



Ministério da Educação

Universidade Federal de Ouro Preto



Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental - ProAmb

MARIANA LAIZ SILVA DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO AGROTÓXICO ACEFATO UTILIZANDO O
MODELO ANIMAL ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Ouro Preto, MG

2023

MARIANA LAIZ SILVA DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO AGROTÓXICO ACEFATO UTILIZANDO O
MODELO ANIMAL ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental – Área de concentração: Toxicologia do Meio Ambiente. Sob orientação da: Prof^a. Dr^a. Maria Elvira Poleti Martucci, e co-orientação da: Prof^a. Dr^a. Karina Taciana Santos Rubio.

Ouro Preto, MG

2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

L732a Lima, Mariana Laiz Silva de.
Avaliação da exposição ao agrotóxico acefato utilizando o modelo animal Zebrafish (Danio rerio). [manuscrito] / Mariana Laiz Silva de Lima. - 2023.

83 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elvira Martucci.

Coorientadora: Profa. Dra. Karina Taciana Rubio.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Área de Concentração: Meio Ambiente.

1. Agroquímicos. 2. Metabolômica. 3. Zebrafish. 4. Testes de Toxicidade. I. Martucci, Maria Elvira. II. Rubio, Karina Taciana. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 502:004

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE MINAS
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL



FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Laiz Silva de Lima

Avaliação da exposição ao agrotóxico acefato utilizando o modelo animal *zebrafish* (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre

Aprovada em 03 de agosto de 2023

Membros da banca

Doutora - Maria Elvira Poleti Martucci - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora - Karina Taciana Santos Rubio - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora - Mônica Cristina Teixeira - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora - Marina Amaral Alves - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Maria Elvira Poleti Martucci, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 30/01/2024



Documento assinado eletronicamente por **Maria Elvira Poleti Martucci, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 30/01/2024, às 13:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0660274** e o código CRC **4BDC16FA**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.001670/2022-54

SEI nº 0660274

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35402-163
Telefone: (31)3559-1725 - www.ufop.br

AGRADECIMENTOS

Ao meu ver, os agradecimentos deveriam ser obrigatórios diante de tantas dificuldades e falta de incentivo em seguir a carreira acadêmica. Tenho reconhecimento da minha determinação, porém, a realização deste trabalho não seria possível sem aqueles a quem tanto devo agradecer.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pois sem a base da minha fé teria sido muito difícil realizar este trabalho, principalmente no âmbito psicológico.

À minha família, especialmente meu pai, por todo amor, exemplo de garra e por sempre acreditar em mim. Aos amigos, principalmente à Isabella F. e Jéssika T, que tanto me apoiaram e incentivaram, especialmente nos momentos em que mais duvidei de mim mesma, lembrando que todos nós temos dificuldades, que devemos aprender com os erros e não desistir de se tornar cada vez melhor naquilo que almejamos.

Aos alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Toxicologia (TOX-EFAR), especialmente ao Lucas, por me auxiliar nos experimentos, pela oportunidade de poder lhe ensinar e me fazer perceber o prazer que tenho em transmitir conhecimento. Ao Laboratório LADETEC da UFRJ pela colaboração, permitindo a utilização de seus equipamentos para minhas análises.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro e fomento à pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PROAMB), por toda estrutura, ensinamentos e disposição em nos ajudar.

Agradeço à minha coorientadora Dr^a. Karina Taciana Santos Rubio, por todas as oportunidades e auxílio. E por último, à minha orientadora, Dr^a. Maria Elvira Poletti Martucci. Agradeço a ela por todas as oportunidades de experimentos que me proporcionou, pelos aprendizados, por sua paciência com meus erros e compreensão com minhas dificuldades na vida pessoal e acadêmica. Às duas, agradeço por serem grandes exemplos de educadoras, pesquisadoras e mulheres.

RESUMO

Dentre os agrotóxicos mais vendidos no Brasil, encontra-se o acefato. Tal substância é um organofosforado com período de meia-vida de 3 a 6 dias. Após esse período, ele é convertido em metamidofós. Estudos relacionam ambas as substâncias com sintomas de toxicidade aguda, genotoxicidade, neurotoxicidade e toxicidade reprodutiva. A União Europeia proíbe a detecção de ambos em água potável na concentração máxima de 0,1 µg/L. Entretanto, no Brasil, foi recentemente definido um valor máximo permitido (VMP) deste composto e do metamidofós em 7 µg/L. Percebe-se, que há necessidade de estudos que analisem a exposição e metabolização deste composto em água, uma vez que, no Brasil, o acefato é muito utilizado, e apresenta poucos estudos relatando sua biotransformação em animais aquáticos e possíveis biomarcadores de exposição. Neste sentido, *Zebrafish* (*Danio rerio*) tem se tornado um bom modelo animal para avaliação da toxicidade, principalmente por ser um organismo com anatomia, fisiologia e desenvolvimento similares a vertebrados superiores; por proporcionar ensaios rápidos e baratos e por absorver facilmente substâncias presentes na água. Desta forma, este trabalho avaliou amostras de água dos aquários contendo acefato a 200 µg/L, e amostras de fígados dos zebrafish expostos ao acefato e ao metamidofós na concentração final de 100 µg/L. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução, utilizado a abordagem metabolômica, seguida de análises estatísticas multivariadas e univariadas. Os resultados sugeriram os metabólitos O,S- dimetilfosfotioato, monometilfosfato e O,O,S-trimetil fosfotioato como potenciais biomarcadores da exposição ao acefato. Além disso, foram detectadas alterações metabólicas endógenas no fígado dos animais exposto ao acefato e ao metamidofós, demonstrando alterações no organismo dos animais. Portanto, espera-se que o presente estudo auxilie o monitoramento de órgãos governamentais na detecção do acefato a partir dos biomarcadores encontrados e, em mais estudos de toxicidade dos metabólitos encontrados.

Palavras-chave: Metabolômica, Acefato, Biomarcadores de exposição, *Zebrafish*, Ensaio de Toxicidade.

ABSTRACT

Acephate is one of the best-selling pesticides in Brazil. This substance is an organophosphate with a half-life of 3 to 6 days. After this period, it is converted to methamidophos. Studies relate both substances with symptoms of acute toxicity, genotoxicity, neurotoxicity and reproductive toxicity. The European Union prohibits and tolerates the detection of both in drinking water at a maximum concentration of 0.1 µg/L. However, in Brazil, a maximum contaminant level (MCL) of this compound and methamidophos at 7 µg/L was recently defined. It is noticed that there is a need for studies that analyze the exposure and metabolization of this compound in water, since, in Brazil, acephate is widely used, and there are few studies reporting its biotransformation in aquatic animals and possible biomarkers of exposure. In this sense, Zebrafish (*Danio rerio*) has become a good animal model for assessing toxicity, mainly because it is an organism with anatomy, physiology and development similar to higher vertebrates; for providing fast and cheap assays and for easily absorbing substances present in water. Thus, this work evaluated aquarium water samples containing acephate at 200 µg/L, and zebrafish liver samples exposed to acephate and methamidophos at a final concentration of 100 µg/L. The samples were analyzed by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry, using the metabolomics approach, followed by multivariate and univariate statistical analyses. The results suggested the metabolites O,S-dimethylphosphothioate, monomethylphosphate and O,O,S-trimethyl phosphorothioate as potential biomarkers of acephate exposure. In addition, endogenous metabolic changes were detected in the liver of animals exposed to acephate and methamidophos, demonstrating changes in the body of animals. Therefore, it is expected that the present study will help the monitoring of government agencies in the detection of acephate from the biomarkers found and, in further studies of toxicity of the metabolites found.

Keywords: Metabolomics, Acephate, Exposure Biomarkers, Zebrafish, Toxicity Assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula Estrutural do Acefato.....	23
Figura 2: Estrutura química do acefato e do metamidofós.	24
Figura 3: Cromatograma da matriz de água para análise do acefato na amostra de seletividade.	46
Figura 4: Curva analítica do acefato a direita e do metamidofós na esquerda, na matriz de água.....	47
Figura 5: Curva analítica do acefato na matriz fígado.	48
Figura 6: Metabólitos formados a partir do acefato.	51
Figura 7: a) Cromatograma do acefato. b) Espectro Full MS do acefato. c) Espectro DDA-MS2 do acefato. d) Cromatograma do metamidofós. e) Espectro Full MS do metamidofós. f) Espectro DDA-MS2 do metamidofós. g) Cromatograma do O,S dimetilfosfotioato. h) Cromatograma do O,S dimetilfosfotioato. i) Espectro Full MS do O,S dimetilfosfotioato. j) Espectro DDA-MS2 do O,S dimetilfosfotioato.	54
Figura 8: a) Cromatograma do O,O,S-trimetil fosforotioato. b) Espectro Full MS do O,O,S-trimetil fosforotioato. c) Espectro DDA-MS2 do O,O,S-trimetil fosforotioato. d) Cromatograma do monometilfosfato. e) Espectro Full MS do monometilfosfato. f) Espectro DDA-MS2 do monometilfosfato. g) Cromatograma do ácido fosfórico. h) Espectro Full MS do ácido fosfórico. I) Espectro DDA-MS2 do ácido fosfórico.	55
Figura 9: a) Cromatograma do acetamida. b) Espectro Full MS do acetamida. c) Espectro DDA-MS2 do acetamida. d) Cromatograma do ácido acético. e) Espectro Full MS do ácido acético. f) Espectro DDA-MS2 do ácido acético. g) Cromatograma do dimetildissulfeto. h) Espectro Full MS do dimetildissulfeto. I) Espectro DDA-MS2 do dimetildissulfeto.....	56
Figura 10: Concentração do acefato ao longo do tempo de exposição no grupo do tratamento.	58
Figura 11: Perfil de biotransformação do acefato (a). Ampliação dos metabólitos na Fig. A para visualizar (b).....	59
Figura 12: Comparações entre as concentrações dos metabólitos no tratamento e na estabilidade.	62

Figura 13: a) *Score plot* - Agrupamento das amostras analisadas do tratamento e do controle negativo (circuladas). b) *Loading plot* – Metabólitos analisados dentro da mesma faixa de valores que as amostras do tratamento em principal component 1 e 3..... 63

Figura 14: Score Plot – Separação dos grupos controle negativo e tratamento da matriz fígado com exposição de 28 dias. 66

Figura 15: Mapa de calor das amostras fígado do controle negativo (grupo a) e das amostras do tratamento (grupo b) da matriz fígado expostos durante 28 dias. 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ranking dos 10 agrotóxicos mais vendidos no Brasil em 2009 e 2020	15
Tabela 2: Uso agrícola do Acefato autorizado pela ANVISA.	22
Tabela 3: Detecções irregulares de Acefato nos últimos cinco anos de monitoramento.	25
Tabela 4: Estudos indicando contaminações em águas do Brasil.	25
Tabela 5: Divisão do Ensaio Crônico.	37
Tabela 6: Parâmetros utilizados no MSDial.	43
Tabela 7: Dados da relação sinal-ruído de acefato, metamidofós e proxifilina.	48
Tabela 8: Dados utilizados no parâmetro arraste.	49
Tabela 9: Valores de Coeficiente de variação da repetibilidade do acefato e do metamidofós nas matrizes utilizadas.	49
Tabela 10: Recuperação das amostras nas matrizes de água e fígado.	50
Tabela 11: Dados do acefato e seus metabólitos encontrados	52
Tabela 12: Parâmetros analisados na análise multivariada OPLS-DA.	64
Tabela 13: Metabólitos alterados de acordo com todos os parâmetros estatísticos analisados.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase

AESA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

AGC – Controle de ganho automático (do inglês, *Automatic Gain Control*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CG – Cromatografia Gasosa

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CV – Coeficiente de Variação

DDA – Aquisição dependente de dados (do inglês, *Data Dependent Acquisition*)

DDT – Dicloro-difenil-tricloetano

DIA – Aquisição Independente de Dados (do inglês, *Data Independent Acquisition*)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPR – Desvio Padrão Relativo

EFAR – Escola de Farmácia

ESI – Ionização por Eletrospray (do inglês, *Electrospray Ionization*)

FC – Análise de Mudança de Dobra (do inglês, *Fold Change*)

Heatmap – Mapas de Calor de Agrupamento Hierárquico (do inglês, *Hierarchical Clustering Heat Maps*)

IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IPCS – Programa Internacional de Segurança Química

IOMC – Programa Interorganizações para a Gestão de Produtos Químicos (do inglês, *Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals*)

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LC – Cromatografia Líquida (do inglês, *Liquid Chromatography*)

LMR – Limite Máximo de Resíduos

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MG – Minas Gerais

MS – Ministério da Saúde

MS/MS – Espectrometria de Massa em tandem (do inglês, *Tandem Mass Spectrometry*)

OECD – Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês, *Organisation for Economic Co-operation and Development*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PDP – Programa de Dados de Pesticidas (do inglês, *Pesticide Data Program*)

PIB – Produto Interno Bruto

PRM – Monitoramento de Reações Paralelas (do inglês, *Parallel Reaction Monitoring*)

Q-Orbitrap – Analisador Quadrupolo acoplado ao analisador Orbitrap

SI – Padrão interno

SIM – Monitoramento de Íon Selecionado

SISAGUA - Sistema de Informação de Monitoramento da Qualidade da Água

SPE – Extração em Fase Sólida (do inglês, *Solid-phase extraction*)

UE – União Europeia

US EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*)

VIGIAGUA – Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano

VMP – Valor Máximo Permitido

SUMÁRIO

1-	INTRODUÇÃO	14
2-	OBJETIVO	18
	2.1- Objetivos Específicos	18
3-	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
	3.1- Agronegócio e o Consumo de Agrotóxicos no Brasil	19
	3.2- Regulação e Monitoramento dos Agrotóxico.....	20
	3.3- Acefato	22
	3.4- Modelo Animal <i>Zebrafish</i>	27
	3.5- Análise Metabolômica	30
	3.6- Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas	32
	4.1- Reagentes e Aparatos	35
	4.2- Equipamentos Utilizados.....	35
	4.3- Preparo das Soluções	35
	4.4- Manejo e Tratamento do Modelo Animal <i>Zebrafish</i>	36
	4.4.1- Ética em Experimentação Animal	36
	4.4.2- Manutenção dos Animais	36
	4.4.3- Ensaio de Exposição Crônica dos Animais ao Acefato	37
	4.4.4- Ensaio de Biotransformação do Acefato.....	38
	4.5- Preparo das Amostras.....	39
	4.5.1- Amostras de Água.....	39
	4.5.2- Amostras do Órgão Fígado	39
	4.6- Análise Instrumental.....	40
	4.7- Validação do Método Analítico	41

4.8 - Detecção de metabólitos para monitorar a exposição ao Acefato	42
4.9 - Análise Metabolômica	43
4.9.1 - Análise Alvo em Matriz Água.....	43
4.9.2 - Análise Global em Matriz Fígado	44
5.1- Validação das matrizes de Água e Fígado	46
5.2 – Análise do Ensaio de Biotransformação do Acefato	51
5.2.1 - Perfil Metabólico do Acefato	58
5.2.2 – Comparação entre a formação de metabólitos a partir do acefato no tratamento e na estabilidade	60
5.2.3 - Análise Metabolômica Alvo do Ensaio de Biotransformação	63
5.3 – Análise Metabolômica Global do Ensaio de Exposição Crônica.....	65
6 - CONCLUSÃO:	70
7 - BIBLIOGRAFIA:.....	71

1- INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são utilizados para proteger as culturas de pragas e doenças nocivas aos seres humanos. O resultado benéfico desta proteção, tornou estes produtos uma importante ferramenta para manter o padrão de vida atual da humanidade. Entretanto, tais substâncias apresentam potenciais efeitos prejudiciais ao meio ambiente e aos animais. (SHARMA et al., 2019).

Com o desenvolvimento da agricultura intensiva, o uso de agrotóxicos vem aumentando progressivamente em todo o mundo. Dentre os agrotóxicos mais utilizados, pode-se destacar os herbicidas e inseticidas, que representam 47,5% e 29,5% do total consumido, respectivamente. Os organofosforados (OPs) são os inseticidas mais utilizados em todo o mundo, respondendo por 45% do total no mercado mundial. Entre os países de maior consumo desses produtos, destaca-se o Brasil (MALI et al., 2022; SYAFRUDIN et al., 2021).

No Brasil, em 2021, constava-se o registro de 499 princípios ativos aprovados para o uso. No ano de 2019, foram comercializadas mais de 600 mil toneladas de princípios ativos de agrotóxicos. Cabe ressaltar que, mesmo quando o agrotóxico é aplicado seguindo as boas práticas agrícolas, uma parte ainda pode ser dispersa na atmosfera e infiltrar no solo, águas superficiais, subterrâneas e aquíferos, prejudicando a qualidade da água para uso humano (BRASIL, 2021a, 2023; DE OLIVEIRA; AGOSTINETTO; SIEGLOCH, 2023; IBAMA, 2022).

Para garantir a qualidade da água no Brasil, o Ministério da Saúde coordena o Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água Potável (VIGIAGUA) com o objetivo de monitorar possíveis contaminantes na água. Os dados sobre a qualidade da água são introduzidos no programa pelas secretarias estaduais e municipais de saúde por meio de um banco de dados denominado SISAGUA (Sistema de Informação de Monitoramento da Qualidade da Água) (BARBOSA; SOLANO; UMBUZEIRO, 2015).

De acordo com (BROVINI et al., 2023), no período de 2018 a 2021 foi realizado um estudo descritivo sobre os dados coletados pelo VIGIAGUA, na

qual o sistema notificou que 719 dos municípios brasileiros (12,9%) apresentaram agrotóxicos em água doce, sendo que 179 (3,2%) tiveram detecção acima do valor máximo permitido em água.

Além das formas previamente citadas, há outros modos de monitoramento de agrotóxicos no país. Um deles é o controle de comercialização sob responsabilidade do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). O Instituto possui um sistema de dados para controlar o volume de pesticidas comercializados no país. De acordo com os relatórios realizados pelo IBAMA, desde 2009 é demonstrado um ranking dos 10 ingredientes ativos entre os agrotóxicos mais vendidos (Tabela 1) (IBAMA, 2022). Dentre os mais vendidos encontra-se o pesticida acefato, que em 2009 ocupava a 7ª posição entre os mais vendidos, no total de 5.204,89 toneladas e em 2020 passou a ser o 5º mais vendido, com um total de 29.982,50 toneladas.

Tabela 1: Ranking dos 10 agrotóxicos mais vendidos no Brasil em 2009 e 2020

OS 10 ingredientes ativos mais vendidos 2009			OS 10 ingredientes ativos mais vendidos 2020		
Unidade de medida: toneladas de IA			Unidade de medida: toneladas de IA		
Ingrediente Ativo	Vendas (ton. IA)	Ranking	Ingrediente Ativo	Vendas (ton. IA)	Ranking
Glifosato e seus sais	118,484.57	1º	Glifosato e seus sais	246,017.51	1º
Óleo mineral	32,634.09	-	2,4-D	57,597.57	2º
Óleo vegetal	13,422.60	-	Mancozebe	50,526.87	3º
2,4-D	12,116.12	2º	Atrazina	33,321.11	4º
Enxofre	11,514.80	3º	Acefato	29,982.50	5º
Metamidofós	10,774.80	4º	Clortalonil	24,191.03	6º
Atrazina	10,133.80	5º	Malationa	15,702.11	7º
Carbendazim	6,712.59	6º	Enxofre	11,390.90	8º
Acefato	5,204.89	7º	Imidacloprido	9,401.65	9º
Tiofanato-metílico	3,754.32	8º	Clorpirifós	8,864.88	10º

Fonte: Elaborada pela autora com base em (IBAMA, 2022)

O acefato (O,S-dimetil-N-acetilfosforamidotoato) é um inseticida organofosforado amplamente aplicado para proteger vegetais e frutas de traças e pulgões. Esta classe de agrotóxico é constituída por inibidores de forma irreversível da enzima acetilcolinesterase, responsáveis por degradar o neurotransmissor acetilcolina (ACHE) e regular os efeitos colinérgicos no sistema nervoso. No entanto, assim como os insetos, os mamíferos e outros animais também possuem a enzima acetilcolinesterase, podendo ser afetados

pelos efeitos tóxicos do acefato, quando expostos aos agrotóxicos dessa classe (WANG et al., 2020).

Seu uso foi parcialmente restringido em muitos países devido à toxicidade do seu produto intermediário o metamidofós. A exposição prolongada ao acefato e ao metamidofós em seres vivos não-alvos tem despertado a preocupação pública devido a sua toxicidade (LIN et al., 2020).

Desta forma, diversos estudos analisaram a toxicidade do acefato e do metamidofós. Um estudo utilizando o modelo animal *zebrafish*, observou que o cérebro é um importante alvo da toxicidade do metamidofós, revelando a sua potencial neurotoxicidade para espécies aquáticas e, possivelmente, para os humanos (HE et al., 2016; PENG et al., 2015).

Nos últimos 30 anos, o *zebrafish* tem sido utilizado para analisar o metabolismo de xenobióticos, em diferentes áreas. Nos primeiros anos, os estudos se concentraram na toxicologia ambiental e no impacto desses contaminantes e seus metabólitos gerados no meio ambiente. Depois, devido a semelhança com os processos de biotransformação dos seres humanos, passaram a comparar a toxicidade de diversas substâncias no *zebrafish* com a toxicidade nos seres humanos (DE SOUZA ANSELMO et al., 2018).

Em geral, os estudos que avaliaram a formação de metabólitos de xenobióticos em *zebrafish* observaram diversos metabólitos de fase I e fase II, demonstrando a utilidade do modelo na predição do metabolismo de diversas substâncias. Há evidências de que o *zebrafish* expressa genes e proteínas com atividades responsáveis pelo metabolismo xenobiótico por metabolismo semelhante aos mamíferos (DE SOUZA ANSELMO et al., 2018).

Um exemplo, é o estudo onde os autores avaliaram a capacidade do *zebrafish* adulto de produzir metabólitos de sibutramina e estanozolos após exposição *in vivo*, na qual foram identificados derivados desmetilados, hidroxilados, desidroxilados, reduzidos e conjugados de estanozolol, todos já detectados na urina humana. Este estudo sugere que este animal adulto pode absorver, oxidar e excretar vários metabólitos de maneira semelhante aos humanos (SOUZA ANSELMO et al., 2017).

Nesse sentido, o *zebrafish* (*Danio rerio*) tem se tornado um excelente modelo animal para avaliação da toxicidade, principalmente por ser um organismo com anatomia, fisiologia e desenvolvimento similares a vertebrados superiores; por proporcionar ensaios rápidos e baratos e por absorver facilmente substâncias presentes na água (DE SOUZA ANSELMO et al., 2018; OTTE et al., 2017). Vários estudos demonstraram a geração de metabólitos pelo *zebrafish* a partir de contaminantes ambientais (MODICK et al., 2016; REE et al., 2015; WANG et al., 2017). Recentemente, (COSTA et al., 2022) detectaram metabólitos de fase I e de fase II do carbendazim na água do aquário contendo *zebrafish*, determinando potenciais alvos analíticos para o monitoramento do carbendazim em água.

Uma das formas de analisar esses metabólitos é por meio da abordagem metabolômica, a qual utiliza técnicas analíticas sensíveis e de alta resolução, combinadas com análises estatísticas (MARCHEV et al., 2021). Uma técnica analítica utilizada amplamente para substâncias polares como o acefato é a Cromatografia Líquida (LC) acoplada a Espectrometria de Massa de Alta Resolução (HRMS). Esta combinação levou à introdução de novas abordagens e técnicas para análise quantitativa direcionada, graças aos modernos espectrômetros de massa híbridos de alta resolução, como o quadrupolo orbitrap-MS (Q-orbitrap-MS) (CAVALIERE et al., 2019).

A aplicação de técnicas cromatográficas com abordagem metabolômica permite avaliar a exposição ambiental de diferentes xenobióticos e identificar metabólitos formados, como possíveis alvos analíticos para monitoramento da exposição a contaminantes (COSTA et al., 2023; HAO et al., 2012).

Diante do apresentado e frente à necessidade de se conhecer melhor o perfil metabólico do agrotóxico acefato e seus metabólitos, este trabalho avalia a metabolização do acefato e possíveis alterações no organismo de animais, utilizando o modelo animal *zebrafish*. Para tal, foram analisadas amostras de água do aquário e dos órgãos dos animais expostos por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS), seguida por análises estatísticas multivariadas e univariadas, utilizando a abordagem metabolômica.

2- OBJETIVO

Avaliar a exposição do zebrafish ao acefato.

2.1- Objetivos Específicos

- Avaliar a biotransformação e o perfil metabólico do acefato por meio de análise de amostras de água dos aquários com os peixes;
- Comparar o perfil metabólico do acefato em amostras de água na ausência e presença dos peixes;
- Avaliar possíveis alterações metabólicas no fígado do *zebrafish* a partir de uma exposição crônica ao acefato e metamidofós, na concentração detectada em recursos hídricos no Brasil.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Agronegócio e o Consumo de Agrotóxicos no Brasil

O agronegócio envolve desde áreas de produção agropecuária até processos de manutenção, vendas e fiscalização, distribuídos por muitos países (CARNEIRO et al., 2015). De acordo com os cálculos do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA), em 2020 a participação do agronegócio no Produto Interno Bruto (PIB) total do Brasil foi de 26,6%. Quando se analisa esta porcentagem no PIB como um todo, a participação majoritária é da agricultura que corresponde a 68%, enquanto a pecuária corresponde a 32%. O agronegócio é, portanto, um dos pilares da economia brasileira (BARROS; LUCCHI; MINARÉ, 2022).

O Brasil é o segundo país que mais exporta produtos agrícolas no mundo. Para manter uma ampla produção agrícola, o agronegócio utiliza sementes transgênicas e insumos químicos, como fertilizantes e agrotóxicos (PIGNATI et al., 2017). A fim de manter tal posição, o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos desde 2008 e vêm aumentando cada vez mais a liberação e utilização de tais compostos (MATTEI; MICHELLON, 2021). Em 2021, foram aprovados 499 novos agrotóxicos, dentre os quais 422 (84,5%) são químicos e 77 (15,5%) são biológicos (REZENDE-TEIXEIRA et al., 2022).

Além do número de produtos aprovados, em 2020 foram utilizadas mais de 600 mil toneladas de ingredientes ativos, o que representa um aumento de 10,5% em relação a 2019. Entre os agrotóxicos autorizados, 60,4% são herbicidas, 15,8% fungicidas e 11,8% inseticidas (BROVINI et al., 2021).

Tal aumento no consumo dos agrotóxicos tem se tornado uma grande preocupação de organizações mundiais, como da Organização Mundial de Saúde (OMS), do Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e do Programa Interorganizações para a Gestão de Produtos Químicos (IOMC), e meios acadêmicos, os quais vêm alertando e ressaltando a importância de produzir alimentos para a população usando métodos éticos, sustentáveis e eficientes de uma maneira segura para os seres humanos e o meio ambiente. Dentre essas preocupações, há vários desafios relacionados com os

lançamentos dos agrotóxicos diretamente no meio ambiente (DA SILVA et al., 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

A utilização destes produtos químicos gera resíduos que podem apresentar impactos ambientais. São considerados resíduos quando, após a aplicação nas lavouras agrícolas, seguem para além da área cultivada por meio de transportes como carreamento superficial, lixiviação e volatilização. A lixiviação dos agrotóxicos ocorre através do solo, resultando na contaminação das águas subterrâneas. Já o carreamento superficial influencia diretamente na contaminação das águas de superfície, com o agrotóxico adsorvido às partículas do solo erodido ou em solução (MINGOTI; SPADOTTO; MORAES, 2016).

Outro problema que pode aumentar a presença dessas substâncias no ambiente é a reutilização, o descarte ou a destinação inadequada das embalagens vazias, que favorecem a contaminação. Apesar da obrigatoriedade dos agricultores devolverem essas embalagens aos estabelecimentos comerciais, prevista pela Lei 9.974 desde 6 de junho de 2000, a maior parte ainda não é recolhida e, portanto, não é devolvida (BRASIL, 2000).

3.2- Regulação e Monitoramento dos Agrotóxicos

De acordo com a Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, o registro de um agrotóxico é feito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que verifica a eficiência no combate a pragas e doenças no campo. Entretanto, o registro só é concedido quando o produto também é autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que avalia os riscos à saúde, e pelo IBAMA, que analisa os perigos ambientais. Sem o aval dos três órgãos, o agrotóxico não é liberado (BRASIL, 1989).

Um ponto a ser destacado é que, no Brasil, conforme dados de pesquisas são publicados, o agrotóxico analisado passa por uma reavaliação ou identificação de irregularidades e fraudes para restringir ou proibir a sua utilização, caso seja necessário. Nesse processo, a ANVISA, o IBAMA e o MAPA avaliam cada produto em termos do potencial de danos à saúde humana, periculosidade ambiental e queda de eficiência agronômica, respectivamente. A decisão é baseada em estudos científicos independentes, dados

epidemiológicos e dados gerados por empresas, conforme previsto na Instrução Normativa Conjunta nº 2 de 2006 (BRASIL, 2006).

Entretanto, em 2002 o Projeto de Lei 6.299, também chamado de “Lei do Veneno”, foi proposto pelo Senado brasileiro com o intuito de centralizar a avaliação dos registros de agrotóxicos no MAPA e, desta forma, agilizar os processos de liberação desses produtos no país. No início de fevereiro de 2022, foi aprovada pela Câmara dos Deputados a proposta de lei PL 6299/2002. Pela proposta, o termo “agrotóxico” deixa de existir e, entra em seu lugar a expressão “produto fitossanitário”, o que dificulta a percepção do real perigo desses produtos. Além disso, a responsabilidade por conceder registros de novos agrotóxicos caberá somente ao Ministério da Agricultura. Em relação as avaliações sobre os perigos ambientais e os riscos à saúde humana, caberia às próprias empresas interessadas em vender os agrotóxicos, a missão de apresentar tais avaliações (BRASIL, 2002).

Essas mudanças geram mais preocupações em relação a contaminação do meio ambiente pelos agrotóxicos e aos riscos pela exposição aos seres vivos. Uma das principais preocupações a respeito do uso de agrotóxicos é a contaminação de recursos hídricos (LOPES; DE ALBUQUERQUE, 2021).

O controle destes compostos em água potável é realizado pelo Ministério da Saúde (MS) por meio do VIGIAGUA. Este programa tem como objetivo auxiliar no gerenciamento de riscos à saúde associados ao abastecimento de água para consumo humano no país, estabelecido no Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5/2017 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017), alterado pela Portaria GM/MS nº 888, de 04 de maio de 2021.

Na Portaria GM/MS nº 888 de 04 de maio de 2021, foi estabelecido um padrão de potabilidade para 40 agrotóxicos e seus metabólitos que representam risco à saúde. Dentre os compostos que foram recentemente incluídos, encontram-se o acefato e seu metabólito metamidofós. O Valor Máximo Permitido (VMP) em água para o acefato e seu metabólito majoritário metamidofós ficou definido na concentração final de 7 µg/L (BRASIL, 2021b). Entretanto, a União Europeia proíbe a utilização de acefato em culturas de alimentos e tolera a detecção em água potável na concentração máxima de 0,1

$\mu\text{g/L}$ (EUROPEAN UNION, 1988). É perceptível que, o VMP permitido na União Europeia é 70 vezes mais baixo que o valor permitido no Brasil, o que demonstra ser um valor alto considerado na legislação brasileira.

3.3- Acefato

No Brasil, o acefato está presente como ingrediente ativo de 19 produtos de diversas formulações, mas sua comercialização mais comum é sob os nomes fantasia Orthone 750® e Nortox® (GOTTEMS, 2017). Este ingrediente ativo, cuja a nomenclatura IUPAC é O,S-dimetil acetilfosforoamidotoato, pertence a classe dos inseticidas e acaricidas, que combatem insetos e ácaros. De acordo com a ANVISA, a Ingestão Diária Aceitável (IDA) do acefato é até 0,0012 mg/kg, porém ele não possui um valor único para o Limite Máximo de Resíduos (LMR) e intervalos de segurança para as aplicações em culturas de alimentos, conforme a tabela 2.

Tabela 2: Uso agrícola do Acefato autorizado pela ANVISA.

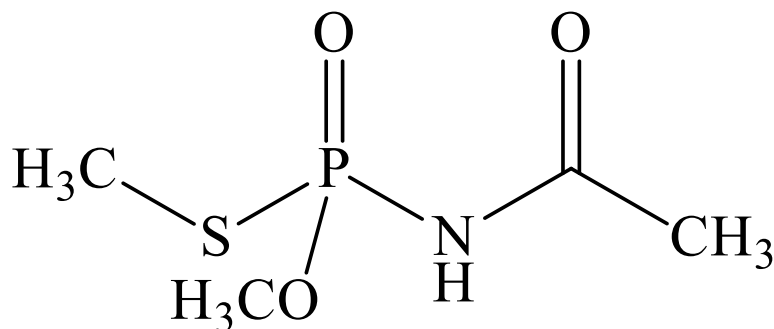
Culturas	Modalidade de Aplicação	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança
Algodão	Foliar	0,03	21 dias
	Sementes		1 mês
Amendoim	Foliar	0,02	14 dias
Batata	Foliar	0,1	21 dias
Citros	Foliar	0,2	21 dias
Feijão	Foliar	0,02	14 dias
	Sementes		1 mês
Melão	Foliar	0,1	14 dias
Milho	Foliar	0,02	35 dias
Soja	Foliar	0,02	21 dias
	Sementes		1 mês
Tomate*	Foliar	0,02	35 dias
LMR = Limite Máximo de Resíduo			
* Uso autorizado somente para tomate rasteiro, com fins industriais.			

Fonte: Elaborada pela autora com base em (ANVISA, 2018).

O acefato pertence ao grupo químico dos organofosforados, compostos orgânicos derivados de ácidos fosfóricos, que contêm pelo menos uma ligação

carbono-fósforo. No acefato, o átomo central de fósforo faz ligação dupla com um átomo de oxigênio, sendo esta estrutura dos organofosforados denominada forma *óxon* (Figura 1).

Figura 1: Fórmula Estrutural do Acefato.



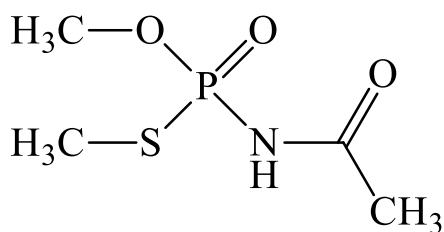
Fonte: Autoria Própria

Este grupo químico atua inibindo a enzima acetilcolinesterase, por meio de uma inibição irreversível, sendo a forma *óxon*, a forma inibidora direta, enquanto a forma *tion* (fósforo fazendo ligação dupla com enxofre) necessita passar por uma bioativação por reação de oxidação para inibir a enzima. A enzima acetilcolinesterase é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina presente nos insetos e em outros organismos (WANG et al., 2019). A inibição desta enzima faz com que ocorra uma acumulação de acetilcolina que, conseqüentemente, promove uma superestimulação dos receptores muscarínicos e nicotínicos, produzindo diversos efeitos no organismo relacionados ao sistema nervoso autônomo e central (AKYUZ et al., 2021).

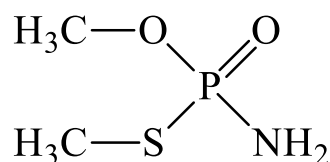
No ambiente, o acefato é rapidamente metabolizado a metamidofós, principal produto intermediário (SYED et al., 2014). Este, por sua vez, também foi utilizado como um inseticida, levando principalmente à inativação enzimática pela fosforilação dos resíduos de serina do sítio ativo da acetilcolinesterase (AChE). Tanto o acefato quanto o metamidofós (Figura 2) são hidrossolúveis, e com potência inseticida semelhante, mas toxicidade diferente em mamíferos. A maior toxicidade apresentada pelo metamidofós é devido a sua inibição mais potente da acetilcolinesterase em mamíferos. Os fatores associados a maior potência do metabolito majoritário são explicados pelas diferenças em suas

propriedades físico-químicas, orbitais moleculares e eletrônicas, que lhe atribuem uma maior toxicidade (LIN et al., 2020).

Figura 2: Estrutura química do acefato e do metamidofós.



Acefato



Metamidofós

Fonte: Autoria Própria

Devido a maior toxicidade do metamidofós, a ANVISA lançou, no Diário Oficial da União, a Resolução nº 143 de 14 de janeiro de 2011, a retirada do ingrediente ativo metamidofós do mercado brasileiro, considerando que no cenário internacional ele foi proibido em diversos países e teve severas restrições devido aos riscos para a saúde humana, como características neurotóxicas, imunotóxicas, toxicidade no sistema endócrino, reprodutor e no desenvolvimento embrionário (ANVISA, 2011).

Apesar disso, o acefato é autorizado para aplicações na agricultura. Em 2015, esse composto teve resíduos detectados acima do permitido pelo relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), mesmo após as restrições determinadas pela Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 45, de 2 de outubro de 2013 (ANVISA, 2013, 2016).

Em decorrência dos resultados observados no monitoramento em 2015, foram adotadas medidas restritivas a fim de mitigar o uso não autorizado do referido ingrediente ativo. Foram excluídas algumas culturas e proibido embalagens primárias inferiores a 1 kg e embalagens hidrossolúveis inferiores a 0,5 kg de produtos formulados à base de acefato (ANVISA, 2019).

Além dos relatórios gerados pelo PARA, em 2014 o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) publicou a Resolução nº 465, de 5 de dezembro de 2014, que Revoga a Resolução CONAMA nº 334/2003, dispondo sobre os requisitos e critérios técnicos mínimos necessários para o licenciamento ambiental de estabelecimentos destinados ao recebimento de embalagens de

agrotóxicos e afins, vazias ou contendo resíduos, fortalecendo a decisão tomada pela ANVISA no relatório de 2015 do PARA (ANVISA, 2016; CONAMA, 2014).

Apesar disso, no relatório de 2017/2018 do PARA verificou-se uma porcentagem de 6,8% de detecções irregulares do total de amostras analisadas para acefato, mesmo após as medidas restritivas adotadas no ano de 2015. Conforme a Tabela 3, percebe-se que houve um aumento no total de detecções irregulares nos últimos relatórios da ANVISA. Ao mesmo tempo, comparando com os anos de 2014 e 2015, o relatório do período 2017-2018 teve um aumento de amostras monitoradas, de modo que, a porcentagem de alimentos com detecções irregulares aparentou ser menor, sendo na verdade numericamente similar à de 2015 (ANVISA, 2019).

Tabela 3: Detecções irregulares de Acefato nos últimos cinco anos de monitoramento.

Ano	Nº de alimentos monitorados	Nº de amostras monitoradas	Nº total de amostras com detecções irregulares*	% de amostras com detecções irregulares*
2013	18	4.455	150	3,37%
2014	16	3.774	134	3,78%
2015	16	3.822	316	8,27%
2017/2018	14	4.616	314	6,80%

Fonte: Elaborada pela autora com base em (ANVISA, 2019)

Tais detecções de resíduos de pesticidas em nossos alimentos, solo e águas residuais levaram a uma crescente preocupação com o acúmulo destes compostos. Em vários países detectaram acefato e metamidofós nos sistemas hídricos superficiais e subterrâneos utilizados para consumo humano direto (MARINS et al., 2021).

No Brasil, estudos demonstraram resíduos de acefato e metamidofós em meio aquático, conforme é descrito na Tabela 4. A contaminação de recursos hídricos e as detecções irregulares em alimentos são fatores que impulsionaram alguns estudos para avaliar os efeitos tóxicos do acefato e do metamidofós.

Tabela 4: Estudos indicando contaminações em águas do Brasil.

Analito	Tipo de Água/ Local	Método Analítico	Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)	Referência
Acefato e Metamidofós	Água potável	LC- MS/MS	Acefato: LD: 0,03 µg/L LQ: 0,1 µg/L Metamidofós: LD: 0,03 µg/L LQ: 0,1 µg/L	(ZANDONÁ, 2019)

Acefato e Metamidofós	Água superficial	HPLC-ESI-MS (tipo TOF)	Acefato: LD: -- LQ: 123,8 ng/L Metamidofós: LD: -- LQ: 248,8 ng/L	(MOLINA, 2014)
Acefato e Metamidofós	Água superficial, SP	CG- NPD	Acefato: LD: 0,2 µg/L LQ: 0,4 µg/L Metamidofós: LD: 0,2 µg/L LQ: 0,3 µg/L	(VIEIRA, 2012)
Acefato e Metamidofós	Água superficial e subterrâneas da Represa de Tinjuqueiro, Go	LC - MS/MS	Acefato: LD: 1,93 ng/L LQ: 5,86 ng/L Metamidofós: LD: 2,89 ng/L LQ: 8,76 ng/L	(ROCHA, 2011)
Metamidofós	Água superficial da Bacia do Rio Sorocaba, SP	HPLC-ESI-MS/MS (tipo QqQ)	LD: 2,46 ng/L LQ: 12,59 ng/L	(GUEDES, 2011)

Fonte: Autoria própria

Entre diversos estudos demonstrando toxicidade do acefato e do metamidofós, um teste realizado em ratos com doses altas de acefato e metamidofós demonstrou um aumento de dissacarídeos no sangue, metabolismo dos animais prejudicado, danos ao DNA, nas barreiras reprodutivas e desenvolvimento de câncer (RIBEIRO et al., 2016). Outro estudo em ratos expostos ao acefato apresentou distúrbios metabólicos, na qual alterações em alguns metabólitos endógenos levaram a danos nos rins e interromperam os processos metabólicos normais, incluindo alterações de glicose, do ácido nucleico e no metabolismo de proteínas (HAO et al., 2012).

Em um estudo somente com o metamidofós, ratos desenvolveram lesões no testículo, caracterizadas por obstrução da espermatogênese, e, epidídimo, apresentando edema grave (FARAG et al., 2012). Além disso, um estudo com metamidofós, observou alterações no DNA em diferentes estágios da espermatogênese e redução da qualidade do esperma em camundongos por meio da resposta acrossomal e diminuição da capacidade de fertilização (URIÓSTEGUI-ACOSTA et al., 2014).

Em humanos, o metamidofós aumenta a geração de estresse oxidativo em células mononucleares do sangue periférico (RAMIREZ-VARGAS et al., 2017). De modo semelhante, o acefato também exibe efeitos citotóxicos e genotóxicos no esperma, diminuindo a motilidade do esperma, a integridade da membrana celular e o volume do esperma (DHANUSHKA; PEIRIS, 2017).

Conforme os estudos supracitados, o uso generalizado de acefato e de metamidofós tem causado diversos efeitos tóxicos em mamíferos, porém esses efeitos não restringem somente a eles. A exposição ao metamidofós utilizando o

zebrafish pode afetar os genes do neurodesenvolvimento e ativar a apoptose intracelular, levando a danos neurais precoces no desenvolvimento do peixe (HE et al., 2016; PENG et al., 2015). No cérebro do *zebrafish*, o metamidofós revelou grande potencial de neurotoxicidade. Além disso, observou-se retardo no desenvolvimento embrionário do *zebrafish*, deformidades larvais e diminuição da tensão superficial coriônica induzidos por exposição ao acefato (LIU et al., 2018).

3.4 - Modelo Animal *Zebrafish*

O *Danio rerio* conhecido popularmente como *zebrafish* ou paulistinha é um peixe nativo do sul da Ásia. Eles são seres vivos sociais, isto é, gostam de viver em grupo, no entanto preferem formar cardumes pequenos. Além disso, são animais com padrão circadiano diurno, em que suas atividades comportamentais e biológicas dependem de uma padronização rigorosa da manhã e da noite (HARPER; LAWRENCE, 2016).

Para a manutenção destes animais, tanto a alimentação e a nutrição, como a qualidade da água tem grande impacto na saúde e produtividade do peixe, uma vez que influencia no seu desenvolvimento, imunidade, fisiologia, anatomia, comportamento e reprodução. Desta forma, os parâmetros de qualidade da água devem ser bem conhecidos e compreendidos. O pH da água pode variar de 6,0 a 8,5; a temperatura entre 26 e 28°C; a alcalinidade do meio entre 50 e 100 mg/L; a oxigenação deve estar acima de 4 mg/L e sem ou com mínima concentração de nitrito e amônia (LÓPEZ-OLMEDA; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2011).

Este modelo animal é bem reconhecido em pesquisas toxicológicas e pode ser usado para modelar a toxicidade de eventos moleculares de alterações na saúde e no comportamento do organismo. Ele pode ser usado para testes de toxicidade química de alto rendimento, permitindo uma triagem rápida e em larga escala semelhante aos ensaios *in vitro*. Ademais, os *zebrafish* são organismos complexos com vias metabólicas que permitem a avaliação da toxicocinética e toxicodinâmica de xenobióticos semelhantes aos modelos de mamíferos (HORZMANN; FREEMAN, 2018).

Devido ao seu tamanho pequeno e vida útil curta, eles exigem menos espaço e são mais econômicos para manutenção de laboratório em comparação

com outros organismos vertebrados, como o camundongo. Além disso, eles geram uma grande prole, e seus embriões possuem uma membrana protetora, o córion, transparente, o que facilita a visualização do desenvolvimento embrionário e possíveis alterações nos embriões. Outras vantagens desse modelo animal são devido ao seu ciclo curto de reprodução e a possibilidade de administrar substâncias por injeção intraperitoneal ou adicionando-as em água (WANG; CAO, 2021).

Diversos estudos utilizam este modelo animal, pois, além das vantagens citadas, eles possuem um genoma sequenciado parecido ao dos mamíferos. Um estudo do genoma do *zebrafish* verificou que 71% dos genes que codificam proteínas no genoma humano são correlacionados aos genes encontrados no genoma do *zebrafish*, e que destes, 84% dos genes conhecidos por serem associados a doenças humanas possuem um gene relacionado em *zebrafish* (HOWE et al., 2012). Eles possuem uma organização estrutural neural de vertebrados e todas as principais estruturas são semelhantes ao cérebro dos mamíferos.

Além disso, eles também possuem uma barreira hematoencefálica funcional semelhante aos humanos. Outra semelhança, é no perfil de neurotransmissores do *zebrafish*, o que é muito importante para estudos neurocientíficos (PANULA et al., 2010). Alguns estudos avaliam alterações comportamentais vinculadas à influência de diversas drogas, como o álcool. Estes estudos permitem estabelecer comparações com o comportamento humano (CLAYMAN; CONNAUGHTON, 2022).

Entretanto o *zebrafish* apresenta algumas desvantagens para sua utilização em pesquisas, como: dificuldade em obter anticorpos apropriados que reconheçam as proteínas do *zebrafish* para avaliação da toxicidade induzida por agrotóxicos (WANG et al., 2016), o desconhecimento sobre a genética de suas linhagens na qual proporciona a redução de possíveis variações em resultados experimentais devido ao conhecimento do seu padrão genético (KALUEFF; ECHEVARRIA; STEWART, 2014) e, de acordo com a OECD 236 e 305, na dificuldade de absorção dos animais ao serem expostos a substâncias apolares é necessário utilização de solvente, como dimetilsulfóxido a 0,1%. No entanto, se mesmo com a utilização do dimetilsulfóxido na maior concentração permitida

a substância de interesse apresentar baixa solubilidade é inviável a realização do experimento (SOBANSKA et al., 2018).

Embora o *zebrafish* seja muito utilizado para investigar os mecanismos de ação de xenobióticos e avaliar toxicidade ambiental, nos últimos anos ele se tornou um modelo excelente na triagem de toxicidade química, no desenvolvimento de novos fármacos e em estudos de neurotoxicidade comparados aos humanos. Desta forma, este modelo animal tem desempenho comparável aos modelos de mamíferos em ensaios de toxicidade de desenvolvimento. Tal comparação no desempenho desses modelos varia de 55% a 100% (HORZMANN; FREEMAN, 2018).

Em avaliações de toxicidade ambiental, as primeiras publicações que verificaram a geração de metabólitos pelo *zebrafish*, demonstraram vias de biotransformação de xenobióticos, desempenhando um papel fundamental nos programas de monitoramento ambiental (DE SOUZA ANSELMO et al., 2018).

A biotransformação de xenobióticos ocorre no fígado. No *zebrafish*, semelhante aos mamíferos, este órgão realiza diversas atividades vitais, como metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, desintoxicação e homeostase (MENKE et al., 2011; TAO; PENG, 2009). Assim como os mamíferos, o *zebrafish* tem a capacidade de realizar reações metabólicas de fase I e fase II com o intuito de tornar as moléculas mais hidrossolúveis e facilitar sua excreção. As enzimas da fase I consistem principalmente do citocromo P450 (CYP), uma superfamília de enzimas microsossomais, catalisando o metabolismo oxidativo e redutor de muitos produtos químicos e compostos endógenos (BROX et al., 2016; CHNG et al., 2012; DIEKMANN; HILL, 2013).

Dentro desta superfamília de enzimas CYP, o *zebrafish* possui enzimas com funções correspondentes às enzimas humanas, sugerindo que seus perfis metabólicos podem ser semelhantes aos dos mamíferos (GOLDSTONE et al., 2010).

Nas reações de fase II, os xenobióticos ou metabólitos das vias da fase I são conjugados enzimaticamente com um composto endógeno hidrofílico pelas

enzimas transferases. A glucuronidação é o principal metabolismo de fase II, com aproximadamente 40% a 70% dos compostos humanos endógenos e exógenos conjugados a formas glucuronidadas a serem excretadas do corpo (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2017). Em *zebrafish*, ocorre de forma bem semelhante a fase II, sendo a maior parte das conjugações realizadas por glucuronidação (CHRISTEN; FENT, 2014; HUANG; WU, 2010).

Alguns estudos observaram a produção *in vivo* de metabólitos de fase I e fase II durante diferentes estágios de vida do *zebrafish* usando, mostrando que o *zebrafish* é um modelo promissor que compartilha semelhanças e diferenças com os mamíferos (DE SOUZA ANSELMO et al., 2018).

Em estudo realizado por (PARDAL et al., 2014) foi avaliado o metabolismo dos compostos fenólicos resveratrol e seu derivado glicosídeo (*piceid*) *in vivo*, após exposição de larvas de *zebrafish* em meio dimetilsulfóxido 1% (v/v). Os principais metabólitos encontrados nas larvas do peixe foram as formas monoglicuronídeo e monossulfato do resveratrol (o metabólito mais abundante), o que ocorre de forma semelhante nos mamíferos, incluindo humanos.

O estudo realizado por (WANG et al., 2017) avaliou o metabolismo *in vivo* de seis organofosforados (OPs) retardadores de chama utilizando *zebrafish* adulto. Nesse trabalho, foram encontrados vários metabólitos de fase I e fase II, incluindo diésteres de OPs, triésteres de OPs hidroxilados, diésteres de OPs hidroxilados e metabólitos conjugados com ácido glicurônico, após hidroxilação, utilizando a abordagem da metabolômica.

3.5 - Análise Metabolômica

Dentre os estudos das abordagens “ômicas”, a metabolômica é uma caracterização sistemática em larga escala dos produtos de metabolismo de baixo peso molecular, uma ferramenta para a descoberta de biomarcadores, de delineamento de vias bioquímicas e de resposta a tratamentos de doenças e suas etiologias (YU et al., 2022). A análise metabolômica tem como objetivo identificar e quantificar os metabólitos de um determinado sistema biológico como resultado de fatores ambientais, de interações genéticas ou devido ao desenvolvimento de um organismo (MARCHEV et al., 2021).

A formação desses metabólitos é afetada tanto por exposições a substâncias exógenas como por processos endógenos (YU et al., 2022), nas quais, podem ocorrer mudanças quantitativas e/ou qualitativas dos metabólitos devido a correlação direta com o estado funcional da célula (DUBEY et al., 2018). Em vista disso, a ciência metabolômica pode auxiliar distintas áreas da ciência, como estudos na nutrição, na toxicologia, na farmacologia, na farmacognosia entre outras áreas (HARDER et al., 2020). De acordo com a necessidade de cada estudo, a abordagem metabolômica pode se dividir em análises alvo ou global.

Uma análise global (*untargeted*) é detectado o maior número possível de componentes da matriz, fornecendo uma visão mais ampla de todo o metaboloma e das alterações correlacionadas. Esta abordagem utiliza análises estatísticas para observar os padrões significativos de metabólitos nas amostras. Esses padrões permitem a classificação das amostras em um ou mais grupos de significância biológica fornecendo informações sobre a quantificação relativa dos metabólitos (DUMONT et al., 2020).

Já a metabolômica alvo (*targeted*), baseia-se em um conjunto predeterminado de compostos relacionados a uma via metabólica do analito de interesse. Esse tipo de análise inclui a possibilidade de quantificação absoluta dos níveis de metabólitos. Muitas vezes, as duas abordagens são utilizadas em conjunto devido ao seu padrão de varredura e capacidade de coletar grandes quantidades de dados em um curto espaço de tempo, proporcionando uma grande vantagem na descoberta de biomarcadores ou na elucidação de perfis metabólicos (MARCHEV et al., 2021).

Os dados gerados pela análise metabolômica são numerosos e complexos, a fim de manter a integridade das variações biológicas inspecionadas, é necessário utilizar ferramentas adequadas de tratamento de dados evitando possíveis erros. Diferentes análises estatísticas são usadas para extrair a informação relevante dos dados, através de métodos de análise multivariada e univariada (SUGIMOTO et al., 2012). Entre as análises estatísticas multivariadas, são aplicados métodos não supervisionados, como análise de componentes principais (PCA), e métodos supervisionados, como

análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) (CANUTO et al., 2017).

A PCA tem sido amplamente utilizado na metabolômica para obter uma visão geral e reconhecimento de padrões nos perfis metabólicos, indicando se há diferença entre os grupos comparados (HAO et al., 2012; XIAO; ZHOU, 2019). Enquanto, para analisar detalhadamente a alteração metabólica, são realizados métodos não supervisionados como a combinação dos mínimos quadrados parciais (PLS) com a análise discriminante (DA), a fim de estabelecer quais são os discriminantes (metabólitos) que melhor separam os grupos (LINDON; NICHOLSON, 2008).

A abordagem metabolômica tem avançado na capacidade de analisar o metaboloma por diferentes técnicas analíticas. Sendo a espectrometria de massas (MS) a técnica de análise mais usada, uma vez que proporciona análises rápidas, com alta sensibilidade e seletividade (CANUTO et al., 2017). A MS pode ser utilizada através da infusão direta, da ionização ou pela dessorção a laser assistida por matriz (MIRNEZAMI et al., 2014). Os constantes problemas de supressão de ionização dos sinais, decorrente de matrizes complexas, são contornados através do acoplamento com técnicas analíticas de separação, como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida (LC) (KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013).

Essas técnicas analíticas podem ser usadas rotineiramente para obter conjuntos de dados metabolômicos devido à sua versatilidade, faixa dinâmica, sensibilidade, acessibilidade etc. (DIEZ-SIMON; MUMM; HALL, 2019). Entretanto, o acoplamento da LC com a MS é atualmente a técnica mais utilizada na metabolômica para analisar metabólitos polares, como os metabólitos gerados na biodegradação do acefato (RANADE et al., 2022).

3.6 - Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

A escolha da técnica de separação depende das características do analito de interesse. A CG se aplica para compostos voláteis, semivoláteis e compostos termicamente estáveis. Enquanto as substâncias não voláteis e termicamente instáveis são mais indicadas para LC, que pode separar muitos compostos

similares sem a necessidade de derivatização da molécula de interesse. Um exemplo, são os analitos polares, que são termicamente instáveis ou não voláteis, priorizando a utilização de LC (SOUZA TETTE et al., 2016).

A LC tem como princípio a separação de misturas por duas fases: uma fase móvel líquida e, outra estacionária. A fase móvel é um solvente e a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna a qual é atravessada pela fase móvel. De acordo com as interações estabelecidas pelo analito com a fase móvel e a fase estacionária, os componentes da amostra são separados e ao passar por uma coluna de alta pressão. Esses componentes saem em diferentes momentos, ou seja, em tempos de retenção distintos, de acordo com a polaridade de cada um (WAHAB; ROY; ARMSTRONG, 2021).

Tem-se utilizado de forma recorrente o espectrômetro de massas, acoplado a uma técnica cromatográfica como, por exemplo, na detecção de análises dos agrotóxicos em água, permitindo a obtenção de limites de quantificação menores, bem como a confirmação dos compostos presentes na amostra ao gerar os seus espectros de massas. Além disso, possui maior seletividade e minimiza a necessidade de se obterem separações cromatográficas com grande resolução. Sendo assim, o espectrômetro de massas é de grande importância para fornecer informações estruturais para resultados mais confiáveis (CALDAS et al., 2010; SOUZA TETTE et al., 2016).

O espectrômetro de massas pode ser entendido como um instrumento contendo uma fonte de íons, seguido de um separador ou filtro de massas, que separa íons em função da razão massa sobre carga (m/z), e uma fonte de detecção. Embora existam várias estratégias para separação e detecção, a etapa de ionização é aquela com o maior número de diferentes estratégias. Isso ocorre devido à grande variedade de tipos de amostras e espécies de interesse. Amostras sólidas, líquidas ou gasosas contendo espécies voláteis ou não requerem diferentes processos de ionização (MORAES; LAGO, 2003).

Entre as possíveis técnicas de ionização para amostras líquidas, a ionização por *eletrospray* (ESI) é a mais utilizada em comparação com a ionização química à pressão atmosférica (APCI) ou a mais recente fotoionização à pressão atmosférica (APPI) devido a sua capacidade de ionizar uma faixa mais

ampla de massa moleculares (BUSTILLOS, 2020; KRAUSS; SINGER; HOLLENDER, 2010).

Além da técnica de ionização, outro parâmetro importante a ser definido na espectrometria de massas, é o analisador. Analisadores do tipo *orbitrap* são cada vez mais utilizado devido a sua combinação de alta resolução, alta precisão de massa (<2 ppm) e uma sensibilidade que pode alcançar a faixa do fentograma. Uma combinação de dois tipos diferentes de analisadores, instrumentos híbridos como *Q-orbitrap* (quadrupolo-orbitrap), mostram excelentes capacidades de detecção e identificação para compostos de baixo peso molecular em diferentes matrizes (CAVALIERE et al., 2019).

Portanto, diante do que foi exposto, a combinação de HPLC/Q-quadrupolo/MS e análise multivariada de dados, como análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), foi utilizada para avaliar o perfil metabólico diante da exposição ao acefato em amostras de água com e sem os animais, e possíveis alterações metabólicas no fígado dos animais ao serem expostos ao acefato.

4 - METODOLOGIA

4.1- Reagentes e Aparatos

Reagentes (grau HPLC): água ultrapura (Milli-Q®); hexano (Dinâmica®) acetonitrila (J.T.Baker®); metanol (J.T.Baker®); proxifilina (SIGMA-ALDRICH®); acefato (SIGMA-ALDRICH®); metamidofós (SIGMA-ALDRICH®); ácido fórmico (SIGMA-ALDRICH®) e enzima β -glucuronidase (Roche®).

Cartucho de extração Spe-ed™ C18; aqua safe (Tetra) – neutralizante de cloro contendo tiosulfato de cloro, sais mineirais, compostos quelantes, hidrocoloides orgânicos e polivinilpirrolidonas; fitas de medição de pH (MColorpHast™); teste de quantificação de amônia, oxigênio e nitrito (Alcon®), aquários, bastão de vidro, micro tubos e tubos de vidro.

4.2- Equipamentos Utilizados

- Bombas de água (Aqua One);
- Termostatos (Roxin HT).
- Agitador vórtex (ALEMMAR®)
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) acoplado a um espectrômetro de massas (MS) com fonte de ionização por electrospray (ESI) e analisador tipo Q-Orbitrap (Q-Exactive™ Orbitrap-Thermo Fisher Scientific).

4.3- Preparo das Soluções

As soluções de acefato e metamidofós foram preparadas em meio aquoso na concentração de 1000 mg/L. A partir dessas soluções estoque foram pipetados volumes necessários para as concentrações finais. A concentração final para o ensaio de exposição crônica foi de 100 μ g/L, enquanto a concentração final do ensaio de biotransformação foi 200 μ g/L. O padrão interno (SI) foi preparado com proxifilina na concentração de 1 μ g/mL. Devido a solubilidade destas substâncias em água, não foi necessário a adição solvente. Além disso, foi preparado solução de água/metanol 7:3 com 0,1% de ácido fórmico para o procedimento de ressuspensão das amostras.

4.4- Manejo e Tratamento do Modelo Animal *Zebrafish*

4.4.1- Ética em Experimentação Animal

O trabalho proposto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto protocolado sob o CEUA nº (7061120319). Todo o processo de experimentação foi realizado nas dependências do Laboratório de Toxicologia da Escola de Farmácia – EFAR da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.4.2- Manutenção dos Animais

Foram adquiridos 660 peixes adultos da espécie *zebrafish* da loja Lindóia Peixes em Muriaé – MG, na mesma proporção entre fêmeas e machos, todos com cerca de 6 meses de idade.

Os peixes foram alocados em aquários de 4 litros na proporção de 5 animais por litro. A água dos aquários foi previamente aclimatada em um aquário maior à parte e condicionada utilizando-se o neutralizador de cloro, com a dosagem recomendada pelo fabricante, de 5 mL a cada 10 L de água. O pH também foi verificado diariamente para manter dentro da faixa adequada.

A temperatura para cada aquário foi mantida na faixa de 26 °C a 28 °C com o auxílio de termostato (Roxin HT). A aeração foi realizada com a assistência de bombas (AquaOne), e a iluminação da sala foi ajustada de forma a fornecer os ciclos de claro: escuro 14h:10h. Antes do início dos experimentos, os peixes passaram por um período de adaptação de 15 dias com o objetivo de avaliar se estavam saudáveis e para se adaptarem ao novo ambiente.

Além disso, utilizou-se o teste de amônia tóxica e o teste de nitrito/NO₂ para monitorar a concentração destes compostos. Outro teste também realizado foi o teste com o teste de O₂ para verificar os níveis de oxigenação. Todos esses testes foram realizados uma vez por semana.

A alimentação foi realizada diariamente com a ração floculada *Basic* da marca *Alcon*, exceto nas datas de necropsia dos animais, quando eles não foram alimentados nas 24h que antecederam à eutanásia. Todos os parâmetros citados foram monitorados e realizados conforme é descrito no protocolo da OECD nº305.

4.4.3- Ensaios de Exposição Crônica dos Animais ao Acefato

Os animais foram expostos durante 28 dias ao agrotóxico acefato e ao seu metabólito metamidofós. Todos os parâmetros para realização da exposição crônica e da manutenção dos animais foram realizados conforme é descrito no protocolo OECD n°305. O ensaio foi realizado em triplicata, com cada aquário contendo 20 peixes (Tabela 5). Ao iniciar o experimento, os animais foram expostos a uma concentração final de 100 µg/L do acefato mais metamidofós (tratamento). Essa concentração foi definida a partir de dados coletados em outros trabalhos, que detectaram a presença de acefato e metamidofós na concentração final de 100 µg/L em águas superficiais brasileiras (BROVINI et al., 2021, 2023). A concentração final de 100 µg/L teve como objetivo a avaliação de possíveis alterações metabólicas nas enzimas presentes no fígado dos animais expostos ao acefato e ao metamidofós por meio de análise metabolômica global.

Para critério de comparação, manteve-se um aquário para o controle negativo durante o ensaio, na qual, os animais não foram expostos ao acefato e ao metamidofós. Contudo, o controle negativo seguiu as mesmas condições de manutenção que os animais expostos durante 28 dias.

Tabela 5: Divisão do Ensaio Crônico.

Ensaio de Exposição Crônica				
Período de exposição:	(Acefato + Metamidofós) = 100 µg/L			
	Controle Negativo	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
28 Dias	20*	20*	20*	20*
* Número de peixes por aquário				

Fonte: Autoria própria

Durante o período de exposição, metade da água dos aquários foi trocada a cada três dias a fim de manter as condições ideais aos animais até o término do ensaio. Ao mesmo tempo, as soluções de acefato e de metamidofós foram reaplicadas para manter a concentração final (100 µg/L) sempre constante.

Ao finalizar os 28 dias do ensaio de exposição crônica, os animais foram eutanasiados seguindo as práticas descritas e aceitas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), o qual preconiza a submersão dos animais em banho de gelo por pelo menos 10 minutos antes do início da dissecação (CONCEA, 2017). Após a eutanásia, o corpo do animal foi seco suavemente com uma toalha de papel, medido com uma régua e pesado para iniciar o processo de dessecação.

Durante dessecação, foi removido o fígado de cada animal. Os órgãos coletados foram imediatamente armazenados em microtubos identificados, pesados, congelados com nitrogênio líquido e triturados com bastão de vidro. Posteriormente, esses microtubos foram acondicionados em freezer a - 80°C até o momento das análises.

4.4.4- Ensaio de Biotransformação do Acefato

O ensaio de biotransformação foi realizado durante 7 dias, com apenas uma aplicação da solução de acefato, na concentração de 200 µg/L, ao iniciar o ensaio. Essa concentração foi definida com o objetivo de avaliar os metabólitos formados a partir do acefato, assegurando uma avaliação adequada, por meio da definição do perfil metabólico e da análise metabolômica alvo. Ademais, este ensaio teve como objetivo comparar os metabólitos gerados na presença e ausência dos animais expostos ao acefato.

A avaliação dos metabólitos gerados foi realizada com 3 grupos diferentes. No primeiro, denominado estabilidade, havia somente água e a solução de acefato, a fim de verificar a formação dos metabolitos em água e sua estabilidade em meio aquoso. No segundo, denominado de tratamento, foram utilizados os peixes para analisar a biotransformação do acefato por reações de fase I e fase II. No terceiro, o controle negativo, os aquários com a presença dos peixes não tiveram a adição do acefato em água.

Os grupos tratamento e estabilidade foram realizados com 3 aquários, enquanto o controle negativo foi realizado com apenas 1 aquário, com cada aquário contendo 20 peixes. A avaliação do ensaio de biotransformação ocorreu por análise de amostras de água dos aquários. Alíquotas de 10 mL de água dos

aquários foram coletadas nos tempos: 0h (imediatamente após a aplicação das substâncias), 1h, 3h, 5h, 8h, 10h e 24h de todos os aquários no primeiro dia; e a cada 24h até o 7º dia.

4.5- Preparo das Amostras

4.5.1- Amostras de Água

A técnica selecionada para extração das amostras de água foi a extração em fase sólida (SPE). Antes de iniciar a extração, foram transferidos 10 µL de cada amostra para o respectivo *vial*. Em seguida, foram acondicionados no freezer até o momento da ressuspensão. Posteriormente, em cada tubo contendo a amostra, foi adicionado SI na concentração de 10 µg/L.

As amostras de água do ensaio de biotransformação foram submetidas à hidrólise antes da extração em fase sólida. A hidrólise foi realizada por meio da adição de 80 µL da enzima β-glucuronidase, seguida pela incubação das amostras em banho a 50°C durante 1 hora.

Na extração em fase sólida foi utilizado o cartucho Spe-ed C18/18 e um dispositivo multivias acoplado a uma bomba de vácuo denominado SPE *Vacuum Manifold*. O cartucho foi condicionado em duas etapas: primeiro utilizou-se 3 mL de metanol seguidos de 3 mL de Água Milli-Q® evitando deixar a resina seca por completo. Em seguida, a amostra foi aplicada no cartucho e, eluída a água presente na amostra completamente com o auxílio de uma pera e com bomba de vácuo. Posteriormente, os analitos de interesse retidos no cartucho foram eluídos com 3 mL de metanol. Logo após a eluição, as amostras foram colocadas sob o fluxo de nitrogênio para evaporar o solvente. A ressuspensão do resíduo seco, foi realizada com 60 µL de solução água/metanol 7:3 0,1% de ácido fórmico, seguido por agitação vigorosa em vórtex. O conteúdo foi transferido para seus respectivos vials, os quais foram armazenados a -20°C até o momento da análise.

4.5.2- Amostras do Órgão Fígado

Os microtubos acondicionados em freezer a - 80°C, após a coleta do fígado dos peixes no ensaio de exposição crônica, foram retirados do freezer a

fim preparar as amostras para a análise. Cada microtubo contendo um fígado triturado do peixe foi agregado de 3 em 3 por amostra, a fim de obter o peso médio ideal para a análise. Cada aquário forneceu 3 amostras, desta forma, no grupo tratamento (3 aquários) foram analisadas 9 amostras e no controle negativo (1 aquário) foram analisadas 3 amostras.

Logo em seguida, as amostras foram fortificadas a 25 ng/mL de solução de padrão interno. Os analitos presentes nas amostras foram extraídos com 2 mL do solvente acetonitrila gelada e agitadas em vórtex. Após a extração, foi adicionado 1 mL de hexano seguido de agitação por 1 minuto e centrifugação pelo mesmo período, com o intuito de extrair a porção lipofílica presente na amostra.

O sobrenadante da amostra centrifugada foi retirado do tubo, eliminando as impurezas apolares. Posteriormente, a amostra foi filtrada com filtro de 0.22 μm e transferida para um frasco limpo. Os frascos contendo as amostras foram acondicionadas sob fluxo de nitrogênio gasoso para secar o solvente.

Para a ressuspensão do resíduo seco, foi adicionado 60 μL de solução água/metanol 7:3 com 0,1% de ácido fórmico, seguida de agitação vigorosa em vórtex e transferência para os respectivos *vials*. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da análise.

4.6- Análise Instrumental

As amostras foram analisadas no cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) acoplado a um espectrômetro de massas (MS) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador tipo Q-orbitrap (Q-Exactive™ Orbitrap-Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), usando uma coluna de fase reversa (Synchronis-Thermo USA, C18, 1.7 μm , 50 X 2.1 mm) mantida a 40°C . A fase móvel A (água, 5.0 mM de formiato de amônio e ácido fórmico 0,1%) e fase móvel B (metanol com ácido fórmico 0,1%) foram empregadas no seguinte gradiente de eluição: 0 min, 2%B; 3 min, 10%B; 4 min, 25%B; 7 min, 100%B; 8 min, 100%B; 8,5 min, 2%B; 10,5 min, 2%B. O volume de cada amostra injetada foi de 5 μL , o fluxo da fase móvel foi de 0,250 mL/min e o tempo de corrida foi de 10,5 min.

As amostras foram analisadas no modo de ionização positivo, sob o modo de aquisição Full-MS e Full-MS/data dependent acquisition (DDA)-MS², utilizando os seguintes parâmetros: voltagem do spray de 2.89 kV e temperatura do capilar de 380 °C. Os fluxos de nitrogênio do *sheath gas* e do *auxiliary gas* foram de 60 e 20, respectivamente. Para a aquisição em FULL-MS, os parâmetros foram: resolução de 70,000; *Automatic Gain Control (AGC) target* de 1e6; *Maximum IT* de 50 ms e a faixa de massa foi de 50-750 *m/z*. Para a aquisição em dd-ms² os parâmetros foram: resolução de 35,000; *Automatic Gain Control (AGC) target* de 1e5; *Maximum IT* de 50 ms; *Isolation Window* de 2,0 *m/z*, *loop count* de 10, Top N de 10, (N) CE de 10, 20 e 30 eV e a faixa de massa de 50-750 *m/z*. O equipamento foi calibrado no modo de ionização positivo e negativo com a solução produzida pelo fabricante (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha).

4.7- Validação do Método Analítico

No procedimento de validação das análises de água foram utilizadas amostras contendo 10 mL de Água Milli-Q®. Já para a análise do fígado, foram utilizados animais saudáveis, na qual, após a dessecação e preparo das amostras de fígado, esses órgãos foram agregados de 3 em 3 para formar cada amostra.

A validação do método analítico desenvolvido foi baseada nas orientações de (INMETRO., 2016; US EPA, 2016), que compreende a avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, curva analítica, repetitividade, recuperação e arraste.

A seletividade foi avaliada por meio da análise de seis amostras diferentes. Foram verificados os picos cromatográficos do acefato e do metamidofós, seguido da verificação de ausência de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos.

Para a curva analítica foram determinados 5 pontos, cada um deles em triplicata, totalizando 15 amostras para cada matriz. O procedimento consistiu na fortificação das amostras com padrão interno a 50 ng/mL e, com acefato e metamidofós nas concentrações de 1; 5; 20; 50 e 100 ng/mL para as amostras de água.

Já para a curva analítica da matriz de fígado, foi fortificada com padrão interno a 25 ng/g e, com acefato e metamidofós a 0,025; 0,25; 0,5; 1 e 5 ng/g. Foi calculado o coeficiente de correlação r^2 a partir dos pontos experimentais (INMETRO., 2016; US EPA, 2016). Para ser validado, o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003).

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada. Sendo utilizado o método da relação sinal-ruído, na proporção de 10:1 para análise desse parâmetro (INMETRO., 2016; US EPA, 2016).

O arraste consistiu na reinjeção da amostra de 20 ng/mL de acefato para as amostras de água e da amostra de 1 ng/g de acefato do fígado. A amostra foi injetada entre 2 amostras de seletividade. Para este parâmetro, o critério de aceitação foi a verificação do sinal cromatográfico do analito na amostra seguinte, em que não fosse superior a 1% do sinal encontrado na amostra controle (INMETRO., 2016; US EPA, 2016).

Os parâmetros repetitividade e recuperação foram avaliados utilizando 15 amostras. A matriz água foi fortificada com SI na concentração final de 50 ng/mL e, com acefato e metamidofós a 1; 50; 150 ng/mL. Simultaneamente, a matriz do fígado foi fortificada com SI na concentração final de 25 ng/g e, com acefato e metamidofós a 0,025; 1; 10 ng/g. A avaliação da repetitividade foi realizada por meio do coeficiente de variação (CV), sendo que o critério de aceitação para CV fosse igual ou menor que 20%. Para a recuperação, as amostras foram fortificadas após a extração e avaliado a porcentagem de rendimento da extração. A recuperação foi estimada pela análise das amostras fortificadas com quantidades conhecidas, sendo calculado a partir do valor observado (acefato e metamidofós) dividido pelo valor esperado (SI) e, multiplicado por 100.

4.8 - Detecção de metabólitos para monitorar a exposição ao Acefato

Os metabólitos do acefato, já descritos na literatura (LIN et al., 2020; REN et al., 2020; SCHULZE, 2011; SINGH et al., 2020) tiveram suas massas exatas calculadas a partir das suas fórmulas moleculares usando o software Thermo Xcalibur (versão 3.0.63; Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha).

Os íons moleculares tiveram suas massas exatas verificadas no modo Full-MS, sendo reconhecidos de acordo com o menor erro de massa (<12 ppm). Subsequentemente, os espectros gerados pela fragmentação no modo varredura *Data Dependent-MS2* (DDA MS2) do acefato e seus metabólitos, foram avaliados para investigar os íons produto.

4.9 - Análise Metabolômica

4.9.1 - Análise Alvo em Matriz Água

As amostras de água do ensaio de biotransformação, foram analisadas por LC-MS e então os dados brutos foram processados na plataforma MSDIAL (MS-DIAL versão 4.9.221218 Windowsx64). Os dados foram agrupados para o processamento, de forma que inicialmente as amostras de água do tratamento do ensaio de biotransformação foram comparadas às amostras de água do controle negativo. Os arquivos MS brutos foram convertidos em ABF (formato de arquivo de base de análise) usando o conversor de arquivos gratuito *Reifycs* (REIFYCS INC, 2018). Os arquivos foram importados para o MS-DIAL com os seguintes parâmetros descrito na Tabela 6:

Tabela 6: Parâmetros utilizados no MSDial.

Parâmetro	Definição
Coleção de Dados	
Início do tempo de retenção	0,2 min
Fim do tempo de retenção	10 min
MS1 faixa de massa inicial	50 Da
MS1 faixa de massa final	750 Da
Precisão de massa de tolerância - MS1	0,001 Da
Precisão de massa de tolerância - MS2	0,0025 Da
Detecção de pico	
Altura mínima do pico	1000
Largura da fatia de massa	0,1 Da
Método de suavização	Média móvel ponderada linear
Nível de suavização	3 scan
Largura mínima do pico	5 scan
MS2 deconvolução	
Valor da janela sigma	0,6
MS/MS abundância cortada	10 amplitude
Excluir após íon precursor	✓
Manter os íons isotópicos até	3 Da

Manter os íons isotópicos w/o MS2Dec.	✓
Arquivo MSP e configuração de identificação MS/MS	
Tolerância do tempo de retenção	10 min
Tolerância da massa precisa	0,01 Da
Pontuação de identificação cortada	0.90%
Espectro de abundância relativa cortada	0.30%
Relatar apenas o maior sucesso	✓
Configuração de Íon de Adução	
Espécies moleculares	[M+H] ⁺ and [M+Na] ⁺
Configuração de parâmetros de alinhamento	
Tolerância do tempo de retenção	0.05 min
Tolerância MS1	0.015 Da
Fator do tempo de retenção	0.5
Fator MS1	0.5
Filtro de contagem de pico	5%
N% detectado em pelo menos um grupo	10%
Preenchimento de lacunas por compulsão	✓

Fonte: Autoria própria

Após o processamento, os dados resultantes foram submetidos à análise por dois modelos de análise estatística. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para determinar as diferenças entre as amostras. O relatório da análise por PCA foi gerado pelo método de escala definido como *auto scale*.

Em seguida, uma análise discriminante de mínimos quadrados ortogonal parcial (OPLS-DA) foi realizada para identificar os metabólitos responsáveis pelas diferenças entre os agrupamentos das amostras. Para gerar o relatório da análise por OPLS-DA, o método de transformação foi o *quad root*. A capacidade preditiva do modelo OPLS-DA foi avaliada pelo valor de Q^2 , em que, valores acima de 0,3 são considerados bons. Na OPLS-DA os metabólitos com VIP igual ou acima de 1 são adequados para indicarem separação dos grupos.

Além disso, foram avaliados o valor de P (menor ou igual a 0,05), e o *fold change* (FC) com valor no mínimo igual a 2.

4.9.2 - Análise Global em Matriz Fígado

O Proteo Wizard aplicativo gratuito (CHAMBERS et al., 2012) foi utilizado para converter os dados brutos adquiridos em arquivos no formato mzxml. Os arquivos no formato mzxml foram carregados na plataforma livre MetaboAnalyst 5.0 para realizar a desconvolução dos picos e alinhar os sinais cromatográficos,

no formato centroide (COSTA et al., 2023; PANG et al., 2021, 2022). Os dados obtidos foram carregados e exportados para opção *Statistical Analysis*, onde foram submetidos à análise estatística com os seguintes parâmetros: para definição dos picos a massa tolerância foi de 0,025 Da e a tolerância do tempo de retenção foi igual a 30 segundos; os dados foram filtrados pelo desvio padrão; a normalização das amostras foi por um grupo de amostra em pool, especificamente o controle negativo e, a transformação dos dados foi por log.

Nos dados resultantes foram aplicados métodos estatísticos como: análise de componentes principais (PCA), FC, teste T e análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Outra ferramenta utilizada para avaliar os metabólitos e a densidade relativa da distribuição dos metabólitos foi o *Heatmap*.

O primeiro teste avaliado foi a análise de componentes principais (PCA), a fim de determinar as diferenças entre os agrupamentos das amostras. Posteriormente, foi utilizado a *Heatmap*, um mapa de calor que fornece visualização dos metabólitos alterados. Os mapas de calor são usados para dados metabolômicos, onde a abundância relativa de íons detectados em cada amostra é representada com intensidade de cor em cada célula (IVANISEVIC et al., 2015).

Logo em seguida foi realizada a análise discriminante ortogonal de mínimos quadrados parcial (OPLS-DA) para identificação dos metabólitos responsáveis pelas diferenças entre as amostras. A OPLS-DA forneceu a variáveis importantes para projeção (VIP), com valores adequados ($VIP > 1,5$) para determinar as variáveis estatisticamente mais significativas, isto é, os metabólitos capazes de discriminar os metabólitos no tratamento responsáveis pela diferença com o controle negativo (WANG et al., 2017). Concomitantemente, foram avaliados o FC (> 2) e o teste T ($< 0,05$) (COSTA et al., 2023).

Os metabólitos discriminados nessas análises estatísticas e, no mapa de calor tiveram suas massas, tempos de retenção e possíveis íons produtos identificados. O software Xcalibur (Ver 3.0.63; Thermo Fisher Scientific) foi usado para calcular fórmulas moleculares. As fórmulas moleculares dos metabólitos foram propostas de acordo com o menor erro de massa, assim como os

possíveis íons produtos. Para isso, foram avaliados os espectros de massa gerados por Full-MS e DDA-MS2.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES:

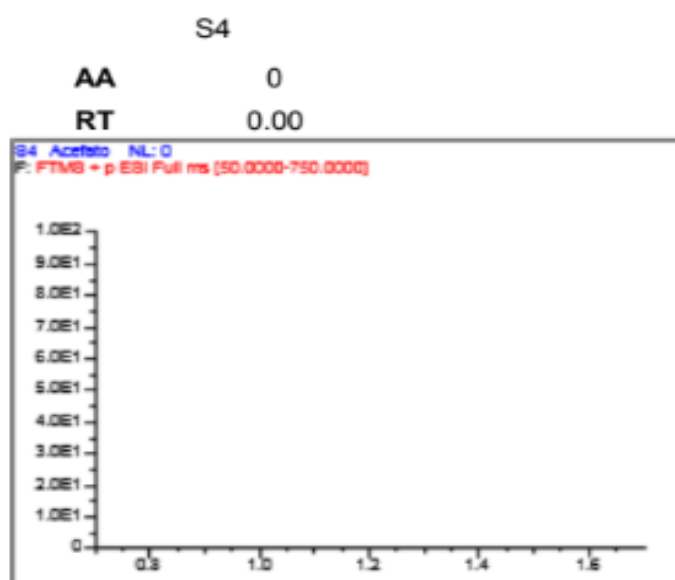
5.1- Validação das matrizes de Água e Fígado

A validação teve como objetivo assegurar uma avaliação fidedigna dos experimentos realizados. Com isso, um método é validado segundo uma série de parâmetros estabelecidos, como: seletividade, linearidade, limite de quantificação, arraste, repetitividade e recuperação (INMETRO., 2016).

Seletividade:

A seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias de interesse, na presença de componentes que podem interferir com a sua detecção (INMETRO., 2016). O método mostrou se seletivo, uma vez que não teve sinal interferente significativo detectado no mesmo tempo de retenção do acefato e do metamidofós, tanto na matriz água como na matriz do órgão (Figura 3).

Figura 3: Cromatograma da matriz de água para análise do acefato na amostra de seletividade.



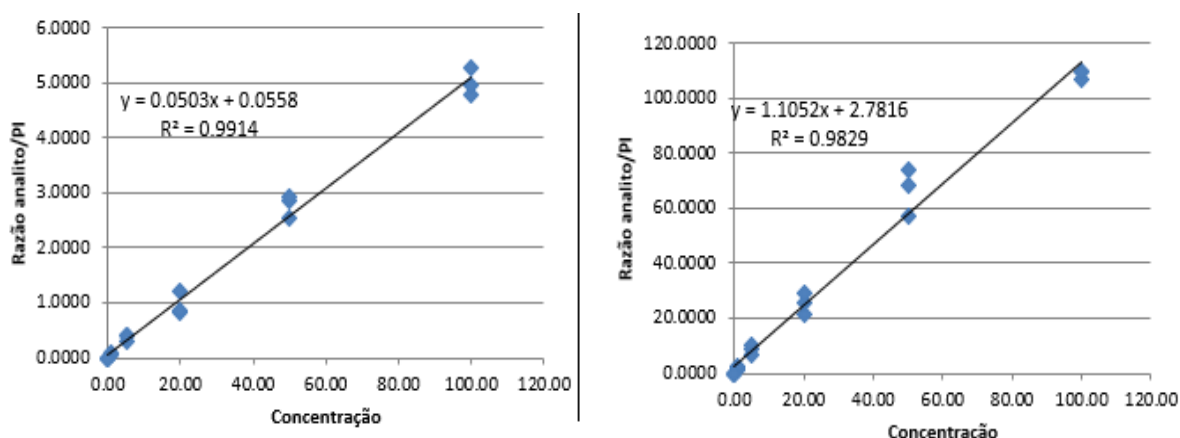
Fonte: Autoria própria

Linearidade:

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação (MOREAU; SIQUEIRA, 2016). Para avaliação da linearidade foram construídas curvas analíticas a fim de demonstrar se os resultados são proporcionais à concentração do analito aplicado em um determinado tempo.

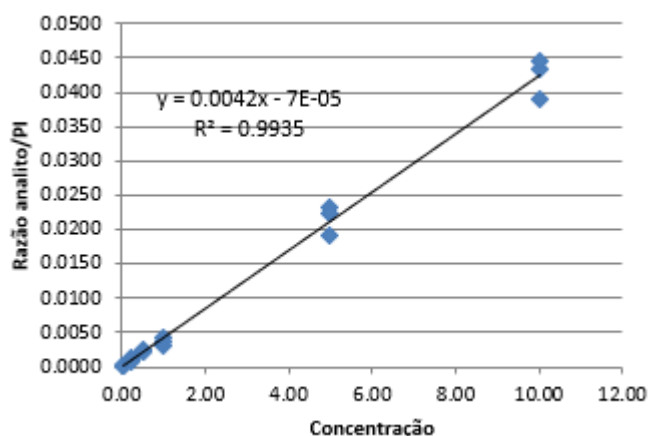
Foram utilizadas concentrações crescentes analisando cinco pontos das curvas (1; 5; 20; 50 e 100 ng/mL) para as amostras da matriz de água, tanto para análise do acefato como para o metamidofós. O coeficiente de correlação linear (r^2) teve resultado igual a 0,9914 para análise do acefato, enquanto o metamidofós obteve um r^2 igual a 0,9829, como é demonstrado na figura 4.

Figura 4: Curva analítica do acefato a direita e do metamidofós na esquerda, na matriz de água.



Fonte: Autoria própria

Na curva analítica construída para validação do fígado foi definido 5 pontos com as seguintes concentrações: 0,025; 0,25; 0,5; 1; 5; 10 ng/g. A matriz do fígado, o coeficiente de correlação linear foi igual a 0,9935 para análise do acefato (Figura 5) e 0,8826 para metamidofós.

Figura 5: Curva analítica do acefato na matriz fígado.

Fonte: Autoria própria

Limite de Quantificação:

Para a medição do limite de quantificação utilizou a relação sinal-ruído na proporção de 10:1. Na tabela 7 estão dispostas as relações sinal/ruído para o acefato, o metamidofós e o padrão interno (proxifilina), analisados a 1 ng/mL e 0,025ng/g para água e para o fígado, respectivamente.

Tabela 7: Dados da relação sinal-ruído de acefato, metamidofós e proxifilina.

Substância	Relação Sinal/Ruído - Água	Relação Sinal/Ruído - Fígado
Acefato	52851	12889
Metamidofós	1696362	130111
Proxifilina	1699104	492813

Fonte: Autoria própria

O critério de aceitação na relação sinal/ruído como estimativa do limite de quantificação é de 10:1. Como a relação encontrada para os analitos de interesse, tanto para água quanto para o fígado, foi superior a 10, portanto, pode se considerar as concentrações de 1 ng/mL e 0,025 ng/g como o limite de quantificação de acefato e metamidofós neste método.

Arraste:

O arraste é utilizado para avaliar o efeito residual (carryover), sendo necessário que sejam realizadas, no mínimo, três injeções da mesma amostra branco, sendo duas antes e uma logo após a injeção da amostra. Na tabela a seguir, estão dispostas as áreas para avaliação do efeito arraste do analito.

Tabela 8: Dados utilizados no parâmetro arraste.

Amostra	Área - Água	Área - Fígado
Branco 1	89266170	0
Branco 2	53719802	0
Carryover - Acefato	2426654509	56921007
Branco 3	31373778	0
Amostra	Área - Água	Área - Fígado
Branco 1	3007405	1462895
Branco 2	1278078	612141
Carryover - Metamidofós	126036698	724971787
Branco 3	837182	802535

Fonte: Autoria própria

O sinal de acefato verificado na injeção da amostra após a análise do controle representa, aproximadamente, 1,3% para água e 0 % para o fígado, da área verificada, ou seja, são valores aceitáveis. Da mesma forma os valores foram são aceitos para o metamidofós, sendo 0,7% para água e 0,1% para o fígado.

Repetitividade:

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações; eventualmente, é denominada precisão intraensaio e pode ser expressa por meio do desvio padrão relativo (RSD), também chamado de coeficiente de variação (CV) (INMETRO., 2016).

Tabela 9: Valores de Coeficiente de variação da repetibilidade do acefato e do metamidofós nas matrizes utilizadas.

Repetibilidade (CV%) * - Matriz Água					
Acefato			Metamidofós		
1 ng/mL	50 ng/mL	150 ng/mL	1 ng/mL	50 ng/mL	150 ng/mL
13%	15%	9%	13%	15%	14%

Repetibilidade (CV%) * - Matriz Fígado					
Acefato			Metamidofós		
0,025 ng/g	1 ng/g	10 ng/g	0,025 ng/g	1 ng/g	10 ng/g
7%	22%	0%	5%	24%	16%

* Critério de aceitação: CV ≤ 20%

Fonte: Autoria própria

De acordo com a tabela 9, todas as concentrações analisadas tiveram o coeficiente de variação dentro do permitido para a matriz água. Entretanto na matriz do fígado, a segunda concentração teve o coeficiente de variação um pouco acima do aceitável. Isso pode ser explicado por erros no preparo das amostras.

Recuperação:

A recuperação demonstra a eficiência de extração de um método analítico. É expressa como a porcentagem da quantidade pré-determinada de uma analito, obtida através da comparação de amostras submetidas ao processo de extração com amostras não extraídas (BRASIL, 2003).

Tabela 10: Recuperação das amostras nas matrizes de água e fígado.

Recuperação (%) - Matriz Água					
Acefato			Metamidofós		
1 ng/mL	50 ng/mL	150 ng/mL	1 ng/mL	50 ng/mL	150 ng/mL
12%	13%	93%	12%	7%	96%

Recuperação (%) - Matriz Fígado					
Acefato			Metamidofós		
0,025 ng/g	1 ng/g	10 ng/g	0,025 ng/g	1 ng/g	10 ng/g
76%	91%	98%	100%	98%	99%

Fonte: Autoria própria

Como pode ser observado na tabela acima, a recuperação das amostras, em todas as concentrações na matriz de fígado foi efetiva. Isso ocorre devido ao fígado ser estrutura lipofílica, que interagem menos com os analitos de interesse, facilitando a recuperação do acefato e do metamidofós no método analítico de extração. Entretanto, na matriz água teve-se uma grande dificuldade de extração nas menores concentrações, pois os analitos são estrutura polares e apresentam maior interação com água do que com a resina, dificultando sua extração em baixas concentrações. No entanto, na maior concentração da validação, foi obtido uma boa recuperação tanto para o acefato (93%) como para o metamidofós (96%) em água.

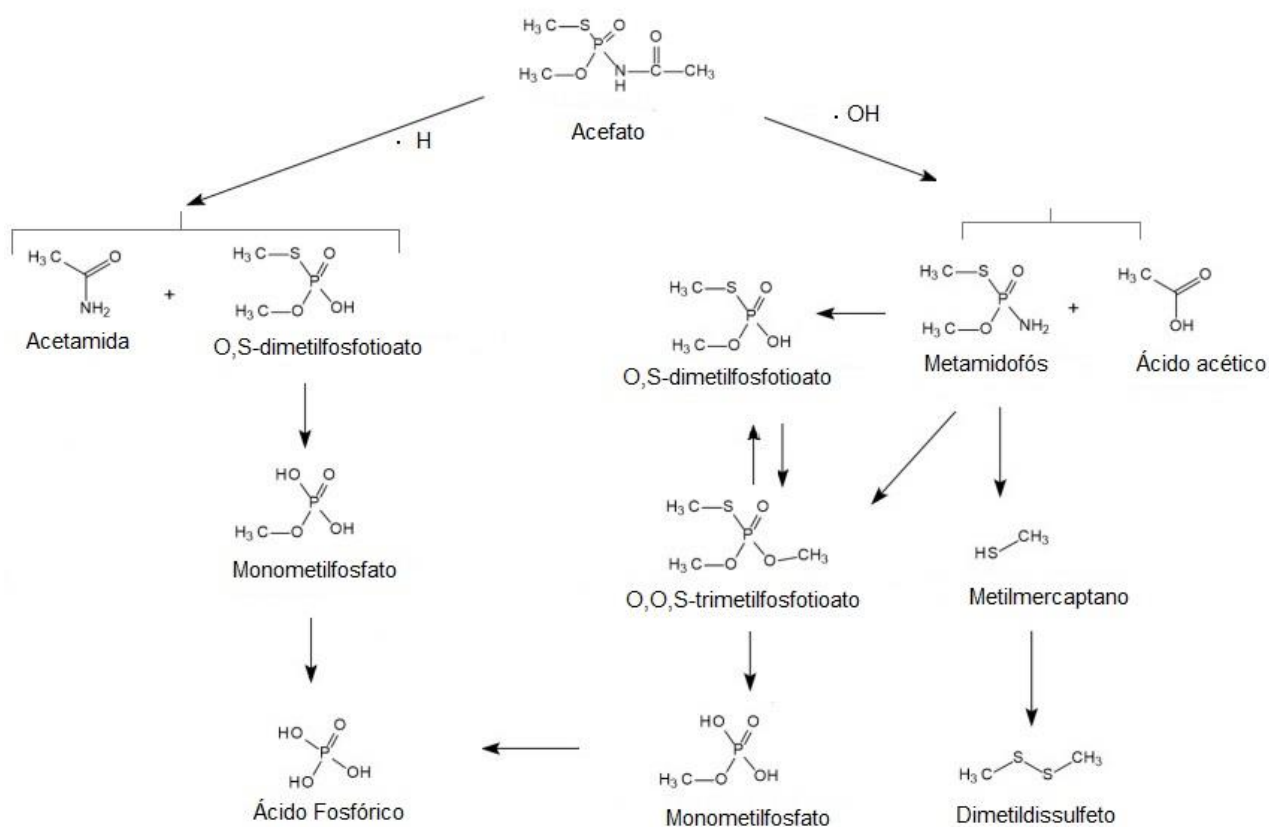
5.2 – Análise do Ensaio de Biotransformação do Acefato

A partir dos metabólitos do acefato já descritos na literatura, foram observados 9 metabólitos: acefato, O,O,S-trimetil fosforotioato, O,S-dimetilfosfotioato, metamidofós, monometilfosfato, ácido fosfórico, dimetildissulfeto, ácido acético e acetamida (HAO et al., 2012; RANADE et al., 2022; REN et al., 2020; SINGH et al., 2020). A formação dos metabólitos a partir do acefato pode ocorrer por duas vias (Figura 6).

Na primeira via, radicais de íons de hidrogênio redutores (H^+) podem catalisar a metabolização do acefato, formando acetamida e O,S-dimetilfosfotioato. Esses metabólitos são formados a partir da clivagem na ligação P-N do acefato, por meio de reações de fase I no organismo do *zebrafish* com enzimas fosfodiesterases (HUANG et al., 2018; ZHAO; BAO; XIA, 2009; ZHAO et al., 2014). O metabólito O,S-dimetilfosfotioato é oxidado em monometilfosfato, que posteriormente é oxidado em ácido fosfórico (REN et al., 2020; SINGH et al., 2020).

Na segunda via da metabolização do acefato, ocorre uma clivagem na ligação da amida, catalisada por íon hidroxila, formando metamidofós e ácido acético (SINGH et al., 2020). Essa reação também ocorre como reação de fase I conduzido por amidases presentes no fígado do *zebrafish*, enzimas que prontamente hidrolisam amidas. O metamidofós, por sua vez, também pode ser oxidado, formando O,S-dimetilfosfotioato (Figura 6), que sofre reação de metilação na hidroxila ligada ao fósforo, formando o O,O,S-trimetil fosforotioato. Subsequentemente, o O,O,S-trimetil fosforotioato forma o monometilfosfato por oxidação, perdendo duas metilas (HAO et al., 2012; RANADE et al., 2022; REN et al., 2020; SINGH et al., 2020).

Figura 6: Metabólitos formados a partir do acefato.



Fonte: Autoria Própria

Tais metabólitos formados foram analisados e identificados pelos seus tempos de retenção, fórmulas moleculares e massas experimentais exatas de íons precursores e produtos, bem como valores de erro em partes por milhão (ppm), mostrados na Tabela 11.

Tabela 11: Dados do acefato e seus metabólitos encontrados

Nomeclatura	Tempo de retenção (min.)	Fórmula molecular	Íon precursor $[M+H]^+$	Erro do íon precursor (ppm)	Íons produtos (m/z)	Erro dos íons produtos (ppm)
Acefato	1.16	$C_4H_{10}NO_3PS$	184.01925	0.073	125.02119	2.741
					142.99274	0.112
					157.00224	-6.038
O,O,S-trimetilfosfotioato	1.16	$C_3H_9O_3PS$	157.00835	0.032	142.99274	0.112

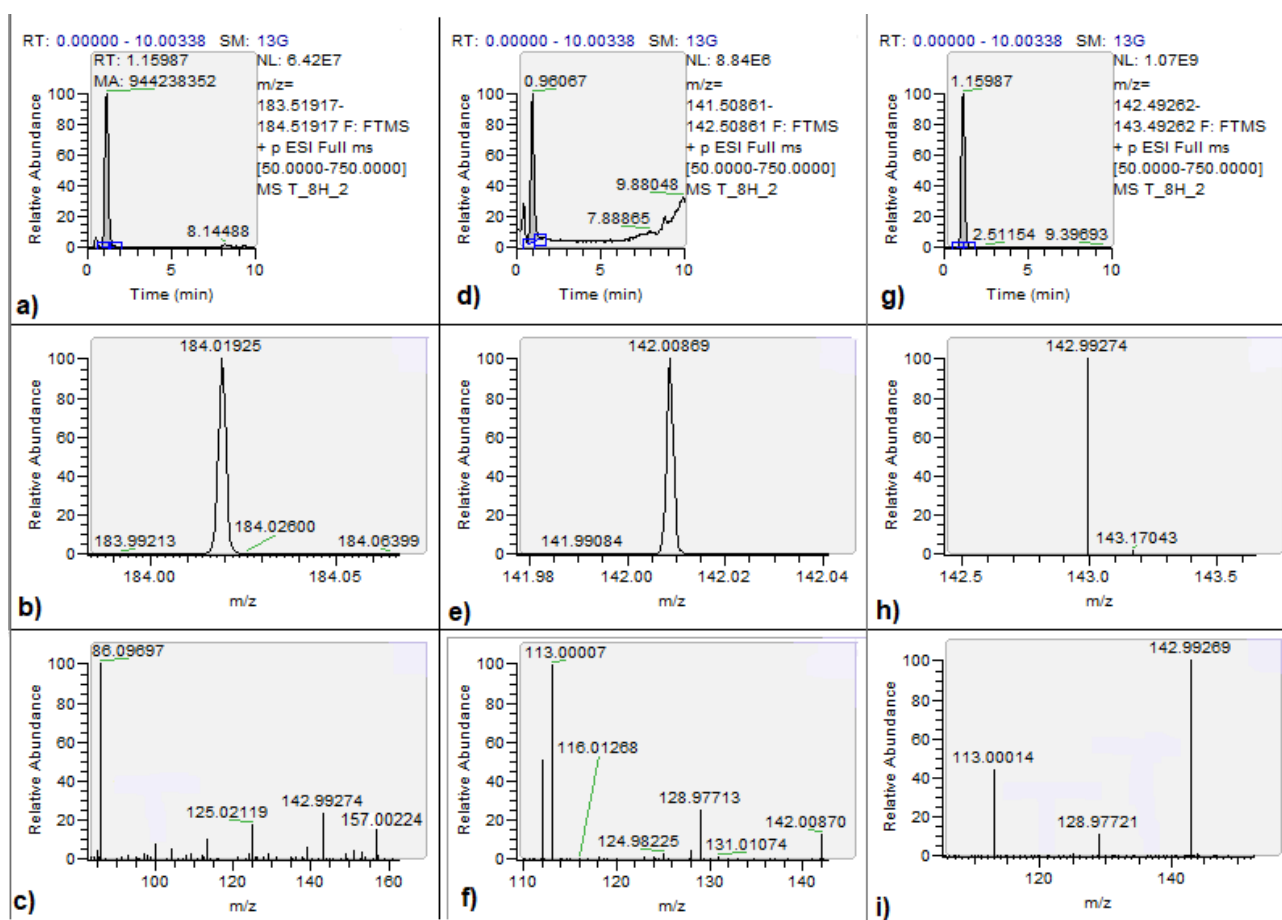
O,S-dimetilfosfotioato	1.16	C ₂ H ₇ O ₃ PS	142.99269	0.078	113.00014	0.248
					128.97721	0.152
Metamidofós	0.96	C ₂ H ₈ NO ₂ PS	142.00869	0.046	113.00007	0.248
					128.97713	0.152
Monometilfosfato	1.16	CH ₅ O ₄ P	112.99982	0.258	67.05493	0.703
					95.04963	0.489
Ácido fosfórico	0.59	H ₃ PO ₄	98.98417	0.448		
Dimetildissulfeto	1.15	C ₂ H ₆ S ₂	94.99836	0.002		
Ácido acético	0.65	C ₂ H ₄ O ₂	61.02918	0.720		
Acetamida	0.53	C ₂ H ₅ NO	60.04439	0.740		

Fonte: Autoria própria

O acefato possui o tempo de retenção em 1.16 min, com resolução de pico (Figura 7a). A partir do modo de varredura Full-MS, foi possível detectar a massa exata de m/z 184.01925 $[M + H]^+$, correspondendo ao acefato protonado (Figura 7b). Avaliando o espectro gerado por DDA MS² observou-se o íon molecular m/z 184.01925 e os íons produtos em m/z 157.00224 e m/z 142.99274, m/z 125.02119 e m/z 86.09697. O íon m/z 157.00224 representa

$C_3H_9O_3PS$, o m/z 142.99274 representa o $C_2H_8O_3PS^+$ e o m/z 125.02119 representa o $C_3H_{10}OPS^+$ (Figura 7c).

Figura 7: a) Cromatograma do acefato. b) Espectro Full MS do acefato. c) Espectro DDA-MS2 do acefato. d) Cromatograma do metamidofós. e) Espectro Full MS do metamidofós. f) Espectro DDA-MS2 do metamidofós. g) Cromatograma do O,S dimetilfosfotioato. h) Cromatograma do O,S dimetilfosfotioato. i) Espectro Full MS do O,S dimetilfosfotioato. j) Espectro DDA-MS2 do O,S dimetilfosfotioato.



Fonte: Autoria Própria

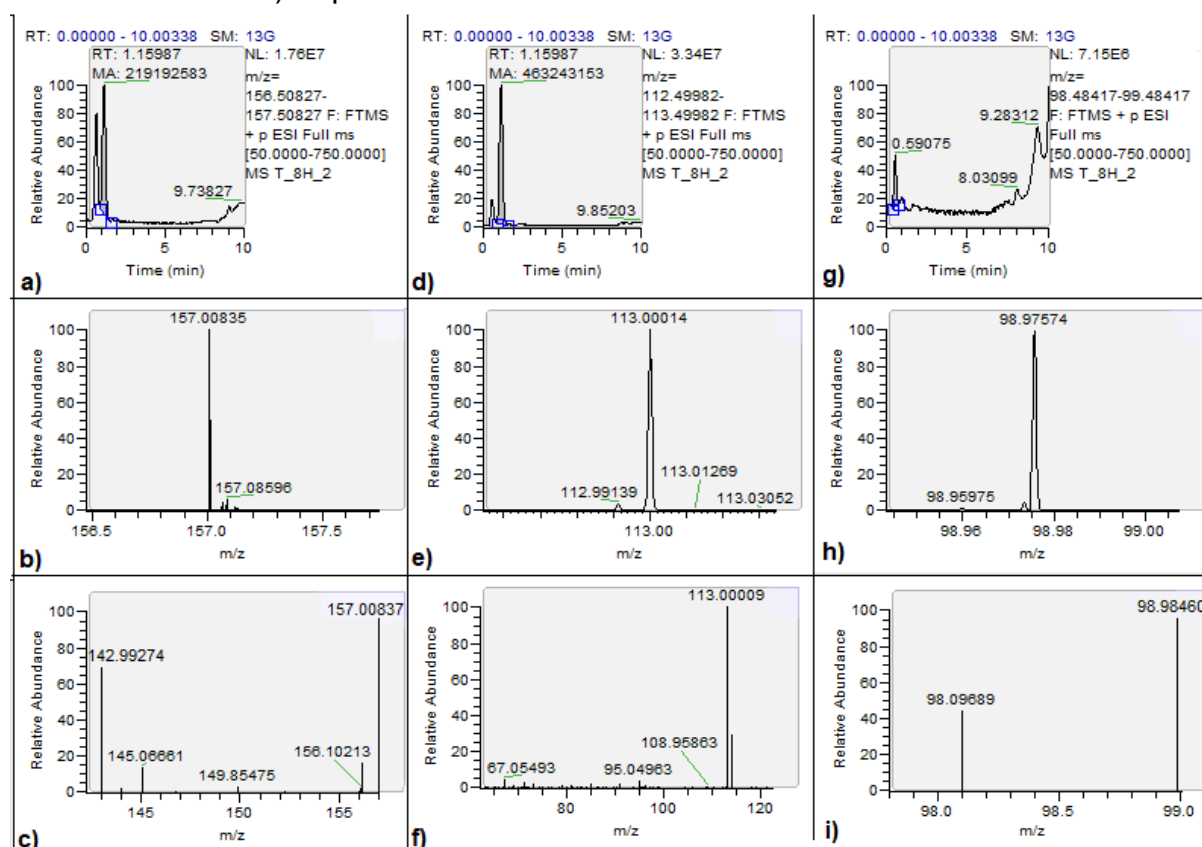
O metamidofós é um metabólito do acefato formado através da clivagem na ligação amida (Figura 7d) (REN et al., 2020). Seu espectro DDA-MS2 (Figura 7f) mostra o íon precursor em m/z 142.00870, que foi gerado a partir do acefato resultando na eliminação de (C_2OH_2) , o íon produto em m/z 128.97713,

representando o íon $\text{CH}_6\text{O}_3\text{PS}^+$ e m/z 113.00007, representando o íon do monometilfosfato.

Ademais, a partir do acefato pode se formar o O,S-dimetilfosfotioato (Figura 7g) por meio de reação de redução, ou através do metamidofós por uma reação de oxidação com a substituição do grupo amina por uma hidroxila (OH) (SINGH et al., 2020). Seu espectro DDA-MS2 (Figura 7i) mostra o íon precursor m/z 142.99269 e os íons produtos em m/z 128.97721, representando o íon $\text{CH}_6\text{O}_3\text{PS}^+$, e m/z 113.00014, representando o íon do monometilfosfato.

O metabólito O,O,S-trimetil fosforotioato formado a partir do metamidofós ou pelo íon O,S-dimetilfosfotioato (LIN et al., 2020), tem em seu espectro DDA-MS2 (Figura 8c), um íon precursor em m/z 157.000837 e o íon produto em m/z 142.99274 que corresponde à perda de (CH_2) e formação de O,S-dimetilfosfotioato.

Figura 8: a) Cromatograma do O,O,S-trimetil fosforotioato. b) Espectro Full MS do O,O,S-trimetil fosforotioato. c) Espectro DDA-MS2 do O,O,S-trimetil fosforotioato. d) Cromatograma do monometilfosfato. e) Espectro Full MS do monometilfosfato. f) Espectro DDA-MS2 do monometilfosfato. g) Cromatograma do ácido fosfórico. h) Espectro Full MS do ácido fosfórico. i) Espectro DDA-MS2 do ácido fosfórico.



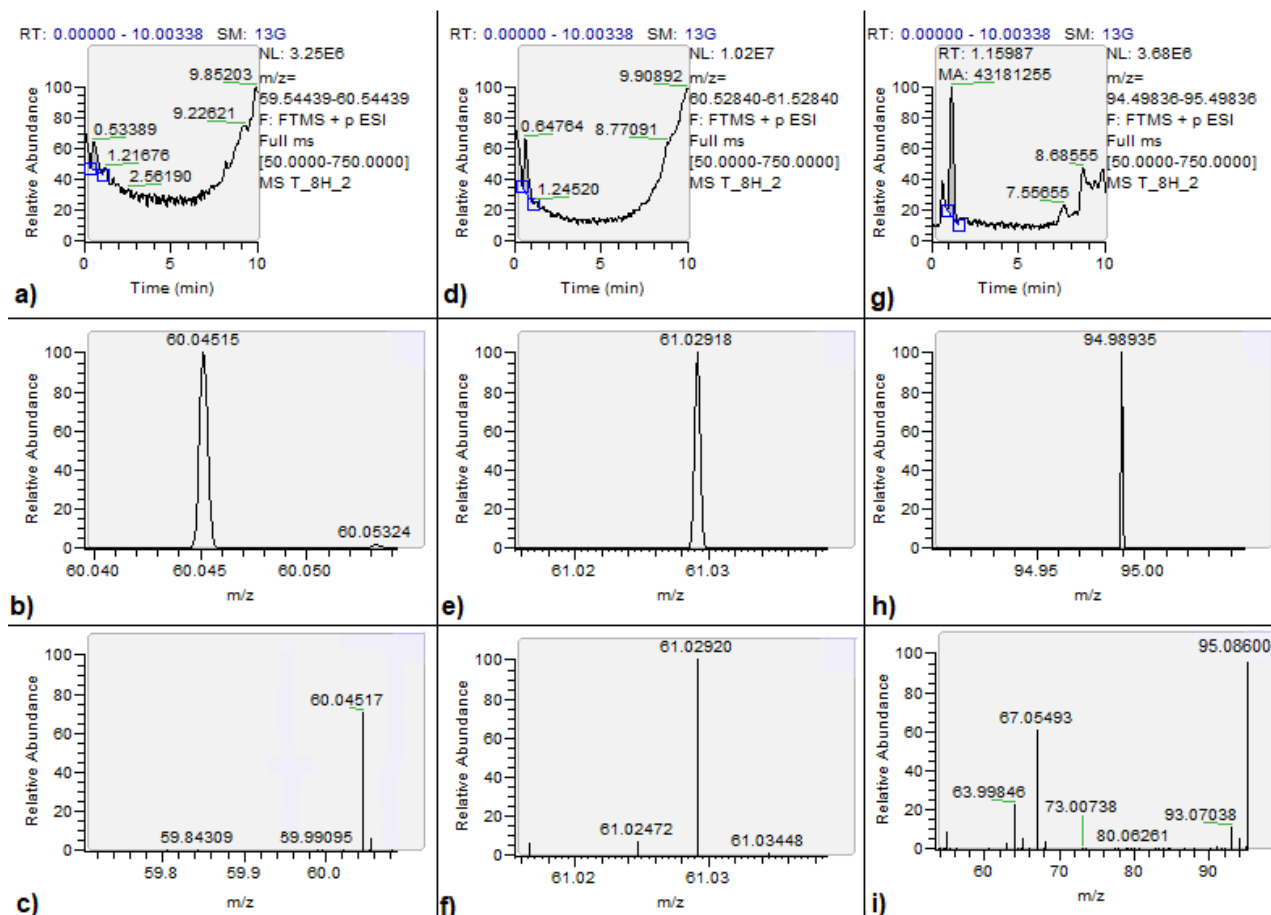
Fonte: Autoria Própria

O monometilfosfato é um metabólito que pode se formar por diferentes vias, assim como seu metabólito precursor o O,S-dimetilfosfotioato. A sua formação pode ocorrer por meio de reação de oxidação na substituição do grupo (SCH₃) por uma hidroxila (OH), ou através do metabólito O,O,S-trimetil fosforotioato perdendo duas metilas (CH₃). O monometilfosfato é um metabólito com o espectro DDA-MS2 (Figura 8f) mostrando o íon precursor em m/z 113.00009 e íons produtos em m/z 95.04963 e m/z 67.05493. O íon produto em m/z 95.04963 representa a perda de uma molécula de água e o íon m/z 67.05494 representa a perda de (CO).

O monometilfosfato pode sofrer oxidação e formar o ácido fosfórico (LIN et al., 2020). O ácido fosfórico também foi encontrado e no espectro Full-MS (Figura 8h) apresentou o íon molecular m/z 98.97574.

Quando o O,S-dimetilfosfotioato é formado diretamente a partir do acefato, é formado outro metabólito na mesma via, a acetamida (REN et al., 2020). A acetamida é um metabólito que apresenta no espectro Full-MS (Figura 8b) o íon molecular em m/z 60.04515.

Figura 9: a) Cromatograma do acetamida. b) Espectro Full MS do acetamida. c) Espectro DDA-MS2 do acetamida. d) Cromatograma do ácido acético. e) Espectro Full MS do ácido acético. f) Espectro DDA-MS2 do ácido acético. g) Cromatograma do dimetildissulfeto. h) Espectro Full MS do dimetildissulfeto. i) Espectro DDA-MS2 do dimetildissulfeto.



Fonte: Autoria Própria

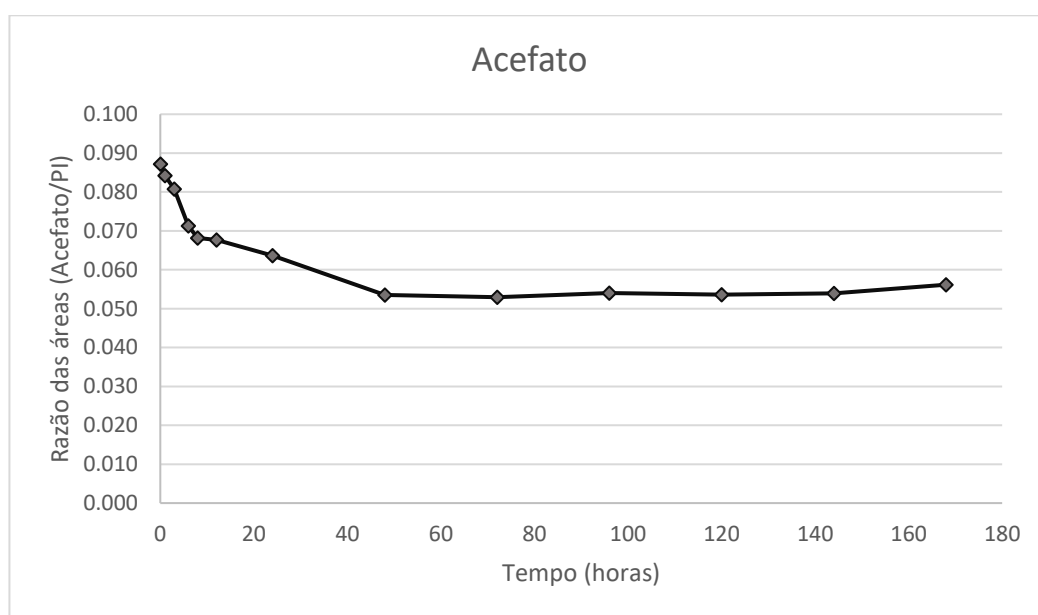
O metabólito formado junto com o metamidofós na clivagem da amida do acefato é o ácido acético. Este ácido apresentou em seu espectro DDA-MS2 (Figura 9f) o íon molecular m/z 61.02920. Assim como a acetamida, devido à alta estabilidade química da molécula, a energia de colisão aplicada não foi suficiente para causar sua fragmentação e apresentar íons produtos que poderiam ser detectados no espectro DDA-MS2.

Outra via de metabolização do metamidofós é a formação do metabólito dimetildissulfeto ($S_2-(CH_3)_2$), em que duas moléculas de metilmercaptano ($SH-CH_3$) se ligam rapidamente em meio aquoso por apresentarem maior estabilidade (LIN et al., 2020). O dimetilssulfeto apresenta no espectro Full MS (Figura 9h) o íon molecular em m/z 94.98935.

5.2.1 - Perfil Metabólico do Acefato

O acefato teve sua concentração determinada através da razão de sua área pela área do padrão interno (Figura 10). Ao observar a figura 10, percebe-se, que no início do tratamento houve uma diminuição da concentração do acefato, no tempo de 0 a 12 horas, demonstrando que no início do experimento o acefato foi metabolizado em maior proporção. Porém, a partir do tempo de coleta de 48 horas a concentração do acefato se manteve constante.

Figura 10: Concentração do acefato ao longo do tempo de exposição no grupo do tratamento.



Fonte: Autoria Própria.

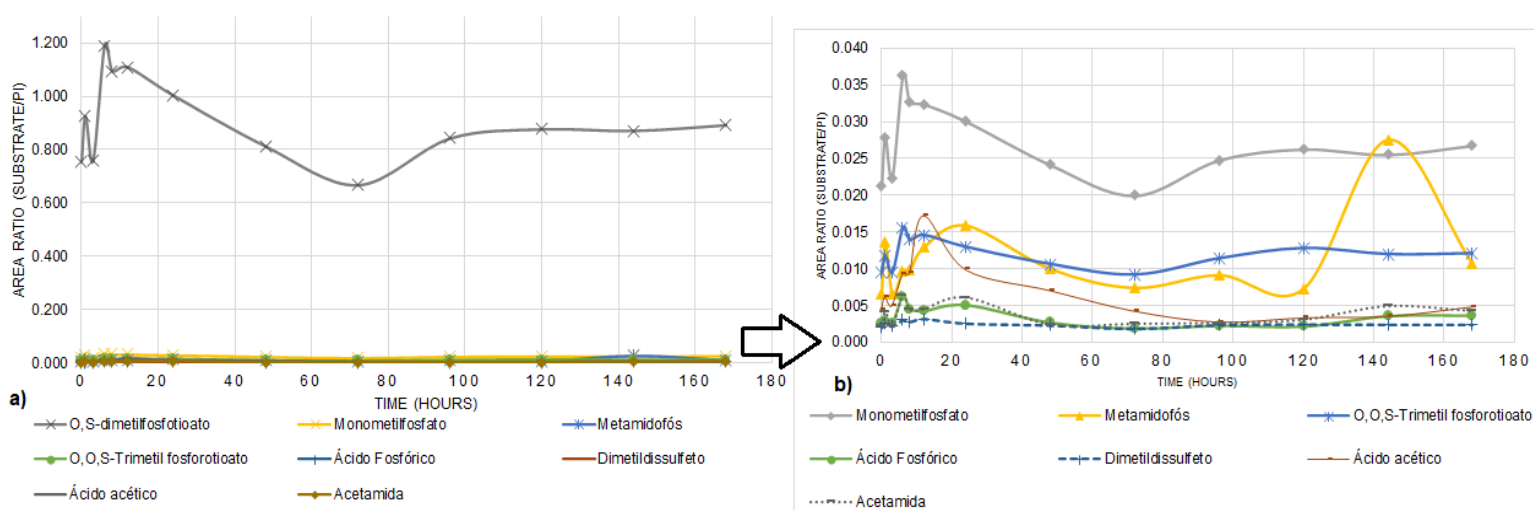
O perfil metabólico do acefato foi avaliado pela determinação dos metabólitos formados através da razão entre as áreas do substrato e do padrão interno ao longo do tempo de coleta (0-168 h). Nos aquários de tratamento houve a formação de metabólitos assim que iniciaram-se os experimentos.

Em relação aos metabólitos formados a partir do acefato no tratamento (figura 11a), ficou evidente a maior formação do metabólito O,S-dimetilfosfotioato, comparado aos outros metabólitos. O maior teor de O,S-dimetilfosfotioato pode ser esclarecido por consequência da sua formação ocorrer nas duas vias de metabolização do acefato. Os 4 metabólitos formados em maiores concentrações estão na via de formação do metamidofós. O

monometilfosfato foi o segundo metabólito mais formado, seguido do O,O,S-trimetil fosforotioato e do metamidofós, respectivamente. O O,S-dimetilfosfotioato é formado a partir do metamidofós por reações de substituição nucleofílica do grupo amina pela hidroxila, na qual, íons OH^- presentes na água auxiliam na conversão do metamidofós em O,S- dimetilfosfotioato, favorecendo a formação do O,S- dimetilfosfotioato (REN et al., 2020; SINGH et al., 2020).

Na figura 11b, percebe-se que todos os metabólitos tiveram maior formação nas primeiras horas, entre 0 e 12 horas, exceto o metamidofós. O baixo teor de metamidofós presente no início da exposição, pode ser explicado por reações de oxidação, na qual, íons OH^- presentes na água rapidamente convertem o metamidofós em O,S- dimetilfosfotioato (SINGH et al., 2020).

Figura 11: Perfil de biotransformação do acefato (a). Ampliação dos metabólitos na Fig. A para visualizar (b).



Fonte: Autoria Própria

Esse resultado corrobora com a menor concentração do metamidofós entre 0 e 12 horas, figura 11(b), no início da exposição. A partir do tempo de coleta de 24 horas, houve uma queda na formação do O,S-dimetilfosfotioato e do monometilfosfato até o tempo de coleta de 72 horas, enquanto os outros metabólitos tiveram uma formação constante. No entanto, a partir do tempo de 72 horas, todos os metabólitos tiveram uma formação constante, inclusive o O,S-dimetilfosfotioato e do monometilfosfato, até o tempo de coleta de 120 horas.

O metabólito metamidofós teve um aumento da sua formação, a partir da coleta de 120 horas até o tempo de 144 horas, ultrapassando a formação do

O,O,S-trimetil fosforotioato e do monometilfosfato. Como o O,S-dimetilfosfotioato é formado a partir do metamidofós e, no tempo de 120 horas sua formação permaneceu constante, a formação do metamidofós foi favorecida, se tornando o segundo metabólito mais formado. No entanto, os metabólitos acetamida, ácido fosfórico, ácido acético e dimetildissulfeto foram formados em baixas concentrações.

A formação dos metabólitos pelo processo de biotransformação no organismo do *zebrafish* ocorre no fígado destes animais, assim como nos mamíferos. A biotransformação de substância endógenas e exógenas, por meio de reações metabólicas de fase I e fase II são responsáveis pela excreção dessas substâncias, tornando os metabólitos mais hidrossolúveis (DE SOUZA ANSELMO et al., 2018; OTTE et al., 2017). As reações da fase I são reações de funcionalização, que atuam expondo grupos polares na estrutura molecular do xenobiótico por meio de reações de oxidação ou redução catalisadas. Essas reações são realizadas por enzimas do sistema citocromo P450 (CYPs) (LOERRACHER; BRAUNBECK, 2021). As CYPs entre as quais as famílias CYP1, CYP2 e CYP3 participam amplamente do metabolismo oxidativo de xenobióticos no *zebrafish*, assim como enzimas amidases e fosfotriesterases (NAWAJI et al., 2020; VERBUEKEN et al., 2017). Portanto, como os metabólitos formados a partir do acefato foram provenientes de reações oxidativas, da clivagem de amida e de ligações com fósforo do acefato, as reações de fase I são as responsáveis pelo perfil metabólico do acefato.

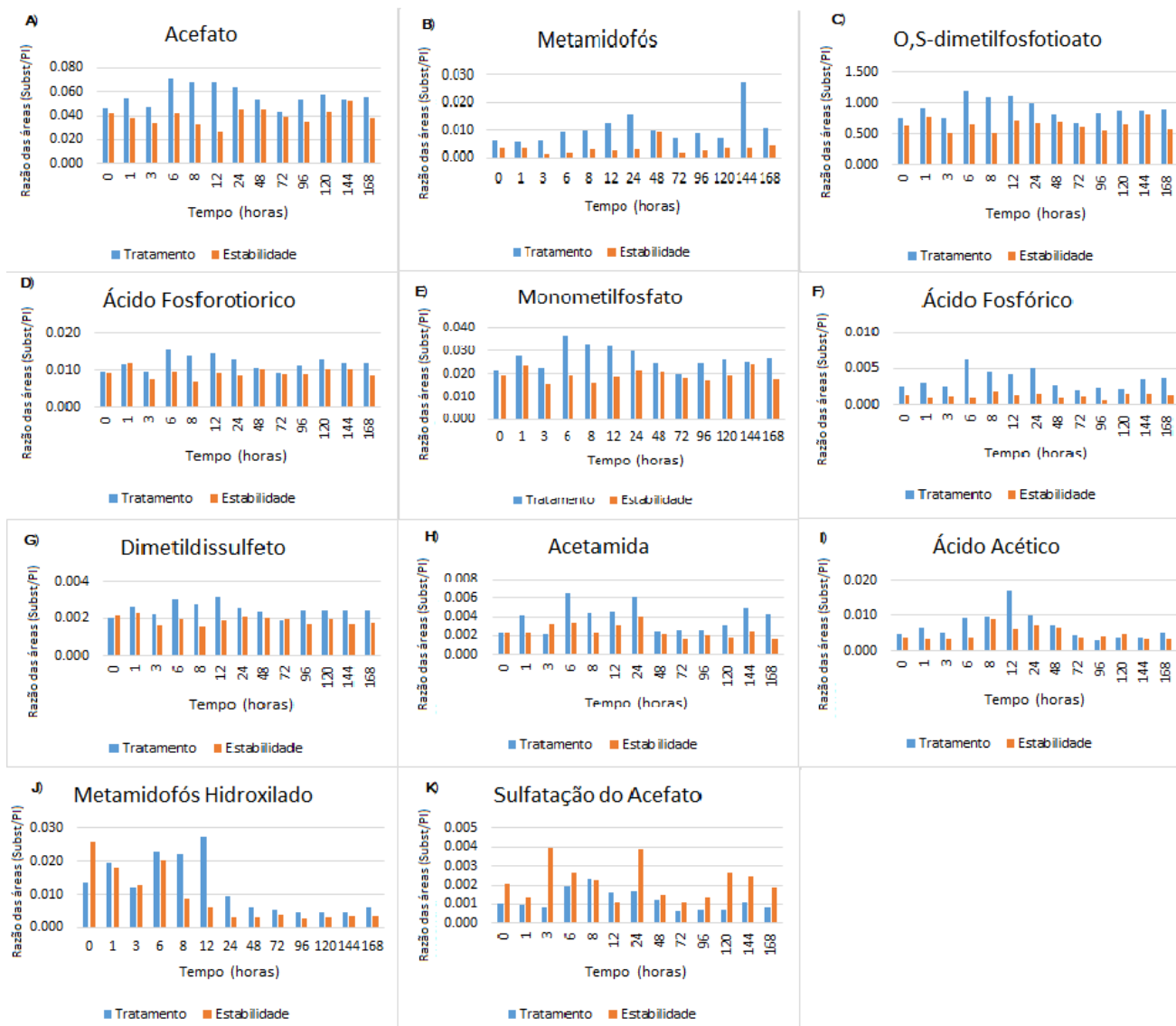
5.2.2 – Comparação entre a formação de metabólitos a partir do acefato no tratamento e na estabilidade

Os metabólitos formados a partir do acefato nos aquários do grupo tratamento foram comparados com os metabólitos formados nos aquários do grupo estabilidade (Figura 12). Os dois grupos formaram os mesmos metabólitos, entretanto em concentrações diferentes.

Assim como os animais, bactérias também metabolizam compostos orgânicos, como acefato, por meio de reações de oxidação e redução (HAO et al., 2012; RANADE et al., 2022; REN et al., 2020; SINGH et al., 2020). É possível que a presença de micro-organismos, como bactérias, nos aquários da estabilidade, tenha metabolizado o acefato formando os mesmos metabólitos

que nos aquários do tratamento. O metabólito formado pela sulfatação do acefato teve maior formação no grupo da estabilidade (Figura 12). Esse resultado pode ser explicado pela presença de bactérias, nas quais também são capazes de metabolizar xenobióticos e substâncias endógenas a partir de reações de sulfatação (JI et al., 2019; KŘEN, 2020; MOUGOUS et al., 2006). As bactérias possuem diferentes classes de enzimas sulfotransferases capazes de catalisar a transferência de um grupo sulfato de uma molécula doadora para uma molécula aceptora (JI et al., 2019), o que corrobora com a presença de microorganismo influenciando a metabolização do acefato nos aquários da estabilidade.

Figura 12: Comparações entre as concentrações dos metabólitos no tratamento e na estabilidade.



Fonte: Autoria Própria.

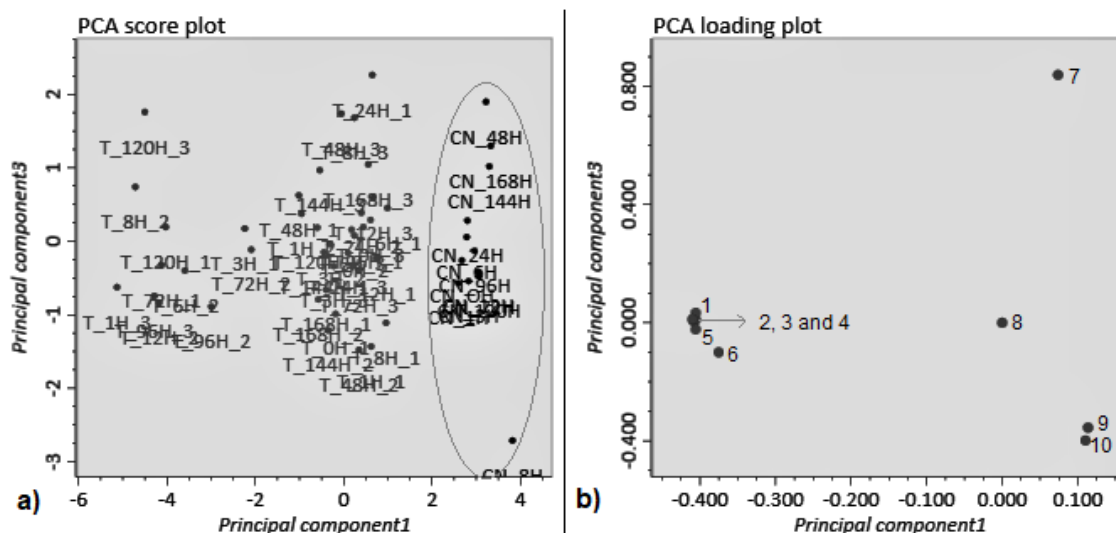
Entretanto, nos aquários do tratamento houve uma formação maior dos outros metabólitos, devido ao processo de biotransformação dos peixes. Desta forma, é perceptível, que o processo de biotransformação do *zebrafish* teve grande relevância na contribuição da formação dos metabólitos a partir do acefato.

5.2.3 - Análise Metabolômica Alvo do Ensaio de Biotransformação

A PCA é um método estatístico multivariado não supervisionado, ou seja, analisa somente como as amostras se agrupam. Este método é utilizado para avaliar as relações entre muitas variáveis e explicar a sua correlação (KURITA, 2020). Os resultados encontrados (Figura 13a) no *score plot*, demonstraram uma tendência de separação entre os dois grupos (tratamento e controle negativo) com base em suas composições metabólicas. A somatória dos dois primeiros componentes principais explicou 80.51487% da variação dos dados analisados no ensaio da biotransformação. Percebe-se, que as amostras do tratamento se mantiveram no centro e no lado esquerdo, enquanto as amostras do controle negativo estão no lado direito. Isso significa que as amostras do grupo tratamento apresentaram diferenças com as amostras do grupo controle negativo. Além disso, não apresentaram comportamento aleatório das amostras (presença de *outlier*).

O *loading plot* (Figura 13b) demonstra a distribuição dos metabólitos, sendo cada um representado pela numeração de 1 a 10, em que: 1 = O,S-dimetilfosforotioato; 2 = O,O,S-trimetil fosforotioato; 3 = monometilfosfato; 4 = dimetildissulfeto; 5 = metamidofós hidroxilado; 6 = metamidofós; 7 = acefato hidroxilado; 9 = ácido fosfórico e 10 = ácido fosforoso. É notável, que os metabólitos de 1 a 6 (Figura 13b) estão espacialmente localizados na mesma posição que as amostras do tratamento (Figura 13a).

Figura 13: a) *Score plot* - Agrupamento das amostras analisadas do tratamento e do controle negativo (circuladas). b) *Loanding plot* – Metabólitos analisados dentro da mesma faixa de valores que as amostras do tratamento em principal component 1 e 3.



Fonte: Autoria Própria.

Ao mesmo tempo, método supervisionado também foi utilizado, como o método de análise discriminante de mínimos quadrados (OPLS-DA) em que seus componentes representam uma medida de quanto uma característica contribui para diferenciar os grupos amostrais (CANUTO et al., 2017).

A análise OPLS-DA apresentou o Q^2 igual a 0.98065, sendo este, um modelo com capacidade preditiva boa. Para cada metabólito com VIP igual ou superior a 1, foram analisados o valor de P fornecido pela ANOVA, com valor menor que 0,05 para ser estatisticamente significativo, e o FC com valor acima ou igual a 2 (YE; LU, 2022). Os metabólitos que apresentam esses parâmetros com valores suficientes, são os metabólitos responsáveis pela diferença entre o grupo do controle negativo e o grupo do tratamento, conforme são demonstrados na tabela 12.

Tabela 12: Parâmetros analisados na análise multivariada OPLS-DA.

ID	Metabólitos	VIP	Valor de P	FC
1436	Monometilfosfato	1	2.03E-09	2550.17
2061	O,S-dimetilfosfotioato	3	2.19E-10	2858.61
2352	O,O,S-trimetil fosfotioato	1	1.29E-09	2414.35

Fonte: Autória Própria.

O parâmetro de importância variável (VIP) permite delimitar a distância entre os grupos e identificar metabólitos de acordo com as ordens de suas contribuições para a separação dos grupos. Desta forma, os metabólitos O,S-dimetilfosfotioato, monometilfosfato e O,O,S-trimetil fosfotioato foram

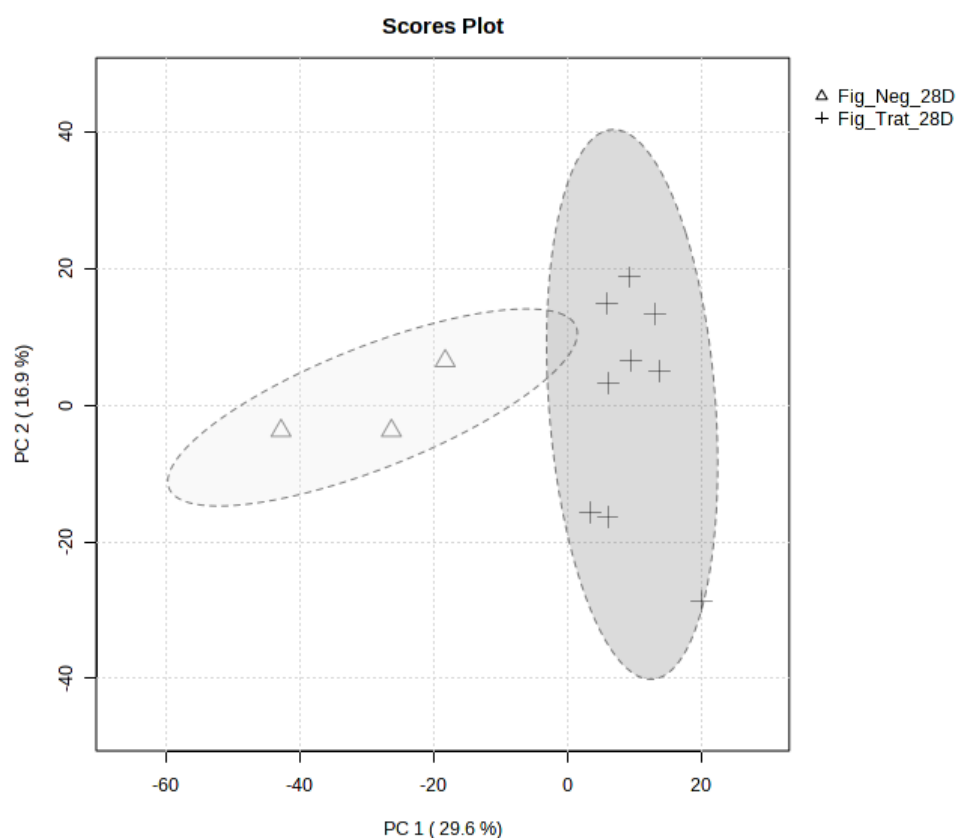
identificados com base nos valores significativos do VIP, do valor de P e do FC. Portanto, esses 3 metabólitos são indicativos de exposição ao acefato, isto é, são possíveis indicadores para monitoramento de exposição ao acefato. No estudo realizado por (HAO et al., 2012) e (OLSSON et al., 2003), o O,S-dimetilfosfotioato já foi identificado como possível biomarcador de exposição ao acefato tanto no metabolismo de bactéria como na urina de humanos, entretanto, não foram encontrados outros trabalhos que demonstrem o monometilfosfato e o O,O,S-trimetil fosfotioato como possíveis biomarcadores. O metamidofós, mesmo sendo um dos 4 metabólitos formados em maiores concentrações, não apresentou um VIP significativo na análise da OPLS-DA.

5.3 – Análise Metabolômica Global do Ensaio de Exposição Crônica

As amostras dos ensaios de exposição crônica ao acefato de 28 dias foram analisadas. Após a análise, os dados brutos foram convertidos no formato mzxml, e posteriormente, foram analisados na plataforma *MetaboAnalyst 5.0*. Nessa plataforma foram utilizadas algumas ferramentas para analisar possíveis alterações metabólicas no fígado dos animais, comparando o grupo controle negativo com o grupo tratamento. Foram avaliados os métodos estatísticos de PCA, FC, Teste T e OPLS-DA, e a ferramenta *Heatmap*.

A PCA é frequentemente utilizada na análise estatística como uma primeira visão dos dados, a fim de verificar se houve diferenças entre os grupos e potenciais outliers. Neste caso (Figura 14), observamos uma separação entre os grupos controle negativo e tratamento, sugerindo que houve diferença nos metabólitos dos grupos comparados. A soma das duas primeiras componentes (PC1 e PC2) é capaz de explicar 46,5% da variabilidade dos dados, que melhor separam as amostras. Não observamos nenhum comportamento aleatório entre as amostras dos dois grupos, isto é, nenhuma amostra fora do intervalo de confiança de cada grupo (Figura 14).

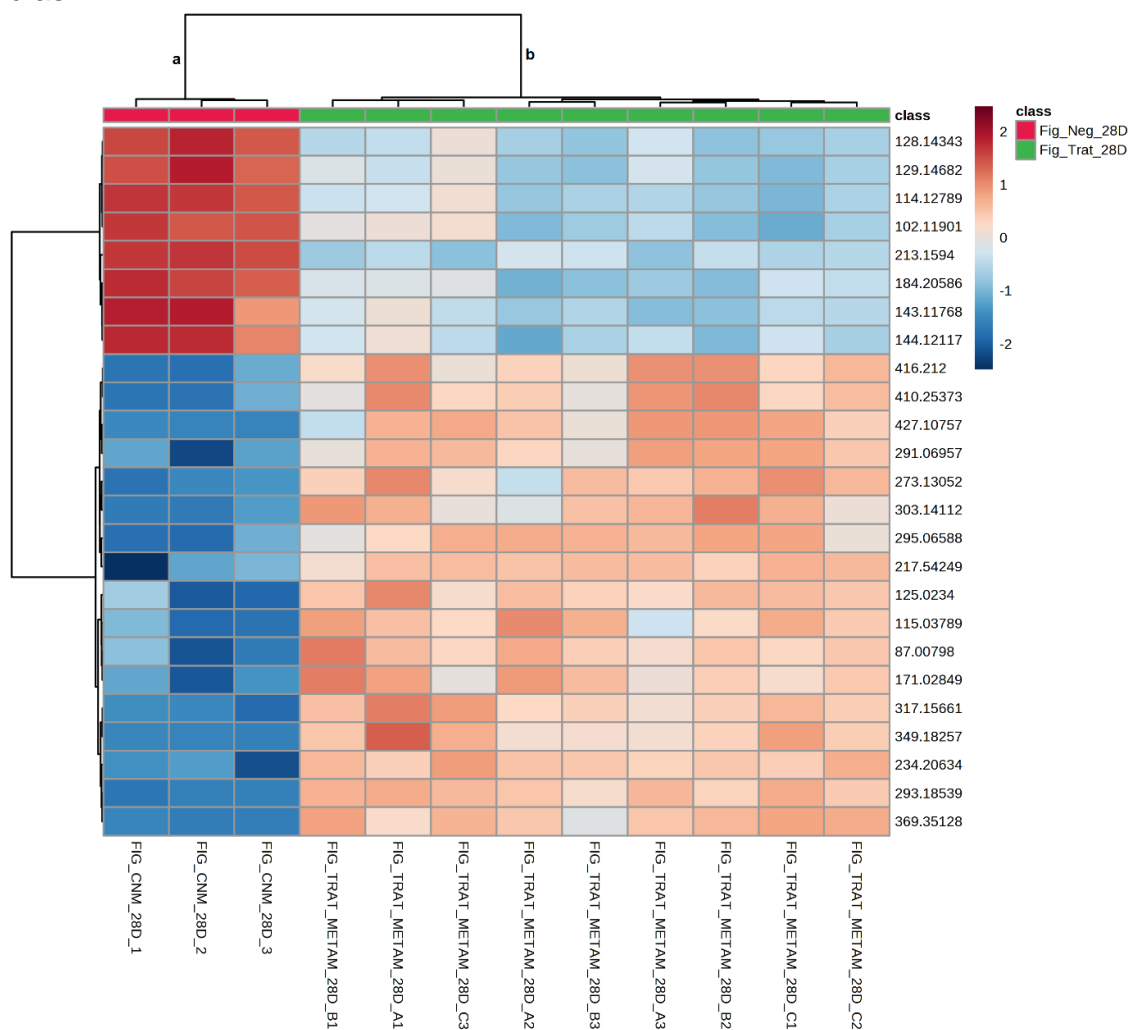
Figura 14: *Score Plot* – Separação dos grupos controle negativo e tratamento da matriz fígado com exposição de 28 dias.



Fonte: Autoria Própria

Posteriormente, foi avaliado a ferramenta *Heatmap*, um mapa de calor utilizado para mostrar visualmente alterações nos metabólitos entre os grupos analisados. Essa análise é observada pela variação da cor de cada célula (metabólito) (CHEN et al., 2019), comparando o mesmo metabólito no grupo controle e no grupo tratamento. O mapa de calor gerado neste estudo demonstrou alterações metabólicas no grupo tratamento em relação ao grupo controle negativo. Foram selecionados os 25 metabólitos alterados, de acordo com essa análise (Figura 15).

Figura 15: Mapa de calor das amostras fígado do controle negativo (grupo a) e das amostras do tratamento (grupo b) da matriz fígado expostos durante 28 dias.



Fonte: Autoria Própria

Os metabólitos presentes no fígado dos animais são de substâncias endógenas. De acordo com a figura 15, os metabólitos na cor vermelha do grupo negativo (a) estão presentes em maiores concentrações do que no grupo tratamento (b). Tal resultado possivelmente indica que os animais expostos ao acefato tiveram esses metabólitos de substâncias endógenas presente no fígado inibidas, ou até mesmo, esgotadas pelo constante processo de biotransformação. Já os metabólitos na cor azul do grupo controle negativo (a) estão presentes em menores concentrações comparadas ao grupo tratamento (b). Nesse caso, os animais ao serem expostos ao acefato tiveram a formação

dessas substâncias endógenas induzidas, isto é, a necessidade de aumentar a produção dessas substâncias pelo organismo dos animais.

Ao mesmo tempo, foram utilizadas análises estatísticas para avaliar os metabólitos presentes no fígado dos animais. As análises estatísticas utilizadas foram: a mudança de dobra (FC >2) (ZHAO et al., 2018) combinada com o teste T (valor de p <0,05), e com a OPLS-DA (VIP > 1.8). Essas análises estatísticas citadas forneceram 7 metabólitos responsáveis pela diferenciação dos grupos (Tabela13). Ao mesmo tempo, de acordo com a análise no mapa de calor, os 7 metabólitos apresentaram menores concentrações no fígado dos animais expostos do que no fígado dos animais no controle negativo.

Tabela 13: Metabólitos alterados de acordo com todos os parâmetros estatísticos analisados.

Metabólitos [M +H] ⁺	Valor de P	FC	Grupo tratado (<i>Heatmap</i>)*
114.12789	1.05E-06	4.7523	Diminuiu
128.14343	4.87E-07	4.5574	Diminuiu
129.14682	3.67E-06	4.3352	Diminuiu
143.11768	8.88E-06	3.8321	Diminuiu
144.12117	1.10E-05	5.2947	Diminuiu
184.20586	3.24E-06	9.3227	Diminuiu
213.1594	2.15E-08	8.0454	Diminuiu

* Comparação dos metabólitos do tratamento em relação ao controle negativo pela análise do mapa de calor

Fonte: Autoria Própria

Os 7 metabólitos alterados em todas essas análises submetidas no *MetaboAnalyst 5.0*, são metabólitos de enzimas presentes no fígado dos animais que sofreram maiores alterações em suas concentrações, discriminando as diferenças nos grupos analisados. Todos os 7 metabólitos tiveram suas

concentrações diminuídas no fígado dos animais expostos ao acefato, o que pode acarretar a falta e até mesmo perda de formação de moléculas essenciais (proteínas, hormônios e enzimas) e da metabolização de outras substâncias presentes no fígado, que sejam necessárias para absorção e um funcionamento normal do organismo dos peixes.

6 - CONCLUSÃO:

O trabalho proposto analisou dois ensaios diferentes, o ensaio de toxicidade crônica do acefato e metamidofós no *zebrafish* durante 28 e 35 dias e o ensaio de biotransformação. De acordo com a avaliação da biotransformação do acefato utilizando o modelo animal *Zebrafish*, os resultados indicaram que o *zebrafish* pode metabolizar o acefato por duas vias, na primeira via ele forma acetamida e O,S-dimetilfosfotioato e na outra via o acefato é metabolizado em metamidofós e ácido acético. O O,S-dimetilfosfotioato e o metamidofós são posteriormente biotransformados em outros metabólitos. A formação desses metabólitos ocorre também no grupo da estabilidade, entretanto, a formação dos metabólitos no tratamento é maior, devido ao metabolismo de fase I do *zebrafish*. O conhecimento das vias de biotransformação e das proporções de cada metabólito formado desempenham um papel fundamental em programas de monitoramento ambiental, auxiliando as autoridades públicas nas regulamentações dessas substâncias em água.

Os metabólitos gerados em maior proporção foram: o O,S-dimetilfosfotioato (m/z 142.99262), o monometilfosfato (m/z 112.99982), o O,O,S-trimetil fosforotioato (m/z 157.00827), e o metamidofós (m/z 142.00861), respectivamente. Além disso, de acordo com a análise OPLS-DA, os metabólitos O,S- dimetilfosfotioato, monometilfosfato e O,O,S-trimetil fosforotioato foram os mais relevantes para diferenciar o tratamento do controle negativo, portanto são possíveis indicadores de exposição ao acefato, contribuindo para o seu monitoramento em ambientes aquáticos. Até o momento, este trabalho foi o único a apresentar o monometilfosfato e O,O,S-trimetil fosforotioato como possíveis biomarcadores de exposição ao acefato e, uma comparação dos compostos gerados na biotransformação do *zebrafish* e na formação dos metabólitos em água (estabilidade).

No ensaio de exposição crônica, é perceptível que houve alterações metabólicas de substâncias endógenas no fígado dos animais expostos ao acefato. Os 7 metabólitos alterados em todas essas análises submetidas no *MetaboAnalyst 5.0*, são possíveis biomarcadores de resposta biológica a exposição do *zebrafish* ao acefato.

7 - BIBLIOGRAFIA:

AKYUZ, E. et al. Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review. **Life Sciences**, v. 265, p. 118826, jan. 2021.

ALMAZROO, O. A.; MIAH, M. K.; VENKATARAMANAN, R. Drug Metabolism in the Liver. **Clinics in Liver Disease**, v. 21, n. 1, p. 1–20, fev. 2017.

ANVISA. **Resolução - RDC nº- 143, de 14 de janeiro de 2011**. Brasília: [s.n.].

ANVISA. Resolução - RDC nº 45, de 2 de outubro de 2013. 2013.

ANVISA. **Relatório das Amostras Analisadas no Período de 2013-2015**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3778json-file-1>>. Acesso em: 2 jul. 2023.

ANVISA. **Relatório das Amostras Analisadas no Período de 2017-2018**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1>>. Acesso em: 2 jun. 2022.

BARBOSA, A. M. C.; SOLANO, M. DE L. M.; UMBUZEIRO, G. DE A. Pesticides in Drinking Water – The Brazilian Monitoring Program. **Frontiers in Public Health**, v. 3, 4 nov. 2015.

BARROS, G. S. DE C.; LUCCHI, B. B.; MINARÉ, R. PIB DO AGRONEGÓCIO CRESCEU ABAIXO DAS PROJEÇÕES. **CEPEA**, p. 1–19, 2022.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. 1989.

BRASIL. Lei nº 9.974, de 6 de junho de 2000. 2000.

BRASIL. Projeto de Lei 6299/2002. 2002.

BRASIL. Resolução Nº 899, de 29 de Maio de 2003. 2003.

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta nº 2, de 23 de janeiro de 2006. 2006.

BRASIL. Portaria de Consolidação nº 5/2017 - Anexo XX. 2017.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias de agrotóxicos (2021)**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/dadosabertos/informacoes-analiticas/monografias-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 1 jul. 2023a.

BRASIL. ATO Nº 9, de 22 de Fevereiro de 2021. 16 jul. 2021 b.

BRASIL. **Informações Técnicas: Registros concedidos - 2005 - 2021**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>>. Acesso em: 1 jul. 2023.

BROVINI, E. M. et al. Three-bestseller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of The Total Environment**, v. 771, p. 144754, jun. 2021.

BROVINI, E. M. et al. Occurrence and environmental risk assessment of 22 pesticides in Brazilian freshwaters. **Aquatic Toxicology**, v. 260, p. 106566, jul. 2023.

BROX, S. et al. Metabolism of clofibric acid in zebrafish embryos (Danio rerio) as determined by liquid chromatography–high resolution–mass spectrometry. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 185–186, p. 20–28, jul. 2016.

CALDAS, S. S. et al. Pesticide residue determination in groundwater using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detector and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 4, p. 642–650, 2010.

CANUTO, G. et al. METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Química Nova**, 2017.

CARNEIRO, F. F. et al. Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. **ABRASCO**, v. 1, 2015.

CAVALIERE, C. et al. A Triple Quadrupole and a Hybrid Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer in Comparison for Polyphenol Quantitation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 17, p. 4885–4896, 1 maio 2019.

CHAMBERS, M. C. et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 918–920, 10 out. 2012.

CHEN, Y.-Y. et al. Elucidating the interaction of kansui and licorice by comparative plasma/tissue metabolomics and a heatmap with relative fold change. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 9, n. 5, p. 312–323, out. 2019.

CHNG, H. T. et al. An Investigation of the Bioactivation Potential and Metabolism Profile of Zebrafish versus Human. **SLAS Discovery**, v. 17, n. 7, p. 974–986, ago. 2012.

CHRISTEN, V.; FENT, K. Tissue-, sex- and development-specific transcription profiles of eight UDP-glucuronosyltransferase genes in zebrafish (*Danio rerio*) and their regulation by activator of aryl hydrocarbon receptor. **Aquatic Toxicology**, v. 150, p. 93–102, maio 2014.

CLAYMAN, C. L.; CONNAUGHTON, V. P. Neurochemical and Behavioral Consequences of Ethanol and/or Caffeine Exposure: Effects in Zebrafish and Rodents. **Current Neuropharmacology**, v. 20, n. 3, p. 560–578, mar. 2022.

CONAMA. Resolução nº 465, de 5 de dezembro de 2014. 2014.

CONCEA. Resolução Normativa CONCEA nº 34, de 27 de julho de 2017. 2017.

COSTA, R. M. et al. Determination of the targeted carbendazim metabolites in zebrafish water tank by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, p. 1–12, 18 mar. 2022.

COSTA, R. M. et al. Untargeted Metabolomics Reveals Lipid Impairment in the Liver of Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to Carbendazim. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 437–448, 23 fev. 2023.

DA SILVA, A. C. G. et al. Assessing Agricultural Toxicity in Brazil: Advances and Opportunities in the 21st Century. **Toxicological Sciences**, v. 177, n. 2, p. 316–324, 1 out. 2020.

DE OLIVEIRA, D. M.; AGOSTINETTO, L.; SIEGLOCH, A. E. Comparison of the drinking water standard for pesticides of the Brazil with other countries. **Heliyon**, v. 9, n. 3, p. e13783, mar. 2023.

DE SOUZA ANSELMO, C. et al. Zebrafish (*Danio rerio*): A valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans? **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 212, p. 34–46, out. 2018.

DHANUSHKA, M. A. T.; PEIRIS, L. DINITHI. C. Cytotoxic and Genotoxic Effects of Acephate on Human Sperm. **Journal of Toxicology**, v. 2017, p. 1–6, 2017.

DIEKMANN, H.; HILL, A. ADMETox in zebrafish. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 10, n. 1, p. e31–e35, mar. 2013.

DIEZ-SIMON, C.; MUMM, R.; HALL, R. D. Mass spectrometry-based metabolomics of volatiles as a new tool for understanding aroma and flavour chemistry in processed food products. **Metabolomics**, v. 15, n. 3, p. 41, 12 mar. 2019.

DUBEY, D. et al. NMR-Based Serum Metabolomics Revealed Distinctive Metabolic Patterns in Reactive Arthritis Compared with Rheumatoid Arthritis. **Journal of Proteome Research**, p. acs.jproteome.8b00439, 30 out. 2018.

DUMONT, D. et al. Multi-Targeted Metabolic Profiling of Carotenoids, Phenolic Compounds and Primary Metabolites in Goji (*Lycium spp.*) Berry and Tomato (*Solanum lycopersicum*) Reveals Inter and Intra Genus Biomarkers. **Metabolites**, v. 10, n. 10, p. 422, 21 out. 2020.

EUROPEAN UNION. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. 1998.

FARAG, A. T. et al. Evaluation of male-mediated reproductive toxic effects of methamidophos in the mouse. **Andrologia**, v. 44, n. 2, p. 116–124, abr. 2012.

GOLDSTONE, J. V et al. Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 643, 18 dez. 2010.

GOTTEMS, L. **Anvisa muda regras para venda de Acefato**. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/noticias/anvisa-muda-regras-para-venda-de-acefato_397877.html>. Acesso em: 2 jun. 2022.

HAO, D.-F. et al. Metabolomic analysis of the toxic effect of chronic low-dose exposure to acephate on rats using ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 83, p. 25–33, set. 2012.

HARDER, J. M. et al. Disturbed glucose and pyruvate metabolism in glaucoma with neuroprotection by pyruvate or rapamycin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 52, p. 33619–33627, 29 dez. 2020.

HARPER, C.; LAWRENCE, C. Life support. Em: TAYLOR; GROUP, F. (Eds.). **The Laboratory Zebrafish**. 1. ed. New York: CRC Press, 2016. v. V.1p. 85–119.

HE, X. et al. Developmental Neurotoxicity of Methamidophos in the Embryo-Larval Stages of Zebrafish. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 1, p. 23, 28 dez. 2016.

HORZMANN, K. A.; FREEMAN, J. L. Making Waves: New Developments in Toxicology With the Zebrafish. **Toxicological Sciences**, v. 163, n. 1, p. 5–12, 1 maio 2018.

HOWE, D. G. et al. ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database: increased support for mutants and transgenics. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D854–D860, 15 out. 2012.

HUANG, H.; WU, Q. Cloning and Comparative Analyses of the Zebrafish Ugt Repertoire Reveal Its Evolutionary Diversity. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e9144, 10 fev. 2010.

HUANG, Y. et al. The mechanisms and process of acephate degradation by hydroxyl radical and hydrated electron. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 226–233, 1 fev. 2018.

IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>>. Acesso em: 1 jun. 2022.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Brasília: [s.n.].

IVANISEVIC, J. et al. An interactive cluster heat map to visualize and explore multidimensional metabolomic data. **Metabolomics**, v. 11, n. 4, p. 1029–1034, 12 ago. 2015.

JI, Y. et al. Directed aryl sulfotransferase evolution toward improved sulfation stoichiometry on the example of catechols. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 9, p. 3761–3771, 4 maio 2019.

KALUEFF, A. V.; ECHEVARRIA, D. J.; STEWART, A. M. Gaining translational momentum: More zebrafish models for neuroscience research. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 55, p. 1–6, dez. 2014.

KŘEN, V. Glycosylation, Sulfation and Phosphorylation. Em: **Applied Biocatalysis**. [s.l.] Wiley, 2020. p. 363–407.

KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. New Advances in Separation Science for Metabolomics: Resolving Chemical Diversity in a Post-Genomic Era. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2437–2468, 10 abr. 2013.

KURITA, T. Principal Component Analysis (PCA). Em: **Computer Vision**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 1–4.

LIN, Z. et al. Degradation of Acephate and Its Intermediate Methamidophos: Mechanisms and Biochemical Pathways. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 18 ago. 2020.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. Spectroscopic and Statistical Techniques for Information Recovery in Metabonomics and Metabolomics. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 45–69, 1 jul. 2008.

LIU, X. et al. Developmental toxicity and neurotoxicity of synthetic organic insecticides in zebrafish (*Danio rerio*): A comparative study of deltamethrin, acephate, and thiamethoxam. **Chemosphere**, v. 199, p. 16–25, maio 2018.

LOERRACHER, A.-K.; BRAUNBECK, T. Cytochrome P450-dependent biotransformation capacities in embryonic, juvenile and adult stages of zebrafish (*Danio rerio*)—a state-of-the-art review. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 7, p. 2299–2334, 20 jul. 2021.

LOPES, C. V. A.; DE ALBUQUERQUE, G. S. C. [Challenges and strides in the control of pesticide residues in Brazil: 15 years of the Program for Analysis of Pesticide Residues in Food Products]. **Cadernos de saude publica**, v. 37, n. 2, 2021.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Thermal Biology**, v. 36, n. 2, p. 91–104, mar. 2011.

MALI, H. et al. A novel organophosphate hydrolase from *Arthrobacter* sp. HM01: Characterization and applications. **Bioresource Technology**, v. 349, p. 126870, abr. 2022.

MARCHEV, A. S. et al. Metabolomics and health: from nutritional crops and plant-based pharmaceuticals to profiling of human biofluids. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 19–20, p. 6487–6503, 19 out. 2021.

MARINS, A. T. et al. Environmentally relevant pesticides induce biochemical changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ecotoxicology**, v. 30, n. 4, p. 585–598, 26 maio 2021.

MATTEI, T. F.; MICHELLON, E. Panorama da agricultura orgânica e dos agrotóxicos no Brasil: uma análise a partir dos censos 2006 e 2017. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 59, n. 4, 2021.

MENKE, A. L. et al. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 5, p. 759–775, 2 ago. 2011.

MINGOTI, R.; SPADOTTO, C. A.; MORAES, D. A. DE C. Suscetibilidade à contaminação da água subterrânea em função de propriedades dos solos no

Cerrado brasileiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 9, p. 1252–1260, set. 2016.

MIRNEZAMI, R. et al. Chemical mapping of the colorectal cancer microenvironment via MALDI imaging mass spectrometry (MALDI-MSI) reveals novel cancer-associated field effects. **Molecular Oncology**, v. 8, n. 1, p. 39–49, fev. 2014.

MODICK, H. et al. Human metabolism and excretion kinetics of aniline after a single oral dose. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 6, p. 1325–1333, 2 jun. 2016.

MORAES, M. C.; LAGO, C. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. Em: **Química Nova**. 4. ed. [s.l.: s.n.]. v. 26p. 556–563.

MOREAU, R. L. DE M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. 2. ed. Rio de Janeiro: [s.n.]. v. 1

MOUGOUS, J. D. et al. A sulfated metabolite produced by *stf3* negatively regulates the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 11, p. 4258–4263, 14 mar. 2006.

NAWAJI, T. et al. Cytochrome P450 Expression and Chemical Metabolic Activity before Full Liver Development in Zebrafish. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 12, p. 456, 11 dez. 2020.

OLSSON, A. O. et al. A liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry method for quantification of specific organophosphorus pesticide biomarkers in human urine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 6, p. 808–815, 1 jul. 2003.

OTTE, J. C. et al. Intrinsic Xenobiotic Metabolizing Enzyme Activities in Early Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicological Sciences**, v. 159, n. 1, p. 86–93, set. 2017.

PANG, Z. et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W388–W396, 2 jul. 2021.

PANG, Z. et al. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. **Nature Protocols**, v. 17, n. 8, p. 1735–1761, 17 ago. 2022.

PANULA, P. et al. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 46–57, out. 2010.

PARDAL, D. et al. Resveratrol and Piceid Metabolites and Their Fat-Reduction Effects in Zebrafish Larvae. **Zebrafish**, v. 11, n. 1, p. 32–40, fev. 2014.

PENG, H.-F. et al. Identification of differentially expressed proteins of brain tissue in response to methamidophos in flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 44, n. 2, p. 555–565, jun. 2015.

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, 1 out. 2017.

RAMIREZ-VARGAS, M. A. et al. Methamidophos induces cytotoxicity and oxidative stress in human peripheral blood mononuclear cells. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 147–155, jan. 2017.

RANADE, Y. H. et al. Functionality of fructosphere bacteria *Kocuria sediminis* strain AC3 in plant growth promotion and biodegradation of the acephate in grape berries. **Biologia**, v. 77, n. 11, p. 3255–3263, 4 ago. 2022.

REE, R. et al. The N-terminal acetyltransferase Naa10 is essential for zebrafish development. **Bioscience Reports**, v. 35, n. 5, 1 out. 2015.

REIFYCS INC, C. **Reifycs Abf (Analysis Base File) Converter**. TóquioReifyes, 2018.

REN, J. et al. Biodegradation of acephate by *Bacillus paramycoides* NDZ and its degradation pathway. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 10, p. 155, 20 out. 2020.

REZENDE-TEIXEIRA, P. et al. What can we learn from commercial insecticides? Efficacy, toxicity, environmental impacts, and future developments. **Environmental Pollution**, v. 300, p. 118983, maio 2022.

RIBEIRO, T. A. et al. Acephate exposure during a perinatal life program to type 2 diabetes. **Toxicology**, v. 372, p. 12–21, nov. 2016.

SCHULZE, T. **Mass Bank**. Disponível em: <https://massbank.eu/MassBank/RecordDisplay?id=MSBNK-Athens_Univ-AU311102>. Acesso em: 12 abr. 2023.

SHARMA, A. et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 11, p. 1446, 21 nov. 2019.

SINGH, S. et al. Kinetic Study of the Biodegradation of Acephate by Indigenous Soil Bacterial Isolates in the Presence of Humic Acid and Metal Ions. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 433, 11 mar. 2020.

SOBANSKA, M. et al. Applicability of the fish embryo acute toxicity (FET) test (OECD 236) in the regulatory context of Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals (REACH). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 657–670, mar. 2018.

SOUZA ANSELMO, C. et al. Drug Metabolism in the Liver. **Drug Testing and Analysis**, v. 9, n. 11–12, p. 1685–1694, 13 nov. 2017.

SOUZA TETTE, P. A. et al. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. **Talanta**, v. 149, p. 124–141, mar. 2016.

SUGIMOTO, M. et al. Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis. **Current Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 96–108, 1 mar. 2012.

SYAFRUDIN, M. et al. Pesticides in Drinking Water—A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 2, p. 468, 8 jan. 2021.

SYED, J. H. et al. Pesticide residues in fruits and vegetables from Pakistan: a review of the occurrence and associated human health risks. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 23, p. 13367–13393, 25 dez. 2014.

TAO, T.; PENG, J. Liver development in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Genetics and Genomics**, v. 36, n. 6, p. 325–334, jun. 2009.

URIÓSTEGUI-ACOSTA, M. et al. Methamidophos alters sperm function and DNA at different stages of spermatogenesis in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 279, n. 3, p. 391–400, set. 2014.

US EPA. **Validation and Peer Review of U.S. Environmental Protection Agency Chemical Methods of Analysis**. Washington, DC: [s.n.].

VERBUEKEN, E. et al. In Vitro Biotransformation of Two Human CYP3A Probe Substrates and Their Inhibition during Early Zebrafish Development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 217, 22 jan. 2017.

WAHAB, M. F.; ROY, D.; ARMSTRONG, D. W. The theory and practice of ultrafast liquid chromatography: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 1151, p. 238170, mar. 2021.

WANG, G. et al. In vivo metabolism of organophosphate flame retardants and distribution of their main metabolites in adult zebrafish. **Science of The Total Environment**, v. 590–591, p. 50–59, jul. 2017.

WANG, J.; CAO, H. Zebrafish and Medaka: Important Animal Models for Human Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 10766, 5 out. 2021.

WANG, Q. et al. Identification of apoptosis and macrophage migration events in paraquat-induced oxidative stress using a zebrafish model. **Life Sciences**, v. 157, p. 116–124, jul. 2016.

WANG, X. et al. Bioavailability and biomagnification of organophosphate esters in the food web of Taihu Lake, China: Impacts of chemical properties and metabolism. **Environment International**, v. 125, p. 25–32, abr. 2019.

WANG, Y. et al. Acephate interferes with androgen synthesis in rat immature Leydig cells. **Chemosphere**, v. 245, p. 125597, abr. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2019**. 2019. ed. [s.l.] World Health Organization, 2020. v. 1

XIAO, X.; ZHOU, Y. Two-Dimensional Quaternion PCA and Sparse PCA. **IEEE Transactions on Neural Networks and Learning Systems**, v. 30, n. 7, p. 2028–2042, jul. 2019.

YE, S.; LU, H. Determination of Fatty Acids in Rice Oil by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) with Geographic and Varietal Discrimination by Supervised Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA). **Analytical Letters**, v. 55, n. 5, p. 675–687, 24 mar. 2022.

YU, C. T. et al. An evaluation of the National Institutes of Health grants portfolio: identifying opportunities and challenges for multi-omics research that leverage metabolomics data. **Metabolomics**, v. 18, n. 5, p. 29, 30 maio 2022.

ZHAO, H. et al. Metabolomics investigation of dietary effects on flesh quality in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **GigaScience**, v. 7, n. 10, 1 out. 2018.

ZHAO, R.; BAO, H.; XIA, L. γ -Irradiation Degradation of Methamidophos. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 27, n. 9, p. 1749–1754, set. 2009.

ZHAO, Y. et al. Isolation, Identification, and Characterization of an Organophosphorous Pesticide Degrading Bacterium, *Enterobacter ludwigii* M2. **Advanced Materials Research**, v. 1051, p. 398–403, out. 2014.