta utilizada na leitura de espectrofotometria e (C) leitura realizada em uma corrida de 1min e 30s em espectrofotômetro ( $\lambda= 380 \text{ nm}$ ) ..... 33
- Figura 4:** Mensuração da SOD: (A) placa de Elisa; (B) aplicação de amostras de brânquias e fígado e reagentes com multicanal e (C) leitura realizada em leitor de microplacas ( $\lambda= 580 \text{ nm}$ ) ..... 39
- Figura 5:** Mensuração da Acetil: (A) sobrenadante de tecidos de cérebro; (B) cubeta utilizada na leitura de espectrofotometria e (C) leitura numa corrida de 5min em espectrofotômetro ( $\lambda= 412 \text{ nm}$ ).....40
- Figura 6:** Alteração visual do exterior dos peixes experimentais: (A) tilápia com coloração normal submetida ao tratamento testemunha e (B) peixe submetido a exposição da formulação microencapsulada de *A. muricata* apresentando escurecimento da pele..... 52
- Figura 7:** Atividade da SOD no fígado, com diferença significativa entre as médias do tratamento 0,500g/L em relação à testemunha.....45
- Figura 8:** Atividade da GST no fígado, apresentando diferenças significativas tanto em relação ao controle, quanto aos tratamentos.....47
- Figura 9:** Atividade da GST nas brânquias, sem interferência à exposição do produto formulado de *A. muricata*.....47
- Figura 10:** Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) no cérebro, sem diferenças significativas, estatisticamente.....48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Tabela adaptada da Legislação de Agrotóxicos. Testes toxicológicos, de Fase I, em peixes exigidos pela legislação brasileira para novos princípios ativos de pesticidas ou bioinseticidas. ....	21
<b>Tabeela 2:</b> Tabela adaptada da Legislação de Agrotóxicos. Testes toxicológicos, de Fase II, em peixes exigidos pela legislação brasileira para novos princípios ativos de pesticidas ou bioinseticidas.. ....	22
<b>Tabela 3:</b> Tabela adaptada da Legislação de Agrotóxicos. Testes toxicológicos, de Fase III, em peixes exigidos pela legislação brasileira para novos princípios ativos de pesticidas ou bioinseticidas. ....	23
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros físico-químicos da água em diferentes concentrações da formulação microencapsulada de <i>A. muricata</i> .....	41
<b>Tabela 5:</b> Estimativas das concentrações letais, CL <sub>50</sub> e CL <sub>99</sub> , na toxicidade aguda e crônica da formulação microencapsulada do extrato etanólico de <i>Annona muricata</i> .....	41
<b>Tabela 6.</b> A média de mortalidade de <i>Oreochromis niloticus</i> em concentrações crescentes no teste de toxicidade aguda e crônica aos períodos de exposição de 24 e 96h.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AChE** - Acetilcolinesterase

**SOD** - Superóxido Dismutase

**°C** - Grau Celsius

**CAT** - Catalase

**CDNB** - Cloro-2,4-dinitrobenzeno

**CL<sub>50</sub>** - Concentração subletal

**CL<sub>99</sub>** - Concentração letal

**DTNB** - Ácido 2-nitrobenzoico

**ELISA** - do inglês: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**EROs** – Espécie reativa de oxigênio

**GPx** - Glutaiona peroxidase

**GST** – Glutathiona S-transferase

**GSH** - Glutathiona Reduzida

**g/L** – Gramas por litro

**nm** - Nanômetros

**mg/L** - Miligras por litro

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**µm** – Micrômetro

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Toxicologia .....	18
2.2 Efeito residual no ambiente .....	19
2.3 Bioacumulação.....	21
2.4 Protocolo e Legislação de testes toxicológicos .....	21
2.4.1 Legislação brasileira referente a ensaios ecotoxicológicos .....	23
2.5 A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos .....	25
2.6 Agrotóxicos no meio ambiente .....	26
2.7. Biomarcadores .....	27
2.7.1 Vias de absorção .....	27
2.7.2 Superóxido Dismutase (SOD).....	28
2.7.3 Glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST).....	28
2.8 Acetilcolinesterase (AChE) .....	29
2.9 Formulação microencapsulada do extrato etanólico de <i>Annona muricata</i> L. no controle de pragas .....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Local da pesquisa .....	33
3.2 Obtenção das sementes de <i>Annona muricata</i> L. ....	33
3.3 Preparo do extrato das sementes de <i>Annona muricata</i> L. ....	33
3.4 Preparo da formulação microencapsulada de <i>Annona muricata</i> L. ....	34
3.5 Criação de Tilápia, <i>Oreochromis niloticus</i> Linnaeus, 1758 .....	34
3.6 Ecotoxicidade do extrato etanólico microencapsulado de <i>Annona muricata</i> , em peixes ..	35

3.7 Preparo do homogenato.....	37
3.8 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes .....	38
3.9 Atividade Acetilcolinesterase .....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Concentração letal (CL <sub>50</sub> ).....	41
4.2 Enzimas antioxidantes (SOD e GST).....	45
4.2.1 Análise SOD .....	45
4.2.2 Análise GST.....	46
4.3 Inibição da Acetilcolinesterase (AChE).....	47
5 CONCLUSÕES .....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

## 1 INTRODUÇÃO

A toxicologia em organismos não alvo, é uma abordagem vital para a proteção da saúde dos ecossistemas e, por extensão, da saúde humana. Ela busca evitar e mitigar os efeitos ecotoxicológicos, ou seja, prejudiciais de substâncias químicas no ambiente, garantindo um equilíbrio sustentável entre as atividades humanas e a biodiversidade. Diante disso, o uso de inseticidas botânicos se tornou mais frequente, sobretudo às formulações microencapsuladas (GOLOMBIESKI et al., 2020).

A ecotoxicologia de formulações microencapsuladas, refere-se ao estudo dos potenciais efeitos dessas formulações no meio ambiente e nos organismos vivos que nele habitam. As formulações microencapsuladas são compostas por partículas sólidas ou líquidas que são revestidas por uma camada de polímeros solúveis, formando microcápsulas. Essas cápsulas podem conter substâncias químicas ativas, como inseticidas, herbicidas, fungicidas ou outros produtos químicos destinados a fins agrícolas, industriais ou farmacêuticos (MATIAS, 1996; CONNELL, 2022).

Quando essas formulações são liberadas no ambiente, seja através da aplicação direta, ou por meio de processos de liberação controlada, é importante avaliar seus possíveis efeitos na vida selvagem, nos organismos aquáticos, nas plantas e no ecossistema como um todo. Isso envolve estudar a toxicidade aguda e crônica dessas formulações, bem como sua capacidade de bioacumulação e persistência ambiental (RODRIGUES, 2007; BERNARDI et al., 2008). Atualmente, não existem estudos que abordem de forma abrangente os efeitos tóxicos desses inseticidas botânicos no ecossistema.

Os estudos ecotoxicológicos podem examinar os efeitos das formulações microencapsuladas em diferentes níveis de organização biológica, desde o molecular até o ecossistêmico. Eles podem incluir testes de toxicidade em organismos aquáticos, como peixes, crustáceos e algas, bem como em organismos terrestres, como insetos e aves. Além disso, a ecotoxicologia também investiga os efeitos dessas formulações nos processos ecológicos, como a decomposição de resíduos, a estrutura da comunidade e a função dos ecossistemas (BELARMINO et al., 2022).

Esses estudos são importantes para determinar a segurança ambiental dessas formulações e ajudar a estabelecer regulamentações e diretrizes adequadas para seu uso. Os resultados desses estudos podem ser utilizados para tomar decisões sobre a aplicação e o manejo

dessas formulações, a fim de minimizar os impactos negativos no meio ambiente e na saúde humana (MAGALHÃES et al., 2008).

Várias espécies da família Annonaceae, têm sido estudadas por suas propriedades bioativas e seu potencial como inseticidas e acaricidas naturais (MACIEL et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; LIMA et al., 2014; MICHELETTI et al., 2017; SANTOS et al., 2018; TRINDADE et al., 2018; PAZ et al., 2018), na obtenção de metabólitos secundários como os alcaloides e as acetogeninas (CORTES, et al., 2014).

No entanto, é importante destacar o crescimento e a potencialidade dos inseticidas vegetais nos últimos anos, devido à crescente preocupação com a sustentabilidade e o impacto ambiental negativo associado ao uso de produtos químicos sintéticos, por serem uma alternativa mais segura e ecologicamente correta, mas também podem oferecer algum risco toxicológico, tanto para o meio ambiente, quanto para saúde humana (FRIEDRICH et al., 2022). Dessa forma, torna-se imprescindível desenvolver e investigar a toxicologia também para produtos de origem vegetal, objetivando avaliar os efeitos no ambiente e organismos não alvos.

Gomes et al. (2016), Silva (2018) e Maciel et al. (2019) constataram em seus estudos a eficiência inseticida da família Annonaceae. A partir disso, eles desenvolveram as formulações microencapsuladas do extrato das sementes de graviola, *Annona muricata* L. e de pinha, *Annona squamosa* L. que apresentaram ótimos resultados no controle da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) e do ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), respectivamente. Essa formulação foi promissora e o produto gerou uma patente que foi concedida em 18 de julho de 2023, sob número de depósito BR102018008313-9.

Diante da importância da família Annonaceae e da formulação microencapsulada de anonáceas, do seu potencial como acaricida e inseticida, para um futuro produto comercial, foram realizados estudos com organismos não alvo: com o extrato etanólico de graviola com os predadores *Eriopsis connexa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Coccinellidae) (SANTOS et al., 2018) e *Cryptoalemus montrier* Mulsant, 1853 (Coleoptera: Coccinellidae) (MORAIS, 2020); e com a formulação microencapsulada do extrato de graviola para as abelhas, *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae) (FIGUEIROA, 2019), sendo de grande relevância, também ser avaliado a toxicidade para organismos aquáticos. Dessa forma, objetivou-se nesta pesquisa, avaliar possíveis efeitos tóxicos da formulação microencapsulada do extrato etanólico de *A. muricata* em alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

(Cichiformes: Cichilidae), a fim de obter a  $CL_{50}$  e parâmetros bioquímicos, com enzimas antioxidantes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Toxicologia

A toxicologia é o estudo dos efeitos adversos das substâncias químicas em organismos, geralmente com foco em seres humanos. Ela examina como diferentes doses de substâncias químicas morreram os organismos, considerando aspectos como toxicidade aguda (efeitos imediatos após uma exposição única) e toxicidade crônica (efeitos a longo prazo após exposição repetida ou contínua). A toxicologia também aborda questões de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de substâncias tóxicas no corpo humano, bem como avaliação de riscos e formulação de diretrizes de exposição segura (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2021).

A ecotoxicologia, por outro lado, rotineiramente confundida com a toxicologia, é uma ramificação da toxicologia que se concentra nos efeitos das substâncias químicas nos ecossistemas e nos organismos que neles habitam. Ela examina como poluentes e substâncias químicas podem afetar organismos aquáticos, terrestres e a interação entre eles. A ecotoxicologia considera não apenas os efeitos diretos nas espécies-alvo, mas também os efeitos secundários, como o impacto em predadores, presas e outros organismos interconectados. Além disso, a ecotoxicologia avalia como os poluentes podem afetar a qualidade da água, do solo e do ar em um nível mais amplo, influenciando a saúde dos ecossistemas e a biodiversidade (ZAGATTO, 2015).

Em resumo, enquanto a toxicologia se concentra nos efeitos das substâncias químicas em organismos individuais, especialmente seres humanos, a ecotoxicologia amplia esse estudo para considerar os efeitos em ecossistemas inteiros e nos organismos que os compõem. Ambos os campos são fundamentais para avaliar os riscos associados à exposição a substâncias químicas e para tomar decisões sobre a regulamentação, uso e manejo dessas substâncias.

A Toxicologia, é a ciência que estuda os contaminantes no ambiente natural e seus efeitos nos organismos, e qual a dose necessária para produzir a morte em 50% dos organismos afetados, denominada de concentração letal média (CONNELL, 2022). Esta ciência fornece ferramentas analíticas eficientes para biomonitoramento, contribuindo para a legislação brasileira, a qual carece de foco na ecotoxicidade dos lançamentos de poluentes.

Segundo a legislação para registros de produtos de origem biológica (LEGISLAÇÃO DE AGROTÓXICOS, 2020) existem três principais bioindicadores de ambientes aéreos, terrestres e aquáticos, sendo estes, abelhas, ratos e peixes, respectivamente, devido às suas

características ecológicas, sensibilidade a mudanças no ambiente e capacidade de refletir os impactos das atividades humanas nos ecossistemas.

As abelhas desempenham um papel crítico na polinização de plantas, confiantes para a biodiversidade e a produção de alimentos. Seu declínio pode indicar perturbações no ecossistema. Além disso, tornam-se ótimos biomonitores, pois são altamente sensíveis a agrotóxicos e outros produtos químicos agrícolas. Seu comportamento e saúde podem indicar a presença de contaminantes no ambiente (DA SILVA NETO et al., 2021).

Peixes são indicadores valiosos da saúde dos ecossistemas aquáticos, porque mudanças em suas populações, saúde e reprodução podem refletir mudanças climáticas, alterações climáticas e degradação dos habitats aquáticos. Uma característica importante para o estudo é que os peixes podem acumular poluentes da água e sedimentos em seus tecidos. Isso torna possível identificar a presença e níveis de contaminantes no ambiente aquático (RIBEIRO; AMÉRICO-PINHEIRO, 2018).

O uso de ratos em estudos toxicológicos, torna-se viável, pois têm uma ampla distribuição geográfica e são capazes de se adaptar a diferentes ambientes. Isso os torna úteis para monitorar a qualidade ambiental em várias regiões. Outro ponto é que, respondem a poluentes e substâncias químicas no ambiente, podendo mostrar efeitos adversos na saúde, como mudanças comportamentais, reprodutivas e de desenvolvimento (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

Ao usar esses organismos como biomonitores, os cientistas podem obter informações sobre as condições ambientais, identificar possíveis riscos para a saúde humana e avaliar os impactos das atividades humanas nos ecossistemas. No entanto, é importante levar em consideração as características específicas de cada espécie, os fatores que podem afetar suas respostas e interpretar os resultados de maneira adequada para tomar decisões controladas sobre a gestão ambiental e a saúde pública.

## **2.2 Efeito residual no ambiente**

A degradação de formulações vegetais pode ocorrer de várias maneiras, dependendo dos componentes apresentados no produto e das condições ambientais em que são expostas. Algumas das principais causas de degradação incluem a: Oxidação e a Hidrólise. Muitos ingredientes vegetais contêm compostos oxidáveis, como óleos vegetais e extratos naturais ricos em antioxidantes (COSTA et al., 2015). A exposição ao ar, calor, luz e umidade pode

levar à apresentação desses compostos, causando mudanças na cor, odor e textura, além de reduzir a eficácia dos ingredientes ativos.

O efeito residual no ambiente refere-se à persistência de produtos químicos ou compostos após sua aplicação ou uso, que podem permanecer no ambiente por um período significativo de tempo (RIBAS; MATSUMURA, 2009). Isso pode acontecer também, com formulações vegetais, que podem misturar substâncias químicas ou componentes que não se degradam rapidamente e são liberados no ambiente, mesmo após o uso ou aplicação. Algumas formulações vegetais podem conter ingredientes ativos que possuem efeito residual (ISMAIL et al., 2019), no qual, pode ser benéfico em alguns casos, pois ao controlar as pragas ou insetos, permite uma proteção prolongada contra os organismos-alvo, no entanto, também pode apresentar riscos para o meio ambiente e a saúde humana, especialmente se esses compostos forem persistentes e tóxicos.

Os efeitos residuais no ambiente podem variar dependendo da formulação vegetal específica e dos compostos envolvidos. Alguns possíveis efeitos negativos incluem o acúmulo em solos e água (NUDELMAN, 1975; PRISTA et al., 1990), afetando a qualidade do ecossistema e podendo contaminar corpos d'água e abastecimento de água potável.

Os efeitos residuais tóxicos também podem incluir, toxicidade para organismos não alvo, ou seja, estes produtos químicos tóxicos afetam não apenas as pragas ou organismos-alvo, mas também outros organismos que entram em contato com eles. Isso pode incluir animais, aves, peixes, insetos, polinizadores e microrganismos, causando danos à saúde, redução da biodiversidade e desequilíbrios ecológicos (LEÃO; VITALE, et al., 2021).

O uso de produtos com baixa toxicidade, alto efeito residual e elevada eficiência, vem sendo priorizado em estudos de controle (RESENDE; GAMA, 2006). Desta forma, o conhecimento da ação residual dos inseticidas vegetais é de extrema relevância para o controle de vetores, pois indica o intervalo mínimo necessário entre as aplicações para a manutenção do poder inseticida avaliando-se o tempo inicial e final de letalidade das substâncias (SANTOS et al., 2007; GUIRADO, 2009).

Porém, existem poucos estudos com inseticidas botânicos que abordem o período de atividade inseticida desses produtos, e o conhecimento da sua persistência no ambiente. Fiuza et al. (2015), foi um dos poucos autores encontrado com esta abordagem, e testou o Efeito do extrato etanólico bruto das frações da *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) Harley em brânquias de *O. niloticus*.

### 2.3 Protocolo e Legislação de testes toxicológicos em bioindicadores

Os ensaios biológicos exigidos para a avaliação toxicológica e ecotoxicológica estão dispostos na Legislação de Agrotóxicos (2020), mas serão requeridos caso a caso, a depender da origem e do modo de uso do produto. E para isso, exige algumas fases:

O objetivo é avaliar danos potenciais do agente a organismos indicadores que representam os principais grupos de organismos não-alvo. Na Fase I os organismos indicadores são submetidos a uma dose única máxima do produto, estabelecendo-se um sistema em que a chance de expressão dos efeitos indesejáveis é máxima. A ausência de danos aos organismos indicadores nesta fase implica um alto grau de confiança de que nenhum efeito adverso ocorrerá no uso real do agente de controle. Se efeitos adversos forem observados na Fase I, então, os testes da Fase II são realizados, em que a exposição potencial dos organismos não-alvo ao agente de controle é estimada (Tabela 1).

**Tabela 1:** Testes toxicológicos, de Fase I, em peixes exigidos pela legislação brasileira para novos princípios ativos de pesticidas ou bioinseticidas.

Parâmetros	EE	Produtos a ser (em) testados	Observações
Oral para aves	R	IA ou PT	Requerido quando a natureza do Inseticida botânico e suas toxinas indicarem contaminação para as aves
Inalatório para aves	CR	IA ou PT	
Mamíferos silvestres	CR	IA ou PT	
Peixes de água doce	R	IA ou PT	
Invertebrados de água doce	R	IA ou PT	
Animais de estuários e marinhos	CR	IA ou PT	Quando o uso for direto em estuário e ambientes marinhos, ou com expectativa de atingirtais ambiente em concentrações significativas (padrão de uso, mobilidade do agente).
Plantas não alvo	CR	IA ou PT	
Insetos não alvo	R	IA ou PT	
Abelhas - CL50 oral (24h)	R	IA ou PT	
Abelhas - CL50 contato	R	IA ou PT	
Mínhocas	CR	IA ou PT	
Legenda: EE= Especificação exigida; CR= Condicionalmente requerido; IA= Ingrediente ativo; PT= Produto técnico; = Produto formulado			

Fonte: Adaptada da Legislação de Agrotóxicos (2020).

Os testes de Fase II contemplam estudos de sobrevivência, persistência, multiplicação e dispersão do agente de controle, em diferentes ambientes. Se os testes da Fase II mostrarem que pode haver exposição dos organismos não-alvo ao agente de controle, então a Fase III torna-se necessária. Os testes da Fase III servem para determinar efeitos dose-resposta ou certos efeitos crônicos. Os testes da Fase IV avaliam qualquer problema específico não resolvido nas Fases anteriores, e são realizados sob condições ambientais simuladas ou reais de campo, elaboradas caso a caso (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2:** Tabela adaptada da Legislação de Agrotóxicos. Testes toxicológicos, de Fase II, em peixes exigidos pela legislação brasileira para novos princípios ativos de pesticidas ou bioinseticidas.

Testes	EE	Produtos a ser(em) testados	Observações
1. Comportamento no ambiente terrestre requerido quando efeitos patogênicos ou tóxicos forem observados	CR	IA ou PT	Requerido quando efeitos patogênicos ou tóxicos forem observados nos testes da Fase I com organismos terrestres. Requerido quando efeitos patogênicos ou tóxicos forem observados nos testes da Fase I com organismos aquáticos de água doce.
2. Comportamento em ambiente estuarino e marinho	CR	IA ou PT	Requerido quando o produto for para aplicação terrestre ou em água doce, e forem observados efeitos tóxicos ou patogênicos em qualquer dos estudos da Fase I com organismos de estuário e marinhos; ou quando o produto for recomendado para ambientes marinhos ou de estuários, ou forem observados efeitos tóxicos ou patogênicos em qualquer dos seguintes testes da Fase I: oral agudo em aves; inalação com aves;
Legenda: EE= especificação da exigência; R= requerido; CR= condicionalmente requeridos; IA= ingrediente ativo; PT= produto técnico.			

Fonte: Adaptada da Legislação de Agrotóxicos (2020).

**Tabela 3:** Tabela adaptada da Legislação de Agrotóxicos. Testes toxicológicos, de Fase III, em peixes exigidos pela legislação brasileira para novos princípios ativos de pesticidas ou bioinseticidas.

EE	Produtos a ser(em) testados	Observações
CR	IA ou PT	Requerido quando efeitos tóxicos sobre organismos não-alvo selvagens, terrestres ou aquáticos forem observados em um ou mais testes da Fase I e os resultados da Fase II indicarem exposição de tais organismos ao agente.
CR	IA ou PT	Requerido quando efeitos patogênicos forem observados em aves na Fase I; efeitos crônicos, carcinogênicos ou teratogênicos forem relatados em testes de avaliação (tóxico-patológico); testes de comportamento no ambiente da fase II indicarem que a exposição de animais terrestres ao agente de controle for provável.
CR	IA ou PT	Requerido quando o produto for indicado para uso em água ou quando houver possibilidade do mesmo ser transportado local de uso, e quando para a água a partir da patogenicidade ou infectividade for observada nos testes aquáticos da Fase I.
CR	IA ou PT	Se for determinado que o seu uso pode resultar em efeitos adversos (principalmente infectividade , patogenicidade ou viabilidade em água natural) a organismos não-alvo de coluna da água e de sedimentos, após análise das informações exigidas para os agentes e avaliação dos resultados das Fases I e Fase II sobre organismos não-alvo e comportamento ambiental.
CR	IA ou PT	Se o produto é transportado do local de aplicação pelo solo, ar, água ou por animais, e quando se observar patogenicidade alvo. O grau de plantas não movimentação será determinado pelos testes da Fase II.
Legenda:	EE= especificação exigida; CR= condicionalmente requerido; IA= ingrediente ativo; PT= produto técnico.	

Fonte: Adaptada da Legislação de Agrotóxicos (2020).

### 2.3.1 Legislação brasileira referente a ensaios ecotoxicológicos

A ecotoxicologia é uma área ainda pouco explorada no Brasil e, além disso, nossas leis ambientais com relação a análises ecotoxicológicas estão em estágio de construção. A Resolução CONAMA nº 357/2005, além de estabelecer e classificar os corpos de água e as diretrizes ambientais para o seu enquadramento, também regulamentam as condições e padrões de lançamento de efluentes, proibindo o lançamento em níveis negativos ou perigosos para os seres humanos e outras formas de vida, ou seja, os efluentes líquidos industriais e domésticos devem atender aos Padrões de Emissão, atendendo aos Padrões de Qualidade, em situações críticas de vazão.

Esta resolução limita uma série de potenciais contaminantes no ambiente e acrescenta, em seu artigo 7º, §4º, que “o mais possível confortável entre as substâncias e a presença de contaminantes não afetados, passíveis de causar danos aos seres vivos, necessário ser investigadas utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos”. Acrescenta ainda que no caso de lançamento de efluentes líquidos industriais provenientes de químicas, petroquímicas e siderúrgicas, poderão ser excluídos requisitos adicionais para cada caso específico, em termos de toxicidade crônica.

A resolução CONAMA 357/2005 é uma legislação federal e por isso permite a formulação de leis mais restritas, de acordo com a necessidade de cada estado brasileiro, deixando livre para cada estado estabelecer seus próprios limites de toxicidade. Por exemplo, em São Paulo, os parâmetros e limites a serem obedecidos, tanto para Padrão de Emissão (efluentes líquidos) como para Padrão de Qualidade (corpos receptores hídricos), constam no regulamento da Lei 997, de 31.05.76, do Estado de São Paulo, aprovado pelo Decreto 8.468, de 08.09.76. A Resolução SMA-3, de 22.02.2000, acrescenta a Lei n. 997/76, determinando que os efluentes lançados não devem causar ou potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com as normas que fixam a toxicidade permissível.

No estado do Rio de Janeiro, a Fundação Estadual de Engenharia e Meio Ambiente (FEEMA-RJ), através da norma técnica NT-213/1990, estabelece critérios e padrões para controle da toxicidade em efluentes líquidos industriais, utilizando testes de toxicidade com organismos aquáticos vivos, de modo a proteger os corpos d'água da ocorrência de toxicidade aguda ou crônica de acordo com a NT-202/1986 e DZ-209/1990, como parte integrante fazer sistema de Licenciamento de Atividades Poluidoras – SLAP.

O IAP-PR e a FATMA vêm estudando desde o ano de 1992 a implementação dos métodos de testes de toxicidade para avaliação ecotoxicológica de efluentes com objetivo de

elaborar uma proposta de lei, onde há limites de lançamento de toxicidade para efluentes industriais. Essa proposta de limites de toxicidade para efluentes industriais teve como base a análise dos dados obtidos pelos órgãos ambientais dos estados de Santa Catarina (FATMA) e do Paraná (IAP). A partir disso, foi criada a Portaria nº 017/02 – FATMA de 18.04.2002, que estabelece os limites máximos de toxicidade aguda para efluentes de diferentes origens. Esses limites são alcançados através do fator de toxicidade que representa o menor fator de diluição que causa até 10% de efeito nos organismos. Esta lei determina que as substâncias existentes no efluente não poderão causar ou possuir potencial causador de efeitos tóxicos capazes de provocar alterações no comportamento e fisiologia dos organismos aquáticos presentes no corpo receptor.

Para o Estado de Alagoas não foi encontrado nenhuma legislação específica para estudos ecotoxicológicos.

Muitos são os laboratórios de instituições oficiais que realizam testes de toxicidade, tornando esta ferramenta mais reconhecida, como um forte instrumento de avaliação de impacto ambiental. No Brasil, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), Companhia Estadual de Tecnologia Ambiental (CETESB-SP), Fundação de Meio Ambiente de Santa Catarina (FATMA-SC), Fundação Estadual de Engenharia e Meio Ambiente (FEEMA-RJ), Fundação Estadual de proteção ambiental (FEPAM-RS), Instituto ambiental do Paraná (IAP-PR) e a Companhia Pernambucana de Meio Ambiente (CPRH-PE), recomendam a utilização da análise de toxicidade através de testes com organismos-padronizados internacionalmente como um forte instrumento para avaliação do potencial de impacto das substâncias produtos químicos ou efluentes lançados no ambiente.

#### **2.4 A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos**

Os peixes formam um grupo de grande importância em estudos de avaliações de toxicidade ambiental, além de estarem presentes em diversos ambientes, apresentam ainda uma ampla distribuição geográfica participando de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, com isso, são considerados ótimos modelos biológicos de estudo, sendo usados inclusive como indicadores de qualidade ambiental (SOUZA et al., 2016).

A espécie tilápia do Nilo, *O. niloticus*, é originária da África, sendo encontrada em ambientes de água doce na África, Ásia, América do Sul e Central, portanto, está presente praticamente em todo o mundo devido ao seu cultivo na aquicultura (MARTINS, 2008;

RODRÍGUEZ-FUENTES; GOLD-BOUCHOT, 2004; SILVA, 2017). Além disso, apresenta diversas características desejáveis por ser um peixe de baixo nível trófico; onívoro; eficiente na ingestão de proteínas de origem animal e vegetal; resistente a doenças e disponível em praticamente em todas as regiões do país (BOSCOLO et al., 2001), tornando-o ótimo bioindicador aquático.

A tilápia do Nilo é frequentemente usada como um bioindicador em estudos ecotoxicológicos devido à sua ampla distribuição, disponibilidade e capacidade de sobreviver em uma variedade de condições ambientais. A resposta da tilápia a substâncias químicas e poluentes pode fornecer informações valiosas sobre a qualidade ambiental e a saúde do ecossistema (OLIVEIRA; VALDES, 2019)

Estudos ecotoxicológicos com tilápias podem envolver a exposição a diferentes concentrações de poluentes, como metais pesados, pesticidas, produtos químicos industriais e produtos farmacêuticos. A resposta do peixe a essas exposições pode ser avaliada por meio de parâmetros como taxa de sobrevivência, crescimento, reprodução, alterações comportamentais e biomarcadores moleculares (TAMANHO, 2022).

## **2.5 Agrotóxicos no meio ambiente**

Anualmente são usados no mundo aproximadamente 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos. O consumo anual de agrotóxicos no Brasil tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais (EMBRAPA, 2021).

O aumento considerável no volume de agrotóxicos aplicados tem trazido uma série de transtornos e modificações para o ambiente, tanto pela contaminação, quanto pela sua acumulação nos segmentos bióticos e abióticos do ecossistema. Um dos efeitos indesejáveis provocado pelos agrotóxicos é a contaminação de espécies não-alvo, ou seja, espécies que não interferem no processo de produção (BRUM, 2020).

Os recursos hídricos agem como integradores de todos os processos biogeoquímicos em qualquer região, assim, superficiais ou subterrâneos, são os principais destinos de agrotóxicos, principalmente quando aplicados na agricultura (BALSAN et al., 2019).

A preocupação com a contaminação de recursos hídricos com agrotóxicos aumentou a partir do ano de 1979, quando os primeiros traços de contaminação foram detectados nos EUA. Ribeiro, Lourencetti, Pereira e Marchi, (2007) relataram que, mesmo em concentrações baixas, são encontrados resíduos de agrotóxicos em amostras de água subterrânea em países como Grã-

Bretanha, Alemanha, Estados Unidos, Grécia, Bulgária, Espanha, Portugal e Brasil. De maneira, geral a contaminação dos ambientes aquáticos no Brasil por resíduos de agrotóxicos pode ser considerada como moderada, salvo exceções em áreas altamente poluídas e é comparativamente menor que a presente nos países do hemisfério norte (DA SILVA; BEHREND, 2022).

No solo, a preocupação com a contaminação é referente à interferência desses princípios ativos em processos biológicos responsáveis pela oferta de nutrientes. São consideráveis as alterações sofridas na degradação da matéria orgânica, através da inativação e morte de microrganismos e invertebrados que se desenvolvem no solo. A ciclagem de nutrientes pode ser afetada quando, por exemplo, o princípio ativo persistente no solo interfere no desenvolvimento de bactérias fixadoras de nitrogênio, responsáveis pela disponibilização desse mineral às plantas (OLIVEIRA; AZEVEDO; CAVALCANTI, 2021). A respiração do solo é um parâmetro utilizado para se observar a atividade geral dos microrganismos e pode ser utilizada como ferramenta para verificar a os efeitos dos agrotóxicos sobre diferentes populações de microrganismos (DE CASTRO et al., 2019).

Já existem programas visando à redução no número de aplicações e no desperdício do produto aplicado. Além disso, a fiscalização de todo o ciclo de vida destes produtos, o incentivo à produção mais limpa, como a produção orgânica, o manejo integrado e a utilização de agentes de controle biológico para a redução de danos no campo. Estas medidas aliadas à promoção da educação ambiental, irão contribuir na diminuição do uso dos agrotóxicos.

## **2.6 Biomarcadores**

### **2.6.1 Vias de absorção**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2000), os biomarcadores compreendem toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade de exposição e o risco à saúde. Estes consistem em uma variedade de respostas biológicas relacionadas à exposição a contaminantes e poluentes que podem incluir uma resposta molecular, celular, fisiológico ou comportamental (MONTSERRAT et al., 2003).

A concentração ou atividade de uma enzima é um dos parâmetros de maior importância nos processos de degradação enzimática de polímeros. Entre os biomarcadores mais empregados incluem a inibição da acetilcolinesterase (AChE) e parâmetros relacionados ao

estresse oxidativo que envolvem a quantificação das enzimas antioxidantes no organismo dos peixes, denominadas de: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona S-transferase (GST), enquanto que a glutaciona reduzida (GSH) é considerada como o principal antioxidante não enzimático (FARREL et al., 2011).

### 2.6.2 Superóxido Dismutase (SOD)

Superóxido dismutases (SODs) são metaloenzimas ubíquas que constituem uma das primeiras linhas de defesa contra espécies reativas de oxigênio. (NARAYANI; YASHODHARA, 2018). Variações comuns no seu contexto ou ambientes adversos, como a ausência prolongada de luz e oxigênio, podem acelerar significativamente a degradação de produtos. Isso ocorre devido a mudanças degenerativas, como a desestabilização das atividades enzimáticas e a desintegração das membranas celulares. Esses efeitos adversos são predominantemente impulsionados pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), que resultam na peroxidação dos lipídios (SILVA et al., 2019).

A SOD tem como função biológica catalisar a dismutação do principal formador de EROs, o radical superóxido  $O_2^-$ , formado nas mitocôndrias, convertendo em  $H_2O_2$  que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas. McCord e Fridovich (1969) descreve a SOD como a enzima mais abundante nas células aeróbicas, sendo de grande importância na defesa do organismo contra EROs. Em geral, existem três tipos principais de SOD, a CuZnSOD presente no citoplasma, a MnSOD, localizada nas mitocôndrias e a EcSOD no líquido extracelular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; FEITEIRO et al., 2020).

### 2.6.3 Glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona S-transferase (GST)

Ainda no sistema enzimático, a enzima glutaciona peroxidase (GSH-Px), a princípio, foi descoberta em mamíferos. Halliwell e Gutteridge (1989) descreveram dois tipos de GPx, sendo uma delas selênio dependente. Esta glutaciona atua no citosol e na matriz mitocondrial, tendo a função de catalisar a redução de  $H_2O_2$  e peróxidos de orgânicos. (OLIVEIRA E SCHOFFEN, 2010). A GPx tem alta atividade no fígado, moderada atividade no coração, pulmão e cérebro, e baixa atividade nos músculos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Os efeitos do selênio na GPx no sistema antioxidante em peixes têm sido demonstrados no *Piaractus mesopotamicus* (BILLER-TAKAHASHI et al., 2015), *Ictalurus punctatus* (GATLIN E WILSON, 1984), *Rachycentron canadum* (LIU et al., 2010), *Clarias gariepinus* (TAWWAB et al., 2007). A GPx,

juntamente com a CAT e a SOD, são as principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

A GST, ou glutathione S-transferase, é uma enzima presente em muitos organismos, incluindo seres humanos, animais, plantas e microrganismos. Sua função principal está associada à proteção celular contra os efeitos negativos de compostos químicos reativos e poluentes. A atividade da GST está envolvida na conjugação dessas substâncias químicas com emissão de glutathione, um tripeptídeo antioxidante presente nas células. A GST é parte fundamental do sistema de defesa antioxidante das células. Ela ajuda a neutralizar os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), que são produtos naturais do metabolismo celular e podem causar danos às estruturas celulares, incluindo o DNA (LIMA; MACEDO, 2021).

## **2.7 Acetilcolinesterase (AChE)**

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas. Nestas sinapses a ACh atua transmitindo a mensagem de um neurônio a outro. As sinapses colinérgicas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), sendo importante para a manutenção de inúmeras funções fisiológicas humanas (WESTFALL, 2006) e a AChE é frequentemente utilizada como um biomarcador em estudos ecotoxicológicos em peixes. Certas substâncias, como pesticidas organofosforados e carbamatos, inibem a AChE, levando à fuga de acetilcolina nas sinapses e causando paralisia e, potencialmente, a morte do peixe (AMÉRICO-PINHEIRO; MERCADO, 2021).

A atividade da AChE pode ser utilizada como um indicador da saúde dos peixes e da qualidade da água. Se a atividade da AChE estiver alterada, isso pode indicar contaminação da água por substâncias tóxicas ou poluentes. Mudanças na atividade da AChE podem ocorrer em resposta ao estresse ambiental, como variações de temperatura, influenciadas e outros fatores, podendo servir como um sinal de que o ambiente está afetando a saúde dos peixes (FERRI et al., 2020).

## 2.8 Formulação microencapsulada do extrato etanólico de *Annona muricata* L. no controle de pragas

Dentre as diversas variedades de plantas com grande potencial econômico, a família Annonaceae, que possui cerca 130 gêneros e 2300 espécies (MISHRA et al., 2013), destaca-se, pelo alto valor comercial na forma de fruta in natura e processada (DE FREITAS, 2013), importância na medicina popular e como agente farmacológico (MENEZES et al., 2014), como também, apresenta um grande potencial bioativo, com resultados promissores na área de inseticidas (CELESTINO et al., 2016) e acaricidas (MACIEL et al., 2014), por apresentar grupos fitoquímicos bioativos específicos, como as acetogeninas. Essas são caracterizadas por um anel  $\gamma$ -lactona, por suas cadeias carbonila, acetila e hidroxila (LIAW et al., 2005; CARBALLO, 2012), e serem exclusivas nas espécies do gênero *Annona* (CORTES et al., 2014).

Os estudos sobre a fitoquímica e atividade biológica de espécies dessa família, estão sendo intensificados (COUVREUR et al., 2019), diante da importância que as mesmas apresentam como grande potencial para o desenvolvimento de produtos com ação inseticida (ISMAN; SEFRIN, 2014) e como antioxidante na área de câncer (RODUAN et al., 2017).

A graviola, *Annona muricata* L., é uma fruta tropical importante, de grande destaque nos mercados frutícolas da América do Sul, América Central e Caribe. A Venezuela, maior produtor desta fruta na América do Sul, possui hoje uma área plantada com gravioleiras superior a mil hectares. Embora no Brasil a gravioleira venha sendo citada pela literatura desde o início do século, sua importância comercial em termos de mercado interno e de exportação ainda é muito pequena, o interesse em explorar essa fruta é uma tendência recente (PINTO; DA SILVA, 1995).

Os estudos com espécies de anonáceas, com ação inseticida e acaricida, já vem sendo estudada há muitos anos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de entomologia: controle alternativo de pragas (LECAP), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), mostrando resultados promissores com a graviola, *Annona muricata* L. (TRINDADE et al., 2011; RODRIGUES et al., 2014; LIMA et al., 2014; MACIEL et al., 2015; GOMES et al., 2016; SANTOS et al., 2016; MACIEL et al., 2017; MICHELETTI et al., 2017; SANTOS et al., 2018; TRINDADE et al., 2018; PAZ et al., 2018; MORAIS et al., 2023); pinha, *Annona squamosa* L. (MACIEL et al., 2020; ZARATE, 2018; LEITE, 2018; MACIEL et al., 2019); e também com *Annona mucosa* (Jacq.) Baill (LEITE, 2018).

O estudo é considerado promissor, pois na indústria alimentícia utiliza-se apenas a polpa e ocorre o descarte das sementes de graviola. Diante disso, a semente de *A. muricata* se torna uma matéria prima de fácil acesso, grande quantidade e sem custo de aquisição. Uma vez comprovada sua eficiência no controle de pragas, surge uma alternativa adequado ao controle de *P. xylostella* e à preservação do meio ambiente.

Os inseticidas botânicos apresentam uma alta suscetibilidade a fatores ambientais, e a busca por técnicas que protejam esses princípios ativos vem sendo proposta (DE MELO et al., 2021).

Produtos naturais têm mostrado valor na proteção de plantas, seja como inseticida, seja como base estrutural para a síntese de novas moléculas inseticidas (DE OLIVEIRA, 2021). Os inseticidas botânicos desempenham um importante papel nos programas de manejo integrado de pragas (MIP), porque possuem atividade residual curta, permitindo que os trabalhadores agrícolas reentrem rapidamente nos campos tratados, pois apresentam baixa toxicidade humana e ambiental e efeitos não direcionados mínimos (CHANDLER et al., 2008; SPORLEDER; LACEY, 2013).

Contudo, os agroquímicos são frequentemente mais baratos (BALE et al., 2008; THAKORE, 2006), mais fáceis de aplicar (PREININGER et al., 2018), armazenados por mais tempo (DUNHAM, 2015), com ação mais rápida (PREININGER et al., 2018) e geralmente considerados mais eficazes, quando comparados com os bioinseticidas (ARTHURS; DARA, 2019). Dessa forma, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novas formulações e tecnologias de aplicação de bioinseticidas, com o intuito de contornar problemas, diminuir os custos de produção desses produtos e torná-los mais competitivos no mercado.

Dessa forma, devido a crescente demanda global por alimentos e a urgência em desenvolver estratégias sustentáveis para o controle de pragas, uma das soluções alternativas é o uso de bioinseticidas microencapsulados (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2014).

A microencapsulação é uma técnica conhecida há muitas décadas, no entanto vem ganhando espaço em aplicações nas mais diversas áreas, tais como farmacêutica, alimentícia e cosmética. Seu conceito tem como base a idealização do modelo celular, no qual o núcleo é envolvido por uma membrana semipermeável que o protege do meio externo e, ao mesmo tempo, controla a entrada e saída de substâncias na célula (RÉ, 2006; SUAVE et al., 2006). Assim, a microencapsulação compreende um processo em que ocorre a incorporação de substâncias de interesse (núcleo ou material ativo) em um sistema de revestimento (material de parede, carreador ou agente encapsulante), obtendo-se microcápsulas com um diâmetro que

varia entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$  (MADENE et al., 2006; TIWARI, et al., 2010). As substâncias a serem encapsuladas, podem apresentar-se no estado líquido ou sólido, podendo também ser um gás (TRINDADE et al., 2008).

Para a realização deste processo, diferentes agentes encapsulantes têm sido utilizados, sozinhos ou em conjunto, para microencapsular, tais como: goma arábica goma gelana, quitosana, maltodextrina, amido, derivados do leite como proteínas (caseínas e proteínas do soro), leite em pó desnatado e soro de leite, prebióticos (inulina, oligofrutose, povidone), entre outros alginato (KIM et al., 2008; GBASSI et al., 2009).

Essa técnica apresenta-se eficiente para conservação, durabilidade de prateleira e proteção a fatores ambientais (DE MELO et al., 2021).

Os microencapsulados podem ser produzidos a partir de materiais biodegradáveis e liberar lentamente as moléculas funcionais que eles contêm, o que reduz as aplicações frequentes. Além disso, são em tamanhos pequenos com grande capacidade de carga e área de superfície, e maior estabilidade e solubilidade quando comparados com seus equivalentes volumosos (ALARCÓN-ALARCÓN et al., 2018; ANNUNZIATA et al., 2020; ZAITOON et al., 2021).

Devido ao interesse da indústria de alimentos na microencapsulação de ativos, alguns protocolos de microencapsulação foram desenvolvidos, estes são divididos em três categorias que incluem processo físico, químico e mecânico (LENGYEL et al., 2019). A escolha de um material de parede apropriado para o processo de microencapsulação por *spray dryer*, método de secagem amplamente utilizado para encapsular substâncias líquidas em partículas secas. Esse processo é aplicado em diversas indústrias, como alimentícia, farmacêutica e de produtos químicos, para proteger ingredientes sensíveis, melhorar a solubilidade, prolongar a vida útil e controlar a liberação de substâncias ativas. Este processo depende do uso final do produto e tem um efeito essencial na obtenção de pós microencapsulados estáveis (DE OLIVEIRA; MAIA, 2023).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local da pesquisa

O estudo foi conduzido no Laboratório de Entomologia: controle alternativo de pragas (LECAP) e no Laboratório de Aquicultura (LAQUA), localizados no *Campus* de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA-UFAL), Rio Largo, Alagoas. O desenvolvimento da pesquisa também contou com a colaboração do Laboratório de Tecnologia de Controle de Medicamentos (LABTCOM), e do Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LMAA) da Universidade Federal de Alagoas (Ac. Simões), Maceió, Alagoas.

#### 3.2 Obtenção das sementes de *Annona muricata* L.

As sementes de graviola foram obtidas no município de Anadia – AL, em fábrica de processamento de frutas Multifrutas (Razão social: AGRICOM\_Agro Indústria e Comércio Anadiense LTDA) para confecção de polpa de frutas. Antes da extração, as sementes passaram por um processo de limpeza através da imersão em água contendo 10% de hipoclorito de sódio, para em seguida, serem submetidas à secagem em estufa a 50°C por um período de 7 dias.

As sementes passaram por uma segunda secagem, desta vez foram acondicionadas em sacos de papel Kraft e secas em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 60°C por 72 horas. Após a secagem as sementes foram passadas em moinho tipo Wiley e o pó obtido foi acondicionado em recipiente hermeticamente fechado até o preparo do extrato.

#### 3.3 Preparo do extrato das sementes de *Annona muricata* L.

Os extratos brutos foram preparados no LECAP, cujo pó das sementes, inicialmente, foi submetido à extração a frio com etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), sob temperatura ambiente (25 - 27°C), em percolador de aço inoxidável por um período de 48 horas, passando por três lavagens seguidas para a extração total. Após a filtração, o solvente foi removido por destilação sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 50°C. Ao fim deste processo, o extrato etanólico descansou em recipientes de vidro, por 48 horas, devidamente etiquetados e pesados, aberto na parte superior para a evaporação máxima de solvente restante e envolto por papel alumínio, para que não houvesse contaminação e não fosse afetado pela luz solar. Finalmente, foi acondicionado em recipiente hermeticamente fechado e armazenado em freezer.

### 3.4 Preparo da formulação microencapsulada de *Annona muricata* L.

A formulação microencapsulada do extrato etanólico da semente de *A. muricata* foi preparada no Laboratório de Tecnologia de Controle de Medicamentos (LABTCOM), da ENSEFAR/UFAL. E o volume utilizado nas formulações foi obtido por meio do cálculo percentual, tendo como base o conteúdo de matéria seca do extrato.

As microcápsulas foram obtidas por secagem utilizando o aparelho modelo BUCHI Mini *Spray Dryer* B-290, a uma temperatura de entrada de 180°C, rotação 33 e velocidade de alimentação 5. A partir de 15 mL de extrato orgânico, foram acrescentados 50 mL de álcool etílico P.A e 50 mL de água milli-q, misturado e depois acrescentado a mistura goma arábica a 20%, amido a 15%, maltodextrina a 40% e aerosil a 10% calculado a partir do peso de sólido contido em 1 mL do extrato. O peso de sólido no extrato foi realizado colocando 1 mL do extrato em estufa em Forno Mufla, a 550 ° C (SILVA, 2018).

### 3.5 Criação de Tilápia, *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758

Os exemplares de Tilápia do Nilo, *O. niloticus*, foram coletados em tanque da Estação de Piscicultura do *Campus* de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas – CECA/UFAL (Figura 1A), em fase de alevinos com 30 dias de vida (Figura 1B).

Após a coleta (Figura 1C), os exemplares foram aclimatados por um período de 10 dias, mantidos e monitorados em um tanque circular pré-moldado de lona de PVC (Figura 1D), com capacidade de 2,4 m<sup>3</sup>, em sistema de recirculação com aerador de 1 Hp, constando de filtros de cartucho com 20 micras, filtro biológico contendo ostras, *bioballs*, porcelana, telas de pvc e bactérias colocadas de forma exógena e filtro *Jebo*, sendo alimentados com ração comercial extrusada (3 mm), com frequência alimentar de 3 vezes ao dia, contendo: 45% (mínimo) de proteína bruta, de acordo com especificação do fabricante (Figura 1E).

Durante esse período, os parâmetros de qualidade de água (oxigênio dissolvido, temperatura e pH) foram monitorados por sonda multiparamétrica (HANNA Instruments, modelo 9828, Woonsocket, USA). As variáveis como pH, temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (mg/L) foram medidos e registrados a cada 24 horas (ABNT, 1993). O projeto foi realizado de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.

**Figura 1:** Processo de criação: (A) açude disponível para a piscicultura do CECA; (B) captura dos alevinos de tilápia; (C) transporte ao laboratório; (D) aclimação e (E) engorda dos animais até o peso ideal para os testes.



Fonte: Autor, 2023.

### 3.6 Ecotoxicidade do extrato etanólico microencapsulado de *Annona muricata*, em peixes

Após o período de aclimação, os animais foram submetidos aos ensaios de toxicidade, de dois experimentos independentes, sendo um de toxicidade aguda e outro de crônica.

As concentrações testadas da formulação microencapsulada do extrato etanólico sobre os peixes, foram baseadas no estudo realizado por Figueiroa (2021), que testou a toxicidade desse extrato na praga chave da família de plantas Brassicaceae, a espécie *Plutella xylostela* L. (Lepidoptera: Plutellidae), e nas abelhas, *A. mellifera*, correspondendo a 0,125; 0,250; 0,500; 1,00 e 2,00 g/L.

O pó de cada concentração foi solubilizado na água do próprio aquário, fazendo uma correlação da concentração com o volume de água. Além dos tratamentos com a formulação, realizado também um teste com a formulação contendo apenas os polímeros, ou seja, sem a presença do extrato de *A. muricata*, para comprovar de que a ação biológica pudesse estar relacionada aos componentes da formulação, e mais a testemunha, que foi apenas o aquário com água.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism (versão 10.0, Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA), cujos dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e estatisticamente avaliados pela análise de variância unidirecional (ANOVA). As diferenças entre médias dos grupos foram comparadas pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em  $P \leq 0,05$ . A análise de correlação de Pearson foi utilizada para examinar possíveis associações entre a enzima superóxido dismutase e a formulação microencapsulada. Foi adotado como critério de avaliação da mortalidade a falta de movimentos e nenhuma reação a estímulos táteis.

#### 3.6.1 Toxicidade Aguda e Determinação da CL<sub>50</sub>

Antes da implementação do teste de toxicidade aguda (24h), a alimentação dos animais foi suspensa por 24h antes do adicionamento dos tratamentos na água seguindo as normas da associação brasileira de normas técnicas-ABNT 2016 para trabalhos de pesquisas de toxicidade que utilizam peixes como organismos teste.

Foram utilizados alevinos de tilápia medindo entre 1,5 e 3 cm, com aproximadamente 30 dias de idade, como organismos teste. Foram utilizados 18 tanques retangulares com capacidade de 10 L, cada tanque recebeu cinco indivíduos, totalizando 90 indivíduos, sendo um em cada cinco tanques não recebeu nenhum tipo de tratamento.

Os pós das diferentes concentrações foram diluídos na água através da mistura da solução com a água do aquário, em cinco concentrações (0,125; 0,250; 0,500; 1,0; 2,0), mais os tratamentos com os agentes encapsulantes e a testemunha. E com base na mortalidade diária, foi calculada a CL<sub>50</sub>, utilizando a análise de Probit, pelo programa estatístico SAS.

Para determinar o Percentual de mortalidade, CL<sub>50</sub>, em *O. niloticus* utilizou-se a fórmula:

$$\% m = \frac{n_M}{n_T} \times 100$$

Onde: %m = percentual de mortalidade;  $n_M$  = número de organismos mortos e  $n_T$  = número total de organismos.

### 3.6.2 Toxicidade Crônica

Posteriormente, foi realizado o segundo ensaio com iguais concentrações, contendo três repetições por concentração, que avaliou a toxicidade crônica, utilizando cinco animais em cada aquário, totalizando 90 animais, utilizando a CL<sub>50</sub> estabelecida através do primeiro teste. No segundo ensaio, também foi utilizado seis tratamentos com base no valor da CL<sub>50</sub> já determinada através do primeiro ensaio de toxicidade aguda.

A análise da mortalidade dos peixes foi durante um período de 96 horas com quantificação de mortalidade a cada 24 horas.

Como parâmetro sobre os níveis de toxicidade do extrato sobre os peixes utilizou-se o cálculo da concentração estimada (CAE) sustentado no trabalho descrito por Manrique et. al (2013). O cálculo ocorre sobre a razão entre 100% da dose do produto sobre o volume total do tanque. A classificação dos riscos foi baseada nos índices da Proposed (1996), seguindo os conceitos básicos da estatística para todas as análises foi adotado o nível de significância (P) de

5%. A alimentação dos animais continuou suspensa por 24h antes do adicionamento dos tratamentos na água seguindo as normas da associação brasileira de normas técnicas-ABNT para trabalhos de pesquisas de toxicidade que utilizam peixes como organismos teste.

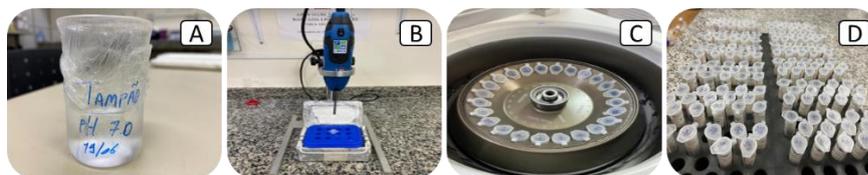
Os parâmetros de qualidade da água como pH, temperatura e níveis de oxigênio foram verificados diariamente em todos os aquários, através da utilização de termômetros e medidores digitais. A finalidade dos testes foi determinar a concentração de uma substância teste (produtos químicos ou efluentes) que produz efeitos deletérios em um grupo de organismos teste sob condições controladas (RODRIGUES, 2007; BERNARDI et al., 2008). Os efeitos observados vão desde a letalidade até qualquer outra manifestação do organismo que a anteceda. E para o teste ser aceitável, a sobrevivência no controle deve ser de 90%, no mínimo (JARDIM, 2004; MASSARO, 2006; RODRIGUES, 2007; BERNARDI et al., 2008).

Após constatar mortalidade, os peixes eram imediatamente coletados dos tanques tratados e as amostras de músculo, fígado, brânquias e cérebro foram retiradas com auxílio de material cirúrgico. Peixes que resistiram ao fim do experimento foram sacrificados por resfriamento ou secção medular, e também coletados os tecidos. As amostras dos filés foram embaladas em papel alumínio e congeladas à -20 °C por três meses.

### 3.7 Preparo do homogenato

Os tecidos dos peixes, fígado e brânquias, foram homogeneizados (Figura 2B) em tampão fosfato de potássio (pH 7.4) 0.2 M (Figura 2A) e a suspensão centrifugada (12000 rpm por 10 minutos à 4°C) (Figura 2C). O sobrenadante resultante foi utilizado para as análises da atividade das enzimas superóxido sismutase (SOD), glutatona S-transferase (GST) (Figura 2D). As análises foram feitas em espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu) ou leitor de microplacas (Multiskan GO User Manual, Thermo Scientific, Ratastie 2 e Finlândia) (Figura 3).

**Figura 2:** Elaboração do homogenato: (A) preparo do tampão fosfato 7,0; (B) trituração de amostras com homogeneizador elétrico; (C) separação das fases por centrifugação e (D) coleta do sobrenadante.



Fonte: Autor, 2023.

### 3.8 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

Para realizar o ensaio de atividade enzimática, foram utilizadas placas de 96 poços (placa de Elisa) Figura 3A), a uma densidade de  $2 \times 10^4$  /poço que foram tratadas com diferentes concentrações dos materiais teste em duplicata e triplicata (Figura 3B). A atividade da SOD foi quantificada usando um leitor de microplacas por meio do programa SoftMax, com uma duração de 60 segundos por placa. As placas de ELISA foram preparadas com uma mistura de reagentes e amostra (fígado ou brânquias), seguindo as etapas a seguir:

Primeiramente, um mapa foi organizado para a placa. Dois poços foram alocados para o controle em branco, contendo 45  $\mu\text{L}$  de tampão em cada um, e dois poços para o controle padrão, com 30  $\mu\text{L}$  de tampão em cada um. Posteriormente, os demais poços da placa foram preenchidos com 30  $\mu\text{L}$  de amostras, 100  $\mu\text{L}$  de tampão em todos os poços, 6  $\mu\text{L}$  de MTT e 15  $\mu\text{L}$  de pirogalol em todos os poços, exceto no controle em branco.

Após a adição desses reagentes, a placa foi incubada em uma estufa a  $40^\circ\text{C}$  por 5 minutos. Após esse período, todos os poços da placa, incluindo os de controle em branco e padrão, receberam 150  $\mu\text{L}$  de DMSO para interromper a reação. Finalmente, as placas foram verificadas à leitura por um leitor de microplacas a um comprimento de onda de 580 nm (Figura 3C).

A atividade das GSTs foi avaliada mediante a adição dos reagentes em um volume total de 1 mL. A solução consistiu em 970  $\mu\text{L}$  de iniciador tampão fosfato Pi 0,1M (pH 7,0), seguida pela adição de 10  $\mu\text{L}$  de amostra do homogenato (fígado ou brânquias)(Figura 4A). Posteriormente, 10  $\mu\text{L}$  de dinitrobenzeno (CDNB 0,1M) e 10  $\mu\text{L}$  de GSH 100 mM foram incorporados, totalizando o volume final.

A cubeta contendo essa mistura reacional (Figura 4B) foi então inserida no espectrofotômetro ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ), em que as leituras foram realizadas. A reação foi iniciada no momento da leitura, e durante um período de 1 minuto e 30 segundos, leituras espectrofotométricas foram registradas em duplicata a cada intervalo de 30 segundos (Figura 4C).

**Figura 3:** Mensuração da SOD: (A) placa de Elisa; (B) aplicação de amostras de brânquias e fígado e reagentes com multicanal e (C) leitura realizada em leitor de microplacas ( $\lambda= 580$  nm).



Fonte: Autor, 2023.

**Figura 4:** Mensuração da GST: (A) sobrenadantes de tecidos de brânquias e fígado; (B) cubeta utilizada na leitura de espectrofotometria e (C) leitura realizada em uma corrida de 1min e 30s em espectrofotômetro ( $\lambda= 340$  nm).



Fonte: Autor, 2023.

### 3.9 Atividade Acetilcolinesterase

O encéfalo de *O. niloticus*, foi mensurado pelo método de Ellman (1951), baseado na taxa de hidrólise da acetiltiocolina (ACh) pela AChE dando origem à tiocolina, que reage com o ânion carboxilato do ácido 5,5'- ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), formando o 2-nitrobenzoato 5-mercaptotiocolina e um ânion de coloração amarela, o 5-tio-2- nitrobenzoato, que é quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 412 nm por 5 minutos e registrado leituras a cada 1 minuto (Figura 5A, 5B e 5C).

Diferente das demais reações, os homogenatos para a análise de Acetil foram preparados utilizando um tampão fosfato com pH 7,4. Após a adição deste piloto aos tecidos do encéfalo, os mesmos foram homogeneizados por 30 segundos cada amostra com o auxílio de um agitador elétrico. A solução resultante passou por um processo de centrifugação de 20 minutos a 10.000 rcf e 4°C. Ao final deste procedimento, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado para ser utilizado nas reações, enquanto os pellets foram descartados.

**Figura 5:** Mensuração da Acetil: (A) sobrenadante de tecidos de cérebro; (B) cubeta utilizada na leitura de espectrofotometria e (C) leitura numa corrida de 5 min em espectrofotômetro ( $\lambda= 412$  nm).



**Fonte:** Autor, 2023.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Concentração letal (CL<sub>50</sub>)

As estimativas de Probit da CL<sub>50</sub> da formulação microencapsulada de *A. muricata* sobre os peixes no período de exposição de 24h foi de 0,229g/L e de 0,249g/L no período de exposição de 96h (Tabela 4).

No que se refere às variáveis indicadoras da qualidade da água, como o oxigênio obtido, temperatura e o pH, elas foram monitoradas e coletadas em cada uma das sete concentrações. Em seguida, foi realizada uma média geral dos parâmetros físico-químicos nos testes agudos e crônicos, gerados em valores de  $6,57 \pm 0,28$  para o oxigênio dissolvido,  $24,37 \pm 0,5$  para a temperatura e  $7,09 \pm 0,24$  para o pH.

**Tabela 4:** Parâmetros físico-químicos da água em diferentes concentrações da formulação microencapsulada de *A. muricata*.

Concentrações (g/L)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	Temperatura °C	pH
Controle	6,83 ± 0,14	24,22 ± 0,57	6,70 ± 0,14
Polímeros	6,60 ± 0,31	24,38 ± 0,55	7,33 ± 0,23
0,125	6,53 ± 0,27	24,31 ± 0,49	7,27 ± 0,31
0,25	6,58 ± 0,25	24,70 ± 0,45	7,30 ± 0,25
0,5	6,60 ± 0,38	24,48 ± 0,81	7,14 ± 0,24
1	6,58 ± 0,29	24,25 ± 0,30	7,15 ± 0,18
2	6,25 ± 0,35	24,25 ± 0,35	6,75 ± 0,35
<b>TOTAL</b>	<b>6,57 ± 0,28</b>	<b>24,37 ± 0,50</b>	<b>7,09 ± 0,24</b>

Fonte: Autor, 2023.

**Tabela 5:** Estimativas das concentrações letais, CL<sub>50</sub> e CL<sub>99</sub>, na toxicidade aguda e crônica da formulação microencapsulada do extrato etanólico de *Annona muricata*

Produto	N	Inclinação±(EP)	CL <sub>50</sub> (95% IC)	CL <sub>99</sub> (95% IC)	X <sup>2</sup>
Toxicidade aguda	75	6,0913 ± 1,4372	0,229 (0,181 ± 0,282)	0,553 (0,406 ± 1,179)	0,28
Toxicidade crônica	75	6,098 ± 1,458	0,249 (0,198 ± 0,307)	0,600 (0,438 ± 1,319)	0,650

N = Número de insetos, EP = erro padrão da média, IC = intervalo de confiança, CL = Concentração Letal,  $\chi^2$  = Qui-quadrado (significativo ao nível de 5% de probabilidade).

Fonte: Autor, 2023.

No teste agudo, com avaliações após 24h do tratamento com a formulação microencapsulada, foram observadas mortalidades a partir da concentração de 0,250g/L, com apenas 6,66%, enquanto na concentração de 0,5g/L, 73,30% dos peixes vieram a óbito. Já o tratamento em que os animais foram submetidos às duas maiores concentrações, 1,0 e 2,0g/L foram mais letais, pois causaram uma mortalidade de 93,33 e 100,00%, respectivamente (Tabela 5).

**Tabela 6.** A média de mortalidade de *Oreochromis niloticus* em concentrações crescentes no teste de toxicidade aguda e crônica aos períodos de exposição de 24 e 96h.

Concentração (g/L)	Média de porcentagem de <i>O.niloticus</i> (n= 90)	
	24h exposição	96h exposição
TEST.	0,00	0,00
Polímeros	0,00	0,00
0,125	0,00	0,00
0,250	6,66	60,00
0,500	73,33	93,33
1,000	93,33	100,00
2,000	100,00	100,00

Meios de ensaio de toxicidade realizados em triplicata de acordo com a ABNT, 2016.

Fonte: Autor, 2023.

A exposição do agente ativo constituído pelos polímeros, que foram utilizados no preparo da formulação microencapsulada, não ocasionaram mortalidade da mesma forma que a testemunha e à concentração mais baixa testada a 0,125g/L (Tabela 5).

No teste crônico, a concentração de 0,250g/L, que só causou 6,66% na análise aguda, com 96h aumentou a sua toxicidade, causando uma mortalidade de 60,00% dos peixes no aquário. Em todas as concentrações testadas, apenas a 0,125g/L não causou mortalidade dos peixes, e nas concentrações de 1,0 e 2,0g/L, todos os peixes morreram (Tabela 5).

Os peixes, de modo geral, são animais utilizados experimentalmente como bioindicadores de qualidade ambiental, e são muito utilizados em testes de novos produtos agronômicos, principalmente dos efeitos adversos da toxicidade de defensivos agrícolas. São animais muito sensíveis às mudanças nas características químicas da água, e muitas vezes podem ser afetados pelas consequências do uso de compostos orgânicos e inorgânicos utilizados na agricultura, que podem ser lixiviados ao ambiente aquático natural. Essa sensibilidade inclui os agrotóxicos de modo geral, que causam diversos danos a esses animais, efeito subletal,

incluindo a morte, efeito letal (MONTANHA; PIMPÃO, 2012; KNAPIK; RAMSDORF, 2020), dependendo da dose a qual foram expostos, envolvendo também a avaliação de um produto natural (AKPA et al., 2010; SYNGAI; BHARALI, 2016; MUSTAPHA et al., 2020; CASTRO et al., 2022), que pode ter a finalidade como inseticida, que no presente estudo é o extrato etanólico de *A. muricata*.

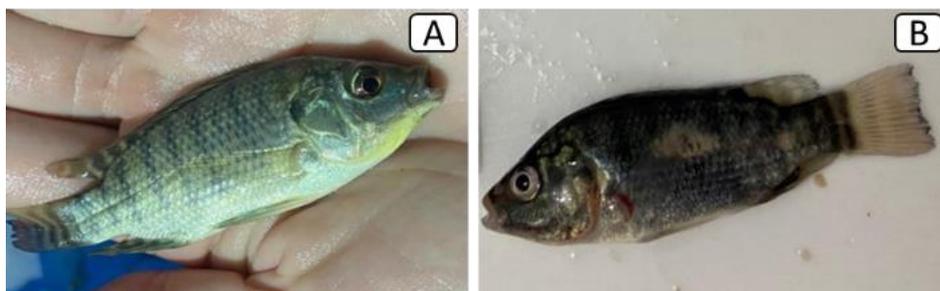
No entanto, por se tratar do estudo de um novo produto, não há resultados comparativos do modo de ação, toxicidade, taxa de mortalidade e impactos fisiológicos do extrato etanólico de *A. muricata* em peixes, sendo considerada inédita a avaliação da toxicidade na tilápia do Nilo, que é a espécie de peixes mais produzida e amplamente difundida no Brasil.

Segundo Coria-Téllez et al. (2018), vale destacar que estudos etnobotânicos indicam que *A. muricata* tem sido usado como inseticida, entretanto, a toxicidade relatada para os extratos é variável dependendo da parte da planta que é utilizada e o solvente que é empregado. Salienta-se ainda que não há concentração de campo recomendada para o produto testado que é o microencapsulado do extrato etanólico de *A. muricata*.

Observou-se ainda, que esses animais apresentaram sinais perceptíveis de estresse comportamental como escurecimento das escamas (Figura 6), nado errático, aumento dos movimentos operculares, além de ida frequente à superfície com o intuito de respirar, mudanças comportamentais muito comuns em estudos ecotoxicológicos (SILVA et al., 2020; BHARTI e RASOOL, 2021).

Pelo que foi descrito acima, esses sinais perceptíveis de estresse comportamental observados nos animais são sintomas típicos de respostas de estresse em peixes. Essas respostas podem ser atribuídas a várias causas, incluindo condições adversas no ambiente aquático em que os peixes estão vivendo, tais como a qualidade da água, visto também por Flores-Lopes (2006), em revisão dos aspectos da taxocenose de peixes mais utilizados como indicadores biológicos da qualidade da água.

**Figura 6:** Alteração visual do exterior dos peixes experimentais: (A) tilápia com coloração normal submetida ao tratamento testemunha e (B) peixe submetido a exposição da formulação microencapsulada de *A. muricata* apresentando escurecimento da pele.



Fonte: Autor, 2023.

Segundo Scott e Sloman (2004), a exposição às substâncias tóxicas pode causar anabolismo proteico em peixe, uma vez que os animais, ao buscarem aliviar os efeitos do estresse decorrente da exposição a agentes estressores, mobilizam suas reservas nutricionais na busca pela homeostase, resultando na redução do desempenho ou até mesmo a morte dos animais, dependendo do nível do estresse aos quais os animais são expostos, este episódio também foi visto em Silva e colaboradores (2017). Com a adição do pó do produto formulado, principalmente nas maiores concentrações, a água dos aquários ficou imediatamente turva e com coloração amarelada, alterando visivelmente a qualidade da água e um ambiente já adaptado e favorável aos animais, o que transfere um ambiente de estresse comportamental, com reações de tentativas de pular para fora da água e movimentos repetitivos de natação errática

Efeitos similares também foram verificados em outra espécie de peixes bastante estudada em ecotoxicologia, com o peixe zebra, *Danio rerio* (Hamilton 1822), em contato com inseticidas químicos, tornando-os mais magros, com movimentos de se contorcer, com movimentação aumentada das guelras, causando perda de equilíbrio (KUMAR; ANSARI, 1983; MELO, 2018).

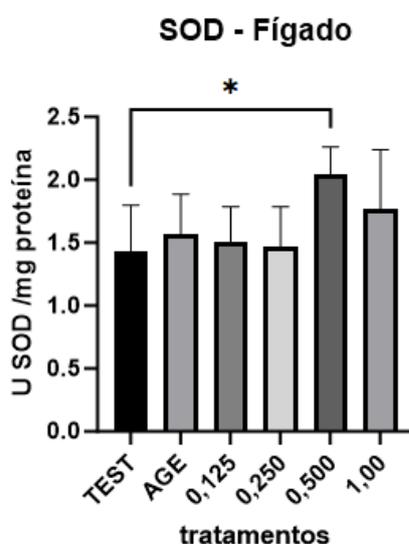
Corroborando esses resultados Fischer e colaboradores (2021), trabalhando com o pesticida malation, que é um inseticida organofosforado de amplo espectro utilizado no controle de pragas tanto na área rural quanto em áreas urbanas, relataram que a exposição a esse inseticida pode causar alterações no comportamento dos animais tanto nos estágios larvais quanto adulto, perturbação no desenvolvimento dos órgãos e também escurecimento da pele. O que também foi observado no presente estudo nos animais submetidos a exposição ao produto teste nas maiores concentrações.

## 4.2 Enzimas antioxidantes (SOD e GST)

### 4.2.1 Análise SOD

Para verificar os efeitos adversos à mortalidade, foram realizadas análises de SOD e GST de fígado e brânquias. A diferença na atividade da SOD no fígado foi encontrada na concentração 0,500g/L em relação à testemunha, os demais tratamentos de 0,125; 0,250; 1,0 e agentes encapsulantes não expressaram diferenças significativas em relação às médias ( $P < 0,05$ ) (Figura 7). Estes resultados demonstram que a formulação microencapsulada do extrato das sementes de graviola podem ter causado estresse oxidativo aos peixes, quando comparado com a testemunha, tendo-se observado nos resultados das análises de fígado dos animais submetidos às diferentes concentrações do produto.

**Figura 7:** Atividade da SOD no fígado, com diferença significativa entre as médias do tratamento 0,500g/L em relação à testemunha.



\*Diferença significativa entre as médias

Fonte: Autor, 2023.

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade antioxidante do organismo para neutralizá-los. Altos níveis de SOD podem ser observados em resposta ao estresse oxidativo, indicando uma tentativa do organismo de combater os danos causados pelos radicais livres (BARBOSA et al., 2010).

O aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nos tecidos dos peixes sugere a ocorrência de estresse oxidativo como resultado do contato com a água, sendo a SOD uma das enzimas antioxidantes que desempenham um papel nesse processo (MORI et al., 2019).

Nwani e colaboradores (2013) reportaram que a enzima SOD é um indicador da capacidade dos tecidos em lidar com o estresse oxidativo. Nossos achados revelaram um aumento na atividade da SOD no fígado após uma exposição de 24 e 96 horas ao microencapsulado de *A. muricata*. No entanto, análises comparativas não podem ser realizadas, uma vez que não existem registros disponíveis para inseticidas botânicos e formulações microencapsuladas até o momento.

#### 4.2.2 Análise GST

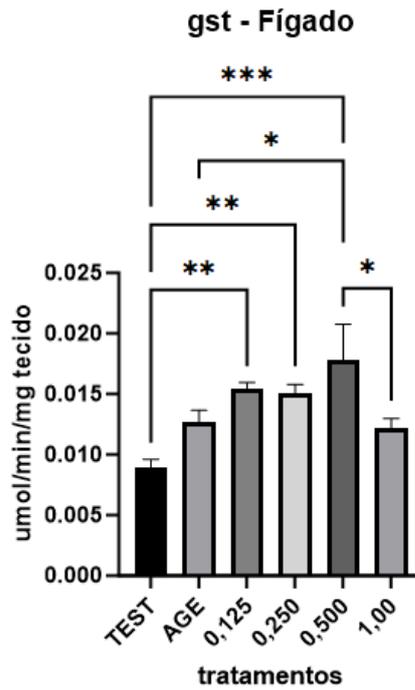
Foi observado um aumento na atividade da glutathione S-transferase (GST) no fígado entre as médias dos grupos 0,125 g/L, 0,250 g/L e 0,500 g/L, em comparação com o grupo de controle. Da mesma forma, ao comparar o grupo 0,500 g/L com o grupo 1,00 g/L e com os polímeros, também foram identificadas diferenças significativas (Figura 8).

Ao contrário do efeito observado no fígado, a exposição da formulação nas brânquias não revelou interferências, conforme indicado pela análise estatística (Figura 9).

A GST é conhecida por seu papel fundamental no metabolismo de xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo), atuando na conjugação de várias substâncias químicas com glutathione, tornando-as mais solúveis em água e, portanto, mais facilmente excretadas pelo organismo. Essa ação de desintoxicação é particularmente relevante para o fígado, já que este órgão é o principal responsável pela metabolização de muitas substâncias, incluindo tóxicos e produtos químicos (FLESCHE, et al., 2012).

De acordo com Winkaler (2008), estudando pacus, *Piaractus mesopotamicus*, expostos ao diflubenzuron (DFB) e teflubenzuron (TFB), a explicação mais provável para a redução da GST no fígado pode ser devido à alta capacidade que as enzimas têm de se ligarem fortemente aos xenobióticos. As reduções da GST indicam um possível comprometimento da atividade de metabolização desses compostos químicos no fígado dos animais (BAINY et al., 1996).

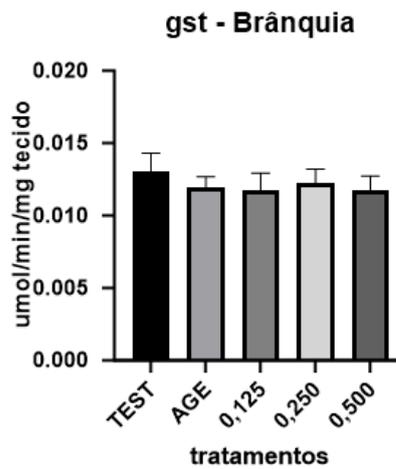
**Figura 8:** Atividade da GST no fígado, apresentando diferenças significativas tanto em relação ao controle, quanto aos tratamentos.



\*Diferença significativa entre médias de 0,500g/L e 1,00g/L e AGE; \*\*Diferença significativa de 0,125 e 0,250g/L em relação à testemunha; \*\*\*Diferença significativa de 0,500g/L em relação à testemunha.

Fonte: Autor, 2023.

**Figura 9:** Atividade da GST nas brânquias, sem interferência à exposição do produto formulado de *A. murucata*.



Fonte: Autor, 2023.

Na literatura não foram encontrados trabalhos relacionando a atividade da GST com a exposição ao TFB, mas de acordo com os resultados deste trabalho, a exposição ao TFB parece

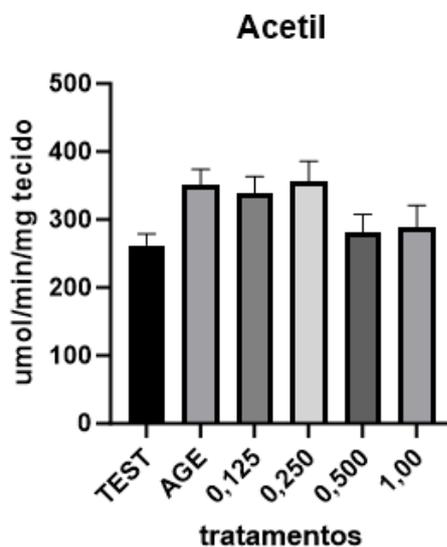
interferir na atividade hepática da GST de forma semelhante ao DFB. O mesmo acontece para inseticidas botânicos (SANCHE, 2014).

### 4.3 Inibição da Acetilcolinesterase (AChE)

Pela análise da ANOVA, não houve diferença estatística entre as médias comparadas (Figura 10), mostrando, com isso, que a formulação microencapsulada de graviola, não causou inibição dos tecidos do encéfalo de *O. niloticus*, analisados por AChE.

A AChE (acetilcolinesterase) é uma enzima crucial no sistema nervoso que desempenha um papel fundamental na transmissão de sinais entre as células nervosas. Ela é responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses nervosas, permitindo a terminação rápida do sinal nervoso e proporcionando uma comunicação eficiente entre os neurônios (PORTO et al., 2021).

**Figura 10:** Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) no cérebro, sem diferenças significativas, estatisticamente.



Fonte: Autor, 2023.

Quanto à biologia redox, a AChE não está diretamente relacionada a esse processo. A biologia redox envolve reações de transmissão-redução, onde ocorre o download de elétrons entre emissão. O estresse oxidativo e as enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione S-transferase (GST), estão mais relacionados à biologia redox (OGUNSUYI et al., 2022).

Portanto, a AChE e a biologia redox não têm uma relação direta. A AChE está mais associada à função neuromuscular e à transmissão de sinais nervosos, enquanto a biologia redox trata das reações de transmissão e redução que ocorrem no corpo, incluindo o equilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes.

Para melhor compreensão de danos oxidativos na participação da toxicidade, foi realizado o teste da inibição acetilcolinesterase.

As toxicidades de caráter agudo por determinadas classes de agrotóxicos são impostas, sobretudo, à capacidade das substâncias em inibir a atividade da AChE, acometendo o Sistema Nervoso Central (SNC), além da geração de radicais livres (RL) e estresse oxidativo (LIMA, 2017).

Para Nerilo et al. (2014), os agrotóxicos das classes de organofosforados e carbamatos são inibidores primários da acetilcolinesterase e desencadeiam uma série de respostas com processos sintomatológicos agudos. A persistência na utilização química gera sinais crônicos, podendo evoluir para óbito por intoxicação exógena.

Jonsson, et al. (2007), estudaram metodologias de análise da atividade de duas enzimas com potencial uso em biossensores. Observando a atividade específica de AChE cerebral no homogenato de cérebro de *O. niloticus* expostos a distintas concentrações de formulação comercial. Após análise em ANOVA, foi observado que ocorreu diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores de atividade específica de AChE na concentração de 0,875 mg/L de formulações comerciais do inseticida PPF (Piriproxifeno) com 23% de redução da atividade, e um aumento da mesma em 18% na exposição à concentração de 1,75mg/L quando comprado a atividade do controle. Após 96h de exposição a 3,5mg/L do PPF, apresentou variação significativa na atividade específica de AChE cerebral em torno de 16% de redução da atividade específica. Ao contrário do estudo atual, que não observaram diferenças estatisticamente significativas em relação à exposição ao produto, os resultados obtidos foram positivos.

É fato que, a literatura carece de estudos toxicológicos abordando inseticidas botânicos. No entanto, existem registros que apontam para os constituintes de óleos provenientes da família Lamiaceae, que têm sido empregados no tratamento da doença de Alzheimer, e que foram identificados como inibidores da acetilcolinesterase (AChE). Isso inclui monoterpenos como o neral, geranial e linalol (DOHI et al., 2009; PICOLLO et al., 2008; PERRY et al., 2000), os quais têm impacto positivo na função colinérgica e cognitiva.

Além disso, o extrato das partes aéreas de outro membro da família Lamiaceae, o *Teucrium polium* L., exibe propriedades anti-amnésicas in vivo e inibe a AChE in vitro, embora

os compostos responsáveis por essa atividade ainda são indefinidos (ORHAN e ASLAN, 2009). Compostos como o limoneno e o álcool perílico, presentes nos óleos essenciais de *Citrus* (Rutaceae), melhoraram o comprometimento da memória induzida pela escopolamina. Tal melhora possivelmente ocorre devido à continuação da AChE (observada *in vitro*) (SOUZA et al., 2012).

Nesse contexto, esses estudos indicam que alternativas ao uso de inseticidas são uma realidade, e devem ser mais exploradas em prol da conservação ambiental e da saúde dos seres humanos.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que:

- Não há alteração enzimática nos tecidos das brânquias de *O. niloticus*, analisados por GST;
- A formulação microencapsulada de *A. muricata* induz perturbações nas enzimas de *O. niloticus*, como evidenciado pela análise das atividades de SOD e GST nos tecidos do fígado e das brânquias. Esse efeito resulta em estresse oxidativo e efeitos zootécnicos associados;
- Não há inibição dos tecidos do encéfalo de *O. niloticus*, analisados por AChE;
- O aumento da dose e do tempo de exposição potencializa as alterações enzimáticas de *O. niloticus*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR 15088: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes (Cyprinidae), que revisa a norma ABNT NBR 15088:2011, elaborada pela Comissão de Estudo Especial de Análises Ecotoxicológicas (ABNT/CEE-106). - See more at: <http://www.abnt.org.br/noticias/5079-ecotoxicologia-aquatica-toxicidade-aguda-metodo-de-ensaio-com-peixes-cyprinidae#sthash.imACEKt6.dpuf>, 2023.

Acesso em: 19 julh. 2023.

Agricultural landscapes. **Conservation Biology**, v. 32, n. 6, p. 1380-1391, 2018.

AKPA, L. E.; AJIMA, M. N. O.; AUDU, B. S.; LABTE, S. M. Effects of Fish Bean (*Tephrosia vogelii*) leave extract exposed to freshwater cichlid fish – *Tilapia zilli*. **Animal Research International**, v. 7, n. 3, p. 1236 – 1241, 2010.

ALAM, M. K.; MAUGHAN, O. E. The effect of malathion, diazinon, and various concentrations of zinc, copper, nickel, lead, iron, and mercury on fish. **Biological Trace Element Research**, v. 34, n. 3, p. 225–236, 1992.

ALARCÓN-ALARCÓN, C. et al. Protection of astaxanthin from photodegradation by its inclusion in hierarchically assembled nano and microstructures with potential as food. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 83, p. 36-44, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.033>.

AMÉRICO-PINHEIRO, J.H.P.; MERCADO, L.S. Agrotóxicos, recursos hídricos e organismos bioindicadores. 2021.

ANNUNZIATA, G.; JIMÉNEZ-GARCÍA, M.; CAPÓ, X.; MORANTA, D.; ARNONE, A.; TENORE, G. C.; TEJADA, S. Microencapsulation as a tool to counteract the typical low bioavailability of polyphenols in the management of diabetes. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 139, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2020.111248>

ANSEL, V.; POPOVICH, N. G.; ALLEN H, C. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo; SANTOS, VL dos A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.**

ARTHURS, S.; DARA, S. K. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 165, p. 13-21, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.008>.

- BAGATINI, M.D.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 444-447, 2007.
- BAINY, A. C. D.; SAITO, E.; CARVALHO, P. S. M.; JUNQUEIRA, V. B. C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aqua. Toxicol.** Amsterdam, v. 34,p. 151-162, 1996.
- BALE, J. S.; VAN LENTEREN, J. C.; BIGLER, F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical. Transactions B**, v. 363, p. 761–776. 2008. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2182>.
- BALSAN, L.; GUIRRA, A.P.M.; BARBOSA, D.S.; SILVA, N.M.; PARANHOS FILHO, A. C. Espacialização do risco intrínseco à contaminação por pesticidas em corpos hídricos e determinação de pontos de monitoramento. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 42, n. 1, p. 496-513, 2019.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BELARMINO, A. B., DE SOUSA, D. S., DA SILVA MENDES, F. R., MARINHO, M. M., DOS SANTOS, H. S., & MARINHO, E. S. Avaliação de potencial inseticida e ecotoxicologia preditiva do composto N-{{4'-[(E)-3-(4-fluorofenil)-1-(fenil) prop-2-en-1-ona]} acetamida. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 11, n. 1, 2022.
- BENSON-PEDRAZA, Allyson. **Metal Accumulation in Soils, Invertebrates, and Whiptail Lizards in the Northern Chihuahuan Desert**. 2022. Tese de Doutorado. The University of Texas at El Paso.
- BERNARDI, M. M.; MORAES, R. C.; VAROLI, F. M. F.; OSTI, S. C. Ecotoxicologia. In: SPINOSA, H. de S.; GÓMIAK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. São Paulo: Manole, 2008. 942 p.
- BHARTI, S.; RASOOL, F. Analysis of the biochemical and histopathological impact of a mild dose of commercial malathion on *Channa punctatus* (Bloch) fish. **Toxicology Reports**, v. 8, p. 443–455, 2021.
- BOSCOLO, W.R. Desempenho e Características de Carcaça de Machos Revertidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Linhagens Tailandesa e Comum, nas Fases Inicial e de Crescimento. **Rev. bras. Zootec**, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, 2001.

- BRASIL – **Censo agropecuário**. 2. Agropecuária. Brasil. 2017. Estatística. I. IBGE. Gerência de Biblioteca e Acervos Especiais. CDU 311.213.1:63 (81-32) RJ-IBGE/2018-06. Periódico. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3093/agro\\_2017\\_resultados\\_preliminares.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3093/agro_2017_resultados_preliminares.pdf). Acessado em: 13 de jun. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância do câncer ocupacional e ambiental. Rio de Janeiro: **INCA**, 2010.
- BAUMGARTEN, M.G.Z.; POZZA, S.A. Qualidade de águas: descrição de parâmetros referidos na legislação ambiental. 2021.
- BRIÃO, J.A; BRITO JUNIOR, J.L.; BISI, T.L.; MEIRE, R.O. Botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da Baía de Sepetiba–RJ, Brasil: Variação temporal da bioacumulação de compostos organoclorados e sua influência no evento de mortalidade atípica associado ao morbilivírus. 2020.
- BRUM, B.R.; D'ÁVILA, R.S.; SGUAREZI, S.B.; SANTOS FILHO, M.; IGNÁCIO, A.R.A. Análise temporal da utilização de aves, como sentinelas ambientais no monitoramento de contaminação por agrotóxicos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e752974807-e752974807, 2020.
- CARARINE, A.D. **Estabilidade de medicamentos: fatores interferentes com destaque em material de embalagem**. 2016.
- CARBALLO, I. La **Guanabana, Salud en Progreso**. 2012. Disponível em: <http://guanabanasalud.blogspot.com/2012/04/la-guanabana-salud-en-progreso.html>. Acesso em: 28 de mai. 2023. 2012
- CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. **Annual Review of Entomology**, v.58, p.99-117, 2013.
- CELESTINO, C. O.; VARÃO, C. A. R.; VELUDO, H. H., BRAGA, A. G.; LIMA, R. A. Ação inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Jacq.). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 3, n. 2, 2016.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Avaliação da toxicidade das águas e sedimentos dos rios da região de Cubatão. São Paulo: CETESB, Relatório Técnico, 10p, 1983.

- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Ensaio biológicos com água e sedimento da represa Cobranças. São Paulo: CETESB, Relatório técnico, 29p, 1983.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Água – Teste de toxicidade aguda com peixes – Parte II – Sistema Semi-Estático. Norma CETESB-L5.019-II. 29p, 1990.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Água – Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Noel, 1876 (Cladocera, Crustáceos). Norma CETESB-, 1994.
- CHANDLER, D., DAVIDSON, G., GRANT, W.P., Greaves, J., Tatchell, G.M. Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. **Journal of Food Science and Technology**. v. 19, p. 275–283. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.12.009>.
- CHEN, Z.; WANG. Y. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. **J. Chromatogr. A.**, v.754, p.367-395, 1996.
- CONNELL, Des W. Ecotoxicology. In: **Toxins and Targets**. Routledge, 2022. p. 185-193.
- CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba**, v. 20, n. 2, p. 203-220, jul./dez. 2002.
- CORIA-TÉLLEZ, A.V.; OBLEDO-VÁZQUEZ, E. N., PADILLA-CAMBEROS, E.; GONZÁLEZ-ÁVILA, M.; MARTÍNEZ-VELÁZQUEZ, M. Annona muricata: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arabian Journal of chemistry**, v. 11, n. 5, p. 662-691, 2018.
- CORTES, et al., **Nuevos Fármacos inspirados en annonáceas**. Palestras V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene a exportação. v. 36, edição especial, e., p. 022-031, Fevereiro 2014.
- COSTA, C. Z.; DE ALBUQUERQUE, M. D. C.; BRUM, M. C.; CASTRO, A. M. D.. Degradação microbológica e enzimática de polímeros: uma revisão. **Química Nova**, v. 38, p. 259-267, 2015.
- COUVREUR, T. L. P.; HELMSTETTER, A. J.; KOENEN, E. J. M., BETHUNE, K.; BRANDÃO, R. D.; LITTLE, S. A.; SAUQUET, H.; ERKENS, R. H. J. Phylogenomics of the major tropical plant family Annonaceae using targeted enrichment of nuclear genes. **Front Plant Sci.**, v. 9, p. 1941, 2019.

- DA SILVA, E.G.; BEHREND, R.D.L. USO DE BIOMARCADORES EM AMBIENTES AQUÁTICOS E O MONITORAMENTO AMBIENTAL EM REGIÕES COSTEIRAS. **Revista Científica e-Locução**, v. 1, n. 22, p. 17-17, 2022.
- DA SILVA NETO, I.F.; DUARTE, M.B.S; CANUTO, M.A.D.F; AGUIAR, A.M. Uma breve revisão sobre a utilização de abelhas como bioindicadores de contaminação ambiental: Ênfase na *Apis mellifera* L. **Revista Semiárido De Visu**, v. 9, n. 3, p. 204-210, 2021.
- DE CASTRO, V. L. S. S; JONSSON, C. M., DE CASTRO, V. L. S. S., & JONSSON, C. M.. Aspectos toxicológicos em ambiente aquático e em mamíferos. 2019.
- DE MELO, C. M. L.; DA CUNHA, M. N. C.; OLIVEIRA, J. P.; NETO, J. M. W. D.; PORTO, A. L. F. Matrizes poliméricas para encapsulação de bioinseticidas. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 26, n. 2, 2021.
- DE OLIVEIRA, S.M.; ROSA, R.O.; FERREIRA, F.M.C. Bioinseticidas e diversidade de abelhas nativas no cultivo do tomateiro. **Revista Ponto de Vista**, v. 10, n. 3, p. 01-13, 2021.
- DE OLIVEIRA, V.A.F.; MAIA, L.F. Microencapsulação de enterocina e óleo de orégano em leiteiro. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 27, n. 1, 2023.
- DECAENS, T.; MARTINS, M. B.; FEIJOO, A.; OSZWALD, J.; DOLÉDEC, S.; MATHIEU, J.; LAVELLE, P. Biodiversity loss along a gradient of deforestation in Amazonian agricultural landscapes. **Conservation Biology**, v. 32, n. 6, p. 1380-1391, 2018.
- DOHI, S., TERASAKI, M., MAKINO, M. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Chemical Composition of Commercial Essential Oils. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 57, p. 4313-4318. 2009.
- DOS SANTOS MENEZES, J.M. Avaliação de óleos essenciais obtidos de espécies vegetais da família Annonaceae no controle de insetos e ácaros fitófagos. 2014.
- DUNHAM, B. Microbial pesticides: A key role in the multinational portfolio. **New Ag International**, pp. 32–36. 2015.
- EMBRAPA. Agricultura e Meio Ambiente: Agrotóxicos no Brasil. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agricultura-e-meio-ambiente/qualidade/dinamica/agrotoxicos-no-brasil#:~:text=Autores&text=Anualmente%20s%C3%A3o%20usados%20no%20mundo,mil%20toneladas%20de%20produtos%20comerciais..> Acesso em: 20 jul. 23.
- FEEMA (Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente). 1986. Critérios e Padrões Para Lançamento de Efluentes Líquidos, NT 202.R-10 de 12/12/86. rio de Janeiro:FEEMA.

- FEEMA (Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente). 1990. Critérios e Padrões para Controle da Toxicidade em Efluentes Líquidos Industriais, NT 213. R- 4 de 4/4/90. rio
- FEEMA (Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente). 1990. Diretriz de controle de efluentes líquidos industriais, DZ-209.R-2 de 25/06/97. Rio de Janeiro: FEEMA.
- FEITEIRO, L.M.S. O papel da bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo no comportamento depressivo em modelo de concussão recorrente em camundongos. 2020.
- FERNANDEZ-PEREZ, M.; FLORES-CESPEDES, F.; DAZA-FERNANDEZ, I.; VIDAL-PENA, F.; VILLAFRANCA-SANCHEZ, M. Lignin and lignosulfonate-based formulations to protect pyrethrins against photodegradation and volatilization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 53, p. 13557-13564, 2014. <http://dx.doi.org/10.1021/ie500186e>
- FERRI, G. H.; CARDOSO, I. L.; GIL, J. A.; JONSSON, C. M.; RANTIN, F. T.; ISHIKAWA, M. M. Determinação da concentração letal média e efeitos subletais da atividade AchE de *Gymnotus carapo* (Teleostei: Gymnotidae) exposto ao triclorfon. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 57, n. 3, 2020.
- FIGUEIROA, L.E de. Efeito da formulação microencapsulada de *Annona muricata* L. (annonaceae) sobre a morfologia do canal alimentar de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (lepidoptera: plutellidae) e sua ação ecotoxicológica sobre abelhas (Dissertação). 2019.
- FISCHER, A.K. **Efeitos Adversos do Inseticida Malation sobre Peixes**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso.
- FIUZA, T.D.S.; SILVA, P.C.; PAULA, J.R.D.; TRESVENZOL, L.M.F.; FERREIRA, H.D.; SABOIA-MORAIS, S.M.T.D. Efeito do extrato etanólico bruto e das frações da *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) Harley em brânquias de *Oreochromis niloticus* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 1-8, 2015.
- FLESCH, S. Respostas do sistema de detoxificação e das defesas antioxidantes celulares em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas a ambientes contaminados em Joinville, SC. 2012.
- FLORES-LOPES, F. revisão dos aspectos da taxocenose de peixes mais utilizados como indicadores biológicos da qualidade da água. p. 35, 2006.
- FOGLIO, M. A; QUEIROGA, C. L; SOUSA, I. M. O; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. **Multiciencia**, 2006.

- FRIEDRICH, K., GURGEL, A. D. M., SARPA, M., BEDOR, C. N. G., SIQUEIRA, M. T. D., GURGEL, I. G. D., & AUGUSTO, L. G. D. S. Toxicologia crítica aplicada aos agrotóxicos—perspectivas em defesa da vida. **Saúde em Debate**, v. 46, p. 293-315, 2022.
- GBASSI, G. K.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 103-105, 2009.
- GILBERT, L. I.; GILL, S. S. **Insect control. Biological and synthetic agents**. San Diego: Academic Press, p. 451, 2010.
- GOLOMBIESKI, J. I., SEBEN, D., SALBEGO, J., & DA SILVA, E. G. TOXICOLOGIA AGUDA DE Rhamdia quelen EXPOSTOS A XENOBIÓTICOS UTILIZADOS EM LAVOURAS ARROZEIRAS. 2020 by Atena Editora Copyright© Atena Editora Copyright do Texto© 2020 Os autores Copyright da Edição© 2020 Atena Editora Editora Chefe: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira, p. 359, 2020.
- GOMES, I.B.; TRINDADE, R.C.P.; SANTANA, A.E.G.; LEMOS, E.E.P.; BASILIO JUNIOR, I.D. Bioactivity of microencapsulated soursop seeds extract on *Plutella xylostella*. *Ciência Rural*, v. 46, p. 771-775, 2016.
- GRISOLIA, C. K. Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Brasília, DF: Universidade de Brasília, p. 392, 2005.
- GUEDES, C. A.; GUEDES, G. H. F.; DOS SANTOS, S. L.; DO MONTE GURGEL, A. Potencial de bioacumulação de agrotóxicos no organismo humano: uma análise dos agrotóxicos autorizados no Brasil. in: anais do 8º congresso brasileiro de ciências sociais e humanas em saúde, 2019, João Pessoa. Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2019. Disponível em: <<https://proceedings.science/8o-cbcs/hs/trabalhos/potencial-de-bioacumulacao-de-agrotoxicos-no-organismo-humano-uma-analise-dos-ag?lang=pt-br>> Acesso em: 20 jul. 2023.
- GUIRADO, M.M.; BICUDO, H.M.C.B. Alguns aspectos do controle populacional e da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Bepa: Epidemiológica Paulista**, v.6, n.64, p.5-14, 2009.
- HENAO, G.J.P.; PAJÓN, J.; TORRES, M.C. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. **Revista CES Medicina**. v.21, n.1, p.1-8, 2007.
- HEREK, J. S.. VARGAS, L.; TRINDADE, S. A. R.; RUTKOSKI, C. F.; HEUDORF, U.; ANGERER, J. Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. *Environ. Health Perspect.*, v.109, n.3, p.213-217, 2001.

- ISMAIL, M. S. M.; TAG, H. M.; RIZK, M. A. Acaricidal, ovicidal, and repellent effects of *Tagetes patula* leaf extract against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Journal of Plant Protection Research**, v. 59, n. 2, p. 151–159, 2019.
- KNAPIK, L. F. O.; RAMSDORF, W. Ecotoxicity of malathion pesticide and its genotoxic effects over the biomarker comet assay in *Daphnia magna*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 5, p. 264-273, 2020.
- KIM, S.; SEUNG, Y. C.; KIM, S. H.; SONG, O.; SHIND, S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 493-500, 2008.
- LEÃO, M.G.P.; VITALE, N.A. Estudo de substituição alternativa de polímeros petroquímicos. 2021.
- LEGISLAÇÃO DE AGROTÓXICOS E AFINS – Adepará. Avaliação de danos sobre organismos não-alvo e comportamento ambiental do agente microbiológico de controle. p. 339-341, 2020. Disponível em: <http://adepara.pa.gov.br/sites/default/files/LEGISLA%C3%87%C3%83O%20DE%20AGROT%C3%93XICOS%20ATUALIZADA%20EM%20ABRIL-2020%20%281%29.pdf>.
- LEMOS, E. P. de. **A produção de anonáceas no Brasil**. Revista Brasileira de Fruticultura. ISSN 0100-2945. vol. 36. Jaboticabal. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500009>. Acesso em: 12 jun. 2023. 2014.
- LENGYEL M.; KÁLLAI-SZABÓ N.; ANTAL V.; LAKI A.J.; ANTAL I. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. **Sci. Pharm.** 2019.
- LIAW, C.; CHANG, F.; CHEN, S. et. al. **Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona Montana***. *Bioorg. & Med. Chem.*, v. 13, p. 4767-4776, 2005.
- LIMA, C.; MACEDO, E.M.V. de. Biomarcadores de função tubular, filtração e permeabilidade renal no perioperatório de transplante hepático: utilidade no diagnóstico e no prognóstico da injúria renal aguda. 2021.
- LIMA, Hully Monaísy Alencar et al. Toxicidade do extrato orgânico de sementes de *Annona muricata* L.(Annonaceae) sobre *Tetranychus evansi* (Baker & Pritchard, 1960)(Acari: Tetranychidae) em tomateiro. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 4, 2014.
- LIMA, R. M. Avaliação Da Radiação Uvc, Processos Uv/H2o2 E Foto-Fenton Na Degradação Do Agrotóxico Clorpirifós Com Acompanhamento Da Ecotoxicidade.94f.

Dissertação de mestrado em Ciências Ambientais, do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental –Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba. 2017.

LIMA, H.M.A.; RODRIGUES, V.M.; VALENTE, E.C.N.; SANTOS, M.D.; DUARTE, A.G.; TRINDADE, R.C.P. Toxicidade de extratos da semente de *Annona muricata* L. (Annonaceae) sobre fêmeas de *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae). ISSN: 1980-4849. Revista Brasileira de Biociências (Online), v. 12, p. 201-205, 2014.

MACIEL, Anilde da Graça Sousa et al. Controle alternativo de *Tetranychus urticae* com extratos de sementes de graviola, *Annona muricata* L. e com ácaro predador *Amblyseius aerialis* (Muma, 1955)(Acari: Phytoseiidae). 2014.

MACIEL, A.G.S.; DIAS, M.S.; TRINDADE, R.C.P.; BASILIO JUNIOR, I.D.; SILVA, E. S.; LEMOS, E.E.P.; ARAUJO, A.M N.; SILVA, V. C.; MORAIS, F.E.M.; BREDAS, M.O. Lethal and sublethal effects of hexane extract and microencapsulation of *Annona squamosa* L. (Annonaceae) seeds to *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae). **International Journal of Acarology**, p. 1-8, 2020.

MACIEL, A. G. S.; RODRIGUES, J. S.; TRINDADE, R. C. P.; SILVA, E. S.; SANT’ANA, A. E. G.; LEMOS, E. E. P. Effect of *Annona muricata* L. (1753) (Annonaceae) seeds extracts on *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae). African Journal of Agricultural Research, v. 10, n. 48, p. 4370-4375, 2015.

MACIEL, A.G.S.; SANTOS, M.D.; TRINDADE, R.C.P.; DUARTE, A.G. Seletividade do extrato etanólico de *Annona muricata* (L. 1753) (Annonaceae) e de Abamectin ao ácaro predador *Amblyseius aerialis* (Muma, 1955) (Acari: Phytoseiidae. Ciencia Agricola (UFAL), v. 15, p. 53, 2017.

MACIEL, A.D.G.S. Preparo do microencapsulado de *Annona squamosa* L.(Annonaceae) e toxicidade letal e subletal do microencapsulado a *Tetranychus urticae* (Koch, 1836)(Acari: Tetranychidae). 2018.

MADENE, A.; MURIEL, J.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 1-21, 2006.

MAGALHÃES, D.P.; SILVA, A. da; FERRÃO-FILHO. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, 12(3):3-. doi: 10.4257/OECO.2008.1203.02. 2008.

MAGALHÃES, Danielly de Paiva et al. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. 2008.

- MARTINS, T.E.P. Estudo comparativo da atividade catalítica e expressão protéica do citocromo P4501A (CYP1A) em cascudos (Loricariidae) e tilápias (Cichlidae). Dissertação (Mestrado em Ciências) - **Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular**, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.
- MASSEBO, F.; TEDESSE, M.; BEKELET, T.; BALKE, W.M.; GREBRE-MICHAEL, T. Evaluation on larvicidal effects of essential oils of some local plants against *Anopheles arabiensis* Patton and *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) in Ethiopia African. **Journal of Biotechnology**, v.8, n.17, p.4183-4188, 2009.
- MATOS, K. S. **Aspectos moleculares da reativação da acetilcolinesterase inibida por ciclosarin e carbofurano/Karina Silvia Matos.**—Lavras: UFLA, 2012. 148 p.: il. Tese de Doutorado. Dissertação (mestrado)—Universidade Federal de Lavras. 2012.
- MISHRA, S.; AHMAD, S.; KUMAR, N.; SHARMA, B.K. **Annona muricata (the cancer killer):** A review. *Glob. J. Pharm. Res.* 2013, 2, 1613–1618. Disponível em: <https://www.yumpu>. 2013.
- MELLO, N.P. de. Recuperação de peixes juvenis de *Oreochromis niloticus* após a intoxicação aguda com o inseticida malathion. 2018.
- MICHELETTI, L.B.; BROGLIO, S.M.F.; LEMOS, E.E.P.; TRINDADE, R.C.P.; VALENTE, E.C.N. Registro de *Xanthopastis timais* em amarílis e efeito do extrato de sementes de graviola em seu desenvolvimento. *Revista Caatinga (UFERSA. Impresso)*, v. 30, p. 420-426, 2017.
- MOGHADAMTOUSI, S. Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI, H. M.; KADIR, H. A. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625-15658, 2015.
- MONSERRAT, J.M., GERACITANO, L.A., PINHO, G.L.L., VINAGRE, T.M., FALEIROS, M., ALCIATI, J.C. & BIANCHINI, A. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe (III) xylenol orange complex formation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 177–183. 2003.
- MONTANHA, F.P.; PIMPÃO, C.T. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes – Revisão. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, n. 18, 58p. 2012.
- MORAIS, F.E.M.; ARAUJO, A.M.N.; VALENTE, E.C.N.; SILVA, P.P.; TRINDADE, R.C.P. Ação bioinseticida de extrato microencapsulado de *Annona muricata* L. (Annonaceae) sobre *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). In: Rubens Pessoa de Barros;

Aldenir Feitosa dos Santos; Cícero Gomes dos Santos. (Org.). Ciências em movimento do ensino pela pesquisa. 1ed. Ponta Grossa: Atena, 2023, v, p. 73-83.

MOREIRA, M.F.; MANSUR, J.F.; MANSUR, J. F. Resistência e inseticidas: estratégias, desafios e perspectivas no controle de insetos. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. **1ed. Rio de Janeiro: INCT-EM**, p. 1-23, 2012.

MORI, N.C.; MICHELOTTI, B.T.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M.A.; BRESSAN, C.A.; HEINZMANN, B.M. Efeitos dos níveis dietéticos da citral sobre os níveis de peroxidação lipídica e atividade de superóxido dismutase de juvenis de *Centropomus undecimalis*. In: **Congresso Internacional em Saúde**. 2019.

MORRETE, T.A. **Bioacumulação de agrotóxicos e genotoxicidade em anuros no sul do Brasil**. 2020. 24 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2020.

MOUTINHO, M. F.; ALMEIDA, E. A.; ESPINDOLA, E. L. G.; DAAM, M. A.; SCHIESARI, L. Herbicides employed in sugarcane plantations have lethal and sublethal effects to larval *Boana pardalis* (Amphibia, Hylidae). **Ecotoxicology**, 2020 <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02226-2>.

NARAYANI, S.; YASHODHARA, V. (2018). Enzymatic Analysis of Superoxide Dismutase (SOD) from *Hordeum vulgare*: Its Role in Drought Stress Tolerance. **Journal of Plant Biochemistry & Physiology**, 7(3):1-4. doi: 10.35248/2329-9029.19.7.238.

NASUTI, C.; CANTALAMESSA, F.; FALCIONI, G.; GABBIANELLI, R. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. **Toxicology**, v.191, n.2-3, p.233-244, 2003.

NAUEN, R.; BRETSCHNEIDER, T. New modes of action of insecticides. **Pesticide Outlook**, v.13, n.6, p.241-245, 2002.

NERILO, S. B.; MARTINS, F. A.; NERILO, L. B.; SALVADEGO, V. E. C.; ENDO, R. Y.; ROCHA, G. H. O.; MOSSINI, S. A. G.; JANEIRO, V.; NISHIYANA, P.; MACHINSKI JUNIOR, M. Pesticide use and cholinesterase inhibition in small-scale agricultural workers in southern Brazil. **Braz. J. Pharm. Sci.**,50(4). 2014.

NUNES, G. L. Microencapsulação por Spray Drying do Extrato Crioconcentrado de Erva Mate (*Ilex Paraguariensis* A. St. Hill) Empregando a Maltodextrina como Agente Encapsulante. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014 **of fish physiology: from genome to environment**. Ed: Elsevier, p. 2266, 2011.

- NWANI, C.D.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; LAKRA, W. S. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 36, n. 2, p. 539-547, 2013.
- OGUNSUYI, O. B.; OLAGOKE, O. C.; AFOLABI, B. A.; OBOH, G.; IJOMONE, O. M.; BARBOSA, N. V.; DA ROCHA, J. B. Dietary inclusions of Solanum vegetables mitigate aluminum-induced redox and inflammation-related neurotoxicity in *Drosophila melanogaster* model. **Nutritional neuroscience**, v. 25, n. 10, p. 2077-2091, 2022.
- OLIVEIRA, D.C.S.; AZEVEDO, P.G.F.; CAVALCANTI, L.A.P. Processos biológicos para o tratamento de efluentes: uma revisão integrativa. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 8, n. 18, p. 397-415, 2021.
- OLIVEIRA, J.M. de. Alterações morfofisiológicas em morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*) expostos à formulação comercial do inseticida deltametrina. 2017.
- OLIVEIRA, H. W.; VALDES, S.A.C. Frequência de micronúcleos em Tilápias *Oreochromis niloticus* (PERCIFORMES, CICHLIDAE) de pisciculturas no município de Matutina (MG), Brazil. **Revista do Comeia**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2019.
- OMS. The World Health Report 2000. **Geneva: WHO**; 2000.
- ORHAN, I.; ASLAN, M. Appraisal of scopolamine- induced anti-amnesic effect in mice and in vitro antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 327-332. 2009.
- PAZ, L.C.; SOARES, A.M.L.; TEIXEIRA, R.R.O.; SILVA, J.P.; FERREIRA, C.H.L.H.; TRINDADE, R.C.P. Toxicity of the organic extract from *Annona muricata* L. (Annonaceae) seeds on *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) In Cabbage Cultivation (*Brassica oleracea* L.). *Ciência Agrícola*, v. 16, p. 55, 2018.
- PELUSO, J.; ARONZON, C. M.; MOLINA, M. C. R.; ROJAS, D. E.; CRISTOS, D.; COLL, C. S. P. Integrated analysis of the quality of water bodies from the lower Parana River basin with different productive uses by physicochemical and biological indicators. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 1-10, 2020.
- PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos saúde e meio ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.
- PERRY, N.S.; HOUGHTON, P.J.; THEOBALD, A.; JENNER, P.; PERRY, E.K. 2000. In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by salvia lavandulaefolia essential oil and constituent terpenes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, p. 895-902. 2000.

- PICOLLO, M.I.; TOLOZA, A.Z.; MOUGABURE, C.G.; ZYGADLO, J.; ZERBA, E. Anticholinesterase And pediculicidal activities of monoterpenoids. **Fitoterapia**, v. 79, p. 271-278. 2008. INTO, AC de Q.; DA SILVA, Euzébio Medrado. **A cultura da graviola**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Embrapa-CPAC, 1995., 1995.
- PLACIDO, S.K.O. Estudo da eficiência da estação de tratamento de efluentes de uma indústria de extratos naturais. 2019.
- DE JESUS PORTO, M.; DE SOUZA, J. P.; COSTA, E. I. F. S.; OLIVEIRA, C. R. V.; DE SOUZA, M. D. F. S.; ARAUJO, A. M. B.; DE MENEZES SOUZA, J. Avaliação toxicológica: alterações em biomarcadores desencadeadas por exposição de trabalhador rural a agrotóxicos. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 1, pág. e26510111859-e26510111859, 2021.
- PREININGER, C.; SAUER, U.; BEJARANO, A.; BERNINGER, T. CONCEPTS AND APPLICATIONS OF FOLIAR spray for microbial inoculants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 102, p. 7265-7282, 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-018-9173-4>.
- PRICE, N.R.; WATKINS, R. W. Quantitative structure-activity relationships (QSAR) in predicting the environmental safety of pesticides. **Pesticide Outlook**, v.14, n.3, p.127-129, 2003.
- PUTRI, Y. R. P.; PRATAMI, D. K.; HERMANSYAH, H.; WIJANARKO, A.; SAHLAN, M. Study controlled release, toxicity test, and pesticide test of microcapsule eugenol with casein micelle. **AIP Conference Proceedings**, New York, v. 2085, n. 020015, 2019.
- RÉ, M. I. Formulating drug delivery systems by spray drying. **Drying Thecnology**, v. 24, n. 4, p. 433-446, 2006.
- RESENDE, M.C.; GAMA, R.A. Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxyfen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.1, p.72-75, 2006.
- RIBAS, P.P.; MATSUMURA, A.T.S.A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.
- RIBEIRO, M.L.; LOURENCETTI, C.; PEREIRA, S.Y.; MARCHI, M.R.R. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 30, n. 3, p. 688-694, 2007.
- RIBEIRO, N.U.F.; AMÉRICO-PINHEIRO, Juliana Heloisa Pinê. Peixes como bioindicadores de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Revista Científica ANAP Brasil**, v. 11, n. 22, 2018.

- RODRIGUES, B. K. **Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto MogiGuaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com Danio rerio (Cypriniformes, Cyprinidae)**. São Carlos, 2007. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2007.
- RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; GOLD-BOUCHOT, G. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine Environmental Research**, v. 58, p. 505–509, 2004.
- RODRIGUES, V. M.; VALENTE, E. C. N.; LIMA, H. M. A.; TRINDADE, R. C. P.; DUARTE, A. G. Avaliação de extratos de *Annona muricata* L. sobre *Aphis craccivora* Koch, 1854 (Hemiptera: Aphididae). **Revista Brasileira de Agroecologia**. 9(3):75-83, 2014.
- RODUAN, M.D. Extratos de folhas de *Annona muricata* previnem a tumorigênese da pele induzida por DMBA/TPA através da modulação do sistema de enzimas antioxidantes em camundongos ICR. **Biomedicina & Farmacoterapia**, v. 94, p. 481-488, 2017.
- SANCHES, A.L.M. Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de seus metabólitos em lambaris (*Astyanax* sp.): testes de toxicidade, marcadores de estresse oxidativo, marcadores genotóxicos e enzimas de biotransformação. 2014.
- SANTOS, L.; TRINDADE, R.C.P.; SANTOS, D.S.; DIAS, M.S.; BROGLIO, S.M.F LEMOS, E.E.P. Effect of anonaceous extracts on *Aphis gossypii* (Glover, 1887) (Hemiptera: Aphididae) and selectivity to *Eriopsis connexa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Coccinellidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, e36267, 2018.
- SANTOS, R.C.; FAYAL, A.S.; AGUIAR, A.E.F.; VIEIRA, D.B.R.; PÓVOA, M.M. Avaliação do efeito residual de piretróides sobre anofelinos da Amazônia brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v.41, n.2, p.276-283, 2007.
- SIES, H.; JONES, D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 21, n. 7, p. 363-383, 2020.
- SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v.68, p.369-392, doi:10.1016/j.aquatox.2004.03.016, 2004.
- SCOTTER, M. J. Characterisation of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. **Food Chemistry, Norwich**, v. 53, n. 2, p. 177-185, 1995.
- SCOTTER, M. J. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, London, v. 26, n. 8, p.1123-1145, 2009.

- SILVA, D.S.D; OLIVEIRA, P.E.G.D.; OLIVEIRA, M.A.F; MARTINS, J.E.R; ALVES, J.O; CECCATTO, V.M. Defesa antioxidante no fígado de ratos Wistar pós influenciado por Alopurinol. **Ciência Anim.(Impr.)** , p. 60-64, 2019.
- SILVA, F.; SILVA, T. J. ; SILVA, J.M ; TENÓRIO, B. M. ; TENORIO, F ; SANTOS, E. L ; MACHADO, S.S; SOARES, E. C. Evaluation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings exposed to the pesticide pyriproxyfen. Latin American. **Journal of Aquatic Research**, v. 48, p. 826-835, 2020.
- SILVA, J.P da. Microcápsulas de extrato de *Annona muricata* L. (Annonaceae): desenvolvimento, caracterização e aplicação no controle de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (Tese). 2018.
- SILVA, M. N. dos S. **Avaliação de adsorventes preparados a partir de sementes de graviola na remoção de corantes têxteis** (Trabalho de Conclusão de Curso). 2023.
- SISINNO, C.L.S.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. **Princípios de toxicologia ambiental**. Interciência, 2021.
- SYNGAI, G. G.; DEY, S.; BHARAL, R. Evaluation of toxicity levels of the aqueous extract of *allium sativum* and its effects on the behavior of juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758). **Asian J Pharm Clin Res**, v. 9, n. 3, p. 417-421, 2016.
- SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; WEINER, M. L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v.171, n.1, p.3-59, 2002
- SOUSA, M.H.O. de. **Prospecção fitoquímica, identificação e avaliação da atividade microbiológica de metabólitos secundários de *Annona mucosa* Jacq.** 2017.
- DA SILVA SOUZA, R.; TEJERINA-GARRO, F. L.; ROCHA, C.; ZARA, L. F.; GONCALVES-JUNIOR, A. C. Trace elements in the water and fish of tropical watercourses in central Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 3, 2016.
- SOUZA, S.P.; VALVERDE, S.S.; DA SILVA, R.L.N.R.; LIMA, K.S.C.; LIMA, A.L.S. Óleos essenciais como inibidores da acetilcolinesterase. **Revista Fitos**, [S.l.], v. 7, n. 4, p. 259-266, 2012.
- SPENCER, C. I.; YUILL, K. H.; BORG, J. J.; HANCOX, J. C.; KOZLOWSKI, R. Z. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.298, n.3, p.1067-1082, 2001.

- SPORLEDER, M.; LACEY, L. A. BIOPESTICIDES. In: ALYOKHIN, A.; VINCENT, C.; GIORDANENGO, P. (Eds.). **Insect Pests of Potato**. London: Elsevier Inc., 2013. p. 463-497. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386895-4.00016-8>.
- SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M, SOLD, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p.12-20, 2006.
- SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/docstec/seguranca/cap12cla.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2007.
- TAMANHO, N. Efetividade do marcador micronúcleo em peixes expostos a agrotóxicos: uma revisão integrativa. 2022.
- THAKORE, Y. The biopesticide market for global agricultural use. **Industrial Biotechnology, New Rochelle**, v. 2, p. 194-208, 2006.
- TIWARI, S.; GOEL, A.; JHA, K. K.; SHARMA, A. Microencapsulation techniques and its application: a review. **The Pharma Research**, v. 3, n. 12, 2010.
- TRINDADE, C. S. F.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Review: microencapsulation of food ingredients. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-109, 2008.
- TRINDADE, R.C.P.; GOMES, I.B.; LEMOS, E.E.P.; SANTANA, A.E.G.. Toxicity of soursop extracts to diamondback moth. *Bioscience Journal*, p. 104-111, 2018.
- TRINDADE, R.C.P.; LUNA, J.S.; LIMA, M.R.F.; SILVA, P.P.; SANTANA, A.E.G. Larvicidal Activity and Seasonal Variation of *Annona muricata* (L.) Extract on *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Revista Colombiana de Entomología*, v. 37, p. 58-62, 2011.
- TURCHEN, L.M.; COSME-JÚNIOR, L.; GUEDES, R.N.C. Plant-derived insecticides under meta-analyses: status, biases, and knowledge gaps. **Insects**, v. 11, n. 8, p. 532, 2020.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2010, Solid waste and emergency response glossary--Bioaccumulation: U.S. Environmental Protection Agency, acesso em 28 de maio de 2023.
- VALENTINE, W. M. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.20, n.2, p.375-382, 1990.
- VIRAN, R. et al. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.55, p.82-85, 2003.
- VOUTSAS, E.; MAGOULAS, K.; TASSIOS, D. 2002. Prediction of the biaccumulation of persistent organic pollutants in aquatic food webs. **Chemosphere**, v. 48, p. 645-651, 2002.

WAYNE, G. LANDIS; RUTH, M., SOFIELD., MING-HO, YU., WAYNE, G., LANDIS. Introduction to **Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems**, Third Edition. 2003.

WESTFALL, T. C.; WESTFALL, D. P. Em Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica, 10a. Ed.; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., eds.; **Mc Graw Hill**, v. 6, 2006.

WINKALER, E.U. Aspectos ecotóxicológicos dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Tese). 2008.

ZAITOON, A.; LIM, L.; SCOTT-DUPREE, C. Activated release of ethyl formate vapor from its precursor encapsulated in ethyl Cellulose/Poly(Ethylene oxide) electrospun nonwovens intended for active packaging of fresh produce. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 112, p. 106313, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106>.

ZAGATTO, Pedro A. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. **Seminário Sobre Ecotoxicologia Aquática**, 2015.