

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

RAFAELA IMOSKI

**USO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS PARA AVALIAR A
EFICIÊNCIA DE DEGRADAÇÃO DO PESTICIDA MALATHION POR
FOTÓLISE E PROCESSO UV/H₂O₂**

**CURITIBA
2023**

RAFAELA IMOSKI

**USO DE MARCADORES BIOQUIMICOS PARA AVALIAR A
EFICIÊNCIA DE DEGRADAÇÃO DO PESTICIDA MALATHION POR
FOTÓLISE E PROCESSO UV/H₂O₂**

**USE OF BIOCHEMICAL MARKERS TO EVALUATE THE EFFICIENCY OF
DEGRADATION OF THE PESTICIDE MALATHION BY PHOTOLYSIS AND
UV/H₂O₂ PROCESS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Área de Concentração: Tecnologias e Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Processos Químicos e Biotecnológicos de Tratamento e Valorização de Resíduos.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz

**CURITIBA
2023**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Curitiba**



RAFAELA IMOSKI

**USO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS PARA AVALIAR A EFICIÊNCIA DE DEGRADAÇÃO DO
PESTICIDA MALATHION POR FOTÓLISE E PROCESSO UV/H2O2**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 30 de Março de 2023

Dr. Marcus Vinicius De Liz, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Adriane Martins De Freitas, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Angela Maria Palacio Cortes, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 30/03/2023.

AGRADECIMENTOS

A minha família, Edna, Gilmar e Rubia que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando para que eu chegasse até aqui. Obrigado pela paciência, sem vocês nada disso teria sido possível. Amo vocês demais!

Ao meu orientador, Professor Marcus Vinicius de Liz, pela orientação, apoio, aprendizado compartilhado e toda paciência nesses anos de convivência no laboratório e na pesquisa. Devo muito a você, muito obrigada por tudo!

As amigas de longa data, Mayara Thais Skrzek, Marília Destefani e Thais Damasio, pelo apoio e paciência nos dias em que eu não estava disponível para sair com vocês ou com qualquer energia pra conversar, por continuarem sempre aqui! Amo vocês!

As amigadas mais improváveis que eu nunca pensei em ter, Barbara Alves de Lima e Tatiani Andressa Modkovski, vocês têm sido fundamentais nessa jornada, não sei nem por onde começar a agradecer. Obrigada por tanto. O ‘trio do Mé’ (mesmo que eu nunca tenha entendido esse nome) sempre estará no meu coração!

As amigas maravilhosas Lais Jarenko da Cruz e Pamella Mariotti, por toda ajuda no laboratório, pela amizade e pelos nossos cafés com fofocas! Vocês são muito importantes pra mim, que nossa amizade só cresça. Obrigada por tanto!

Aos meus estagiários mais atrapalhados e companheiros, o “pequeno” Gabriel Helmer e o irritado Eric Schwamberger que sempre fazem questão de me irritar. Obrigado por tanto e por tudo que fazem por mim, vocês sabem que meus dias são mais felizes com vocês, seus manés!

A Cintia Boeira Batista Lafay, por ter me acolhido tão bem. Por transmitir tanto amor e serenidade. Obrigada por tudo que fez e tem feito por mim! A Eveline Camillo e a Rubia Bottini, por tantos momentos de alegria, de bolo com café e fofocas, por transmitirem toda a sua experiência adquirida ao longo da vida comigo! Obrigada!

A Angela, Ana e Professor Mario Navarro, pelo conhecimento e pela ajuda com os marcadores bioquímicos e toda a paciência para explicar cada etapa! Obrigada!

A banca por todas as contribuições e apontamentos durante a defesa desse trabalho.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná por todo o ensino e a oportunidade de utilizar as dependências e recursos para realização desse trabalho.

Aos laboratórios multiusuários LAMEAA e LAMAQ pela disponibilidade instrumental, permitindo a realização deste trabalho.

A todos, muito obrigado!

RESUMO

IMOSKI, R. **Uso de marcadores bioquímicos para avaliar a eficiência de degradação do pesticida malathion por fotólise e processo UV/H₂O₂**. 2023, 99f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2023.

Este trabalho teve como objetivo avaliar as respostas dos marcadores bioquímicos após a degradação do malathion padrão e em formulação comercial por fotólise e processo UV/H₂O₂. O método analítico para determinação do analito foi desenvolvido em cromatografia líquida de alta eficiência aliado a extração em fase sólida. Os ensaios de degradação por fotólise e UV/H₂O₂ foram realizados em reator fotoquímico convencional de 1L nos tempos 15, 30 e 45 minutos, com fonte de radiação de lâmpada de alta pressão de mercúrio 125W, protegido com bulbo protetor de quartzo e imersa na solução. Houve reestabelecimento da concentração de H₂O₂ em 100 mg L⁻¹ a cada 5 minutos. A concentração do malathion foi acompanhada por HPLC-DAD e a formação de subprodutos por GC-MS/MS. A toxicidade aguda foi analisada com larvas de *Stegomyia aegypti* e a fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa*. Para avaliar o efeito subletal do malathion e seus subprodutos, foram avaliados biomarcadores bioquímicos (AChE, GST, EST- α , EST- β , SOD e LPO) em mosquitos de *Stegomyia aegypti* criados desde o primeiro estágio até a emergência dos mosquitos. O método cromatográfico apresentou linearidade adequada ($R^2 > 0,99$) e níveis de recuperação para a extração de 76 (16,5)%. O limite de detecção e quantificação para o malathion foi de 0,03 e 0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A degradação do malathion apresentou valores abaixo do limite de detecção do método analítico em todos os tempos e processos analisados. A atividade larvicida com *Stegomyia aegypti* mostrou os maiores efeitos tóxicos para as amostras não tratadas de ambos os processos. Para a fitotoxicidade, foi observada uma variação entre inibição, estimulação e sem efeito observado dependendo do método e do tempo de tratamento. As maiores alterações para a atividade enzimática foram registradas para EST- β e para as enzimas de estresse oxidativo na fotólise, demonstrando a incapacidade do sistema antioxidante de eliminar o excesso de radicais induzidos pelo malathion e seus subprodutos. O tratamento mostrou-se efetivo para a degradação do malathion, porém, foi observada a formação de subprodutos que podem aumentar a toxicidade da solução tratada, colaborando para que não haja a completa desintoxicação do meio.

Palavras-chave: HPLC-DAD. Processos avançados de oxidação. *Stegomyia aegypti*. *Lactuca sativa*. Acetilcolinesterase.

ABSTRACT

IMOSKI, Rafaela. **Use of biochemical markers to evaluate the efficiency of degradation of the pesticide malathion by photolysis and UV/H₂O₂ process.** 2023. 99p. Thesis (Master's in Environmental Science and Technology) – Federal University of Technology – Paraná, Curitiba, 2022.

This work aimed to evaluate the responses of biochemical markers after degradation of standard malathion and in commercial formulation by photolysis and UV/H₂O₂ process. The analytical method for determining the analyte was developed using high performance liquid chromatography combined with solid phase extraction. The photolysis and UV/H₂O₂ degradation tests were carried out in a conventional 1L photochemical reactor at times of 15, 30 and 45 minutes, with a radiation source of a 125W high-pressure mercury lamp, protected with a quartz protective bulb and immersed in the solution. The H₂O₂ concentration was reestablished at 100 mg L⁻¹ every 5 minutes. Malathion concentration was monitored by HPLC-DAD and the formation of by-products by GC-MS/MS. Acute toxicity was analyzed with *Stegomyia aegypti* larvae and phytotoxicity with *Lactuca sativa* seeds. To evaluate the sublethal effect of malathion and its by-products, biochemical biomarkers (AChE, GST, EST- α , EST- β , SOD and LPO) were evaluated in *Stegomyia aegypti* mosquitoes reared from the first stage to mosquito emergence. The chromatographic method showed adequate linearity ($R^2 > 0.99$) and recovery levels for the extraction of 76 (16.5) %. The limit of detection and quantification for malathion was 0.03 and 0.03 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Malathion degradation showed values below the detection limit of the analytical method at all times and processes analyzed. Larvicidal activity with *Stegomyia aegypti* showed the greatest toxic effects for untreated samples from both processes. For phytotoxicity, a variation between inhibition, stimulation and no observed effect was observed depending on the method and time of treatment. The greatest changes in enzymatic activity were recorded for EST- β and for oxidative stress enzymes in photolysis, demonstrating the inability of the antioxidant system to eliminate the excess of radicals induced by malathion and its by-products. The treatment proved to be effective for malathion degradation, however, the formation of by-products was observed that can increase the toxicity of the treated solution, contributing to the lack of complete detoxification of the environment.

Keywords: HPLC-DAD. Advanced oxidation processes. *Stegomyia aegypti*. *Lactuca sativa*. Acetylcholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de degradação da molécula por fotólise.....	21
Figura 2 - Morfologia da semente de <i>Lactuca sativa</i>	31
Figura 3 - Ciclo de vida do mosquito <i>Stegomyia aegypti</i>	32
Figura 4 - Metodologia de trabalho.	36
Figura 5 - Fluxograma da metodologia de extração em fase sólida.	39
Figura 6 - Representação do reator fotoquímico de bancada	40
Figura 7 - Gradiente de fase móvel utilizado no método cromatográfico.	45
Figura 8 - Cromatogramas do pesticida Malathion padrão analítico e a formulação comercial. Modo gradiente, volume de injeção 50 μL , vazão 0,3 mL min^{-1} , comprimento de onda 200 nm.	46
Figura 9 - Cromatograma da água isenta do analito. Modo gradiente volume de injeção 50 μL , vazão 0,3 mL min^{-1} , comprimento de onda 200 nm.....	48
Figura 10 - Curvas de calibração para o malathion em diferentes faixas de trabalho. Curva baixa - 75 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (A) ; curva alta – 200 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (B).....	48
Figura 11 - Gráfico de dispersão dos resíduos para as curvas de calibração. A: curva baixa - 75 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$; B: curva alta – 200 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	50
Figura 12 - Cromatograma em triplicata do pesticida malathion no processo de extração em fase sólida, [MLT]=400 ng L^{-1} , SPE 500x, modo gradiente, volume de injeção 50 μL , vazão 0,3 mL min^{-1} , comprimento de onda 200 nm.....	53
Figura 13 – Cromatogramas do tempo zero da fotólise e processo UV/H ₂ O ₂ para o pesticida padrão e em formulação comercial, [MLT] = 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, modo gradiente, volume de injeção 50 μL , vazão 0,3 mL min^{-1} , comprimento de onda 200 nm.....	54
Figura 14 - Cromatogramas da degradação por fotólise para o pesticida padrão com lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo, [MLT] ₀ = 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, SPE 500x; modo gradiente, volume de injeção 50 μL , vazão 0,3 mL min^{-1} , comprimento de onda 200 nm.	55
Figura 15 - Cromatogramas da degradação por fotólise para o pesticida em formulação comercial com lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo, [MLT] ₀ = 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, SPE 500x; modo gradiente, volume de injeção 50 μL , vazão 0,3 mL min^{-1} , comprimento de onda 200 nm.....	58
Figura 16 - Cromatogramas da degradação por UV/H ₂ O ₂ (100 mg L^{-1} H ₂ O ₂) para o malathion padrão com lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor	

de quartzo, $[MLT]_0 = 500 \mu\text{g L}^{-1}$, SPE 500x; modo gradiente, volume de injeção 50 μL , vazão 0,3 mL min^{-1} , comprimento de onda 200 nm.	62
Figura 17 - Cromatogramas da degradação por UV/ H_2O_2 (100 $\text{mg L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$) para o malathion em formulação comercial com lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo, $[MLT]_0 = 500 \mu\text{g L}^{-1}$, SPE 500x; modo gradiente, volume de injeção 50 μL , vazão 0,3 mL min^{-1} , comprimento de onda 200 nm.	65
Figura 18 - Fitotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i> para a fotólise nas amostras pesticida padrão e pesticida na formulação comercial; $[MLT]_0 = 500 \mu\text{g L}^{-1}$; lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo.	75
Figura 19 - Fitotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i> para o processo UV/ H_2O_2 nas amostras pesticida padrão e pesticida na formulação comercial; $[MLT]_0 = 500 \mu\text{g L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 100 \text{mg L}^{-1}$; lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo.	76
Figura 20 – Atividade da acetilcolinesterase em mosquitos de <i>Stegomyia aegypti</i> para a fotólise e processo UV/ H_2O_2 em 15 minutos de tratamento.	77
Figura 21 - Atividade da glutathione S-transferase em mosquitos de <i>Stegomyia aegypti</i> para a fotólise e processo UV/ H_2O_2 em 15 minutos de tratamento.	79
Figura 22 - Atividade da esterase alfa em mosquitos de <i>Stegomyia aegypti</i> para a fotólise e processo UV/ H_2O_2 em 15 minutos de tratamento.	80
Figura 23 - Atividade da esterase beta em mosquitos de <i>Stegomyia aegypti</i> para a fotólise e processo UV/ H_2O_2 em 15 minutos de tratamento.	81
Figura 24 - Atividade da peroxidação lipídica em mosquitos de <i>Stegomyia aegypti</i> para a fotólise e processo UV/ H_2O_2 em 15 minutos de tratamento.	82
Figura 25 - Atividade da superóxido dismutase em mosquitos de <i>Stegomyia aegypti</i> para a fotólise e processo UV/ H_2O_2 em 15 minutos de tratamento.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Potencial de oxidação dos oxidantes mais usados.....	19
Tabela 2 - Condições cromatográficas para HPLC-DAD	45
Tabela 3 - Dados obtidos para determinação do índice de pureza do pico cromatográfico.	47
Tabela 4 - Parâmetros calculados para as curvas analíticas do Malathion	49
Tabela 5 - Dados estatísticos calculados para comprovação da linearidade do método.	49
Tabela 6 - Dados estatísticos calculados para o teste F da ANOVA.....	50
Tabela 7 - Dados estatísticos calculados para o teste de Shapiro-Wilk.....	51
Tabela 8 - Dados utilizados para o cálculo da precisão e exatidão do método.	52
Tabela 9 - Limite de quantificação e detecção calculados para o método.....	52
Tabela 10 – Subprodutos detectados do malathion padrão e da formulação comercial na fotólise e no processo UV/H ₂ O ₂	69
Tabela 11 – Atividade larvicida com larvas de <i>Stegomyia aegypti</i> (cepa Rockfeller) para a fotólise amostras pesticida padrão e pesticida na formulação comercial; [MLT] ₀ =500 µg L ⁻¹ ; lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo.	73
Tabela 12 - Atividade larvicida com larvas de <i>Stegomyia aegypti</i> (cepa Rockfeller) para o processo UV/H ₂ O ₂ nas amostras pesticida padrão e pesticida na formulação comercial; [MLT] ₀ =500 µg L ⁻¹ ; [H ₂ O ₂]=100 mg L ⁻¹ ; lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo.....	73
Tabela 13 – Resumo dos resultados para os marcadores bioquímicos.....	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Propriedades físicas e químicas do inseticida malathion	16
Quadro 2 - Classificação dos processos avançados de oxidação.	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	OBJETIVOS.....	13
1.1.1	Objetivo geral	13
1.1.2	Objetivos específicos	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	PESTICIDAS	15
2.1.1	Pesticida organofosforado Malathion	15
2.2	PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO.....	18
2.2.1	Fotólise.....	21
2.2.2	Processo UV/H ₂ O ₂	21
2.3	DEGRADAÇÃO DO MALATHION POR PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO	22
2.4	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	24
2.4.1	Seletividade.....	25
2.4.2	Linearidade	25
2.4.3	Precisão	28
2.4.4	Exatidão	29
2.4.5	Limite de quantificação	29
2.4.6	Limite de detecção	29
2.5	ECOTOXICIDADE EM DIFERENTES ORGANISMOS.....	30
2.5.1	Lactuca Sativa.....	30
2.5.2	<i>Stegomyia aegypti</i>	31
2.6	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	33
2.6.1	Acetilcolinesterase	33
2.6.2	Biotransformação	34
2.6.3	Estresse oxidativo	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	REAGENTES, EQUIPAMENTOS E INSUMOS	36
3.2	PREPARO DAS VIDRARIAS E MATERIAIS.....	37
3.3	CONTROLE ANALÍTICO	37
3.3.1	Cromatografia líquida	37
3.3.2	Cromatografia gasosa	37
3.3.3	Curva de calibração	38
3.3.4	Validação do método cromatográfico.....	38
3.3.5	Quantificação de peróxido de hidrogênio residual	38
3.3.6	Extração em fase sólida	39
3.3.7	Preparo das soluções para degradação.....	40
3.4	ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO POR FOTÓLISE E UV/H₂O₂.....	40
3.5	ECOTOXICIDADE	41
3.5.1	Atividade larvicida com <i>Stegomyia aegypti</i>	41
3.5.2	Efeito subletal no crescimento e desenvolvimento das larvas de <i>Stegomyia aegypti</i> ...	42
3.5.2.1	Bioquímicos.....	42
3.5.2.1.1	Proteínas totais	42
3.5.2.1.2	Acetilcolinesterase	42
3.5.2.1.3	Esterases	43
3.5.2.1.4	Glutathione S-transferase	43
3.5.2.1.5	Superóxido dismutase	43
3.5.2.1.6	Peroxidação lipídica	43
3.5.2.1.7	Análises estatísticas.....	43

3.5.3	Fitotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i>	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1	MÉTODO CROMATOGRÁFICO	45
4.2	VALIDAÇÃO ANALÍTICA	47
4.2.1	Seletividade.....	47
4.2.2	Linearidade	48
4.2.3	Precisão e exatidão.....	51
4.2.4	Limite de quantificação e detecção.....	52
4.3	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	53
4.4	DEGRADAÇÃO DO MALATHION POR FOTÓLISE E UV/H₂O₂	54
4.5	DETERMINAÇÃO DOS SUBPRODUTOS POR GC-MS/MS	68
4.6	ECOTOXICIDADE COM DIFERENTE ORGANISMOS	73
4.6.1	Atividade larvicida em <i>Stegomyia aegypti</i>	73
4.6.2	Fitotoxicidade com <i>Lactuca sativa</i>	74
4.6.3	Efeito subletal no crescimento e desenvolvimento de larvas de <i>Stegomyia aegypti</i>	76
4.6.3.1	Acetilcolinesterase	77
4.6.3.2	Biotransformação	79
4.6.3.3	Estresse oxidativo	82
5	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da produção agroindustrial, o uso contínuo de pesticidas tornou-se um dos métodos mais utilizados para controlar o crescimento de ervas daninhas e maximizar o crescimento das plantações. O uso indiscriminado desses compostos traz diversas consequências quando liberado ao meio ambiente e para a população exposta. Assim que são aplicados, os pesticidas podem passar por diferentes processos, como físicos, químicos ou biológicos, gerando consequências no ambiente, além de, cada vez mais, estarem sendo encontrados em diferentes matrizes ambientais (CEDILLO-HERRERA et al., 2020; PERGAL et al., 2020; RIBEIRO; PEREIRA; MARCHI, 2007a; TONY et al., 2017).

No Brasil, segundo a resolução do CONAMA nº357/2005, em corpos hídricos menos restritivos, a concentração máxima permitida do malathion é de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Já em corpos hídricos utilizados para abastecimento público e outras atividades, a concentração máxima permitida é de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2005a). Em comparação com a legislação de países como os Estados Unidos, a concentração encontrada nos estudos para águas de abastecimento está acima do permitido, onde a concentração máxima estipulada fica em $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, determinado desde 1986. Já no Brasil, a resolução foi publicada em 2005, de modo que as concentrações no meio podem estar acima do que hoje é permitido, já que antes disso não teria o controle necessário. Albuquerque et al. (2016) analisou diversos estudos sobre a presença de organofosforados em água potável em estados como São Paulo, Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Sergipe, sendo o malathion encontrado em dois estados, São Paulo e Sergipe, em concentrações entre $0,035$ e $0,54 \mu\text{g L}^{-1}$ (ALBUQUERQUE et al., 2016).

A presença de pesticidas em matrizes como águas superficiais e, até mesmo, água potável, tem mostrado que os processos convencionais de tratamento não são suficientes para o adequado tratamento desses compostos (KRALJ et al., 2007; ZHANG; PAGILLA, 2010). Desta forma, os processos avançados de oxidação (AOP) têm sido estudados como uma alternativa de tratamento. Esses processos baseiam-se na geração *in situ* de radicais oxidantes como o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), radical sulfato ($\text{SO}_4^{\bullet-}$), entre outros. Os radicais oxidantes são extremamente reativos, seletivos ou não, tem alto potencial padrão de oxidação (1,4-3,0V), podendo levar à mineralização dos contaminantes ou à conversão em novos compostos com maior biodegradabilidade (KRALJ; TREBŠE; FRANKO, 2007; MIKLOS et al., 2018; OLIVEIRA, 2011; SHARMA; AHMAD; FLORA, 2018; TEIXEIRA; JARDIM, 2004).

Estudos envolvendo a degradação de pesticidas organofosforados, como o malathion, por processos avançados de oxidação, têm sido descritos na literatura. Fadaei et al. (2012)

avaliaram a degradação do Malathion na presença de bicarbonato e sulfato utilizando o processo UV/H₂O₂. A presença de sais durante a degradação diminuiu a efetividade do processo e aumentou o tempo necessário para degradação em comparação a degradação sem a utilização de sais (FADAEI et al., 2012).

Cedillo-Herrera, et al. (2020) avaliou a remoção do malathion a partir do processo UV/H₂O₂ como pré-tratamento acoplado a um sistema *Wetlands*. A taxa de remoção com o processo atingiu 94% do malathion e 45% TOC no processo isolado e 65% de TOC no processo combinado, ambos os índices de carbono orgânico associados a formação de subprodutos. Esses resultados reforçam a necessidade de tratamento e de outros tipos de avaliação, como a ecotoxicidade, após o tratamento (CEDILLO-HERRERA et al., 2020).

Vela et al. (2019) avaliaram a degradação de seis pesticidas, entre eles o malathion, em águas residuárias em reator de escala piloto sob luz solar utilizando persulfato como oxidante e TiO₂ como fotocatalisador. As concentrações dos reagentes foram otimizadas em reator de escala de bancada e os resultados mostraram que o uso combinado do oxidante e do fotocatalisador aumentou a degradação dos compostos quando comparado ao uso da luz solar isolada. A toxicidade foi avaliada com *Vibrio fischeri*, apresentando remoção da toxicidade dentro dos limites aceitáveis para este organismo e, portanto, o processo mostrou-se eficiente para a remoção de poluentes recalcitrantes usando luz solar como fonte renovável de energia (VELA et al., 2019).

Em função da necessidade de tratamentos mais efetivos para a degradação destes compostos, bem como a importância ambiental e para saúde pública, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de degradação do pesticida Malathion em duas formulações pela fotólise e pelo processo avançado de oxidação UV/H₂O₂, associado ao uso da cromatografia com o acompanhamento da ecotoxicidade com diferentes organismos e avaliação de marcadores bioquímicos .

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de degradação do pesticida organofosforado Malathion padrão e Malathion 500®CE a partir da aplicação da fotólise e do processo UV/H₂O₂, determinando as respostas ecotoxicológicas e bioquímicas para diferentes organismos pós-tratamentos.

1.1.2 Objetivos específicos

Estabelecer um método cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e fluorescência (HPLC-DAD-FLD) para o pesticida Malathion;

Avaliar a seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção para o método cromatográfico em HPLC-DAD;

Avaliar a formação de subprodutos por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas tandem (GC-MS/MS);

Determinar a eficiência do método de extração em fase sólida para o pesticida padrão;

Avaliar a degradação do pesticida malathion padrão e em formulação comercial por fotólise e pelo processo avançado de oxidação UV/H₂O₂;

Determinar as respostas ecotoxicológicas para o pesticida padrão e para o produto comercial antes e após os tratamentos a partir de testes com larvas de *Stegomyia aegypti* e sementes de *Lactuca sativa*;

Avaliar os marcadores bioquímicos para o mosquito do *Stegomyia aegypti* após os tratamentos aplicados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PESTICIDAS

De acordo com a Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989, a definição para agrotóxicos é:

Agrotóxicos e afins: a) produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos e b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento ((BRASIL, 1989).

Após a década de 50, cada vez mais novas formulações de agrotóxicos têm sido desenvolvidas e o lançamento desses compostos no meio ambiente sem qualquer tipo de tratamento, atinge diversas matrizes, como a água, o solo e o ar, fazendo com que a exposição humana seja maior do que apenas quando são consumidos alimentos contaminados (CULLINEY; PIMENTEL; PIMENTEL, 1992; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013). A permanência dos pesticidas no solo ou em outras matrizes, depende das características da matriz e do contaminante. Pesticidas como os organofosforados, podem permanecer no ambiente adsorvidos em partículas do solo ou até mesmo serem levados para águas superficiais para longe da fonte de contaminação, atingindo todo um ecossistema. (FLORES et al., 2004a; MUTURI, 2013; RIBEIRO; PEREIRA; MARCHI, 2007b)

Os pesticidas são classificados de acordo com o seu modo de ação (inibição da acetilcolinesterase, da fotossíntese, disruptores de membranas), alvo acaricida, formicida, fungicida, inseticida e a classe química (clorados, clorofosforados, fosforados e carbamatos) (FLORES et al., 2004b; SANCHES et al., 2003a).

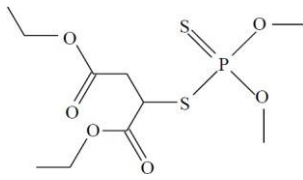
2.1.1 Pesticida organofosforado Malathion

Os pesticidas organofosforados são moléculas derivadas do ácido fosfórico, fosfônico, fosforotiamídicos ou fosforotiólicos com grupamentos ésteres, amidas ou tióis. Caracterizam-se pela presença da ligação P=O ou P=S e a grande maioria é solúvel em água, com alto coeficiente de partição octanol/água, baixa pressão de vapor e estabilidade em pH neutro. São formulados em óleo, solventes miscíveis em água, grânulos inertes para uso direto, dispersão em água, concentrados emulsificáveis com ingrediente ativo ou líquidos pressurizados (AJIBOYE et al., 2022; PARRA-ARROYO et al., 2022).

O malathion (diethyl 2-dimethoxyphosphinothioylsulfanylbutanedioate) (Quadro 1) é um organofosforado alifático sintetizado na década de 50, sendo um dos pesticidas organofosforados mais utilizados no Brasil (IBAMA, 2021). É um inseticida e acaricida não

sistemático de amplo espectro, usado na agricultura em culturas, gramas, jardins, áreas residências externas, erradicação de pestes, insetos como formigas, pulgões, lagartas, moscas, mosquitos etc., ectoparasitas, podendo ser usado para tratar piolho em humanos (IARC, 2015; IARC/WHO, 2015a; REED; RUBIN, 2014). Sua fabricação é feita pela reação do pentassulfeto de fósforo com metanol em tolueno produzindo um intermediário, o ácido dimetil ditióicofosfórico e um subproduto, o sulfeto de hidrogênio. A partir da reação de condensação, o intermediário reage com maleato de dietila ou fumarato de dietila, produzindo o malathion (IARC/WHO, 2015b; LANDRIGAN; BELPOGGI, 2018; PARRA-ARROYO et al., 2022; WILSON et al., 2003).

Quadro 1 - Propriedades físicas e químicas do inseticida malathion.

Propriedades	Característica
Nome químico	diethyl 2-dimethoxyphosphinothioylsulfanylbutanedioate
Fórmula química	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$
Estrutura	
Massa molecular	330,4 g mol ⁻¹
Ponto de fusão	2,8°C
Ponto de ebulição	156°C
Pressão de vapor a 30°C	5,3 mPa
Densidade a 25°C	1,23 g cm ³
Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	145 a 25°C
Meia vida	8 a 24 horas
Constante de dissociação (pKa)	6,8
Coefficiente de partição (Kow)	2,89

Fonte: (DRUGBANK, 2021; PUBCHEM, 2021).

No Brasil, o emprego autorizado do malathion é para uso agrícola em aplicação foliar em culturas de alface, algodão, berinjela, brócolis, cacau, café, citros, couve, couve-flor, feijão, maçã, morango, orquídeas, pastagens, pepino, pêra, pêssego, repolho, rosa, soja e tomate, aplicação em arroz, feijão, soja e milho armazenados. Para emprego domissanitário, é autorizado o uso em concentrações de 2 a 5% p/p para venda livre, líquidos, iscas, pós e granulados. Para jardinagem, a autorização é para uso líquido em concentração de 0,5% p/v. Em campanhas de saúde pública, como para combate ao mosquito *Stegomyia aegypti*, a concentração permitida em formulações de ultrabaixo volume (UBV) para fumacê e concentrado emulsionável (CE) é de 100% p/p e para formulação em pó molhável (PM) de 40%

p/p. O limite máximo residual nos alimentos é entre 0,1 mg/kg para soja e café e 135 mg/kg para pastagens e o limite diária aceitável de 0,3 mg/kg de peso corporal (ANVISA, 2012a; COLEONE et al., 2017a; LEME et al., 2014; MACORIS et al., 1999). Segundo o último relatório divulgada pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos (PARA), que avaliou diversas frutas, legumes e hortaliças avaliou ingredientes ativos de diversos pesticidas, identificou a presença de malathion em 13 amostras de laranja entre os anos de 2017 e 2018, totalizante o limite diária aceitável de 4 mg kg⁻¹, acima do permitido pela ANVISA para o pesticida (PARA, 2019).

De acordo com a Resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que dispõe sobre o enquadramento dos corpos hídricos e apresenta a concentração máxima de diversos poluentes, esta é dependente da classe dos corpos d'água. Os corpos d'água de classe 1 e 2, utilizados para abastecimento da população após desinfecção, proteção de ambientes aquáticos, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças e outros usos diretamente ligados a população, devem apresentar concentração máxima do pesticida malathion de 0,1 µg L⁻¹. Em corpos d'água de classe menos restritiva, usados para outros tipos de atividades e não para o abastecimento da população, a concentração permitida do malathion e de diversos outros pesticidas é mais alta (100 µg L⁻¹) (BRASIL, 2005b, 2011).

A Companhia Ambiental de São Paulo (CETESB) avaliou a ocorrência de pesticidas para águas superficiais, subterrâneas e sedimento de amostras do estado de São Paulo, tendo identificado a presença de malathion em águas superficiais em concentrações acima do permitido pela legislação vigente no país (máximo 0,1 µg L⁻¹) e dos limites europeus (0,1 a 290 µg L⁻¹) (CETESB, 2019).

Em países da América do Norte, como no Canadá, o limite máximo aceitável de concentração na água de consumo humano é de 190 µg L⁻¹. Em 2021, foi feita uma consulta online pelo país, para que esse limite fosse aumentado para 290 µg L⁻¹ baseado em estudos em ratos que mostraram que essa concentração não causaria danos aos rins, considerado o órgão mais afetado pela toxicidade do malathion, porém não há estudos que mostrem os efeitos do malathion nos rins humanos (HEALTH CANADA, 2019, 2021, 2023). Na Austrália, o Conselho Nacional de Saúde e Pesquisa Médica (*National Health and Medical Research Council*) determina que a concentração do malathion em água destinada ao consumo humano não deve ultrapassar 70 µg L⁻¹, baseada nos riscos para saúde humana (NHMRC, 2021). Na Europa, o Conselho da União Europeia (*The Council of European Union – EC*) por meio da Diretiva nº 2020/2184/UE, que dispõe sobre a qualidade da água destinada a consumo humano, determina o limite máximo permitido de pesticidas em concentrações inferiores a 0,1 µg L⁻¹

sem considerar as características de cada pesticida (THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2020).

Mekonen et al. (2016) avaliaram amostras de água em Jimma e na capital da Etiópia, Addis Ababa, para resíduos de pesticidas. Os rios avaliados abrangem a lagoa Legedadi, principal fonte de abastecimento da Etiópia. Entre os compostos analisados, o malathion foi encontrado em todas as fontes de água avaliadas, sendo água de torneira ($5,1-11 \mu\text{g L}^{-1}$), água de poço ($0,001-105 \mu\text{g L}^{-1}$), água potável ($0,0001-33 \mu\text{g L}^{-1}$), água de nascente ($0,0001-67 \mu\text{g L}^{-1}$) e água de rio ($0,001-50 \mu\text{g L}^{-1}$), e, por se tratar de água de abastecimento humano, a concentração máxima permitida para o malathion é de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. A avaliação de risco para a saúde não demonstrou risco agudo, porém o risco crônico de exposição a longo prazo foi observado, sendo o monitoramento e a redução da concentração dos pesticidas necessárias para minimizar os riscos à saúde humana (MEKONEN et al., 2016).

Duttagupta et al. (2020) avaliaram a presença de poluentes orgânicos persistentes em águas subterrâneas, águas de rios e sedimentos em localidades ao sul do estado da Bengala Ocidental, Índia, sendo aproximadamente 60% da área analisada rural, seguida de áreas semiurbanas e urbanas. Entre os compostos, o malathion foi predominantemente encontrado em 60% das amostras de águas subterrâneas em concentrações entre 150 e $9330 \mu\text{g L}^{-1}$, acima do limite internacional de $190 \mu\text{g L}^{-1}$, água de rio na concentração de $9033 \mu\text{g L}^{-1}$ e sedimento entre 56 e $200 \mu\text{g kg}^{-1}$. Além disso, o subproduto malaoxon foi encontrado em 75% das amostras de águas de rios analisados em concentrações entre 410 e $1420 \mu\text{g L}^{-1}$ e em sedimento acima de $900 \mu\text{g/kg}$. Os herbicidas analisados foram mais encontrados em áreas rurais do que em áreas urbanas, levantando questões sobre a potencial exposição da população aos poluentes orgânicos em água potável e os riscos associados a saúde (DUTTAGUPTA et al., 2020).

2.2 Processos Avançados de Oxidação

O aparecimento de pesticidas em diversos tipos de matrizes, principalmente na água, mostra a resistência aos tratamentos convencionais e a necessidade de estudo de tratamentos complementares alternativos aos já existentes, que envolvem técnicas como transferência de fase, adsorção em carvão ativado, tratamento biológico, entre outros (ANDREOZZI et al., 1999; PRIETO-RODRÍGUEZ et al., 2013; TEIXEIRA; JARDIM, 2004). Um dos tratamentos alternativos são os processos avançados de oxidação, que utiliza uma espécie oxidante, como radicais hidroxila e sulfato, para degradação dos compostos e devido a sua eficiência tem obtido destaque no tratamento de contaminantes (TEIXEIRA; JARDIM, 2004).

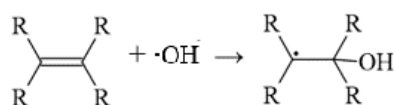
Os processos avançados de oxidação (AOP) são caracterizados por processos capazes de transformar a maioria dos contaminantes orgânicos em dióxido de carbono, água e íons inorgânicos a partir de reações que utilizam espécies oxidantes, com o radical hidroxila sendo um dos radicais com maior potencial de oxidação (Tabela 1) (GUERRA-RODRÍGUEZ et al., 2018; TEIXEIRA; JARDIM, 2004).

Tabela 1 - Potencial de oxidação dos oxidantes mais usados.

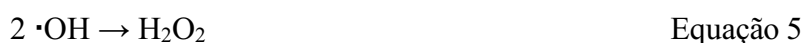
Oxidante	Potencial de oxidação (V)
Flúor (F ₂)	3,0
Radical hidroxila (OH [•])	2,8
Radical sulfato (SO ₄ ^{•-})	2,5 – 3,1
Ozônio (O ₃)	2,1
Persulfato (S ₂ O ₈ ⁻²)	2,1
Peroximonosulfato (HSO ₅ ⁻)	1,8
Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	1,8
Permanganato (MnO ₄ ⁻)	1,7
Dióxido de cloro (ClO ₂)	1,5
Cloro (Cl ₂)	1,4

Fonte: Adaptado de Guerra-Rodríguez et al., 2018.

A forma de interação do radical varia dependendo da estrutura do contaminante e pode ocorrer de diferentes formas: (i) por abstração do átomo de hidrogênio, onde ocorre a oxidação dos compostos orgânicos gerando radicais orgânicos e a adição de oxigênio molecular formando radicais peróxido que desencadeiam a degradação dos contaminantes até CO₂, H₂O e íons inorgânicos (Equação 1 e 2); (ii) por adição eletrofílica em que ocorre a adição dos radicais hidroxila a compostos orgânicos que contenham ligações π e resulta na formação de radicais orgânicos (Equação 3); (iii) por transferência eletrônica que ocorre quando a abstração e a adição são desfavorecidas (Equação 4) e (iv) por reações radical-radical que também acontece na mesma situação da transferência eletrônica e desfavorecem a eficiência do processo pois consomem os radicais hidroxila disponíveis (Equação 5 e 6) (DENG; ZHAO, 2015; IKEHATA; EL-DIN, 2006; PUPO NOGUEIRA et al., 2007; TEIXEIRA; JARDIM, 2004).



Equação 3





De maneira geral, os processos avançados de oxidação podem ser classificados em alguns critérios: (i) baseados na geração de radicais oxidantes; (ii) baseados no uso ou não de radiação ultravioleta ou visível e (iii) baseados na oxidação em única etapa ou com uso de catálise heterogênea (Quadro 2) (MIKLOS et al., 2018; REDDY; KIM, 2015; TEIXEIRA; JARDIM, 2004; VAGI; PETSAS, 2020).

Quadro 2 - Classificação dos processos avançados de oxidação.

Baseados na geração de radicais oxidantes	Baseados no uso ou não de radiação ultravioleta ou visível	Baseados na oxidação em única etapa ou uso de catálise heterogênea
<p>Químicos $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ Oxidação com persulfato</p> <p>Fotoquímicos $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ UV/O_3 $\text{UV}/\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ Eletro-Fenton Catálise heterogênea</p> <p>Sonoquímicos $\text{US}/\text{H}_2\text{O}_2$ US/O_3</p> <p>Eletroquímicos Oxidação eletroquímica Oxidação anódica</p>	<p>Químicos Fotólise direta $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ $\text{UV}/\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ (foto-Fenton) $\text{UV}/\text{Fe}^{+3}/\text{H}_2\text{O}_2$ (foto-Fenton-like) Eletro-Fenton UV/TiO_2</p> <p>Não químicos Ozonização $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Fenton) Eletrooxidação Campo elétrico pulsado Ultrassom Plasma</p>	<p>Homogêneos Ozonização (O_3, O_3/UV, $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{O}_3/\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$) Fenton ($\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{UV}/\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{UV}/\text{Fe}^{+3}/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{US}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{+2}$, eletro-Fenton, sono-foto-Fenton) Oxidação com persulfato Não térmicos (Radiação gama, campo elétrico pulsado, ultrassom, plasma)</p> <p>Heterogêneos Catálise heterogênea (TiO_2, ZnO, SnO_2 etc.) com uso de radiação ultravioleta ou visível Ozonização catalítica Fenton-like heterogêneo Catálise a baixa temperatura e pressão</p>

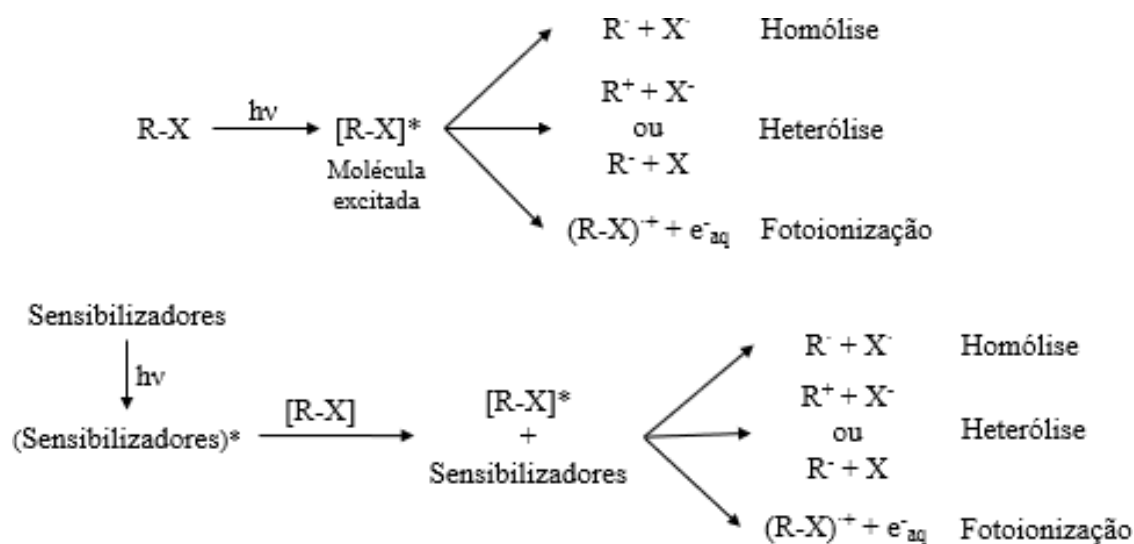
Fonte: Adaptado de Miklos et al., 2018; Reddy; Kim, 2015; Teixeira; Jardim, 2004; Vagi; Petsas, 2020.

Os processos avançados de oxidação apresentam diversas vantagens frente a outros tratamentos, como o alto poder oxidante, a baixa seletividade, possibilitam trabalho in situ e em sua grande maioria, não necessita de pós-tratamento ou disposição final, entre outras vantagens. Entre os tratamentos, o processo $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ tem sido bastante estudado e mais recentemente, o processo que utiliza persulfato na geração de radicais hidroxila tem se mostrado efetivo no tratamento de diversos contaminantes (ANDREOZZI et al., 1999; DENG; ZHAO, 2015; GUERRA-RODRÍGUEZ et al., 2018; IKE et al., 2018; LEE et al., 2021; PHILIP J. BRANDHUBER et al., 2021; TEIXEIRA; JARDIM, 2004; WACŁAWEK et al., 2017).

2.2.1 Fotólise

A fotólise não é considerado como um processo oxidativo avançado, por não gerar radicais no meio reacional e, portanto, a degradação acontece pela quebra da molécula e não pelo ataque oxidativo do radical e pode ocorrer de forma direta ou indireta. Na forma direta, a absorção da radiação é dada pelo grupo cromóforo na estrutura da molécula e de forma indireta, a excitação da molécula é dada pela homólise, heterólise e/ou fotoionização iniciando uma série de reações que facilitam a transformação da molécula e então o restante do processo ocorre através da fotólise direta (Figura 1) (PEHKONEN; ZHANG, 2002a; REDDY; KIM, 2015; REMUCAL, 2014; TEIXEIRA; JARDIM, 2004).

Figura 1 - Mecanismos de degradação da molécula por fotólise.



Fonte: Adaptado de Reddy; Kim, 2015.

Durante o processo de fotólise, pode ocorrer a formação de produtos que não absorvem a radiação, dificultando a completa mineralização do composto alvo. Esse processo é comumente aplicado em conjunto a outro processo oxidativo avançado para verificar se há influência da irradiação no sistema (PEHKONEN; ZHANG, 2002b; REDDY; KIM, 2015; REMUCAL, 2014; VALENTE et al., 2015).

2.2.2 Processo UV/H₂O₂

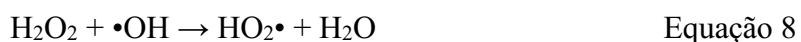
O peróxido de hidrogênio é um oxidante forte (1,8V), que pode ser utilizado em todos os valores de pH, porém apresenta melhor desempenho em pH alcalino devido ao alto coeficiente de absorvidade molar do ânion peróxido (HO⁻) que apresenta o valor de 240 M⁻¹

cm⁻¹ em 254 nm. Entretanto, o peróxido de hidrogênio não tem capacidade de oxidar os contaminantes por si próprio e necessita da combinação com outros processos avançados de oxidação para tal função (ANDREOZZI et al., 1999; IKEHATA; EL-DIN, 2006).

Nesse processo, a geração do radical hidroxila é feito a partir do uso de peróxido de hidrogênio combinado com a aplicação da radiação ultravioleta. A incidência da radiação sob o oxidante leva a quebra homolítica da ligação O-O da molécula de peróxido de hidrogênio e a formação de dois radicais hidroxila por molécula de peróxido de hidrogeno (Equação 7) (ANDREOZZI et al., 1999; DENG; ZHAO, 2015; IKEHATA; EL-DIN, 2006; MIKLOS et al., 2018; SHARMA; AHMAD; FLORA, 2018).



Em concentrações acima do ideal, o peróxido de hidrogênio pode sofrer recombinação a partir dos radicais já formados no meio reacional e dar origem a radicais de superóxidos (Equação 8). A partir dessa etapa, pode ocorrer a formação de peróxido de hidrogênio (Equação 9) e a decomposição em água e oxigênio (Equação 10) (CRITTENDEN et al., 1999; IKEHATA; EL-DIN, 2006; LOURES et al., 2013; PRIETO-RODRÍGUEZ et al., 2013; SHARMA; AHMAD; FLORA, 2018).



A formação do radical superóxido (HO₂•) não contribuiu para a degradação das substâncias orgânicas, visto que o radical superóxido tem menor potencial de oxidação que o radical hidroxila. Desta forma, a concentração do peróxido de hidrogênio deve ser otimizada, geralmente levando em consideração a concentração de carbono orgânico na amostra para favorecer o processo de oxidação das substâncias orgânicas (CRITTENDEN et al., 1999; IKEHATA; EL-DIN, 2006; LOURES et al., 2013; MIKLOS et al., 2018; PRIETO-RODRÍGUEZ et al., 2013).

2.3 Degradação do malathion por processos avançados de oxidação

Alguns estudos referentes ao uso dos processos avançados de oxidação para o malathion podem ser consultados na literatura.

Li et al. (2019) avaliaram a formação de subprodutos e o mecanismo de reação, aliado a toxicidade do malathion padrão por *Vibrio fischeri* a partir da fotólise (UVC) e dos processos UV/H₂O₂ ([H₂O₂]= 100 mg L⁻¹), UV/TiO₂ ([TiO₂]= 1 mg L⁻¹) e UV/Fe⁺²/H₂O₂ ([Fe⁺²]= 1,2 mg L⁻¹; [H₂O₂]= 100 mg L⁻¹). A remoção do carbono orgânico total apresentou valores próximos

para os processos, porém maiores do que o observado para a fotólise. Para todos os processos, foi observado a formação de subprodutos durante a degradação. A toxicidade aumentou conforme a degradação do malathion era atingida, demonstrando que apesar da eficiência de remoção do pesticida, isso não necessariamente diminuiu a toxicidade da solução, de forma que os subprodutos formados durante os processos podem aumentar a toxicidade da solução tratada, resultando em matrizes com diferentes toxicidades. Desta forma, mostra-se necessário a avaliação da toxicidade pois assume-se que diminui conforme a concentração dos micropoluentes diminuem (LI et al., 2019).

Vasseghian et al. (2022) avaliaram a eficiência de degradação do malathion padrão utilizando os processos Fenton: Fenton $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ ($[\text{Fe}^{+2}] = 20 \text{ mg L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 700 \text{ mg L}^{-1}$), sono-foto Fenton UV/ $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ ($[\text{Fe}^{+2}] = 20 \text{ mg L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 700 \text{ mg L}^{-1}$) e sono-foto Fenton US/UV/ $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ ($[\text{Fe}^{+2}] = 20 \text{ mg L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 700 \text{ mg L}^{-1}$), para todos os processos a concentração inicial do malathion foi de 20 mg L^{-1} e os experimentos foram conduzidos em pH 3. A formação de subprodutos foi observada em todos os processos, atingindo 98% de degradação do malathion por sono-foto Fenton, 70,92% para o foto-Fenton e 55,94% para o Fenton. A toxicidade foi determinada pela luminescência da *Vibrio fischeri* e foi dependente do processo aplicado e que apesar do processo sono-foto Fenton ter sido o mais eficiente para a remoção do malathion no sistema, isso não equivale a diminuição ou eliminação da toxicidade da solução (VASSEGHIAN et al., 2022a).

Cedillo-Herrera et al. (2020) avaliaram a eficiência de remoção do malathion padrão por UV/ H_2O_2 como pré-tratamento acoplado a um sistema construído de *Wetlands* com *Phragmites australis*. No primeiro estágio, foram aplicados 90 minutos de tratamento com concentração otimizada de H_2O_2 de 2210 mg L^{-1} , atingindo 94% de remoção do malathion e 45% de carbono orgânico total. Para o segundo estágio, na parte da aplicação de *Wetlands*, a remoção do carbono orgânico total foi de 65% em 17 dias, com 24% de biosorção dos subprodutos, portanto, os resultados indicaram que o sistema acoplado é uma opção para o tratamento do malathion (PHILIP J. BRANDHUBER et al., 2021).

Ferhi et al. (2021) avaliaram a degradação de três pesticidas, entre eles o malathion, utilizando um sistema de escala piloto com fluxo contínuo acoplado a um sistema múltiplo de lâmpadas de vapor de mercúrio UVC em águas residuárias de irrigação. A degradação do malathion atingiu 80% em 25 minutos em concentrações acima da encontrada em águas residuárias naturais. O sistema piloto mostrou-se efetivo para a remoção dos pesticidas utilizando um largo volume de amostra pelo processo de fotólise direta mesmo quando a turbidez da água for elevada (FERHI et al., 2021).

Vela et al. (2019) avaliaram a degradação de seis pesticidas, entre eles o malathion, em águas residuárias fortificada a partir do processo heterogêneo solar fotocatalítico usando ZnO/Na₂S₂O₈. As condições do oxidante e do catalisador foram otimizadas previamente, sendo determinadas em [MLT] = 0,3 mg L⁻¹, [TiO₂] = 200 mg L⁻¹ e [S₂O₈⁻²] = 250 mg L⁻¹. Os estudos mostraram que a combinação do ZnO/Na₂S₂O₈ aumentou a taxa de degradação dos pesticidas e os valores de carbono orgânico total, do que quando aplicado o teste fotocatalítico isolado. A toxicidade foi avaliada com *Vibrio fischeri*, observando-se a diminuição da toxicidade da solução até os valores aceitáveis para este organismo. O processo mostrou-se eficaz para a remoção dos pesticidas pelo uso da luz solar, sendo uma alternativa renovável para locais que possuem áreas ensolaradas (VELA et al., 2019).

Vasseghian et al. (2020) avaliaram a degradação do malathion padrão a partir do processo UV/Fe⁺²/S₂O₈⁻² e os efeitos do pH, da concentração do oxidante, da concentração do malathion e os diferentes íons orgânicos. A máxima eficiência de degradação do malathion foi atingida em pH = 3, [S₂O₈⁻²] = 285 mg L⁻¹, [Fe⁺²] = 160 mg L⁻¹ e [MLT] = 20 mg L⁻¹ por 60 minutos. A degradação diminuiu na presença dos íons inorgânicos e os estudos indicam que os radicais persulfato atuam mais na degradação do que os radicais hidroxilas e com as condições otimizadas, a remoção do malathion do sistema atingiu 95,54% (VASSEGHIAN et al., 2020).

Sudhaik et al. (2020) utilizaram um fotocatalisador de nitreto de carbono suportado em grafeno (g-C₃N₄,GCN), que aumenta a área superficial, atua como suporte e reduz a recombinação de carga para a fotoativação do persulfato (PMS) e posterior degradação do malathion padrão. A combinação do persulfato com o fotocatalisador suportado em grafeno obteve maior eficiência de degradação do que quando comparado com os fotocatalisadores separadamente (Gr/GCN/PMS = 94%; Gr/GCN = 72%; GCN/PMS = 65%; GCN = 45%; Gr = 30%) (SUDHAIK et al., 2020).

2.4 Validação analítica

Um método analítico tem como princípio verificar a consistência, confiabilidade e a precisão dos dados, portanto, para assegurar as informações, os dados devem passar por uma validação.

Alguns guias de validação analítica estão disponíveis para consulta e determinam quais parâmetros devem ser obrigatoriamente validados. Os parâmetros mais fundamentais que contemplam os guias são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção (ANVISA, 2017a, 2017b; MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014; U.S DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2018).

2.4.1 Seletividade

A seletividade refere-se à capacidade do método em identificar ou quantificar o analito avaliado, na presença de interferentes, subprodutos ou compostos de estrutura semelhante, diluentes e componentes da matriz. No caso dos métodos cromatográficos, a seletividade é determinada pela avaliação da pureza cromatográfica do sinal do analito e/ou pela avaliação da matriz isenta do composto, de forma que nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do analito de interesse, sendo que toda a matriz e demais interferentes devem estar completamente separadas do sinal do analito (ANVISA, 2017a; PERIS-VICENTE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2015; TIWARI; TIWARI, 2010).

2.4.2 Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método de obter respostas analíticas diferentes que são diretamente proporcionais a concentração do analito em uma amostra, denominada de curva analítica. Para a construção de uma curva analítica, é necessário a análise de, no mínimo, 5 níveis de concentração em triplicata.

Para avaliação da linearidade, deve-se avaliar: a) representação gráfica das respostas em relação a concentração do analito; b) representação gráfica dos resíduos com a avaliação estatística; c) equação da reta de regressão de y em x pelo método dos mínimos quadrados (Equação 11; d) avaliação dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) e e) avaliação da significância do coeficiente angular (ANVISA, 2017a, 2017b; GOES et al., 2019; MARSON et al., 2020; RIBANI et al., 2004).

$$A = (b \pm s_b)x + (a \pm s_a) \quad \text{Equação 11}$$

Em que: A é a área do pico; b a inclinação da curva; s_b o desvio padrão de b ; x é a concentração do analito; a é intersecção em y e s_a é o desvio padrão de a .

Para comprovar a linearidade do método, além das análise visual, da determinação do coeficiente de determinação, uma análise estatística precisa ser realizada. A primeira etapa envolve calcular a variância de y para cada nível de concentração (Equação 12), de modo a se determinar a homoscedasticidade ou não dos dados e assim, a escolha do melhor método de ajuste do conjunto (ANVISA, 2017b; GOES et al., 2019; MARSON et al., 2020).

$$S^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m (y_{ij} - \bar{y})^2 \quad \text{Equação 12}$$

Em que: S é a variância; j representa o j -ésimo resultado para o conjunto de réplicas i ; y a resposta analítica do valor de y em cada ponto; \bar{y} a média aritmética dos valores de y ; m representa o número de réplicas para cada y em cada ponto.

A homoscedasticidade dos dados é comprovada aplicando o teste de Cochran (Equação 13), que compara as variâncias entre todas e se três ou mais conjuntos de frequência ou proporções diferem significativamente entre si e as hipóteses a serem aceitas ou recusadas são (Equação 14) (ANVISA, 2017b; GOES et al., 2019; MARSON et al., 2020):

$$\begin{cases} H_0: \sigma_{y_1}^2 = \sigma_{y_2}^2 = \sigma_{y_i}^2 \dots = \sigma_{y_u}^2 & i = 1, 2, \dots, n \\ H_1: \text{pelo menos um dos } \sigma_{y_i}^2 \text{ é diferente} \end{cases} \quad \text{Equação 13}$$

Em que: $\sigma_{y_i}^2$ é a variância dos valores de y para um determinado nível de concentração.

$$C = \frac{S_{y_{max}}^2}{\sum_i^n S_{y_i}^2} \quad \text{Equação 14}$$

Em que: $S_{y_{max}}^2$ é a variância máxima em y ; $\sum_i^n S_{y_i}^2$ representa a soma de todas as variâncias em y .

O valor de C calculado deve ser comparado com o valor crítico com nível de significância de 5%, concluindo-se que se $C < C_{\text{crítico}}$, aceita-se a hipótese nula de forma que os dados são homocedásticos e se $C \geq C_{\text{crítico}}$, a hipótese é rejeitada e os dados são classificados como heterocedásticos (ANVISA, 2017b; CARDOSO et al., 2010).

A significância do coeficiente de correlação linear é determinada a partir do teste t de Student (Equação 15), avaliado com base em 2 hipóteses com nível de significância de 5% (Equação 16) em que se $t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$, rejeita-se a hipótese nula e indica que existe diferença significativa entre as variáveis (ANVISA, 2017b; BRITO et al., 2003; GOES et al., 2019).

$$t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{Equação 15}$$

Em que: r é o coeficiente de correlação para os dados amostrais e $n - 2$ é o número total de pontos

$$\begin{cases} H_0: \rho = 0 \\ H_1: \rho \neq 0 \end{cases} \quad \text{Equação 16}$$

Para cada classificação dos dados, aplica-se um dos métodos dos mínimos quadrados que mais se adequar ao conjunto de dados para aplicação. Para os dados homocedásticos, o método mais adequado é o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e para os dados heterocedásticos, aplica-se o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) que é calculado a partir de um fator de ponderação pelo inverso da variância em y , considerando a média de todas as variâncias em y (ANVISA, 2017b; CARDOSO et al., 2010; GOES et al., 2019; MARSON et al., 2020).

A análise da variância (ANOVA) avalia se a reta da regressão estimada explica a relação entre a concentração e o sinal detectado. Para o MMQO, deve-se calcular a soma dos quadrados médios pela Equação 17:

$$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 + \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad \text{Equação 17}$$

Em que: \bar{y} é a média aritmética dos valores de y ; y_i é o valor de y obtido experimentalmente em um ponto; \hat{y}_i é o valor individual de y calculado pelo modelo em um ponto; n é o número de pontos; $\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$ é a soma dos quadrados totais; $\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ é a soma dos quadrados de regressão; $\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$ é a soma dos quadrados dos resíduos.

Os valores de quadrado médio são obtidos a partir da razão entre a soma dos quadrados pelo número dos graus de liberdade (Equação 18-20).

$$QM_{Total} = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1} \quad \text{Equação 18}$$

$$QM_{Reg} = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{p-1} \quad \text{Equação 19}$$

$$QM_{Res} = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p} \quad \text{Equação 20}$$

Em que: $\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$ é a soma dos quadrados totais; $\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ é a soma dos quadrados de regressão; $\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$ é a soma dos quadrados dos resíduos; n é o número total de pontos e p é o número de parâmetros do modelo.

Por fim, o valor de F é obtido a partir dos valores dos quadrados médios da regressão e dos resíduos (Equação 21), considerando as hipóteses (Equação 22), de forma que se $F_{calculado} \geq F_{(\alpha,1,n)}$, rejeita-se a hipótese nula de que $b = 0$ e assume-se que y varia em função de x e o método é considerado linear (ANVISA, 2017b; BRITO et al., 2003; CARDOSO et al., 2010; GOES et al., 2019).

$$F = \frac{QM_{Reg}}{QM_{Res}} \quad \text{Equação 21}$$

$$\begin{cases} H_0: b = 0 \\ H_1: b \neq 0 \end{cases} \quad \text{Equação 22}$$

Para os dados heterocedásticos, aplica-se o MMQP seguindo o mesmo processo de análise da variância em MMQO, porém deve-se adicionar um fator de ponderação (Equação 23).

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_{i=1}^n s_i^{-2} / n} \quad \text{Equação 23}$$

Em que: s é o inverso da variância de y ; n é o número total de pontos.

Para a análise dos resíduos, a avaliação da normalidade pode ser feita de 2 formas: a) pela avaliação visual do gráfico; b) testes estatísticos, tais como: Shapiro Wilk, Lilliefors, gráficos de probabilidade ou histograma.

O teste de Shapiro Wilk verifica se um conjunto de dados segue a distribuição normal, de forma que as hipóteses do teste são (Equação 24):

$$\begin{cases} H_0: \text{os dados seguem uma distribuição normal} \\ H_1: \text{os dados não seguem uma distribuição normal} \end{cases} \quad \text{Equação 24}$$

A estatística do teste de Shapiro Wilk segue a descrição das Equações 25-28:

$$D_{s-w} = \frac{b^2}{s^2} \quad \text{Equação 25}$$

$$b_1 = \sum_{i=1}^{n/2} a_{n-1+1} (y_{n-1+1} + y_i) \quad \text{Equação 26}$$

$$b_2 = \sum_{i=1}^{(n+1)/2} a_{n-1+1} (y_{n-1+1} + y_i) \quad \text{Equação 27}$$

$$w = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad \text{Equação 28}$$

Em que: b_1 é o parâmetro para valores pares; b_2 é p parâmetro para valores ímpares; a é um valor tabelado relacionado aos valores de y ordenados de forma crescente; y_{n-1+1} é a i -ésima estatística da ordem; y é o valor observado e \bar{y} é a média dos valores observados.

Caso o $D_{s-wcalc} > D_{s-wtab}$, aceita-se a hipótese nula de que os dados seguem uma distribuição normal e se $D_{s-wcalc} < D_{s-wtab}$ aceita-se a hipótese de que os dados não seguem uma distribuição normal. O teste de Shapiro Wilk também pode ser analisado baseado no p-valor com nível de significância de 5% e nesse caso é necessário o uso de software para estimar esse valor (MIOT, 2017; RAZALI; WAH, 2011; SHAPIRO; WILK, 1965).

2.4.3 Precisão

A precisão de um método avalia a dispersão dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de uma amostra, determinando os erros de forma que é possível determinar como os resultados são afetados. A Equação 29 apresenta o coeficiente de variação (CV) que pode ser obtido para analisar a precisão, de forma que os valores de CV aceitos variam e podem chegar a 20% dependendo da faixa de concentração ou impurezas de amostras complexas.

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Equação 29}$$

Em que: s é a estimativa do desvio padrão obtido a partir de 3 réplicas da mesma concentração e \bar{x} é a média das réplicas da mesma concentração.

A precisão pode ser avaliada de 3 formas: a) repetitividade: avalia a concordância dos resultados em medidas sucessivas, utilizando o mesmo procedimento, analista, instrumento, local em um curto período de tempo e deve ser feita a partir da avaliação de 3 concentrações de baixa, média e alta com 3 réplicas em cada nível ou 6 replicadas na concentração máxima da curva individualmente preparadas; b) precisão intermediária: avalia as variações dentro do laboratório em diferentes dias, analista ou equipamento ou uma combinação dos fatores representando a variabilidade dentro do laboratório. Esse parâmetro também avalia de efeitos aleatórios, como a mudança de lote de reagente ou padrões, assim como pureza dos reagentes,

a calibração do equipamento e mudança de temperatura e c) reprodutibilidade: avalia a reprodutibilidade dos resultados a partir de análises em laboratórios diferentes (ANVISA, 2017a; MARSON et al., 2020; PERIS-VICENTE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2015; RIBANI et al., 2004; TIWARI; TIWARI, 2010).

2.4.4 Exatidão

A exatidão de um método avalia a concordância de uma medida analítica em relação a um valor de referência. A exatidão pode ser calculada de 2 formas: a) pela razão entre a concentração experimental e a concentração teórica (Equação 30) e b) a partir do erro calculado pela diferença da concentração experimental e a teórica, dividido pela concentração teórica (Equação 31) (ANVISA, 2017a; MARSON et al., 2020; PERIS-VICENTE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2015; RIBANI et al., 2004; TIWARI; TIWARI, 2010).

$$E = \frac{C_{exp}}{C_{teo}} \cdot 100 \quad \text{Equação 30}$$

$$E = \frac{C_{exp} - C_{teo}}{C_{teo}} \cdot 100 \quad \text{Equação 31}$$

2.4.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) refere-se a menor concentração do analito que pode ser quantificado com exatidão e precisão. O limite de quantificação pode ser determinado de três formas: a) pelo método visual a partir da análise de 6 replicatas em concentração decrescente com o desvio padrão relativo versus a concentração; b) pela avaliação do sinal-ruído a partir da menor concentração considerando a proporção 10:1 e c) pelo método baseada na curva analítica descrito pela Equação 32:

$$LQ = 10 \frac{s}{S} \quad \text{Equação 32}$$

Em que: S é a inclinação da curva e s é a estimativa do desvio padrão obtido: a partir do desvio padrão do eixo Y de no mínimo 3 curvas de calibração do analito em concentração próxima ao limite de detecção; do desvio padrão residual da regressão ou da estimativa do ruído de análises do branco (ANVISA, 2017a; MARSON et al., 2020; PERIS-VICENTE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2015; RIBANI et al., 2004).

2.4.6 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) refere-se a menor concentração do analito que pode ser detectado, mas não quantificado e pode ser calculado de quatro formas: a) pelo método visual determinado pela adição de padrão na matriz, distinguindo entre ruído e sinal analítico; b) pelo

método da relação sinal-ruído comparando-se a medição de amostra em baixa concentração na matriz; c) uma matriz isenta do analito, estabelecendo-se uma relação sinal-ruído nas proporções 3:1 ou 2:1; e d) pelo método baseado em parâmetros da curva analítica descrito pela Equação 33:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad \text{Equação 33}$$

Em que: S é a inclinação da curva e s é a estimativa do desvio padrão obtido: a partir do desvio padrão do eixo Y de no mínimo 3 curvas de calibração do analito em concentração próxima ao limite de detecção, do desvio padrão residual da regressão ou da estimativa do ruído de análises do branco (ANVISA, 2017a; MARSON et al., 2020; PERIS-VICENTE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2015; RIBANI et al., 2004).

2.5 Ecotoxicidade em diferentes organismos

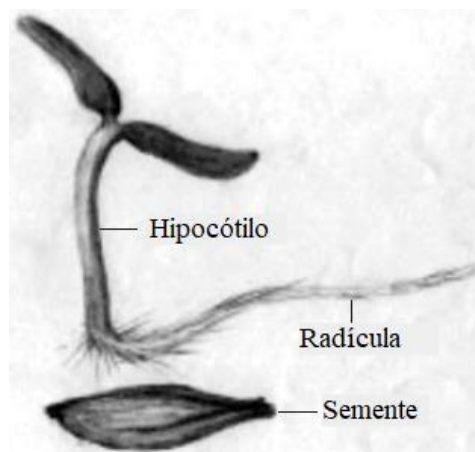
Os bioensaios são testes que determinam o efeito de agentes físicos ou químicos sob um organismo teste, sendo que os efeitos podem variar dependendo da característica química da substância, concentração, frequência de exposição, tipo e fase de vida do organismo submetido ao teste. Os organismos testes escolhidos devem pertencer a diferentes níveis tróficos auxiliando na compreensão dos efeitos tóxicos dos compostos avaliados e facilitar a comparação com trabalhos de outras áreas de estudo (ANGELI et al., 2021; DÍAZ-GARDUÑO et al., 2016; UTZIG et al., 2019).

No caso dos processos avançados de oxidação, os bioensaios auxiliam na avaliação da eficiência do processo, pois nem sempre o composto é completamente mineralizado, podendo ainda formar subprodutos mais tóxicos e prejudiciais ao ecossistema em que será despejado (ANGELI et al., 2021; CÁCERES et al., 2007; LI et al., 2019; PARKER et al., 2017; UTZIG et al., 2019; VASSEGHIAN et al., 2022a; ZHANG et al., 2011).

2.5.1 Lactuca Sativa

O bioensaio com sementes é utilizado para avaliar a germinação e crescimento das radículas. Durante o desenvolvimento da planta, ocorrem processos fisiológicos complexos, de forma que a presença de substâncias tóxicas possa interferir nos parâmetros mencionados. A avaliação da toxicidade é feita através de resultados baseados na inibição da germinação, do crescimento da radícula e do hipocólito (Figura 2) (PRIAC; BADOT; CRINI, 2017; SOBRERO; RONCO, 2004).

Figura 2 - Morfologia da semente de *Lactuca sativa*.



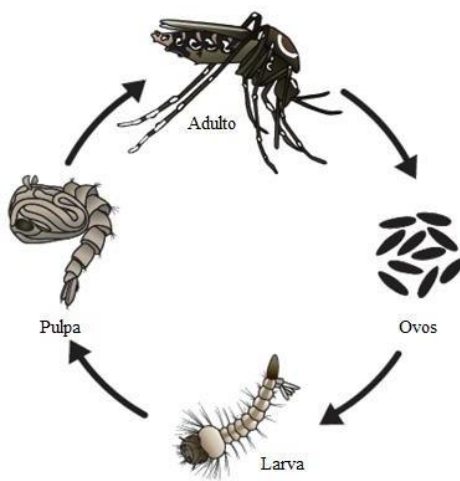
Fonte: Adaptado de Sobrero; Ronco, 2004.

Os ensaios de toxicidade com sementes são recomendados pela *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD) e a semente de *Lactuca sativa* é uma das espécies sugeridas, assim como *Allium cepa*, *Cucumis sativus*, *Triticum aestivum*, entre outras (OECD, 2006).

Utzig et al. (2019) avaliaram o efeito do pesticida clorpirifós em alguns organismos, incluindo as sementes de *Lactuca sativa* após a aplicação do processo oxidativo avançado UV/H₂O₂ e da radiação UVC. Após o tratamento, o ensaio com sementes apresentou toxicidade, mesmo após 120 minutos onde já não era mais observado sinal cromatográfico para o clorpirifós, possivelmente relacionado aos subprodutos formados durante o processo. Esse resultado ressalta a importância da avaliação da toxicidade pós-tratamento (UTZIG et al., 2019).

2.5.2 *Stegomyia aegypti*

O *Stegomyia aegypti* pertence à família *Culicidae* e ordem *Diptera*, originário da África e atualmente é encontrado em todo o mundo. É relatado como transmissor da dengue, Zika e chikungunya. O mosquito tem seu ciclo de vida caracterizada por 4 fases: ovos, larvais, pupa e adulto (Figura 3). Enquanto larva, o *Stegomyia aegypti* passa por 4 estágios, seguido pela fase da pupa e esses estágios ocorrem em meio aquático. O último estágio do ciclo de vida do *Stegomyia aegypti* é aéreo, onde o mosquito se torna adulto (BAR; ANDREW, 2013; MACORIS et al., 1999; MUTURI, 2013; PIOVEZAN et al., 2017; U.S DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2020a).

Figura 3 - Ciclo de vida do mosquito *Stegomyia aegypti*.

Fonte: Adaptado de (U.S DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2020b).

Visando o controle do *Stegomyia aegypti*, o Brasil tem usado inseticidas de diversas classes. Em 2011, o Instituto Oswaldo Cruz através da Nota Técnica n. 2/2011 relacionou o uso excessivo de piretóides à mutação do gene *kdr* (*knockdown resistance*), criando resistência dos mosquitos. Devido a isso, iniciou-se o uso do temefós, outro pesticida organofosforado. Novamente, em 2016, o Instituto divulgou através da Nota Técnica n.4/2016, a resistência dos mosquitos ao novo inseticida. O documento ainda indica que o controle químico dos mosquitos poderia ser feito com malathion, outro pesticida organofosforado, mas que a probabilidade de os mosquitos adquirirem resistência através do fenômeno de resistência cruzada seria alta e que outras formas de controle deveriam ser aplicadas (INSTITUTO OSWALDO CRUZ/FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (IOC/FIOCRUZ), 2011, 2016).

Até 2019, o Ministério da Saúde aprovava o uso do pesticida organofosforado malathion para o controle do mosquito *Stegomyia aegypti*, distribuindo uma formulação emulsionável 44%. Devido a dificuldades no uso do pesticida em sua formulação comercial, como a sedimentação do produto, formação de fase, densidade elevada e outros problemas relatados e análises realizadas pelo fabricante, o Ministério da Saúde recomendou a troca do inseticida. Além disso, através da Nota Técnica n.103/2019, foi comprovada a resistência dos mosquitos em diferentes municípios de todas as regiões do Brasil. Portanto, a partir dos dados apresentados foi recomendada a troca do malathion por outras formulações de pesticidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019a, 2019b).

Adams et al. (2018) estudou a degradação do malathion em formulação comercial por fotólise e processo UV/H₂O₂ e avaliou a toxicidade dos subprodutos com sementes de *Lactuca*

Sativa e larvas de *Stegomyia aegypti*. Após os tratamentos, não foi observado imobilização das larvas de *Stegomyia aegypti*, porém, para as sementes de *Lactuca sativa*, os tratamentos não foram capazes de remover ou reduzir a toxicidade inicial (ADAMS et al., 2018).

Utzig et al. (2019) avaliou a degradação do clorpirifos por fotólise e processo UV/H₂O₂ com avaliação ecotoxicológica. Os resultados mostraram que ambos os tratamentos foram eficientes para degradação do pesticida, porém, foi observado o aumento da toxicidade no processo UV/H₂O₂, comprovado pelo aumento da mortalidade das larvas de *Stegomyia aegypti* e inibição no crescimento da radícula para as sementes de *Lactuca sativa* (UTZIG et al., 2019).

Angeli et al. (2021) estudou a degradação do clorpirifos por fotólise e processo UV/H₂O₂ em concentração ambiental (200 µg L⁻¹) com tempo de tratamento até 480 minutos e avaliação ecotoxicológica com larvas de *Stegomyia aegypti* e *Daphnia magna*. Após 30 minutos de tratamento, para ambos os processos, a degradação do pesticida foi acima de 98%. Para a fotólise, a toxicidade aguda com *Daphnia magna* oscilou durante o processo e diminuiu em 480 minutos para o processo UV/H₂O₂. Já para a atividade larvicida com *Stegomyia aegypti*, após 60 minutos de fotólise e UV/H₂O₂ não foi mais observado efeito tóxico, mostrando a importância do biomonitoramento nesse tipo de processo (ANGELI et al., 2021).

2.6 Biomarcadores bioquímicos

2.6.1 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase é uma hidrolase encontrada nos tecidos nervosos que atua na regulação do neurotransmissor acetilcolina em mamíferos, pássaros e insetos. Os organofosforados atuam na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) no sistema nervoso, causando o acúmulo do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses e inibindo a sua conversão em ácido acético e colina, super estimulando os receptores nicotínico e muscarínico do sistema nervoso central e periférico, levando a contrações dos músculos, cólicas abdominais, espasmos musculoesqueléticos e possíveis efeitos na memória, aprendizagem e comportamento (AJIBOYE et al., 2022; ECOBICHON et al., 2008; GALLOWAY; HANDY, 2003; PANG et al., 2012; PRINTES; FERNANDES; ESPÍNDOLA, 2011; ROBERTS, JAMES R.; REIGART, 2013; SANCHES et al., 2003b).

A toxicidade dos organofosforados frente a acetilcolinesterase é dependente da concentração e do tempo de exposição. Após a exposição inicial, a ligação permanente entre enzima-fosforil é fortalecida a partir da perda de um grupo alquila do aduto formado. Dependendo do tempo de exposição, a fosforilação da acetilcolinesterase pode ser revertida

pela reativação por desfosforilação por um composto da família oxima (ECOBICHON et al., 2008; FULTON; KEY, 2001; GALLOWAY; HANDY, 2003; PANG et al., 2012).

2.6.2 Biotransformação

A excreção de contaminantes em um organismo ocorre pela biotransformação enzimática, denominada de Fase I – oxidação, redução ou hidrólise; II – conjugação e III – transformação, gerando compostos mais lipossolúveis que facilitam sua excreção (PRINTES; FERNANDES; ESPÍNDOLA, 2011; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A glutathione S-transferase (GST) é uma enzima que participa da fase II de biotransformação de contaminantes orgânicos, catalisando a reação da glutathione com compostos eletrofílicos. Essa enzima também está envolvida no transporte dos contaminantes através do citoplasma, podendo formar ligações covalentes para prevenir danos ao DNA e células. Em sua maioria, os compostos formados após a conjugação enzimática são mais tóxicos que os originais, porém são mais facilmente excretados das células (PRINTES; FERNANDES; ESPÍNDOLA, 2011; SHI et al., 2012; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Diversas rotas metabólicas que levam a diferentes respostas e a desintoxicação podem ser afetadas pela presença dos organofosforados, sendo as enzimas da fase I responsáveis pela oxidação, redução ou hidrólise das moléculas dos contaminantes, como as proteínas do citocromo P450 e as esterases (CACCIATORE; VERRENGIA GUERRERO; COCHÓN, 2013; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

As esterases são complexos enzimáticos capazes de hidrolisar a ligação éster presente nos em alguns contaminantes ambientais, como o malathion. Além disso, a enzima é responsável por catabolizar e regular o processo fisiológico dos insetos, que envolvem os hormônios juvenil, desenvolvimento ontogenético, digestão, funcionamento do sistema nervoso e reprodução (PALAKSHA; SHAKUNTHALA, 2015; SINGH; KAUR; SINGH, 2014).

2.6.3 Estresse oxidativo

Os radicais livres são espécies formadas a partir da clivagem homolítica da ligação covalente presente nos contaminantes, sendo as mais comuns o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), íon hidroxila (OH^-) e íon óxido (O_2^{-2}). Essas espécies são formadas pelas células durante o processo metabólico, porém sob condições normais, o organismo é capaz de reparar os danos causadas pela oxidação (LUSHCHAK, 2014; WANG et al., 2008).

A superóxido dismutase (SOD) é a enzima responsável por catalisar a reação dos radicais superóxido a peróxido de hidrogênio. Em seguida, a catalase é responsável por inativar o H_2O_2 rapidamente (BOELSTERLI, 2007; LUSHCHAK, 2014; ROMÉO et al., 2000; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

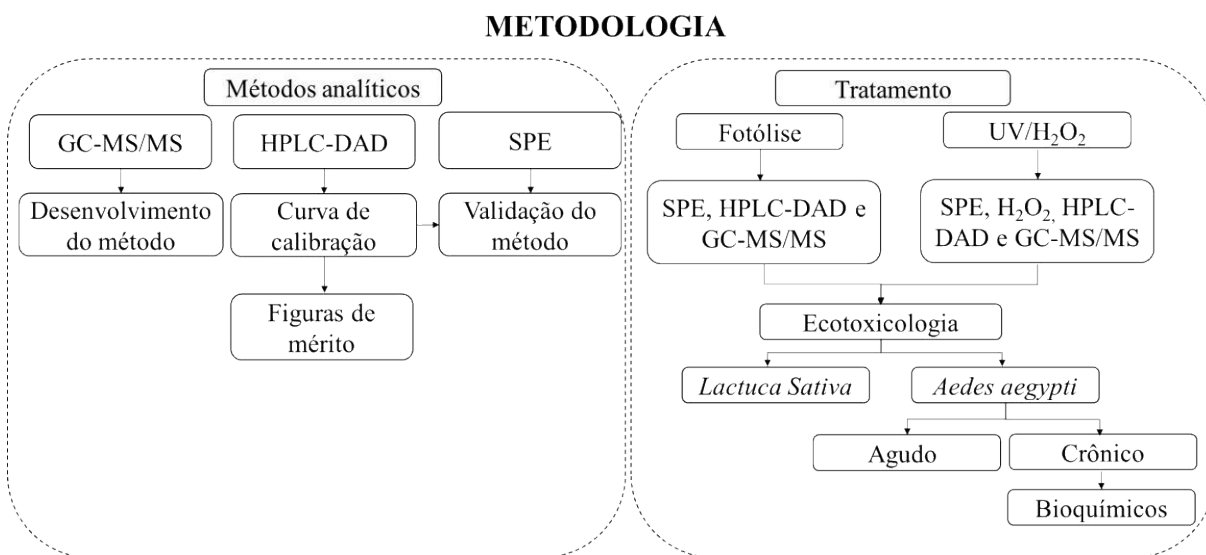
A peroxidação lipídica (LPO) é resultado do dano oxidativo a lipoproteínas, membranas celulares e outras estruturas que contenham lipídios, provocadas pelas espécies reativas de oxigênio ou pela redução da defesa antioxidante. A peroxidação lipídica é um dos parâmetros para avaliar o estresse oxidativo celular, ocorrendo em etapas já conhecidas (BOELSTERLI, 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; HULBERT et al., 2007; LUSHCHAK, 2014).

Primeiro, um átomo de hidrogênio é transferido do ácido graxo que contenha no mínimo duas ligações duplas separadas por metilenos intercalados (LH) e um radical lipídico com conjugação de dienos. Em seguida, ocorre a interação do radical lipídico com o oxigênio molecular, formando o radical peroxil, que retira um átomo de hidrogênio tanto do LH adjacente quanto de outro grupo doador de hidrogênio, induzindo uma reação de propagação, formando um hidroperóxido de ácido graxo. Danos a essas estruturas podem levar a reações inflamatórias, danos a células e tecidos que podem levar a morte celular, órgãos disfuncionais e perda de aptidão do organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; HIGUCHI, 2003; HULBERT et al., 2007; LUSHCHAK, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia geral utilizada nesta pesquisa pode ser observada esquematicamente no fluxograma apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Metodologia de trabalho.



Fonte: O autor (2023).

3.1 Reagentes, equipamentos e insumos

O pesticida utilizado foi o Malathion (Pestanal) e pesticida na formulação comercial Malathion® 500 CE (Dipil). No processo UV/H₂O₂ foi utilizado o peróxido de hidrogênio 35% da Peróxidos do Brasil. Outros reagentes utilizados neste trabalho foram catalase de fígado bovina 2000 – 5000 unidades mg⁻¹ (Sigma-Aldrich), bissulfito de sódio, etanol PA, acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker), acetona grau HPLC (J.T. Baker) e fitas colorimétricas para análise do H₂O₂ residual *Quantofix® Peroxid 25* 0,5-25 mg L⁻¹ H₂O₂ (Macherey-Nagel).

Para determinação das massas dos reagentes, foi utilizada uma balança digital Shimadzu® AUY220, com incerteza de ±0,0001g. Para a etapa de extração em fase sólida, o cartucho utilizado foi Chromabond® C18 500 mg 3cc, acoplado a um sistema de Manifold da Agilent® e bomba a vácuo Tecnal® modelo TE-0581. As medidas de pH foram feitas em pHmetro Phox P1000.

Para as análises cromatográficas, foram utilizados o cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Agilent 1260 series equipado com bomba quaternária G1311B, injetor automático G1329B, detector DAD G4212B e cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas tandem (CG-MS/MS) Agilent 7890A MS/MS 7000 disponíveis no Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA-UTFPR).

As análises espectrofotométricas foram realizadas em equipamento espectrofotômetro UV Carry 50Conc Varian disponível no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ-UTFPR).

Os ensaios de degradação, extração em fase sólida e outras etapas necessárias foram realizados no laboratório de contaminantes ambientais do Grupo de Pesquisa em Tecnologias Avançadas de Tratamento de Águas e efluentes (GPTec-UTFPR).

Para os bioensaios, os ovos de *Stegomyia aegypti* da linhagem Rockefeller foram cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE - Fundação Oswaldo Cruz – RJ) e as sementes para o ensaio de fitotoxicidade de *Lactuca sativa* pelo Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

As análises de marcadores bioquímicos com larvas de *Stegomyia aegypti* foram realizadas no Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (LAMFIC² – UFPR) em equipamento espectrofotômetro de microplacas (Multiskan Sky – ThermoScientific[®]) e microplaca de 96 poços (greiner bio-one) .

3.2 Preparo das vidrarias e materiais

As vidrarias e materiais usados foram lavados com álcool comercial 96% (92,3% INMP), enxaguados com água corrente da torneira e colocadas em ácido nítrico 10% (v/v) por, no mínimo, 24 horas e enxaguadas com água de osmose e secos em estufa a 100°C, com exceção das vidrarias volumétricas.

Após estarem completamente secos, todo o material foi calcinado em mufla a 400°C por 4 horas.

3.3 Controle analítico

3.3.1 Cromatografia líquida

A fase móvel utilizada para o método foi composta de acetonitrila grau HPLC previamente filtrada em membrana de PTFE 0,45 µm e água ultrapura (Mega Purity[®], resistividade 18,2 MΩ cm a 20°C) aplicando diferentes proporções de gradiente até a otimização da corrida cromatográfica.

3.3.2 Cromatografia gasosa

Para a detecção do malathion e seus subprodutos, as amostras em acetona foram analisadas por GC-MSMS (Agilent Technologies, Modelo 7890A, MS/MS 7000) com uma

coluna não polar, com baixo sangramento, própria para detector de massas (DB-5, 5% phenyl-95% methylpolysiloxane, 30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 μm , Agilent Technologies).

O injetor e transfer line foram mantidos a 280°C, fonte de ionização a 230°C, forno a 60°C. com aumento de temperatura a 70°C min^{-1} até 160°C e 10°C min^{-1} até 280°C, mantidos por 15 minutos. O volume de injeção foi de 1 μL no modo spitless. Hélio 6,0 foi usado como gás carreador a 1,6 mL min^{-1} em fluxo constante. A identificação dos picos foi feita utilizando a biblioteca de massas NIST (National Institute of Standard Technology, versão 2.0, Gaithersburg, MD, USA).

3.3.3 Curva de calibração

As curvas analíticas foram preparadas a partir da diluição da solução estoque de malathion 10.000 mg L^{-1} em acetona grau HPLC. A curva analítica foi preparada em dois intervalos de trabalho sendo a curva de baixa concentração entre 75 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, e a curva de alta concentração entre 200 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.3.4 Validação do método cromatográfico

As curvas analíticas foram verificadas a partir do coeficiente de correlação linear, do coeficiente linear e angular e seus respectivos erros para determinação dos limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão foram baseados na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017c).

Além desses parâmetros, a seletividade dos compostos foi avaliada através dos teores de pureza do pico cromatográfico dado pelo *Software ChemStation B* do equipamento HPLC.

3.3.5 Quantificação de peróxido de hidrogênio residual

Para a determinação do peróxido de hidrogênio residual, utilizou-se a metodologia adaptada pelo reagente de Allper[®], uma solução de sal de titânio e ácido sulfúrico. Após a reação com peróxido de hidrogênio, forma-se um complexo de peroxotitânio que adquire a cor amarelada e absorve em 395 nm (OLIVEIRA et al., 2011; PHILIP J. BRANDHUBER, 2009).

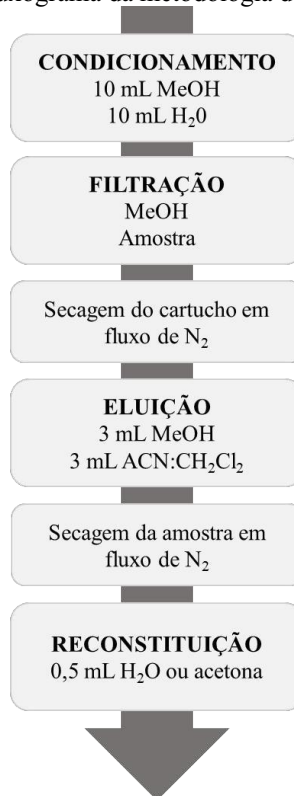
A curva foi realizada na faixa de trabalho de 10 a 50 mg L^{-1} . Para a leitura das amostras foi utilizado 1,5 mL de amostra e 1,5 mL de H_2O adicionando 3 gotas de reagente de Allper[®], para que a concentração da amostra ficasse dentro da curva de calibração. Para o branco, foi utilizado 1,5 mL de amostra e 1,5 mL de H_2O sem adição do reagente.

3.3.6 Extração em fase sólida

A pré concentração das amostras foi realizado a partir da extração em fase sólida utilizando cartucho *Chromabond*® C18 500 mg 3cc (Macherey-Nagel), com auxílio de um sistema manifold da Agilent® e bomba a vácuo da marca Tecnal®.

A determinação da eficiência do processo de extração, tal como os níveis de recuperação, foi feita utilizando uma solução com o analito em padrão cromatográfico em concentração 400 ng L⁻¹ preparada em água acidificada pH 3 com ácido clorídrico. O método de extração em fase sólida foi realizado adaptando-se o método proposto por Reddy et al. (2016) e pode ser observado na Figura 5 (REDDY et al., 2016). Apenas os ensaios de recuperação foram analisados em triplicata proporcionando resultados de exatidão e precisão. As amostras do processo de degradação foram acidificadas para pH 3 com ácido clorídrico.

Figura 5 - Fluxograma da metodologia de extração em fase sólida.



Fonte: O autor (2023).

O condicionamento do cartucho foi realizado com 10 mL metanol seguido de 10 mL de água proveniente de sistema de filtração tipo 1, em um fluxo de 5 mL/min.

A quantidade de amostra para o cartucho foi definida em 250 mL adicionando-se 2 mL metanol em cada amostra para HPLC e 1000 mL adicionando-se 8 mL de metanol para o GC.

Após a passagem da amostra pelo cartucho secou-se em fluxo de nitrogênio para retirada da água residual e de qualquer solvente que possa ter ficado no cartucho que interfira na próxima etapa.

A eluição dos compostos foi feita a partir de 3 mL metanol, seguido de 3 mL de acetonitrila:diclorometano (1:1). Os solventes resultantes da eluição foram evaporados em fluxo de nitrogênio.

Para o HPLC, a reconstituição das amostras após a evaporação no fluxo de nitrogênio foi feita com 0,5 mL de água tipo 1 de forma que o fator de concentração das amostras chegasse a 500 vezes. Para o GC, a amostra foi reconstituída com 0,5 mL de acetona, sendo o fator de concentração de 2000 vezes.

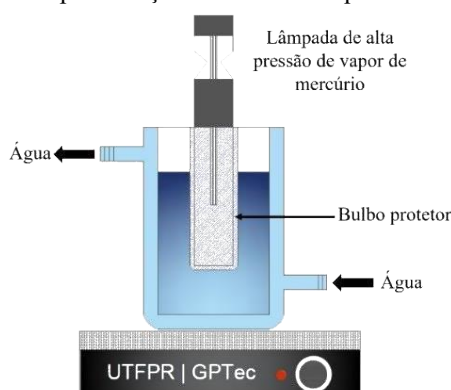
3.3.7 Preparo das soluções para degradação

A solubilização da amostra comercial foi feita com 2 mL de etanol padrão analítico e o volume foi completado para um balão de 1000 mL. A partir dessa solução, foi feita a diluição no reator de 1000 mL para a degradação, para obter uma concentração nominal inicial de $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.4 Ensaios de degradação por Fotólise e UV/H₂O₂

Os processos de tratamento foram conduzidos em um reator fotoquímico convencional de bancada, com capacidade de 1000 mL, refrigerado por fluxo contínuo de água. A homogeneização da amostra foi realizada por meio de agitação mecânica. Utilizou-se radiação artificial a partir de uma lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio de 125 W sem o bulbo protetor, inserindo-a na solução com auxílio de bulbo de quartzo (Figura 6) (RODRIGUES-SILVA et al., 2022).

Figura 6 - Representação do reator fotoquímico de bancada.



Fonte: Adaptado de Rodrigues-Silva, et al. 2022.

Em função da necessidade de pré-concentração das amostras após o tratamento, cada tempo de reação foi realizado separadamente. Os tempos de degradação foram de 15, 30 e 45 minutos.

No processo UV/H₂O₂, a determinação da concentração inicial de peróxido de hidrogênio utilizada no processo de degradação, baseou-se na determinação da demanda química de oxigênio realizada para o pesticida comercial Malathion (MACHADO, 2014).

As amostras resultantes dos processos avançados de oxidação encaminhadas à cromatografia, tiveram o peróxido de hidrogênio residual abatido a partir de uma solução de bissulfito de sódio 40% (v/v) e a remoção foi testada a partir da verificação do método colorimétrico com fitas *Peroxide Test*, MQuant™.

3.5 Ecotoxicidade

3.5.1 Atividade larvicida com *Stegomyia aegypti*

A metodologia para o bioensaio foi baseada na descrição da Organização Mundial de Saúde e adaptada por Utzig et. al (2019) brevemente descrita a seguir (UTZIG et al., 2019; WHO, 1981).

A eclosão dos ovos foi feita em um béquer de 1L contendo 500 mL de água mineral (Características físico-químicas (mg L⁻¹): cálcio – 35,301; magnésio – 22,179; potássio – 0,538; cloro – 1,61; bicarbonato – 214,38; sódio – 1,131; nitrato – 5,34; sulfato – 0,27; pH a 25°C – 7,36; condutividade elétrica a 25°C – 341 µS cm⁻¹) previamente aerada por 2 horas para desclorificação da água. As larvas foram alimentadas com comida macerada de peixe (AlconBASIC).

O armazenamento para eclosão dos ovos foi feito em uma estufa incubadora BOD, com fotoperíodo de 16 horas no claro e 8 horas no escuro, mantidos na temperatura de 28°C.

Depois da eclosão dos ovos e do crescimento das larvas no terceiro ou quarto instar, aproximadamente 96 horas após a eclosão, os experimentos foram realizados em quadruplicata.

Os testes foram realizados a partir da adição de 25 mL da amostra ou de água proveniente do sistema de filtração por osmose reversa para o branco em um béquer de 50 mL, adicionando-se 20 larvas em cada amostra da quadruplicata. Mantiveram-se as amostras em estufa incubadora BOD por 24 horas, sem fotoperíodo a 23°C. Após 24 horas de incubação, avaliou-se o percentual de imobilização dos organismos.

Os resultados dos bioensaios com *Stegomyia aegypti* foram submetidos a distribuição de dados pela análise de variância (ANOVA) aliado ao teste de Fisher (LSD) (UTZIG et al., 2019).

3.5.2 Efeito subletal no crescimento e desenvolvimento das larvas de *Stegomyia aegypti*

A eclosão dos ovos foi realizada conforme descrito no item 3.5.1. O ensaio foi realizado em frascos de polipropileno (diâmetro 11 cm, comprimento 11 cm e volume total de 750 mL). Em cada frasco, 20 larvas no primeiro instar foram adicionadas e para cada amostra, o ensaio continha 8 replicatas. O grupo controle foi exposto a água mineral e as amostras a serem analisadas foram determinadas após o teste de atividade larvicida.

O efeito da amostra nos organismos foi registrado a cada 12 horas até a completa emergência das larvas. Os efeitos incluíam mudanças no comportamento natatório, respiração e alimentação. Após a emergência, em até 24 horas, os adultos foram armazenados em freezer a -80°C para os ensaios de marcadores bioquímicos.

As análises foram feitas em microplacas com 96 poços e a leitura foi feita em espectrofotômetro para microplacas (Multiskan Sky -ThermoScientific®).

3.5.2.1 Bioquímicos

Para os ensaios de marcadores bioquímicos, os organismos foram mantidos em tubos Eppendorf e armazenados a -80°C antes das medidas de atividade enzimática e peroxidação lipídica. Cada amostra foi homogeneizada em 620 μL de água ultrapura (Milli-Q) e centrifugada a 12.000g por 1 minuto a 4°C .

3.5.2.1.1 Proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada usando albumina sérica bovina como padrão. Em uma microplaca, foi adicionado 10 μL de amostra e 250 μL do reagente de Bradford (Sigma®) e a absorbância foi lida em 595 nm (BRADFORD, 1976).

3.5.2.1.2 Acetilcolinesterase

Para a determinação da atividade da acetilcolinesterase, foram adicionados 25 μL de amostra, 200 μL DTNB em tampão fosfato de potássio pH 7,5 ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$ 5',5'-dithiobis(ácido 2-nitrobenzoico) em 100 mmol L^{-1} tampão fosfato de sódio pH 7,5) e 50 μL de iodeto de acetiltiocolina 10 mmol L^{-1} .

A microplaca foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e a atividade foi mensurada a cada 30 segundos durante 5 minutos em 405 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (ELLMAN et al., 1961).

3.5.2.1.3 Esterases

Para a determinação da alfa esterase (EST- α) foram adicionados 10 μ L de amostra e 200 μ L de alfa-naftil acetato ou beta-naftil acetato em tampão fosfato de potássio pH 7,5. A microplaca foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e então adicionado 50 μ L de 0,3% fast blue em 70% dodecil sulfato de sódio em água Milli-Q. Após 5 minutos, a atividade foi mensurada em 570 nm. Os resultados foram expressos em nmol alfa-naftol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína e nmol beta-naftol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína (VALLE et al., 2006).

3.5.2.1.4 Glutathione S-transferase

A atividade da glutathione S-transferase, foram adicionadas 15 μ L de amostra, 195 μ L de CDNB 21 mmol L^{-1} (2,4-dinitroclorobenzeno) e GSH 100 mmol L^{-1} (glutathione reduzida) em tampão fosfato de potássio pH 6,5. A absorbância foi medida durante 20 minutos em intervalos de 1 minuto em 340 nm. Os resultados foram expressos em nmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976).

3.5.2.1.5 Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase foi medida pela adição de 40 μ L de amostra e 885 μ L de tampão Tris-base 1M/EDTA 5 mM pH 8,0. Após agitação no vórtex, foram adicionados 50 μ L de pirogalol 20mM. A amostra foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, e em seguida, a reação foi interrompida com 25 μ L de HCl 1N. Para a análise, 300 μ L de amostra foi transferida para um microplaca. A leitura foi feita no modo *endpoint* em 440nm. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína (GAO et al., 1998).

3.5.2.1.6 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pela adição de 70 μ L de amostra e 900 μ L de reativo Fox (metanol, H_2SO_4 250 mM, laranja de xilenol 0,1 mM, hidroxitolueno butilado 4mM e sulfato ferroso amoniacal 2,5 mM). Para a análise, 300 μ L de amostra foi transferida para um microplaca. A leitura foi feita no modo *endpoint* em 570nm. Os resultados foram expressos em nmol mg^{-1} de proteína (JIANG; HUNT; WOLFF, 1992).

3.5.2.1.7 Análises estatísticas

Os resultados da atividade enzimática foram submetidos a análise de variância unidirecional (ANOVA), Tukey e Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações

de Dunn, quando necessário. A diferença foi considerada significativa quando $p \leq 0,05$ através do software R environment (v.1.3.1093).

3.5.3 Fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa*

Os bioensaios com sementes de *Lactuca sativa* seguiram a metodologia descrita por Rodrigues-Silva et al. (2022).

O teste consistiu na disposição de 15 sementes da marca Isla da variedade delícia americana em uma placa de Petri de 10 cm alocadas em cima de um papel filtro (80 g m⁻², Unifil) com 4 mL de amostra. As placas foram seladas individualmente com filme plástico e incubadas em BOD a 20 ± 2 °C sem fotoperíodo por 120 horas. O controle negativo foi feito com água de osmose reversa e o controle positivo com solução de glifosato comercial a 3% (m/v) (RODRIGUES-SILVA et al., 2022).

Após o período de incubação, o comprimento das radículas de cada semente foi medido com uma régua de precisão de uma casa de milímetro. As radículas com comprimento inferior a 0,3 foram consideradas não germinadas e a partir dos resultados obtidos, foram calculados o desvio padrão e coeficiente de variação de comprimento de cada réplica, considerando o mínimo de 90% de germinação e o máximo de 30% de coeficiente de variação (GARCIA et al., 2009).

Os resultados foram avaliados em relação ao índice de germinação (IG) e do índice de crescimento relativo (ICR), descritos nas Equações 34 e 35, respectivamente (GARCIA et al., 2009; YOUNG et al., 2012).

$$IG = \frac{\text{Média de germinação de cada réplica da amostra}}{\text{Média de germinação de cada réplica do controle negativo}} \times 100 \quad \text{Equação 34}$$

$$ICR = \frac{\text{Média do comprimento das radículas das amostras}}{\text{Média do comprimento das radículas do controle negativo}} \quad \text{Equação 35}$$

A interpretação dos resultados obtidos foi realizada de acordo com Garcia et al. (2009) para o cálculo do índice de germinação e Young et al. (2012), para o índice de crescimento relativo apresentando três formas de classificação: sem efeito toxicológico ($0,8 > ICR < 1,2$), inibição do crescimento das radículas ($ICR < 0,8$) e estímulo de crescimento das radículas ($ICR > 1,2$) (YOUNG et al., 2012).

Os bioensaios com *Lactuca sativa* foram submetidos a distribuição de dados pela análise de variância (ANOVA) aliado ao teste de Dunnett.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Método cromatográfico

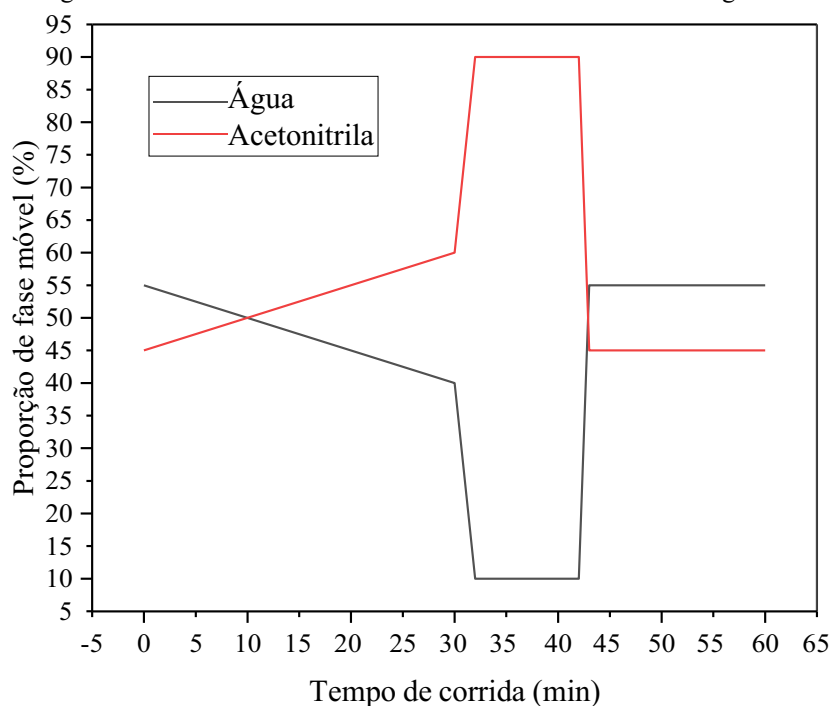
As condições iniciais de teste do método cromatográfico foram feitas a partir da combinação de referências bibliográficas e com base nisso, foram testadas e ajustadas as condições cromatográficas, descritas na Tabela 2 e o gradiente para fase móvel na Figura 7 (ABU-QARE; ABOU-DONIA, 2001; COLEONE et al., 2017b; KRALJ et al., 2007; VELKOSKA-MARKOVSKA; PETANOVSKA-ILIEVSKA, 2013).

Tabela 2 - Condições cromatográficas para HPLC-DAD

Coluna cromatográfica	Poroshell 120 EC-C18 (Agilent Technologies) 4,6x150 mm, 2,7 μ m		
Temperatura da coluna	33 °C		
Fase móvel	Água:Acetonitrila		
Tipo de eluição	Gradiente		
Proporção da fase móvel	Tempo (minutos)	Fase móvel A: H ₂ O (%)	Fase móvel B: ACN (%)
	0	55	45
	30	40	60
Volume de injeção	50 μ L		
Vazão de fase móvel	0,3 mL min ⁻¹		
λ monitorado	200 nm		
Tempo de retenção	32,4 minutos		
Tempo do método	60 minutos		

Fonte: o autor (2023).

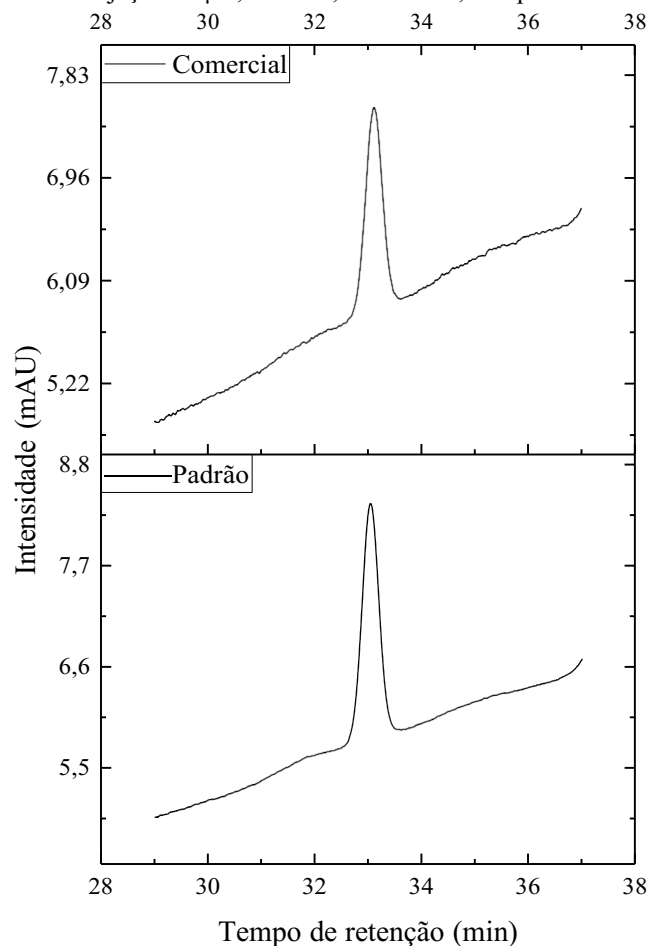
Figura 7 - Gradiente de fase móvel utilizado no método cromatográfico.



Fonte: O autor (2023).

A identificação do analito foi feita a partir da injeção de uma amostra padrão na mesma condição descrita na Tabela 2, assim como uma amostra do analito em formulação comercial (Figura 8).

Figura 8 - Cromatogramas do pesticida Malathion padrão analítico e a formulação comercial. Modo gradiente, volume de injeção 50 μL , vazão 0,3 mL min^{-1} , comprimento de onda 200 nm.



Fonte: O autor (2023).

O tempo de retenção para o malathion foi identificado em 32,4 minutos tanto para o padrão quanto para o comercial. Em relação ao comprimento de onda, alguns autores relatam diferentes comprimentos de onda de monitoramento entre 200 e 210 nm para o malathion, sendo para este trabalho, escolhido o comprimento em 200 nm, determinado a partir da análise da área espectral (ABU-QARE; ABOU-DONIA, 2001; VELKOSKA-MARKOVSKA; PETANOVSKA-ILIEVSKA, 2020). Em 200 nm, a área registrada foi de 66,3 mAU para 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, em 205 nm foi de 55,1 mAU e em 210 nm foi de 50,1 mAU, chegando a 24,4% de diferença e desta forma, o menor comprimento de onda foi escolhido devido à sua maior sensibilidade.

4.2 Validação analítica

4.2.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da pureza do pico cromatográfico determinada pelo software e os dados da curva de pureza obtidos são mostrados na Tabela 3, demonstrando a seletividade do método de 99,99% de pureza do pico analisado.

Tabela 3 - Dados obtidos para determinação do índice de pureza do pico cromatográfico.

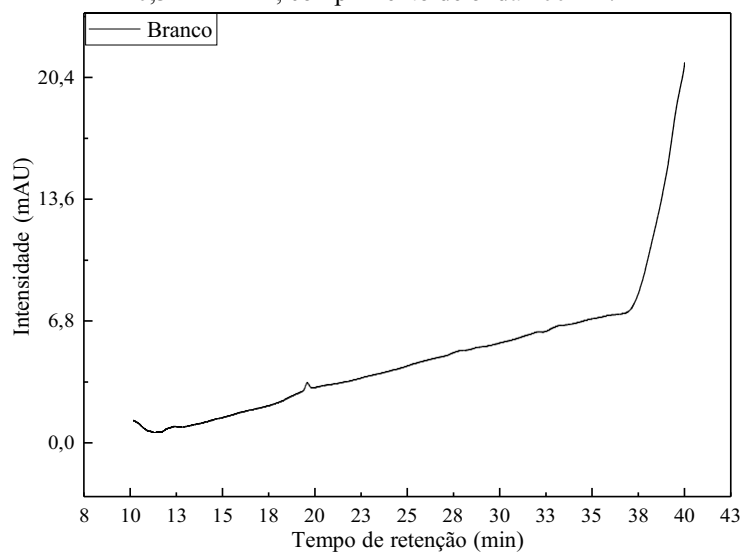
Tempo (min)	Pureza¹	Threshold²	Diferença³
32,364	999,998	999,976	0,022
32,371	999,998	999,977	0,021
32,377	999,998	999,977	0,020
32,384	999,998	999,978	0,020
32,391	999,998	999,978	0,020
32,397	999,997	999,978	0,019
32,404	999,997	999,978	0,019
32,411	999,998	999,978	0,019
32,417	999,998	999,979	0,020
32,424	999,998	999,979	0,020
32,431	999,998	999,978	0,020
32,437	999,998	999,978	0,020
32,444	999,997	999,978	0,019
32,451	999,996	999,978	0,018
32,457	999,993	999,978	0,017
32,464	999,993	999,977	0,016
32,471	999,993	999,977	0,016
32,477	999,993	999,977	0,016
32,484	999,994	999,976	0,018

Fonte: O autor (2023).

Legenda: ¹: valor da pureza calculado em relação ao espectro médio do espectro do pico selecionado; ²: limite calculado com base no ruído do espectro; ³: diferença entre a pureza e o limite calculado.

A partir da análise de água isenta do composto (Figura 10), também foi possível avaliar a seletividade do método cromatográfico, comprovando que no tempo de retenção do analito não foi observado nenhum pico cromatográfico.

Figura 9 - Cromatograma da água isenta do analito. Modo gradiente volume de injeção 50 μL , vazão 0,3 mL min^{-1} , comprimento de onda 200 nm.

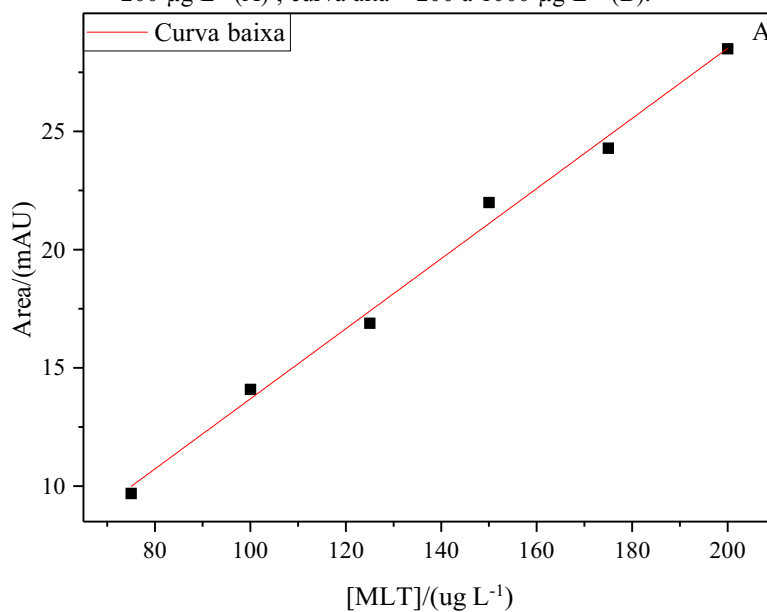


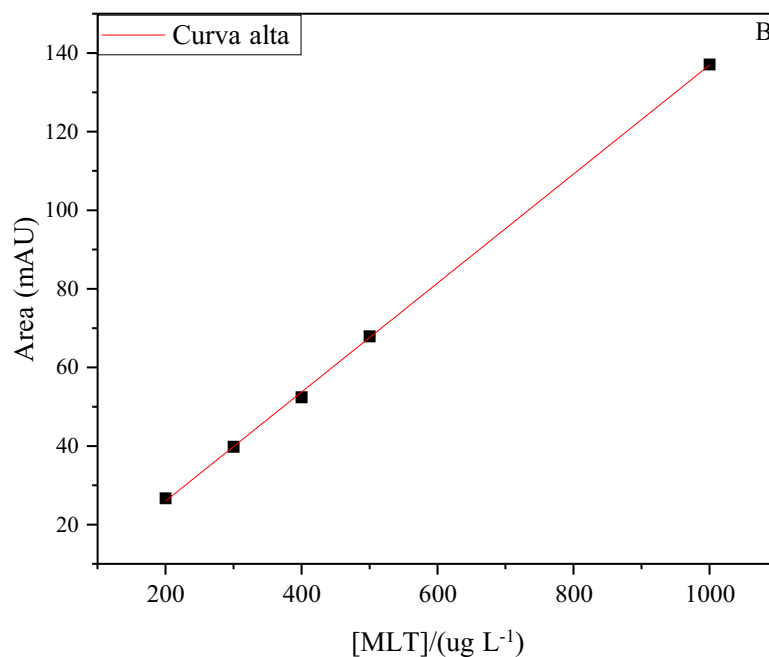
Fonte: O autor (2023).

4.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi comprovada a partir da representação gráfica das respostas de área em função da concentração do analito (Figura 10). Embora o coeficiente de correlação da curva tenha apresentado valor acima de 0,99 ($R^2 > 0,99$) (Tabela 4), tal informação precisou ser confirmada a partir de testes estatísticos para a adequabilidade do método linear (ANVISA, 2017b, 2017a).

Figura 10 - Curvas de calibração para o malathion em diferentes faixas de trabalho. Curva baixa - 75 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (A); curva alta - 200 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (B).





Fonte: O autor (2023).

Tabela 4 - Parâmetros calculados para as curvas analíticas do Malathion.

Parâmetro	Curva alta	Curva baixa
Intercept	-1,79897	-1,13143
Desvio Intercept	0,79332	0,85958
Slope	0,13871	0,14823
Desvio Slope	0,00143	0,00597
R ²	0,9995	0,9919

Fonte: O autor (2023).

A adequação do modelo foi feita a partir da análise da homocedasticidade (variância em y), através do teste estatístico de Cochran, seguida do teste t de Student para avaliação do coeficiente de correlação linear (Tabela 5).

Tabela 5 - Dados estatísticos calculados para comprovação da linearidade do método.

Teste estatístico	Cochran		t student ⁵	
	Curva alta	Curva baixa	Curva alta	Curva baixa
Valor calculado	0,668	0,574	89,420	23,993
Valor tabelado	0,684 ¹	0,616 ²	2,776 ³	2,571 ⁴

Fonte: O autor (2023).

Legenda: ¹: n=5, réplicas=3; ²: n=6, réplicas=3; ³: gl=4; ⁴: gl=5; ⁵: $\alpha = 0,05$.

A partir dos resultados dos testes estatísticos, em que $C_{cal} < C_{tab}$ para ambos os intervalos da curva, aceita-se a hipótese nula de que as variâncias não diferem significativamente entre si e comprova-se que os dados são homocedásticos, sendo possível aplicar o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).

E como $t_{cal} > t_{tab}$, rejeita-se a hipótese nula de que o coeficiente linear não é estatisticamente diferente de zero e comprova a linearidade do método (ANVISA, 2017b; BRITO et al., 2003; CARDOSO et al., 2010).

Com base nos testes estatísticos calculados, o MMQO foi aplicado, seguido pelo teste F com os dados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados estatísticos calculados para o teste F da ANOVA.

Parâmetro avaliado	Curva baixa	Curva alta
QM _{tot}	243,4	9427,0
QM _{reg}	60,44	3141,8
QM _{res}	0,33	1,25
F _{calculado}	180,6	1964,8
F _{tabelado}	7,71 ¹	10,13 ²

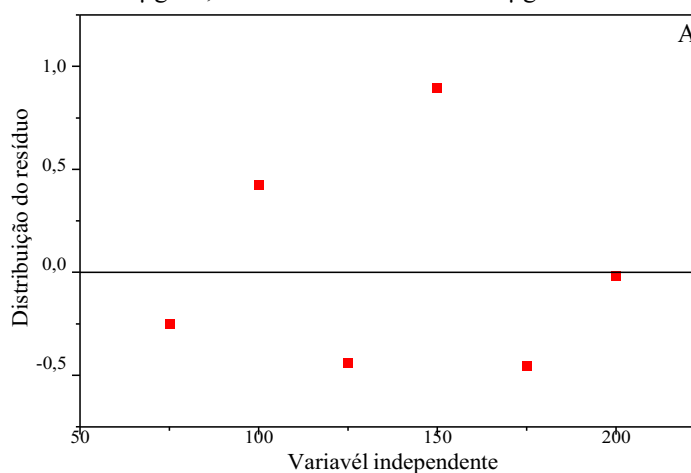
Fonte: O autor (2023).

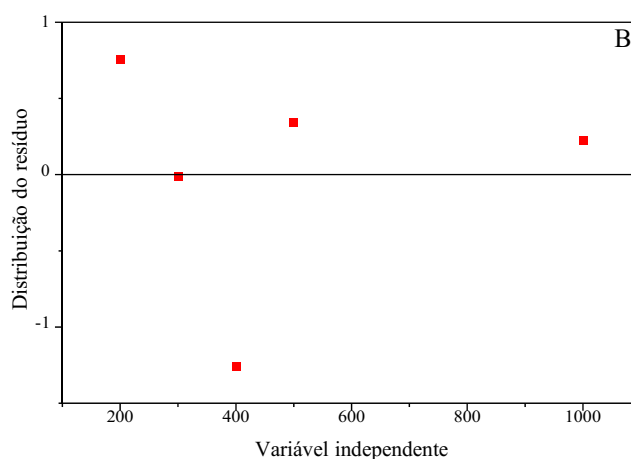
Legenda: ¹: n=6, gl=5, p=2; ²: n=5, gl=4, p=2.

Como os valores de $F_{calculado}$ foram maiores do que $F_{tabelado}$ para ambos os intervalos da curva, indica-se que a hipótese de que $b=0$ deve ser rejeitada e que, portanto, o valor de y varia em função de x e o método é considerado linear, podendo-se seguir com a validação (ANVISA, 2017b; BRITO et al., 2003; CARDOSO et al., 2010).

A avaliação dos resíduos da curva analítica foi realizada a partir da análise visual do gráfico de resíduos (Figura 11) e pela aplicação do teste estatístico de Shapiro-Wilk (Tabela 7).

Figura 11 - Gráfico de dispersão dos resíduos para as curvas de calibração. A: curva baixa - 75 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$; B: curva alta - 200 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.





Fonte: O autor (2023).

Tabela 7 - Dados estatísticos calculados para o teste de Shapiro-Wilk.

Parâmetro	Curva alta	Curva baixa
1º termo	10,74	6,27
2º termo	2,88	1,79
3º termo	-	0,16
b	13,63	8,2
w	153,5	75,6
$D_{\text{calculado}}$	1,21	0,89
D_{tabelado}	0,762 ¹	0,788 ²

Fonte: O autor (2023).

Legenda: ¹: n=6; $\alpha=0,05$; ²: n=5, $\alpha=0,05$.

Os valores calculados ($D_{\text{calculado}}$) no teste de Shapiro-Wilk em relação aos valores tabelados (D_{tabelado}), para ambos os intervalos da curva, indicam que se deve rejeitar a hipótese de que os dados não seguem uma distribuição normal (a maioria dos dados não está próxima a média), ou seja, afirma a dispersão dos dados de resíduos (MIOT, 2017; RAZALI; WAH, 2011; SHAPIRO; WILK, 1965).

4.2.3 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas a partir repetitividade dos dados calculando-se o coeficiente de variação (CV) de 3 concentrações em níveis diferentes para as duas faixas de trabalho utilizadas (Tabela 8).

Tabela 8 - Dados utilizados para o cálculo da precisão e exatidão do método.

	$C_{teórica} (\mu\text{g L}^{-1})$	$C_{calculada} (\mu\text{g L}^{-1})$	Média	Desvio padrão	CV (%)	Exatidão (%)
Baixa	90	102,1	97,9	4,37	4,46	108,8
		93,4				
		98,1				
	130	133,1	133,1	2,01	1,51	102,4
		131,1				
		135,1				
180	178,8	179,5	0,67	0,37	99,7	
	179,5					
	180,2					
Alta	250	220,1	218,7	1,90	0,87	87,5
		216,5				
		219,4				
	350	368,0	355,1	11,45	3,22	101,4
		350,7				
		346,4				
600	552,7	554,4	2,91	0,52	92,4	
	557,8					
	552,7					

Fonte: O autor (2023).

Os resultados obtidos para precisão ficaram abaixo de 5%, dentro do limite permitido para o coeficiente de variação entre todos os níveis de concentração, segundo a RDC 04/2012 (ANVISA, 2012b).

A exatidão foi calculada para avaliar a concordância dos valores determinados pela curva de calibração frente ao valor teórico, variando de 87 a 108%, dentro dos limites preconizados pela RDC 166/2017 (ANVISA, 2017a).

4.2.4 Limite de quantificação e detecção

Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) do método foram determinados a partir da inclinação da curva e do desvio padrão relativo referente ao eixo y das curvas de calibração (Tabela 9).

Tabela 9 - Limite de quantificação e detecção calculados para o método.

Parâmetro avaliado	Curva baixa	Curva alta
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	57,9	57,1
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	19,1	18,8

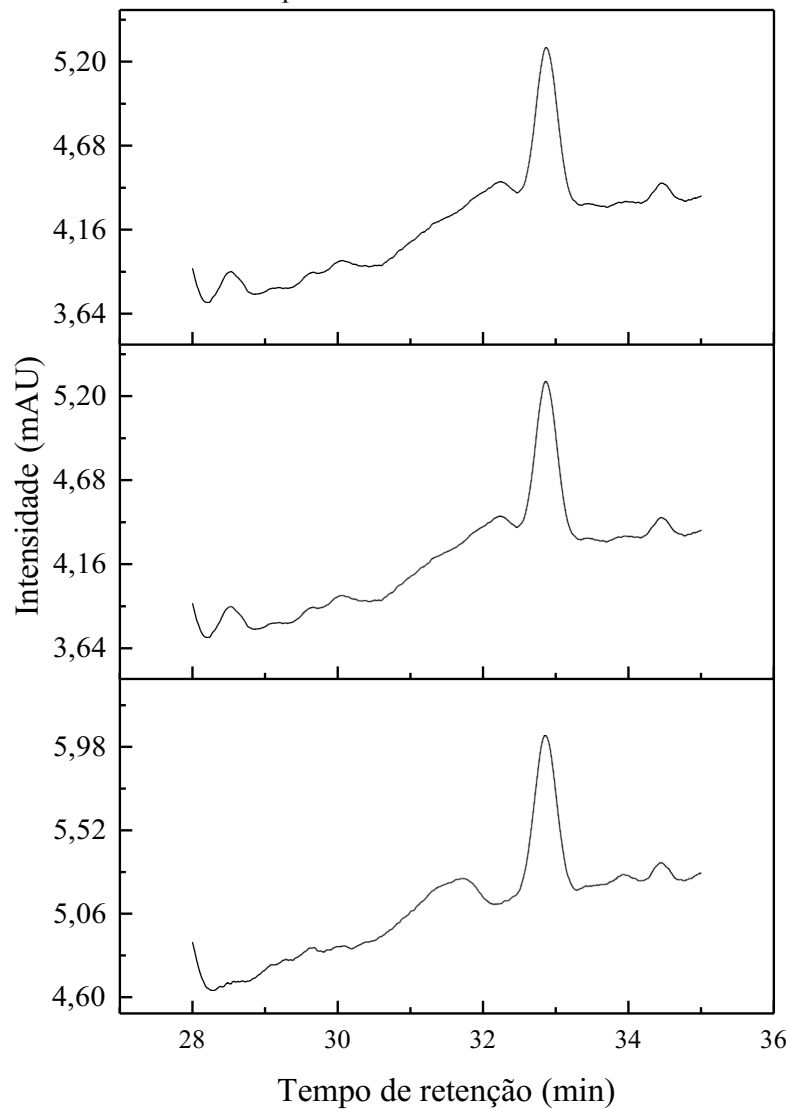
Fonte: O autor (2023).

Conforme os dados apresentados na Tabela 9, para a curva de baixa (75 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$), o valor calculado do LQ e LD foi de 57,9 e 19,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para a curva de alta (200 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$), foi de 57,1 e 18,8 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.3 Extração em fase sólida

O procedimento de extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* – SPE) foi adaptado segundo metodologia descrita por Reddy et al. (2016). O volume de amostra filtrada foi definido em 250 mL, atentando-se a recomendação do fabricante do cartucho e o fator de concentração foi fixado em 500 vezes. A concentração de fortificação para teste foi de 400 ng L⁻¹ para o Malathion. O resultado obtido no teste de recuperação do Malathion padrão é apresentado na Figura 12.

Figura 12 - Cromatograma em triplicata do pesticida malathion no processo de extração em fase sólida, [MLT]=400 ng L⁻¹, SPE 500x, modo gradiente, volume de injeção 50 µL, vazão 0,3 mL min⁻¹, comprimento de onda 200 nm.



Fonte: O autor (2023).

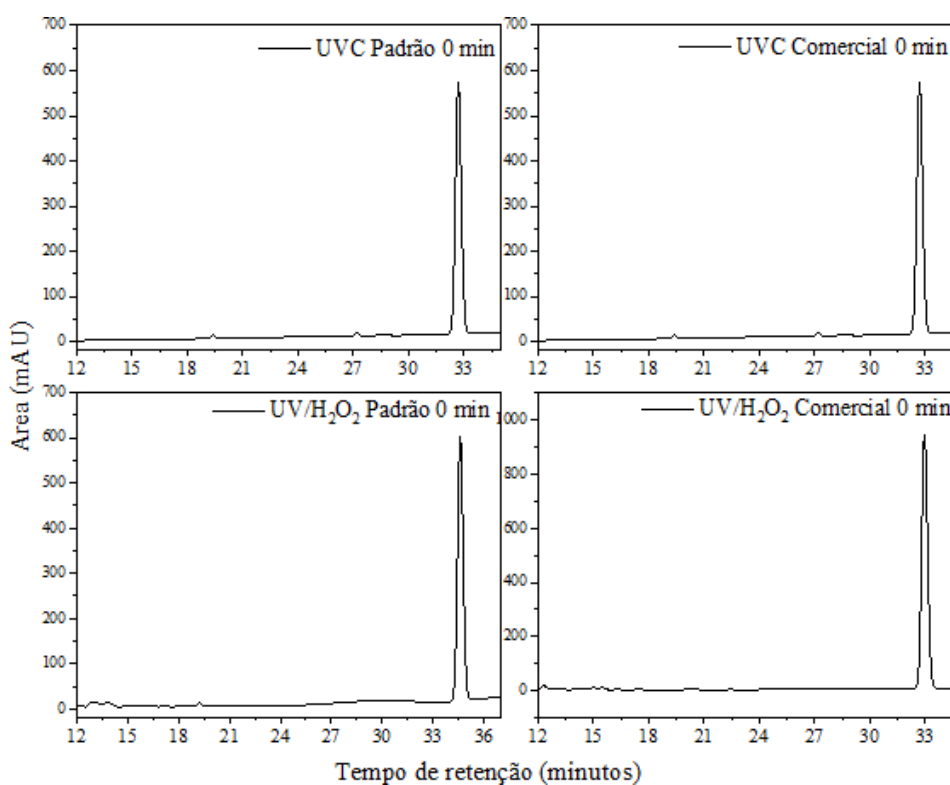
A concentração média das recuperações ($n=3$) foi de $307,7 (16,5) \mu\text{g L}^{-1}$, com recuperação média de 76% e coeficiente de variação 5,38%, dentro dos valores permitidos pela resolução vigente (ANVISA, 2017a).

Reddy et al. (2016) obteve média de recuperação de 89% com o cartucho *Chromabond* C18 500 mg, mesmo utilizado nesse trabalho. Esta diferença na recuperação pode ser atribuída a diminuição na quantidade de amostra (500 mL para 250 mL), na concentração de fortificação para validação ($50 \mu\text{g L}^{-1}$ para 400ng L^{-1}) e na forma de quantificação feita pelo autor, utilizando GC-MS, e no presente trabalho, a identificação foi feita por HPLC-DAD, que apresenta menor sensibilidade para quantificação, podendo justificar a diferença de recuperação (REDDY et al., 2016).

4.4 Degradação do Malathion por fotólise e UV/H₂O₂

Os cromatogramas para os tempo zero da a fotólise e processo UV/H₂O₂ para o pesticida padrão e a formulação comercial são apresentados na Figura 13.

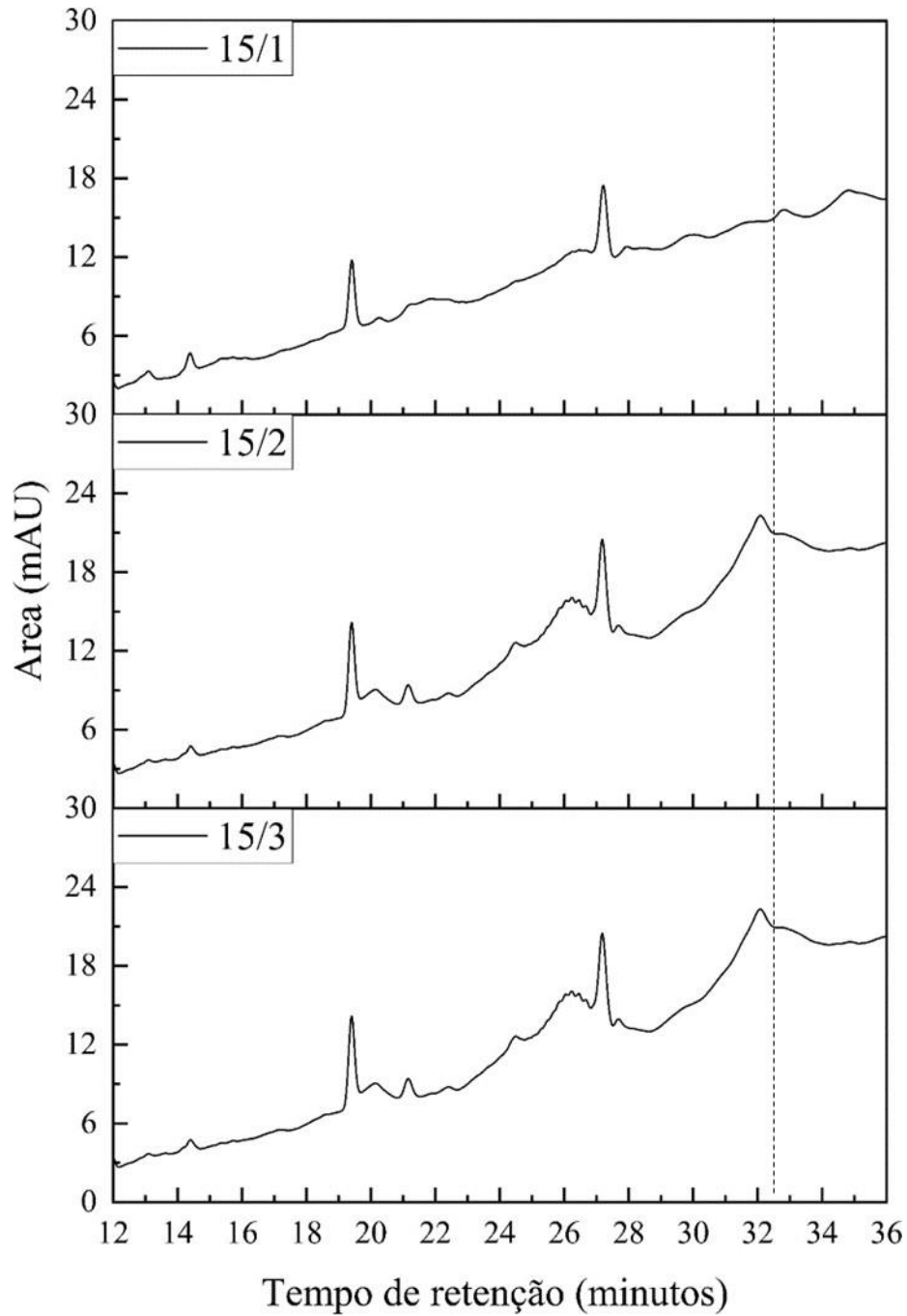
Figura 13 – Cromatogramas do tempo zero da fotólise e processo UV/H₂O₂ para o pesticida padrão e em formulação comercial, [MLT] = $500 \mu\text{g L}^{-1}$, modo gradiente, volume de injeção $50 \mu\text{L}$, vazão $0,3 \text{mL min}^{-1}$, comprimento de onda 200 nm.

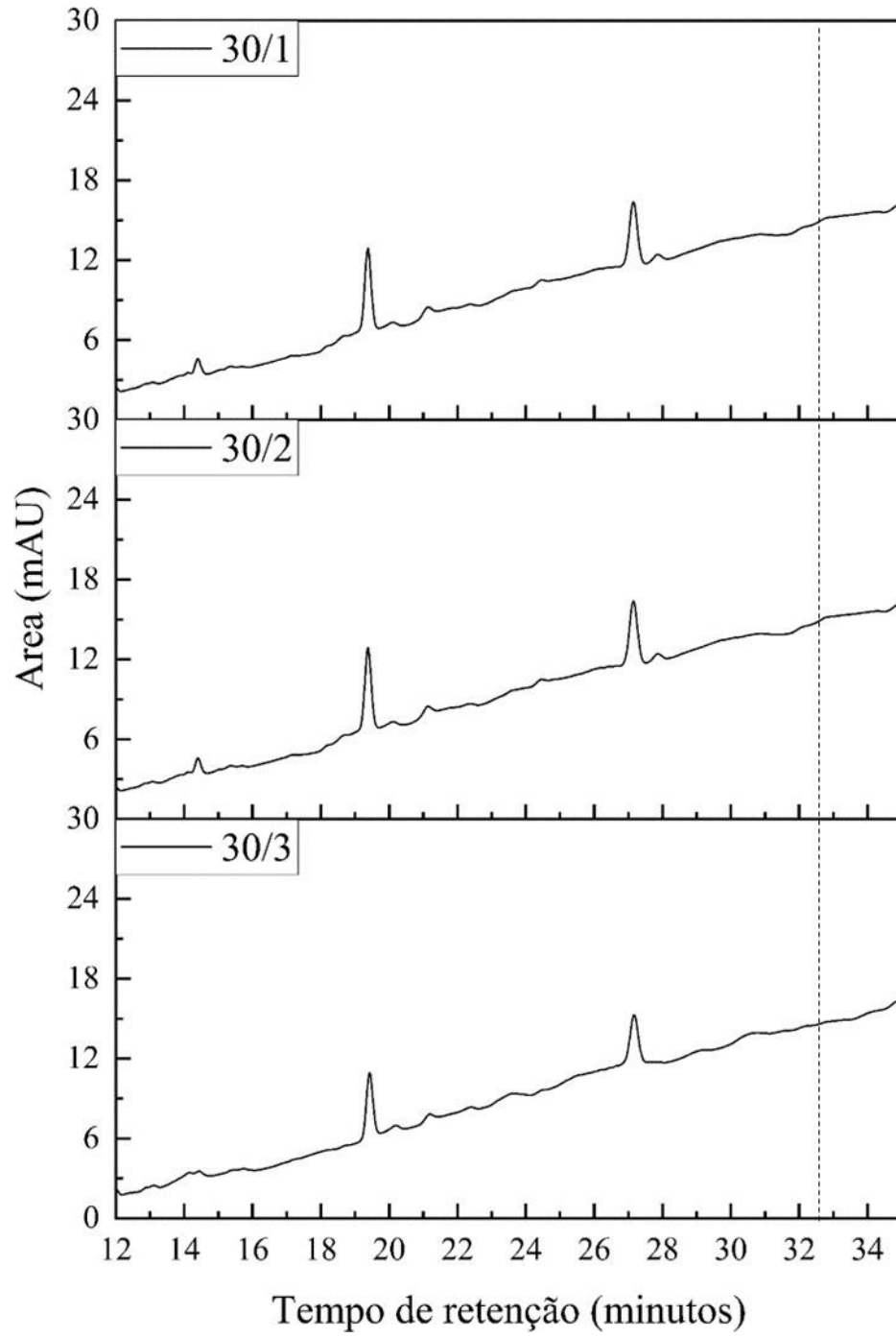


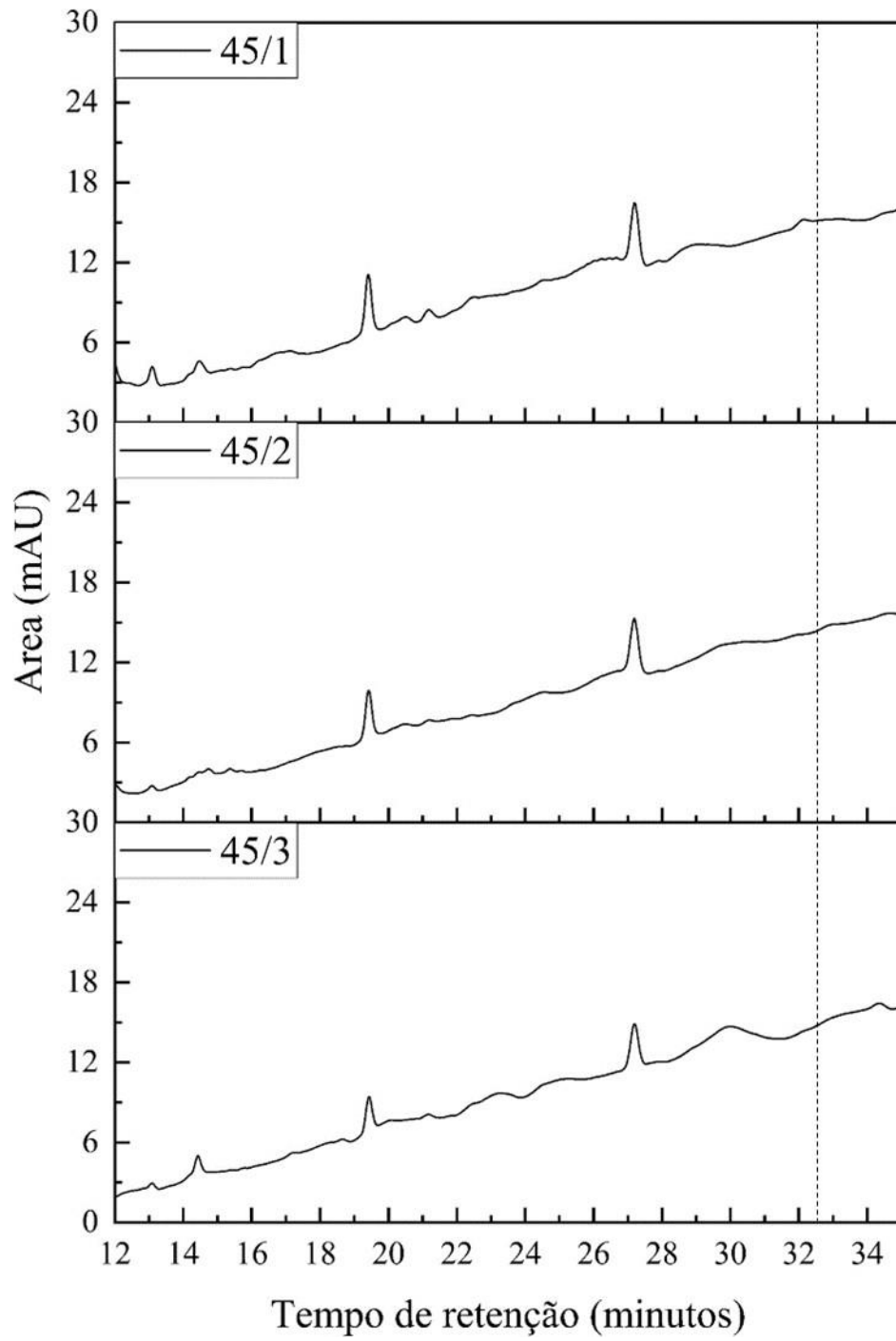
Fonte: O autor (2023).

Os resultados do monitoramento do pesticida Malathion para o tratamento por fotólise tanto para o composto padrão quanto para o malathion na formulação comercial, podem ser observados na Figura 15 e 16, respectivamente.

Figura 14 - Cromatogramas da degradação por fotólise para o pesticida padrão com lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo, $[MLT]_0 = 500 \mu\text{g L}^{-1}$, SPE 500x; modo gradiente, volume de injeção $50 \mu\text{L}$, vazão $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, comprimento de onda 200 nm .

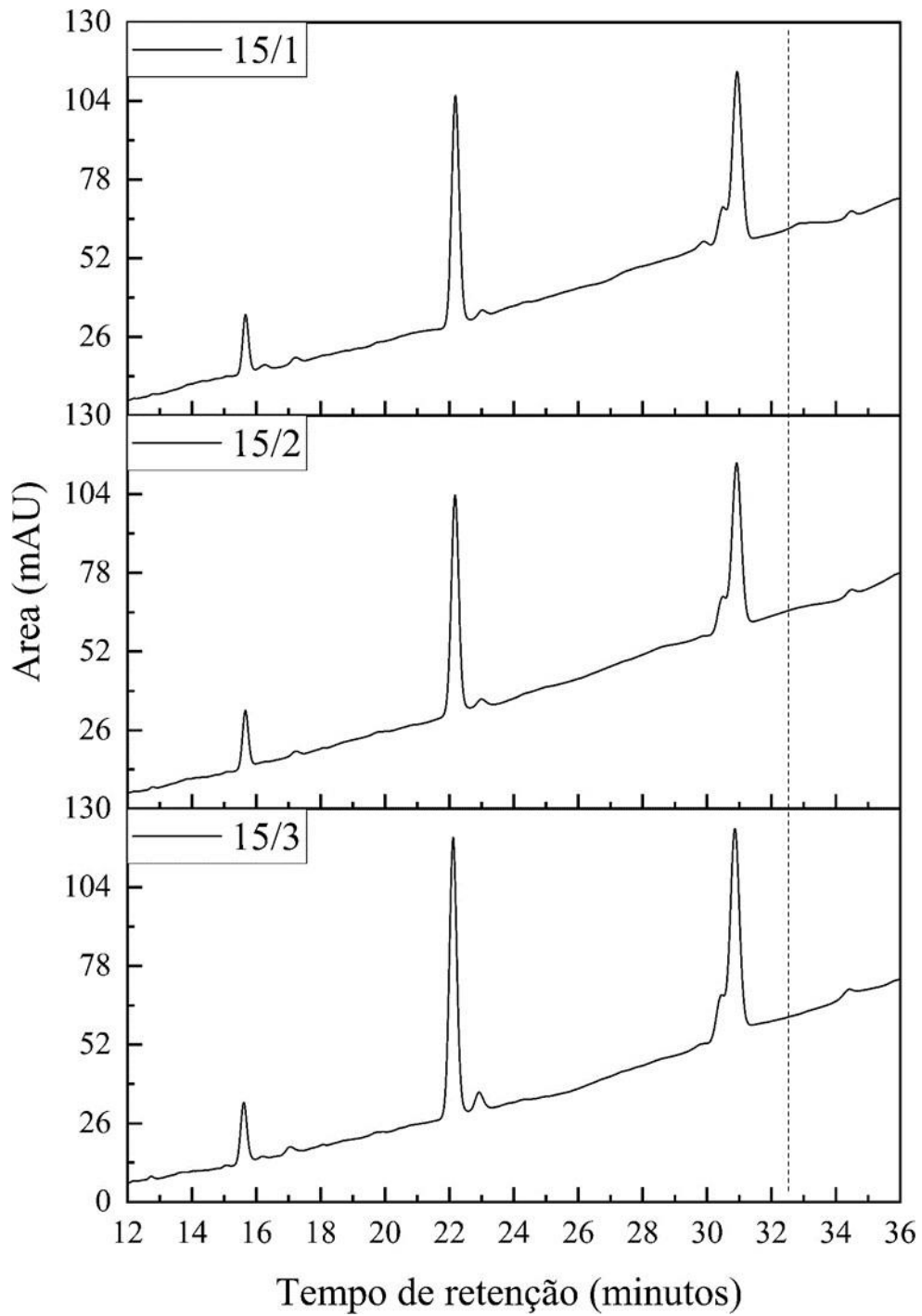


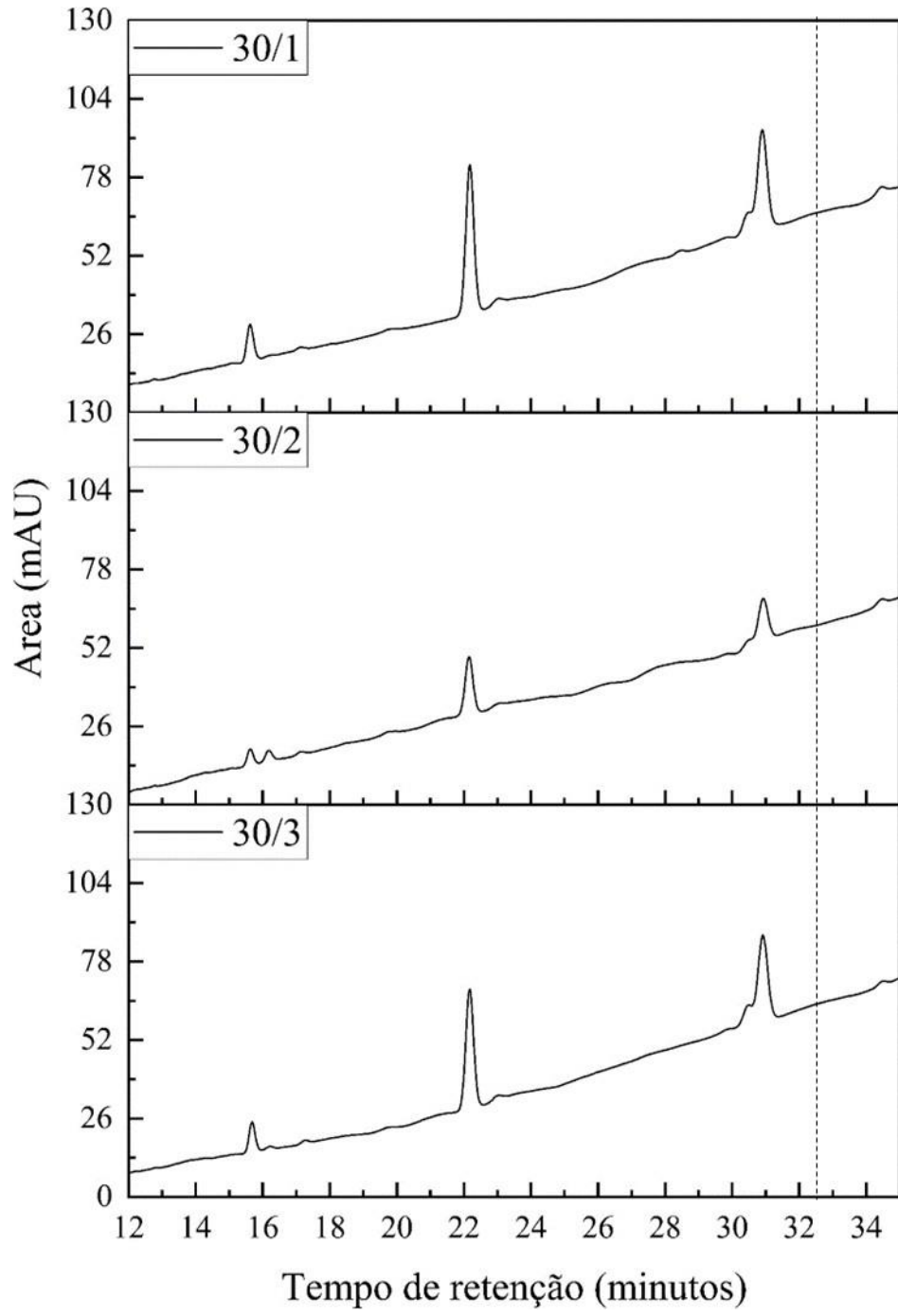


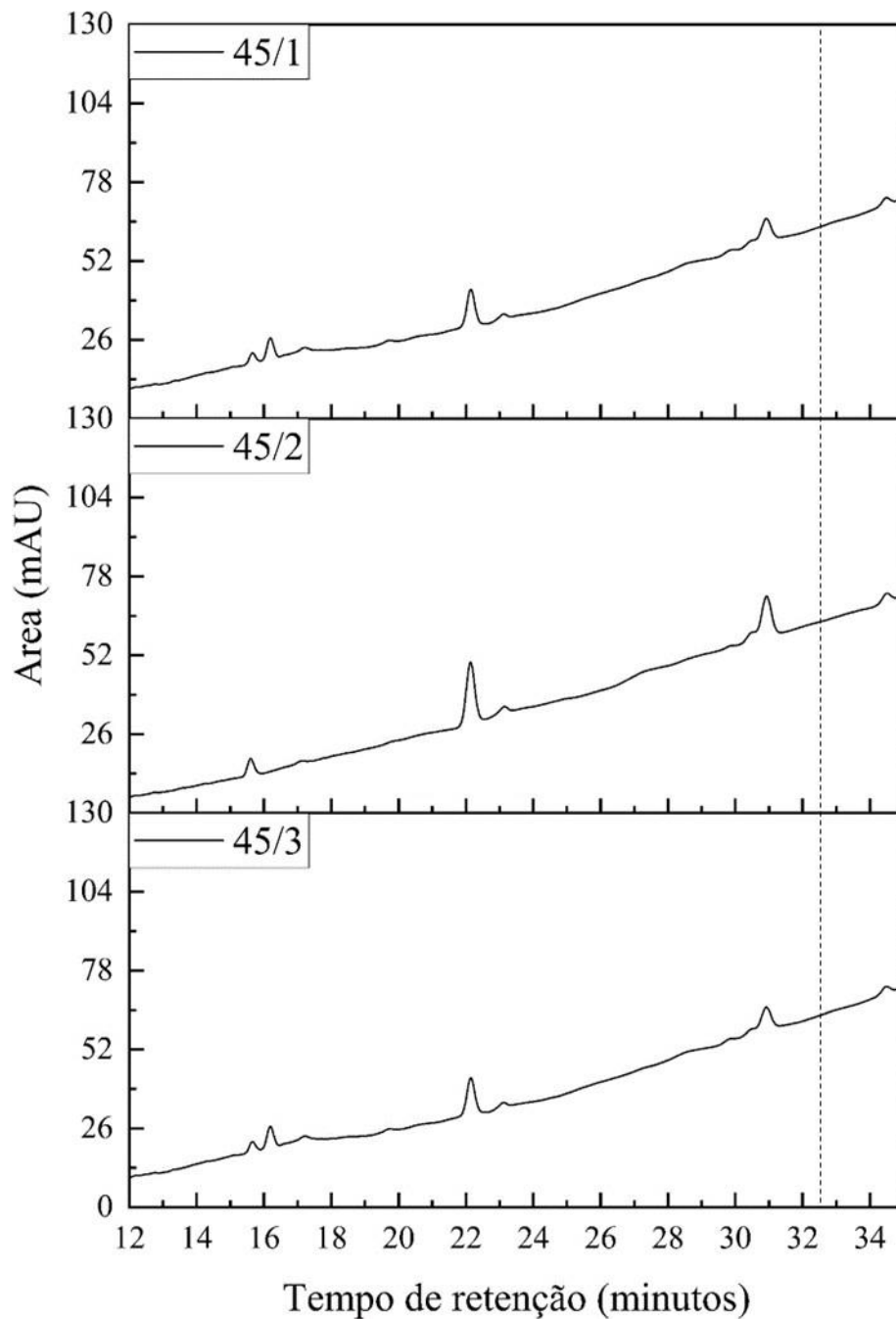


Fonte: O autor (2023).

Figura 15 - Cromatogramas da degradação por fotólise para o pesticida em formulação comercial com lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo, $[MLT]_0 = 500 \mu\text{g L}^{-1}$, SPE 500x; modo gradiente, volume de injeção $50 \mu\text{L}$, vazão $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, comprimento de onda 200 nm .







Fonte: O autor (2023).

Com base nos resultados, após 15 minutos não foi possível identificar o pico referente ao pesticida malathion em ambas as formulações, estando abaixo do LD do método cromatográfico e, portanto, a remoção do composto de pelo menos 99,99% no processo estudado. Entretanto, foi possível verificar a formação de picos ao longo do cromatograma, não presentes no tempo inicial do tratamento.

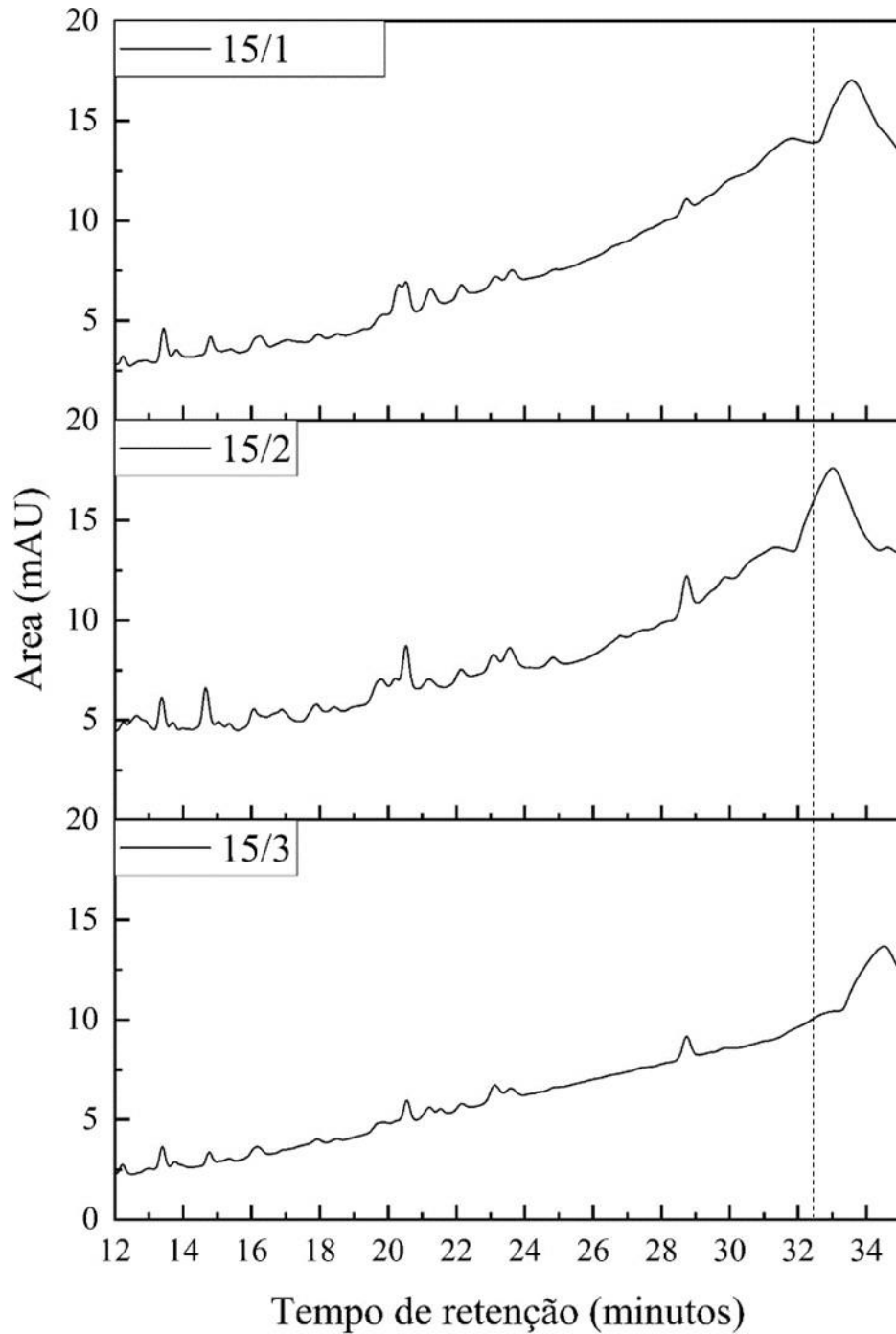
Os espectros de absorção dos subprodutos em 19 e 27 minutos foram iguais para todos os tempos de tratamento. A área dos subprodutos ao longo do processo aumentou, sendo que

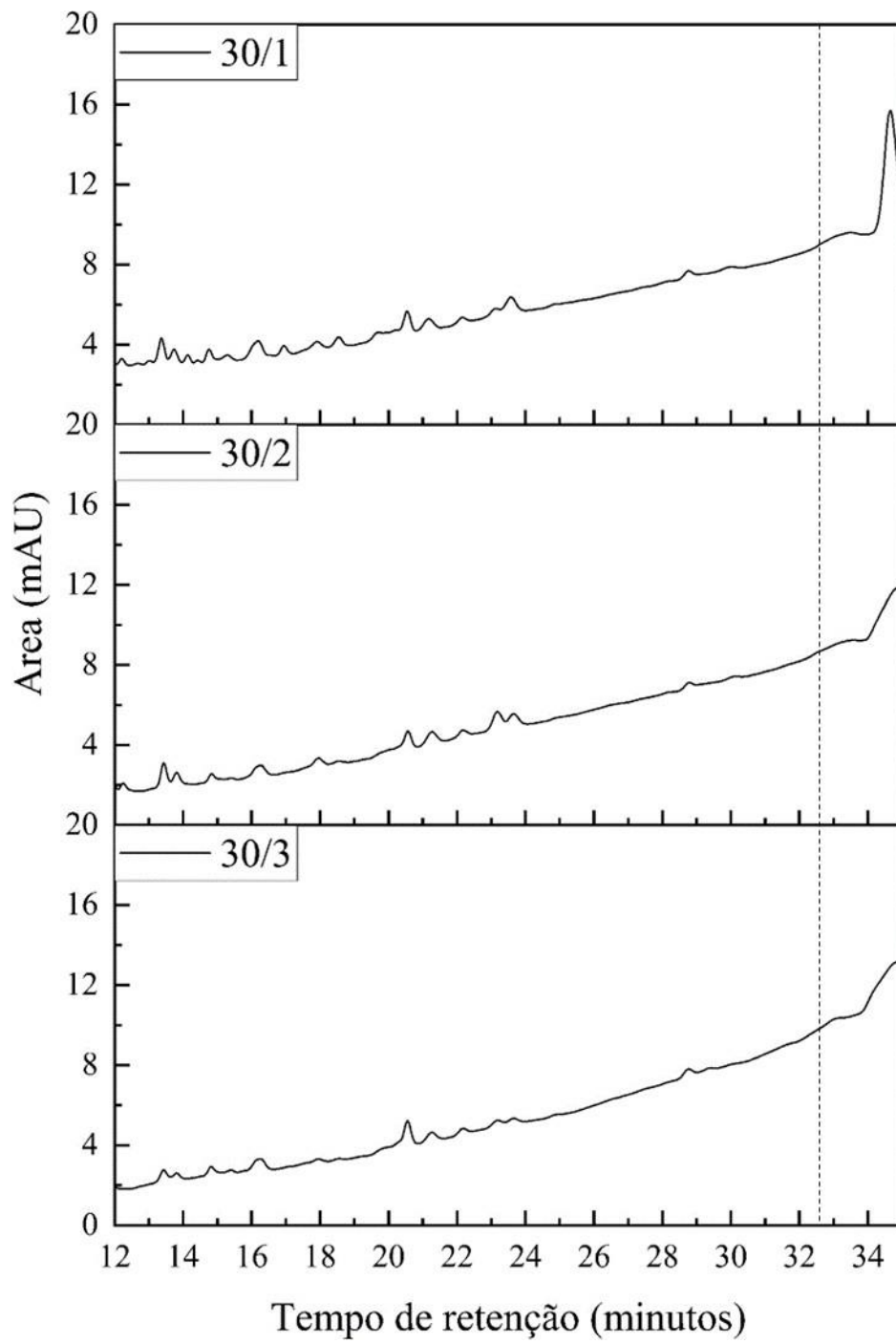
em 15 minutos a área do primeiro subproduto era de 195,2 mAU, subindo para 395,8 mAU em 45 minutos. E o subproduto observado em 27 minutos, a área subiu de 188,2 mAU para 260,2 mAU, corroborando com a diminuição do pico do malathion no tempo inicial para o pesticida padrão.

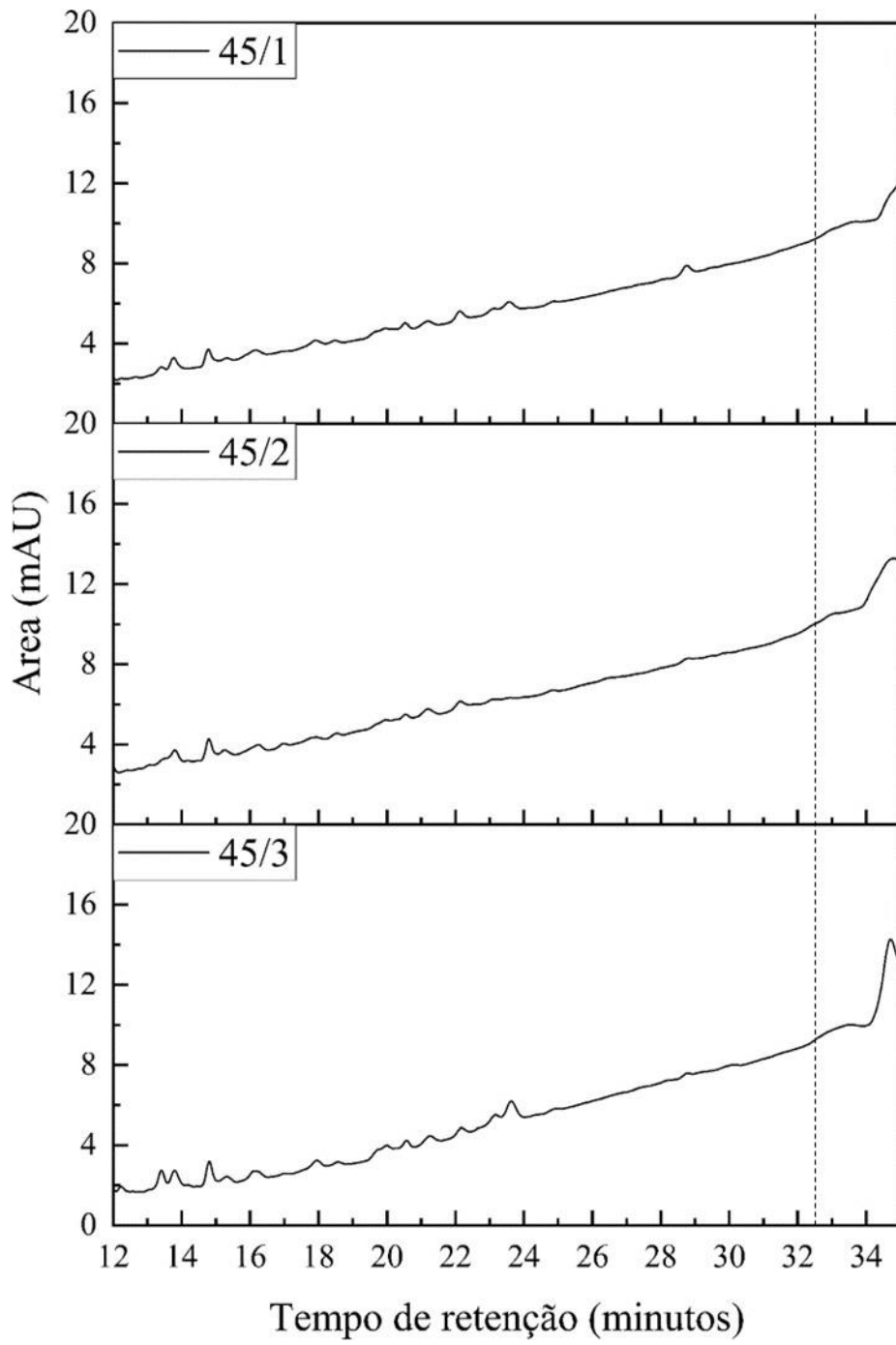
Para a formulação comercial, foi observado a redução do pico do Malathion em 15 minutos com a formação de outros picos em tempos de retenção distintos e a partir de 30 minutos, foi observada a redução das áreas dos subprodutos.

Os resultados para degradação do malathion com processo UV/H₂O₂ são apresentados na Figura 16 e 17. É possível observar que após 15 minutos do processo, não há mais identificação do pico cromatográfico do pesticida padrão, estando abaixo do LD do método, atingindo 99,99% de degradação e diferente da fotólise, nenhum pico cromatográfico foi detectado no processo UV/H₂O₂.

Figura 16 - Cromatogramas da degradação por UV/H₂O₂ (100 mg L⁻¹ H₂O₂) para o malathion padrão com lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo, [MLT]₀ = 500 µg L⁻¹, SPE 500x; modo gradiente, volume de injeção 50 µL, vazão 0,3 mL min⁻¹, comprimento de onda 200 nm.

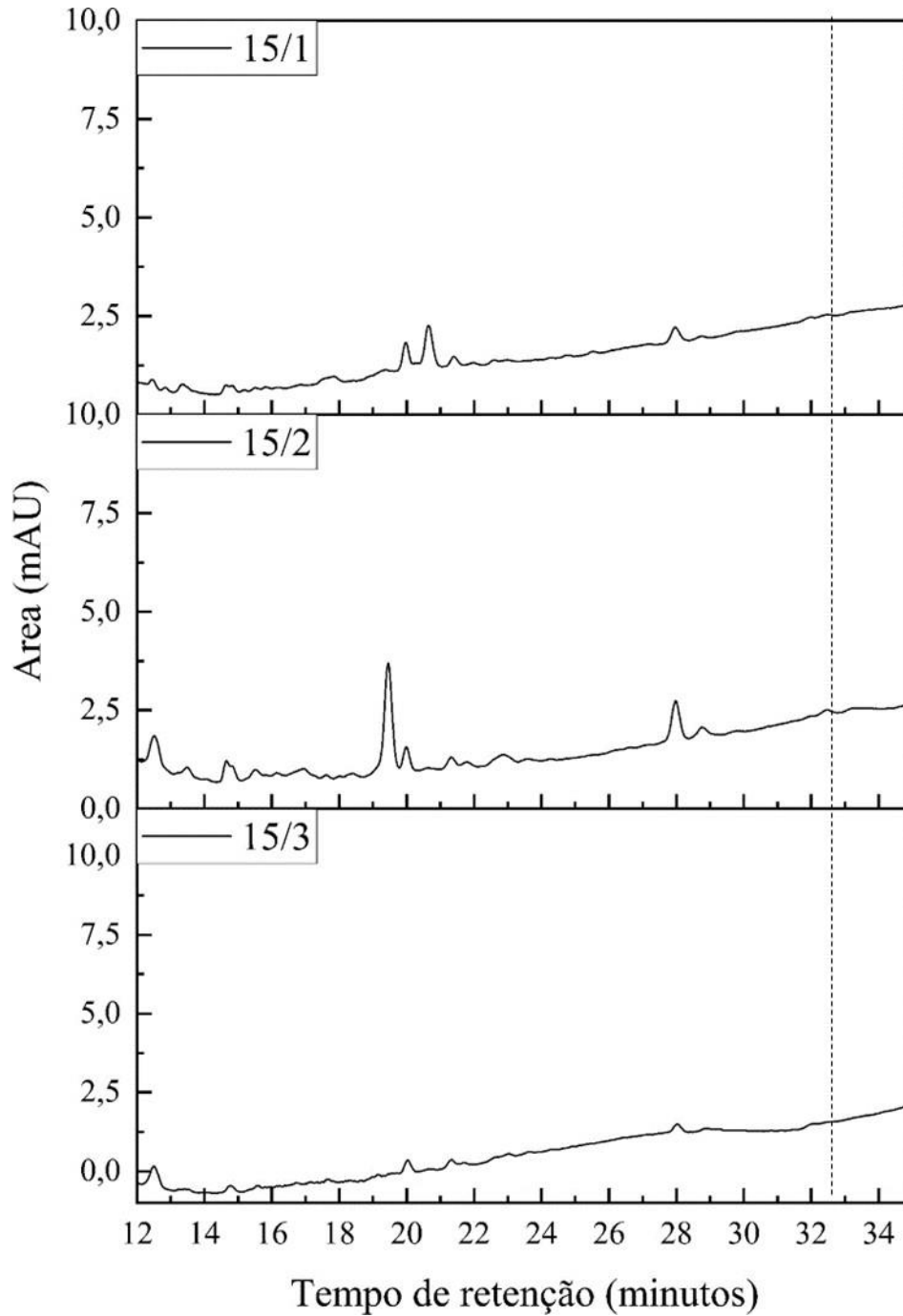


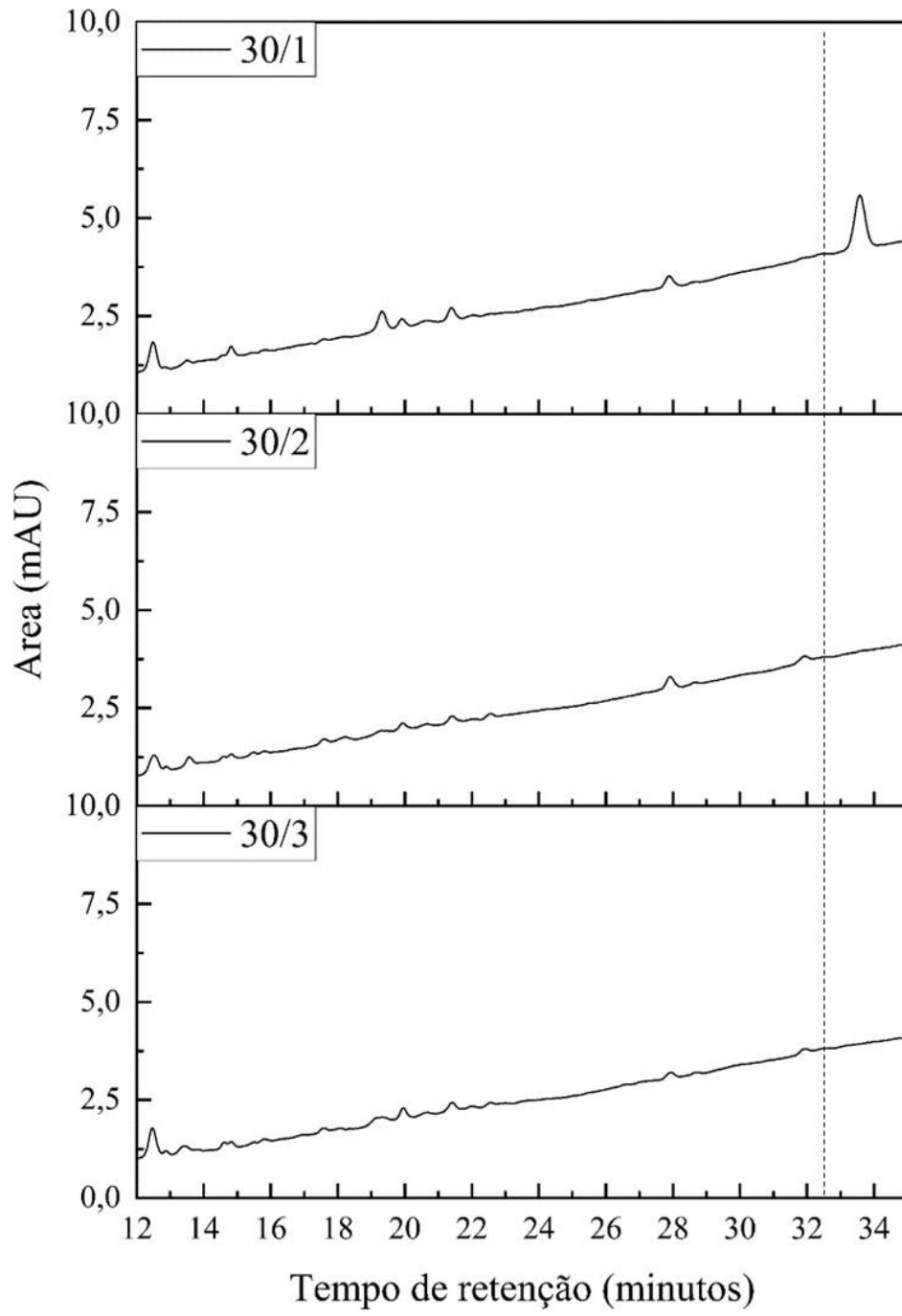


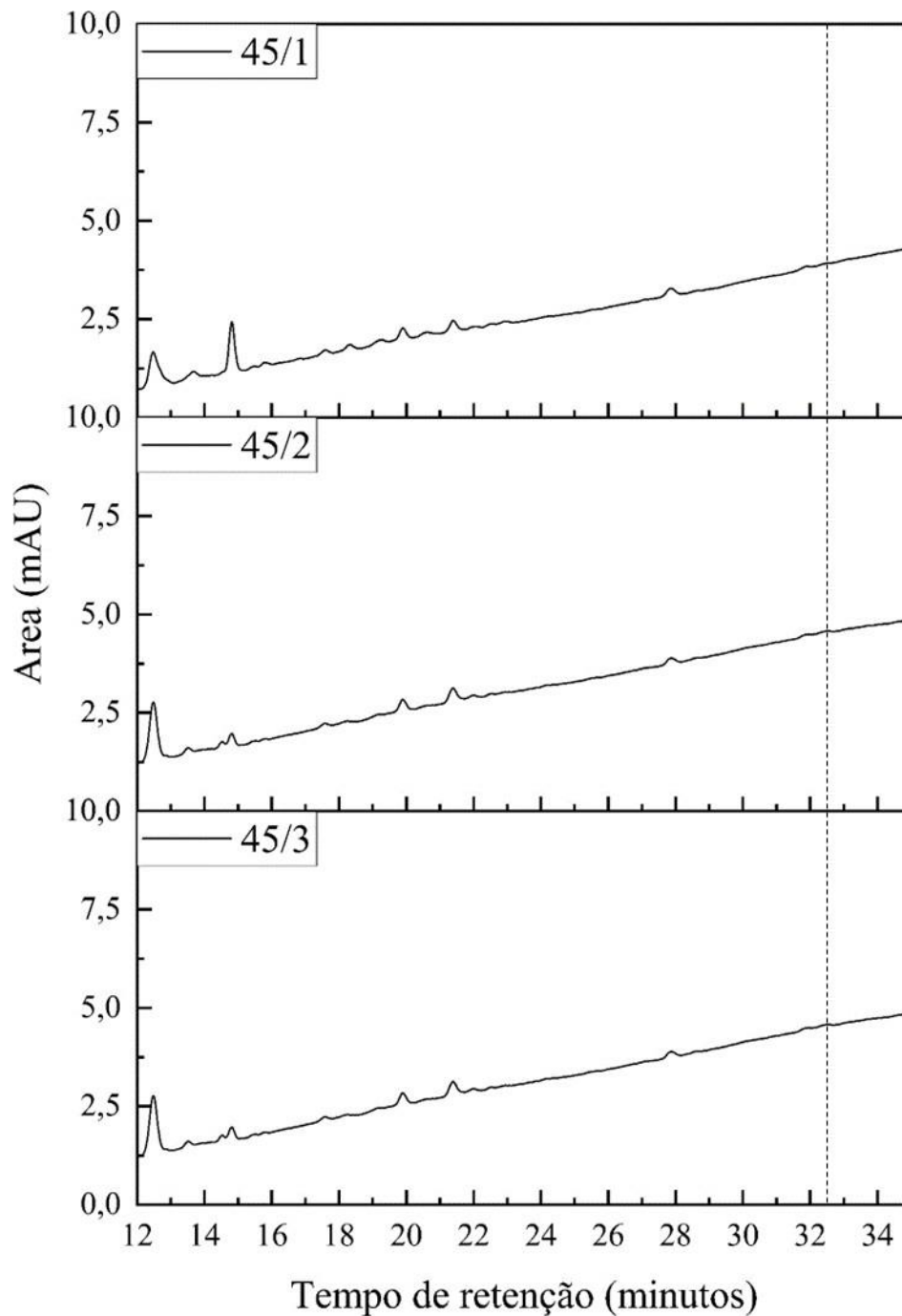


Fonte: O autor (2023).

Figura 17 - Cromatogramas da degradação por UV/H₂O₂ (100 mg L⁻¹ H₂O₂) para o malathion em formulação comercial com lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo, [MLT]₀ = 500 µg L⁻¹, SPE 500x; modo gradiente, volume de injeção 50 µL, vazão 0,3 mL min⁻¹, comprimento de onda 200 nm.







Fonte: O autor (2023).

Kralj et al. (2007) estudou a degradação do malathion e de sua formulação comercial por diferentes processos avançados de oxidação, entre eles a fotólise utilizando uma lâmpada de vapor de mercúrio de 15W e observou que ambas as formulações de malathion ($[MLT] > 10 \text{ mg L}^{-1}$), em 30 minutos a concentração já estava próxima de zero, com a formação de diversos subprodutos ao longo do tempo de tratamento. (KRALJ et al., 2007).

Tony et al. (2017) avaliaram a degradação do malathion em formulação comercial por fotólise (lâmpada de alta pressão de mercúrio 10W, [MLT] = 14ppm), ozonização ($[O_3] = 5 \text{ mg L}^{-1}$) e oxidação química (NaOCl, $Ca(OCl)_2$, MCICA, DCICA e TCICA). Os resultados mostraram que a degradação do malathion levou a formação de subprodutos durante os processos, atingindo níveis de degradação de 68% para fotólise, 96% para ozonização e até 47% para a oxidação química em 12 horas de processo (TONY et al., 2017).

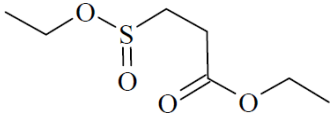
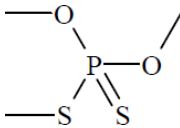
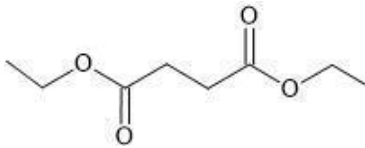
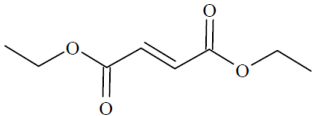
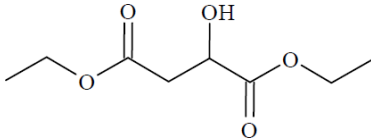
Li et al. (2019) estudaram a degradação e a formação de subprodutos do malathion padrão por processos avançados de oxidação, entre eles a fotólise e o UV/H₂O₂, demonstrando que no segundo processo, a formação de subprodutos no sistema é maior devido, além da presença da radiação ultravioleta, a presença de radicais hidroxilas resultantes de fotólise do peróxido de hidrogênio. Os autores analisaram os subprodutos por UPLC-ESI-MS/MS e verificaram a mesma formação de subprodutos na fotólise e na fotoperoxidação com peróxido de hidrogênio (LI et al., 2019).

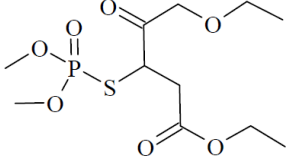
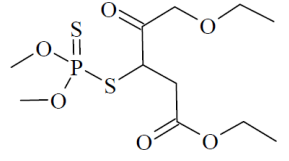
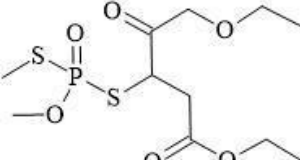
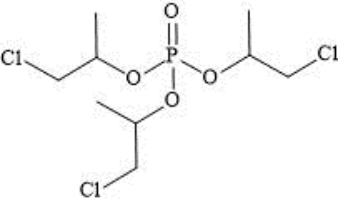
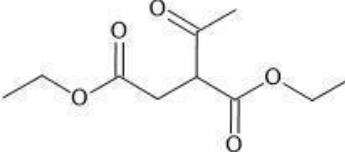
4.5 Determinação dos subprodutos por GC-MS/MS

Para a determinação dos subprodutos do malathion, a concentração inicial nos tratamentos foi de 2 mg L^{-1} .

De acordo com a biblioteca de espectros de massas (NIST), os seguintes compostos foram detectados: 2-butenedioic acid (Z) diethyl ester (P1), O,O,S-trimethyl phosphorodithioate (P2), butanedioic acid diethyl ester (P3), butenedioic acid (E) diethyl ester (P4), hydroxy butanedioic acid diethyl ester (P5), malaoxon (P6), malathion (P7), isomalathion (P8), 1,2-benzenedicarboxylic acid (P9), 2,21-thiodissuccinic acid (P10), 2-propanol, 1-chloro phosphate (3:1) (P11), phthalic acid, ethyl-2-methylbutyl ester (P12), heptadecanoic acid (P13), 1,2-Benzenedicarboxylic acid bis(2-methylheptyl) ester (P14), 1,2-Benzenedicarboxylic acid bis(2-methylpropyl) ester (P15), phthalic acid isobutyl 3-methylbutyl ester (P16), octadecanoic acid (P17), 1,2-Benzenedicarboxylic acid 1,2-dipentyl ester (P18), 1,2-Benzenedicarboxylic acid 1-butyl,2-nonyl ester (P19), bis(2-ethylhexyl) phthalate (P20) e butanedioic acid acetyl diethyl ester (P21). A estrutura, a fórmula molecular, o número CAS, o nome e as quebras podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10 – Subprodutos detectados do malathion padrão e da formulação comercial na fotólise e no processo UV/H₂O₂.

Produto	Estrutura	Fórmula molecular	Número CAS	Probabilidade NIST (%)	Nome	Íons (m/z)/ Abundância
P1 ¹		C ₈ H ₁₂ O ₄	141-05-9	65	2-butenedioic acid (Z) diethyl ester (diethyl maleate)	172 [M ⁺], 127 (50%), 99 (100%)
P2 ^{1,4}		C ₃ H ₉ O ₂ PS ₂	2953-29-9	94,1	O,O,S-trimethyl phosphorodithioate	172 [M ⁺] (97%), 125 (78%), 93 (100%)
P3 ¹		C ₈ H ₁₄ O ₄	123-25-1	65	Butanedioic acid diethyl ester (diethyl succinate)	174 [M ⁺], 129 (75%), 101 (100%)
P4 ^{1,4,5}		C ₈ H ₁₂ O ₄	623-91-6	90	Butenedioic acid (E) diethyl ester (diethyl fumarate)	172 [M ⁺], 127 (100%), 99 (56%)
P5 ¹		C ₈ H ₁₄ O ₅	7554-12-3	94,8	hydroxy diethyl ester (diethyl malate)	190 [M ⁺]; 145 (25%), 117 (100%), 89 (51%), 71 (83%)

P6 ^{1,4}		C ₁₀ H ₁₉ O ₇ PS	1634-78-2	97	Malaoxon	315 [M ⁺] (15%), 268 (27%), 173 (30%), 127 (100%), 99 (43%)
P7 ^{1,4,5}		C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	121-75-5	98,6	Malathion	331 [M ⁺] (16%); 285 (31%), 173 (90%), 127 (100%)
P8 ^{1,2,3}		C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	3344-12-5	84,9	Isomalathion	331 [M ⁺] (3%), 269 (10%), 173 (90%), 127 (100%), 99 (37%)
P9 ^{2,4,5}		C ₉ H ₁₈ Cl ₃ O ₄ P	13674-84-5	78	2-Propanol, 1-chloro-phosphate (3:1)	328 [M ⁺], 125 (99%), 99 (84%)
P10 ³		C ₁₀ H ₁₆ O ₅	1115-30-6	86,8	Butanedioic acid acetyl diethyl ester	217 [M ⁺], 43 (99%), 128 (45%)

Legenda: ¹produtos detectados na fotólise padrão; ²produtos detectados na fotólise da formulação comercial; ³produtos detectados no processo UV/H₂O₂ padrão; ⁴produtos detectados no processo UV/H₂O₂ comercial; ⁵produto detectado na formulação comercial sem degradação.

Fonte: O Autor (2023).

A principal via de decomposição do malathion é iniciada pela quebra da ligação P-S-C, formando o produto P2. A partir disso, ocorre a quebra da ligação S-C e leva a formação dos buteno(e) dietil ésteres substituintes (P1, P3, P4 e P5). O subproduto O,O,S-trimethyl phosphorodithioate (P2) é dado pela irradiação ultravioleta do malathion e pode sofrer isomerização a O,S,S-trimethyl phosphorodithioate. O isomalathion (P8) é relatado como uma impureza do padrão e como isômero do malathion. (KRALJ; TREBŠE; FRANKO, 2007; KRSTIĆ et al., 2008).

O 2-propanol-1-chloro-phosphate (P9) é um retardador de chama e foi detectado apenas na formulação comercial, podendo ser um dos compostos adicionados com a função de aumentar a solubilidade do malathion nesse tipo de produto (WHO, 2004). O butanedioic acid acetyl diethyl ester (P10) é usado como intermediário em reações orgânicas de síntese e em aplicações industriais.

Estudos similares reportaram a degradação do malathion por fotólise e processos oxidativos. Kralj et al (2007) e Kralj, Franko e Tebse (2007) mostraram que os principais compostos formados durante a fotodegradação do malathion pertencem a classe dos but(a)eno dietil ésteres. A isomerização trans-cis do P4 para P1 foi observada na fotólise para ambas as formulações (padrão e comercial), assim como o P5, resultante da hidroxilação análoga do dietil ácido butenedióico éster pela adição do radical hidróxi na dupla ligação. O composto P3 foi encontrado apenas na degradação do malaoxon padrão, sugerindo que esses subprodutos derivados do produto principal também são degradados e formam novos produtos (KRALJ et al., 2007; KRALJ; FRANKO; TREBŠE, 2007).

Tony et al (2017) avaliou a degradação do malathion por processos oxidativos avançados e oxidação química, e analisou a formação de subprodutos por GC-MS/MS. Três subprodutos principais foram identificados: dimethyl hydrogen phosphate, diethyl succinate (P3) e malaoxon (P6), corroborando com os resultados nesse artigo (TONY et al., 2017).

Além disso, Vasseghian et al. (2022) também avaliou a formação de subprodutos do malathion por processos oxidativos avançados, atingindo mais de 98% de degradação do composto e reportou a presença de 5 compostos de degradação: D-malate, ethyl 2-hydroxysuccinate, diethyl malate, diethyl maleate (P1) e malaoxon (P6), sendo os últimos dois também encontrados nesse artigo (VASSEGHIAN et al., 2022b).

4.6 Ecotoxicidade com diferentes organismos

Devido à solubilidade do malathion em solvente orgânico, a solução estoque foi preparada em acetona. Desta forma, levantou-se a questão da toxicidade frente aos organismos estudados nesse trabalho.

Lima (2017) avaliou a toxicidade de solventes orgânicos, entre eles a acetona, em solução aquosa por fotólise e processo UV/H₂O₂ na concentração de 0,2%, de forma que o resultado se mostrou não tóxico para os organismos testados nessa concentração acima da utilizada após as diluições para a degradação, que foi de 0,005% e, portanto, sugere-se que os resultados não sejam afetados pelo solvente (LIMA, 2017; OECD, 2012).

4.6.1 Atividade larvicida em *Stegomyia aegypti*

Os resultados dos testes realizados para atividade larvicida utilizando larvas de *Stegomyia aegypti* (cepa Rockefeller) para as amostras pesticida padrão e na formulação comercial para a fotólise e para o processo UV/H₂O₂ são apresentados na Tabela 11 e 12.

Tabela 11 – Atividade larvicida com larvas de *Stegomyia aegypti* (cepa Rockefeller) para a fotólise amostras pesticida padrão e pesticida na formulação comercial; [MLT]₀=500 µg L⁻¹; lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo.

Replicata	Controle	Padrão				Formulação comercial			
	negativo	0 min	15 min	30 min	45 min	0 min	15 min	30 min	45 min
1	0	20	0	3	0	20	1	0	0
2	0	20	0	0	0	20	1	0	0
3	0	20	0	0	0	20	2	0	0
Média	0	20	0	1	0	20	1,3	0	0
Mortalidade (%)	0	100	0	3	0	100	5	0	0

Fonte: O autor (2023).

Tabela 12 - Atividade larvicida com larvas de *Stegomyia aegypti* (cepa Rockefeller) para o processo UV/H₂O₂ nas amostras pesticida padrão e pesticida na formulação comercial; [MLT]₀=500 µg L⁻¹; [H₂O₂]=100 mg L⁻¹; lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo.

Replicata	Controle	Padrão				Formulação comercial			
	negativo	0 min	15 min	30 min	45 min	0 min	15 min	30 min	45 min
1	0	20	0	0	0	20	0	0	0
2	0	20	0	0	0	20	0	0	0
3	0	20	0	0	0	20	0	0	0
Média	0	20	0	0	0	20	0	0	0
Mortalidade (%)	0	100	0	0	0	100	0	0	0

Fonte: O autor (2023).

De acordo com os resultados apresentados, para ambos os tratamentos, apenas no tempo inicial foi registrado mortalidade, o que já era esperado dada a característica do composto. Entre todas as amostras, a partir da análise estatística pelo teste de Fisher (LSD), as amostras demonstraram diferença significativa apenas em relação ao tempo inicial para ambas as formulações.

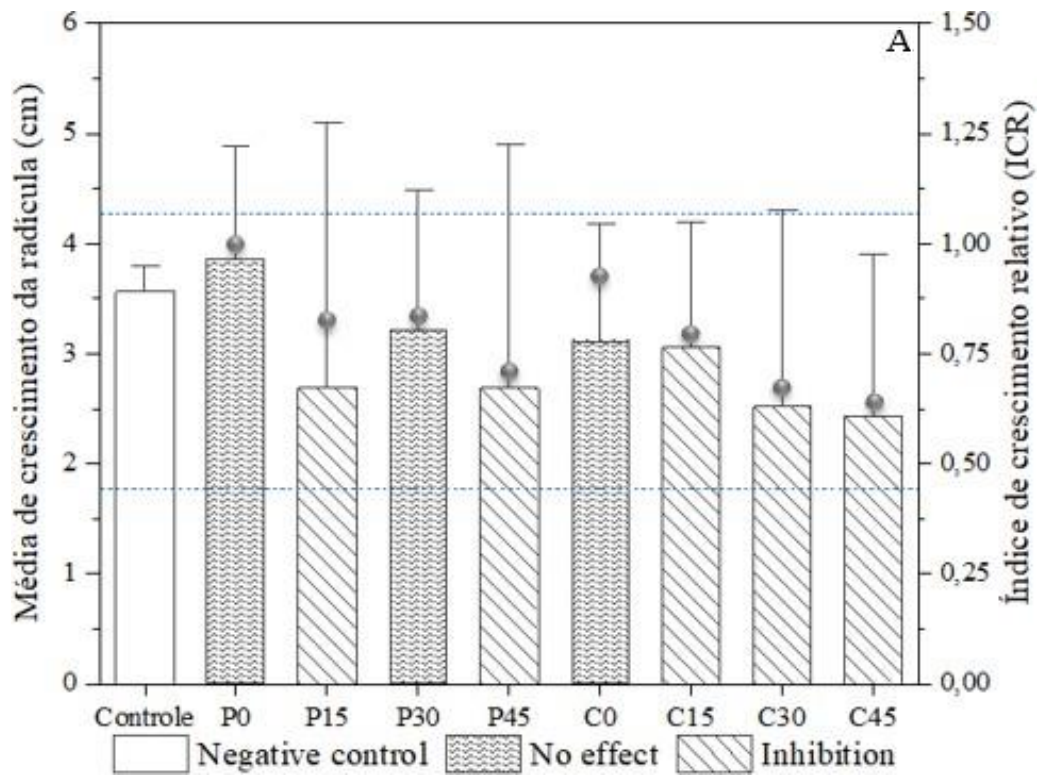
Adams et al. (2018) avaliou a degradação do malathion em formulação comercial por fotólise e processo UV/H₂O₂ e determinou a EC₅₀ do composto. Para larvas do *Stegomyia aegypti*, esse valor foi de 0,4 µg L⁻¹, corroborando com os resultados de mortalidade encontrados, pois a concentração inicial do tratamento foi 1250 vezes maior e ao final do tratamento, a concentração do pesticida não foi detectada, estando abaixo do LD (<0,11 µg L⁻¹) (ADAMS et al., 2018).

4.6.2 Fitotoxicidade com *Lactuca sativa*

Os resultados obtidos para os ensaios de fitotoxicidade utilizando sementes de *Lactuca sativa* para a fotólise e para o processo UV/H₂O₂ em amostras de pesticida padrão e pesticida na formulação comercial podem ser observados na Figura 18 e 19, respectivamente.

Os resultados para os testes com semente apresentaram valores de coeficiente de variação inferiores a 30% para todas as amostras, de acordo com o determinado por Sobrero e Ronco (2004). O controle positivo com solução de 3% de glifosato comercial apresentou índice de germinação acima de 90%, confirmando a sensibilidade das sementes frente ao herbicida (SOBRERO; RONCO, 2004).

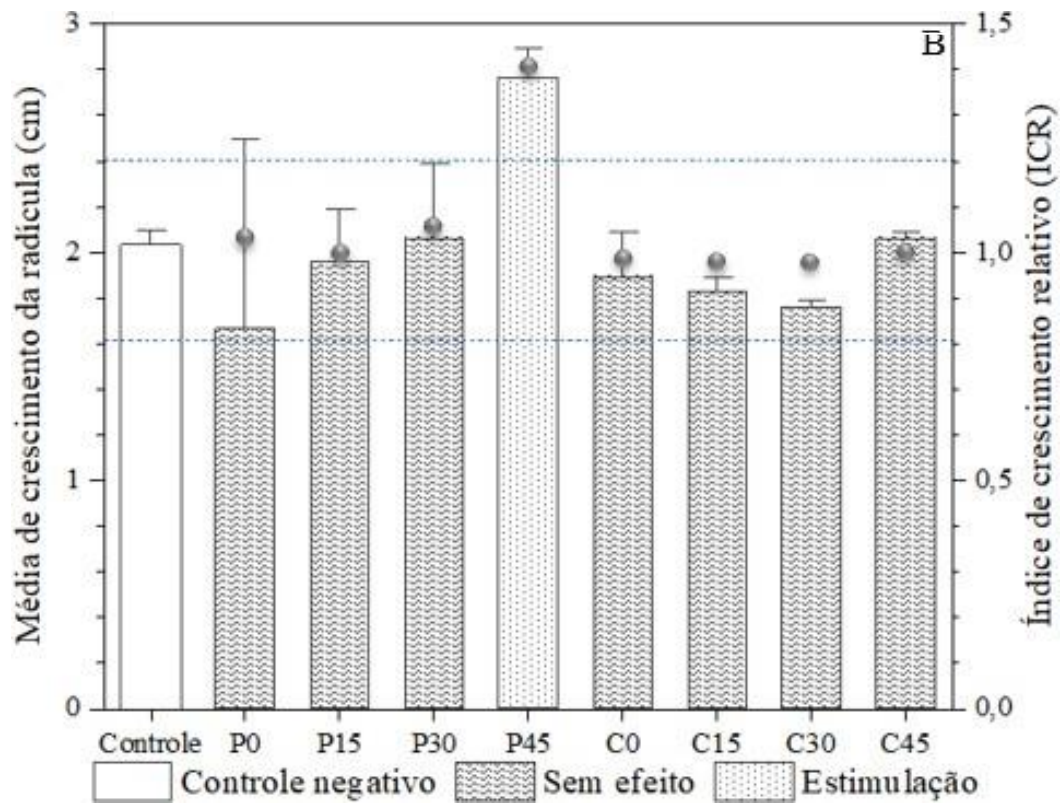
Figura 18 - Fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa* para a fotólise nas amostras pesticida padrão e pesticida na formulação comercial; $[MLT]_0=500 \mu\text{g L}^{-1}$; lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo.



Fonte: O autor (2023).

Para a fotólise, as amostras nos tempos iniciais mostram diferença significativa em relação ao controle ($\alpha = 0.05$; $p\text{-valor} < 0.05$). Em relação as amostras, em ambos os processos e com exceção da amostra em 30 minutos, foram observadas a inibição do crescimento da radícula, comprovado pelo teste de variância aliado ao teste de Dunnet que apresentou $p\text{-valor}$ menor que 0,05. Nota-se também que apesar da degradação do pesticida ter atingido níveis acima de 99,9% em ambos os processos, a toxicidade não deve estar relacionada somente a molécula original, podendo ser atribuída a formação de subprodutos tóxicos no meio reacional.

Figura 19 - Fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa* para o processo UV/H₂O₂ nas amostras pesticida padrão e pesticida na formulação comercial; [MLT]₀=500 µg L⁻¹; [H₂O₂]₀=100 mg L⁻¹; lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio 125W submersa com bulbo protetor de quartzo.



Fonte: O autor (2023).

Para o processo UV/H₂O₂, a maioria das amostras não demonstrou efeito significativo no crescimento da radícula, apenas em 45 minutos para o padrão, foi observado a estimulação do crescimento e a análise estatística apresentou diferença significativa apenas para essa amostra em relação ao controle ($\alpha = 0.05$; p-valor < 0.05).

Adams et al. (2018) avaliou a degradação do malathion em sua formulação comercial por fotólise e processo UV/H₂O₂ através de dois organismos, *Stegomyia aegypti* e *Lactuca sativa*, observando valores de EC₅₀ de 0,4 e 550 µg L⁻¹, respectivamente. Para as amostras submetidas ao teste com semente, os resultados mostraram inibição em todos os tempos analisados e em ambos os processos, condizentes com os resultados alcançados nesse trabalho (ADAMS et al., 2018).

4.6.3 Efeito subletal no crescimento e desenvolvimento de larvas de *Stegomyia aegypti*

Em 15 minutos de tratamento para ambos os processos e formulações, não foi observada mortalidade nos organismos. Porém, alterações na mobilidade e no nado foram

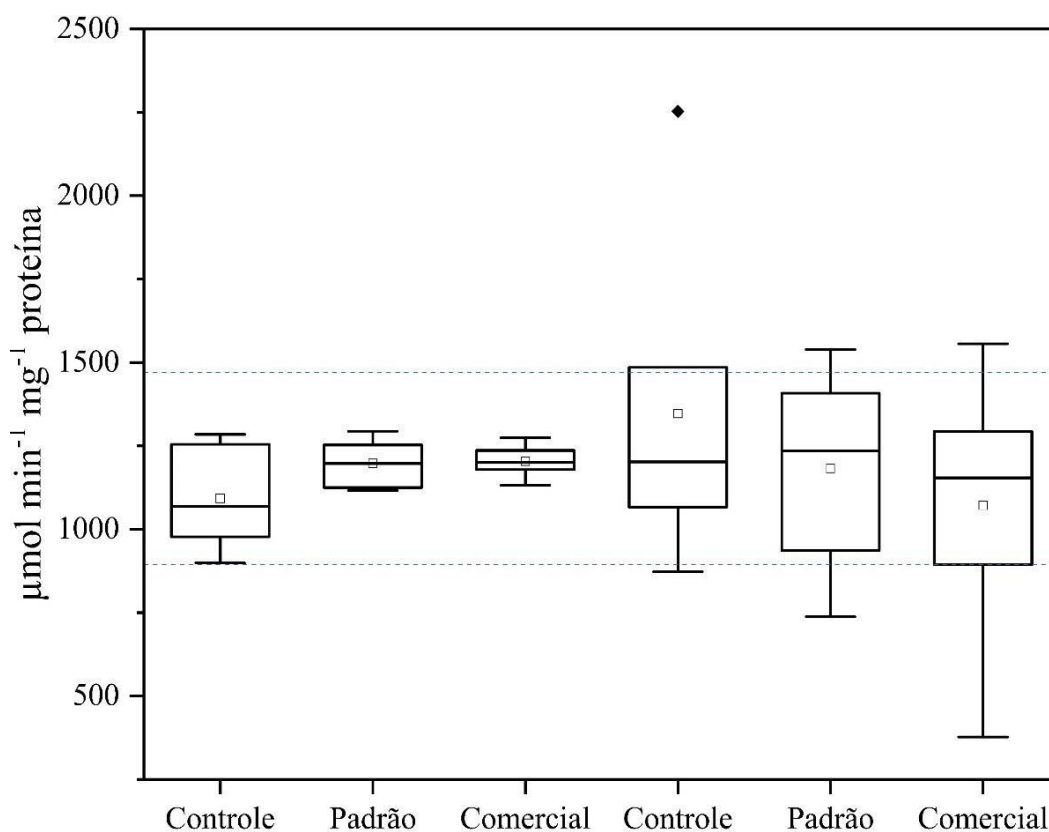
registradas. Em 30 e 45 minutos, os organismos apresentaram comportamento normal quando comparados ao controle.

Devido a isso, um ensaio com maior tempo de exposição dos organismos (da fase larval até emergência dos mosquitos) foi realizado com a função de avaliar se, apesar da degradação do malathion ter sido atingida e determinada por cromatografia em 15 minutos de processo, a concentração restante abaixo do limite de detecção do método e a presença de subprodutos poderiam afetar o perfil enzimático dos organismos.

4.6.3.1 Acetilcolinesterase

Os resultados para a atividade de acetilcolinesterase são mostrados na Figura 20, para a fotólise e processo UV/H₂O₂ para ambas as formulações em 15 minutos de tratamento.

Figura 20 – Atividade da acetilcolinesterase em mosquitos de *Stegomyia aegypti* para a fotólise e processo UV/H₂O₂ em 15 minutos de tratamento.



Fonte: O autor (2023).

Com base nos resultados apresentados para a acetilcolinesterase, a atividade enzimática mostrou inibição para os organismo expostos em todos os processos. Para a fotólise,

a inibição variou entre 12,2% para o padrão e 20,4% para a formulação comercial. Já para o processo UV/H₂O₂, a inibição foi de 9,6% para padrão e 10,2% para a formulação comercial.

Krstic et al (2008) estudou a degradação do malathion por fotólise usando uma lâmpada de xenônio de 125W, em diferentes tempos até 120 minutos e avaliou a toxicidade da solução pela enzima acetilcolinesterase. Para os subprodutos encontrados, como malaoxon (P6) e isomalathion (P8), um efeito aditivo foi observado em concentrações menores (66 a 150 µg L⁻¹) com um efeito antagonista para concentrações mais altas. Para os outros subprodutos, O,O,S-trimethyl ester (P2) e O,O-S,dimehtyl thiophosphate, a atividade enzimática não foi inibida, porém, para o diethyl maleate (P1), a inibição foi notada apenas em concentrações acima de 1700000 µg L⁻¹. Em conclusão, a inibição enzimática aumentou conforme aumentava a porcentagem de degradação do malathion e conseqüentemente, a formação de subprodutos em solução (KRSTIĆ et al., 2008) .

Li et al (2019) investigou a formação de subprodutos do malathion por fotólise e processos avançados de oxidação e indicou que após o tratamento, foi notado um rápido aumento na inibição da AchE, porém, não foi observada mudança na toxicidade do malathion quando tratado apenas por fotólise, indicando que apesar da alta taxa de remoção do pesticida, isso não significa que a completa detoxificação da amostra foi atingida, podendo aumentar significativamente dependendo do processo aplicado (LI et al., 2019).

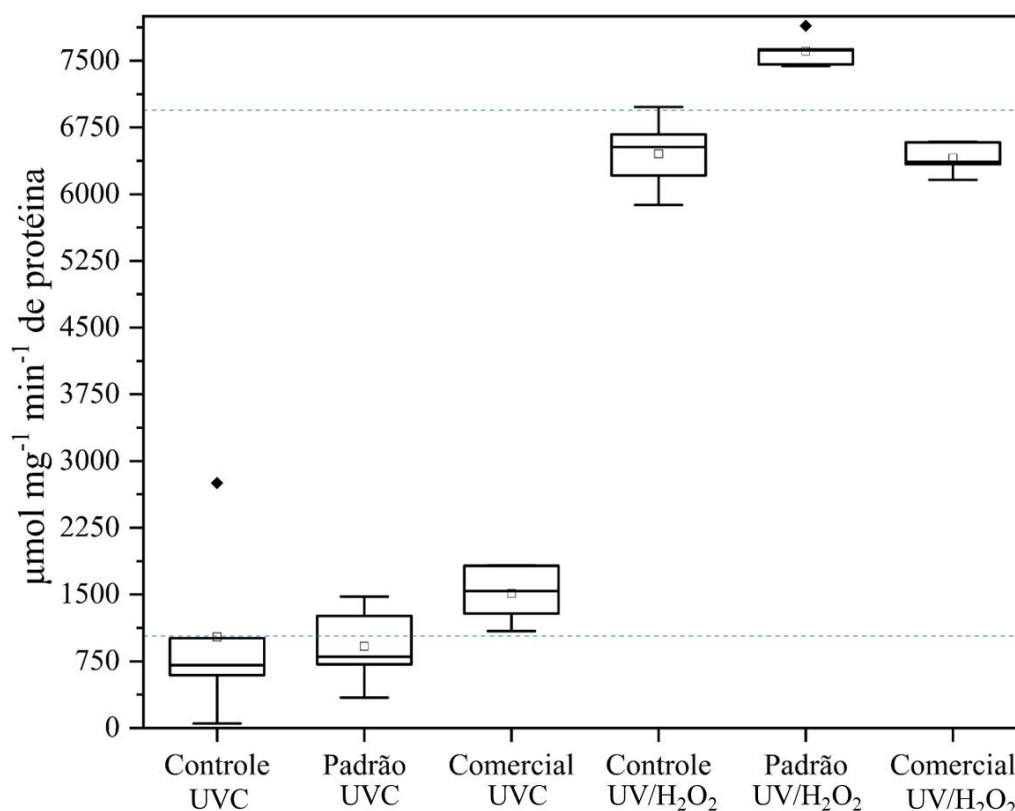
Li et al (2020) estudou a degradação do malathion por cloração e hidrólise alcalina, avaliando a toxicidade remanescente pela enzima AchE. Os resultados mostraram que na cloração, apesar de mais de 90% de degradação do pesticida ter sido atingida, a toxicidade a solução aumentou consideravelmente rápido, sendo atribuída a formação do malaoxon. Subseqüentemente, foi aplicado o processo de hidrólise alcalina na solução restante, não tendo alteração na toxicidade em 10 minutos de tratamento, porém, após 20 minutos, a inibição atingiu níveis próximos a zero, mesmo com a formação de novos subprodutos, que não interferem na acetilcolinesterase, indicando a completa detoxificação da amostra (LI et al., 2020).

Vasseghian et al (2022) avaliou a eficiência de degradação do malathion por processos Fenton e determinou a toxicidade dos subprodutos em solução. Para a enzima AchE, a inibição aumentou conforme a taxa de degradação do composto aumentou, sendo a toxicidade atribuída aos principais subprodutos formados como: malaoxon, diethyl malate, diethyl maleate, também encontrados nesse estudo para os processos avaliados (VASSEGHIAN et al., 2022a).

4.6.3.2 Biotransformação

Os resultados para a atividade da glutathione S-transferase são mostrados na Figura 21, para a fotólise e processo UV/H₂O₂ para ambas as formulações em 15 minutos de tratamento.

Figura 21 - Atividade da glutathione S-transferase em mosquitos de *Stegomyia aegypti* para a fotólise e processo UV/H₂O₂ em 15 minutos de tratamento.



Fonte: O autor (2023).

Com base na Figura 21, a atividade enzimática da glutathione S-transferase, para a fotólise, houve uma diminuição de 10,1% para o padrão e aumento de 47,8% para a formulação comercial. Já para o processo UV/H₂O₂, houve um aumento de 15,23% para o padrão e não foram observadas alterações para a formulação comercial.

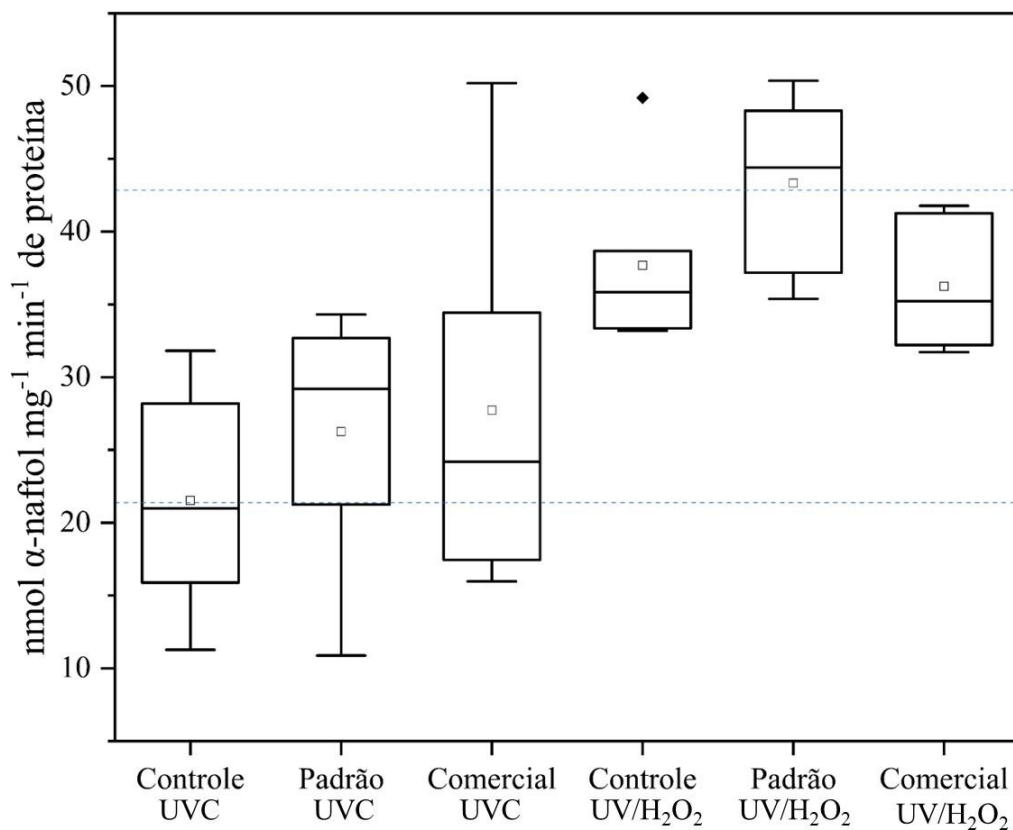
O aumento da atividade da enzima indica a presença de contaminantes que afetam o organismo e que, portanto, as enzimas ativam a glutathione para que seja transferida para o componente tóxico, deixando a glutathione livre no ambiente e na leitura há um aumento no valor da enzima. Já a diminuição, pode indicar que não há componentes tóxicos que precisem ser combatidos e, portanto, a glutathione não é envolvida (ADHIKARI; KHANIKOR, 2021).

Portanto, na fotólise, uma diminuição para o pesticida padrão e aumento para a formulação comercial foi observada, assim como para o processo UV/H₂O₂ em que houve um aumento da atividade da enzima e para a formulação comercial, não foram registradas

mudanças. O aumento da atividade dessa enzima pode indicar a presença de contaminantes que afetam o metabolismo e dessa forma, o GSH é liberado para ligar com o composto, deixando GST livre. Já a diminuição ou não mudança na atividade, indica que não há compostos que precisem ser transformados e dessa forma, a glutathione não é envolvida.

Os resultados para a atividade da esterase alfa são mostrados na Figura 22, para a fotólise e processo UV/H₂O₂ para ambas as formulações em 15 minutos de tratamento.

Figura 22 - Atividade da esterase alfa em mosquitos de *Stegomyia aegypti* para a fotólise e processo UV/H₂O₂ em 15 minutos de tratamento.

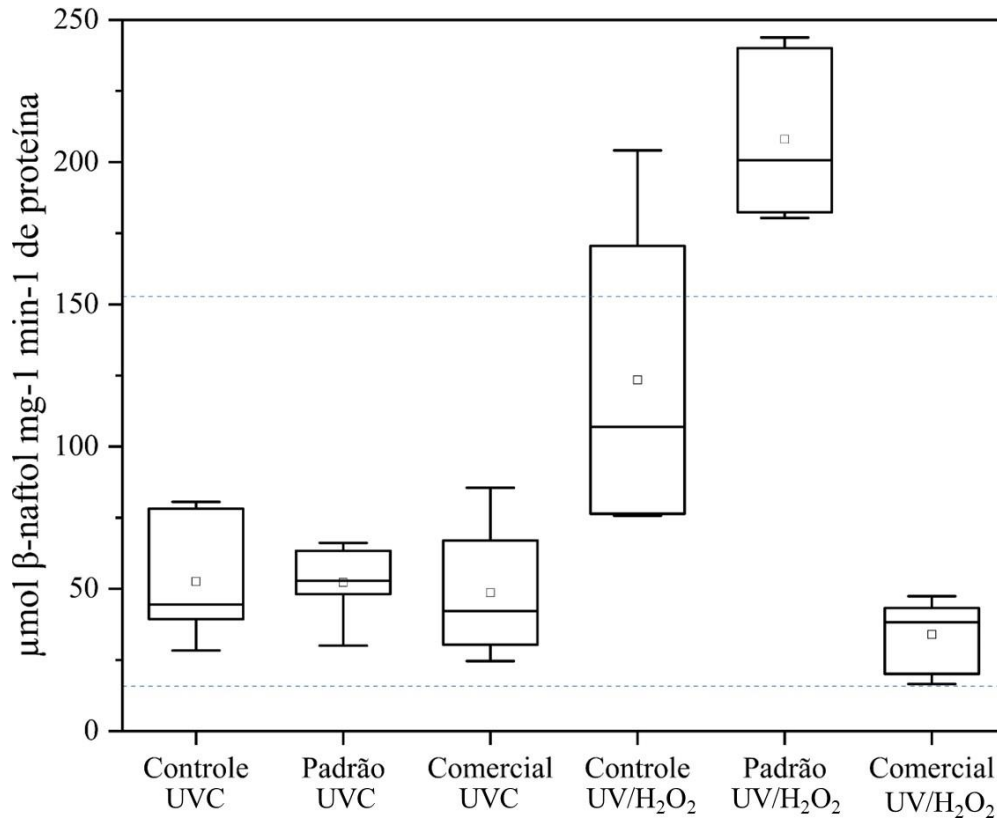


Fonte: O autor (2023).

Com base nos resultados apresentados na Figura 22, a atividade enzimática da esterase alfa para a fotólise não foi afetada por nenhum das formulações. Já para o processo UV/H₂O₂, houve uma leve diminuição de para 4,3 % o padrão e aumento de 11,5% para a formulação comercial. Os resultados para esterase alfa corroboram com a literatura, já que é indicado que essa enzima não é afetada por organofosforados e inibidores de acilação, e são hidrolisados a ésteres não carregados (SINGH; KAUR; SINGH, 2014).

Os resultados para a atividade da esterase beta são mostrados na Figura 23, para a fotólise e processo UV/H₂O₂ para ambas as formulações em 15 minutos de tratamento.

Figura 23 - Atividade da esterase beta em mosquitos de *Stegomyia aegypti* para a fotólise e processo UV/H₂O₂ em 15 minutos de tratamento.



Fonte: O autor (2023).

Com base nos resultados apresentados na Figura 23, a atividade enzimática da esterase beta, para a fotólise houve uma diminuição de 12,9% para o padrão e 4,3% para a formulação comercial. Já para o processo UV/H₂O₂, houve um aumento de 68,5% para o padrão e diminuição de 73,6% para a formulação comercial.

Essa enzima é afetada pela presença de organofosforados no meio e sua atividade é dependente da concentração do composto tóxico presente. Alterações na atividade da esterase beta pode minimizar os efeitos do tóxico na acetilcolinesterase, aumentando as chances de sobrevivência do organismo (SINGH; KAUR; SINGH, 2014).

Rebecchi et al (2014) avaliou a exposição crônica e aguda em larvas de *Chironomus sancticarloi* em concentrações baixas (0,3 a 4,5 μg L⁻¹) de malathion pela análise dos biomarcadores bioquímicos AchE, EST-α e EST-β. Para a exposição aguda, houve uma diminuição da atividade das enzimas, assim como para a exposição crônica chegando a níveis de inibição de até 28%, indicando que o malathion pode afetar o metabolismo em baixas concentrações (REBECHI et al., 2014). Porém, um efeito dependente da concentração do organofosforado foi relacionado, de forma que a inibição das esterases no organismo pode

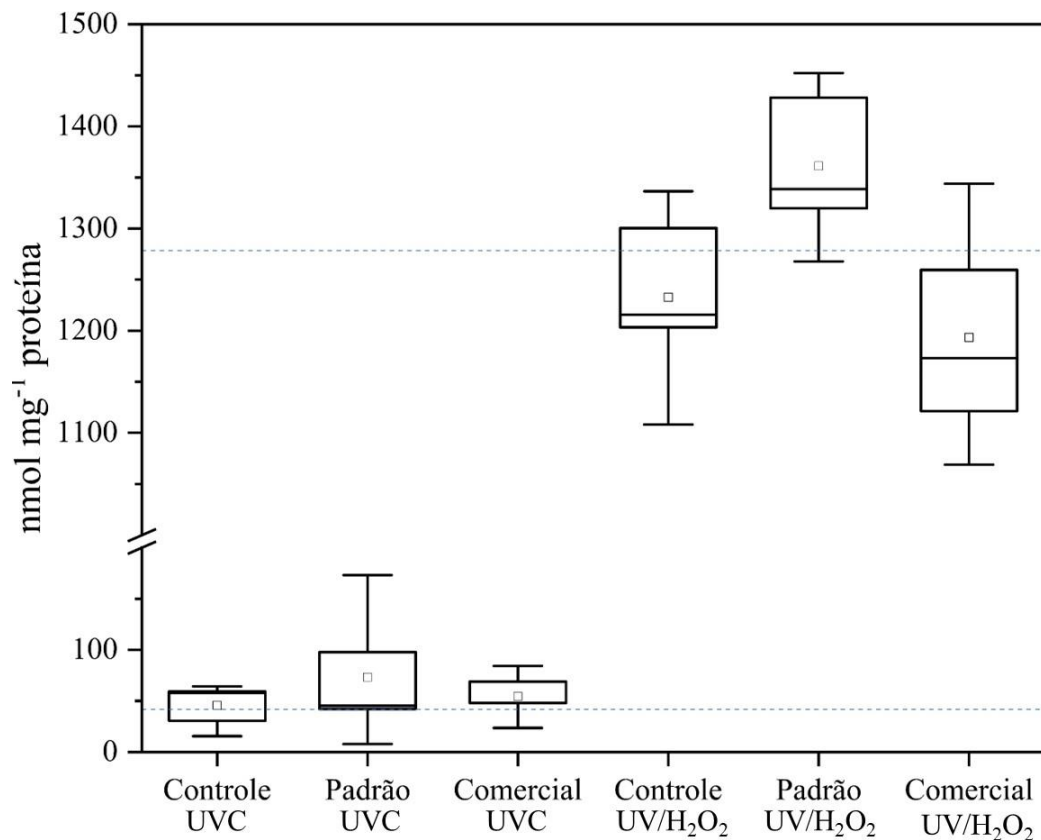
minimizar o efeito do inseticida no sítio ativo da acetilcolinesterase, fazendo com que as chances de sobrevivência do organismo aumentem (RAKOTONDRAVELO et al., 2006).

Wu et al (2011) estudou os efeitos do malathion e do clorpirifos, dois organofosforados, na atividade de AChE, EST- α e EST- β e antioxidantes após a aplicação tópica em diferentes concentrações para *Oxya chinensis*. Os resultados mostraram alteração para todas as enzimas avaliadas para os dois compostos. Para as esterases, foi observada a inibição de até 54% em relação ao controle para o malathion. Para a GST, a atividade enzimática atingiu 78% de aumento em relação ao controle, sugerindo que para concentrações baixas do composto, a GST é capaz de desintoxicar o organismo e em concentrações maiores não, diminuindo sua atividade (WU et al., 2011).

4.6.3.3 Estresse oxidativo

Os resultados para a atividade da peroxidação lipídica são mostrados na Figura 24, para a fotólise e processo UV/H₂O₂ para ambas as formulações em 15 minutos de tratamento.

Figura 24 - Atividade da peroxidação lipídica em mosquitos de *Stegomyia aegypti* para a fotólise e processo UV/H₂O₂ em 15 minutos de tratamento.



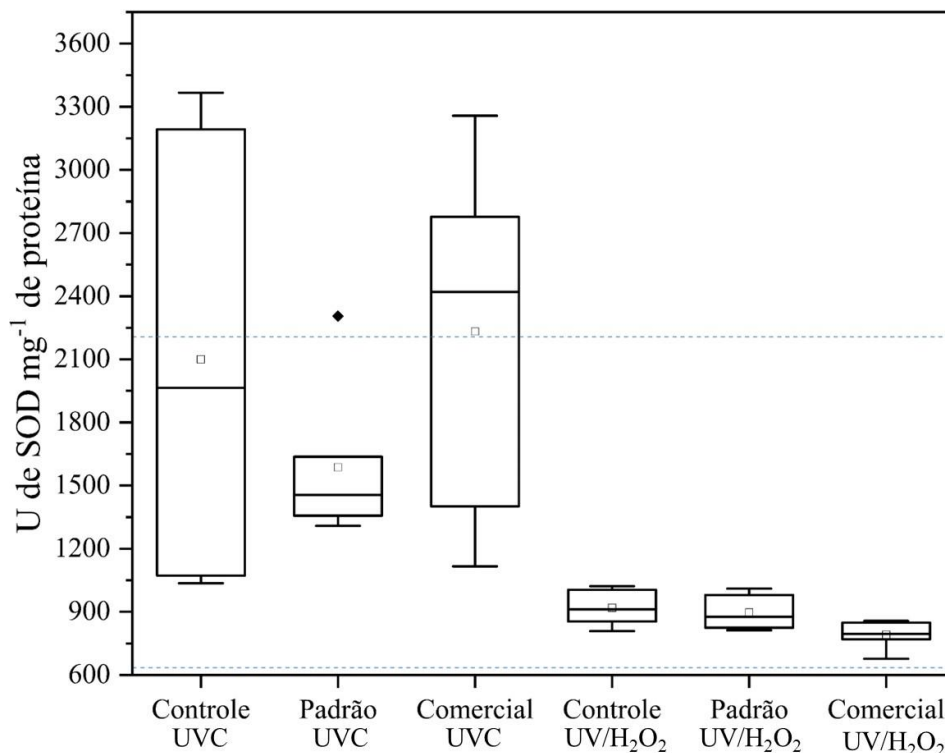
Fonte: O autor (2023).

Para a atividade da peroxidação lipídica, na fotólise houve um aumento de 10,4% para o padrão e diminuição de 3,1% para a formulação comercial. Já para o processo UV/H₂O₂, houve um aumento de 62,6% para o padrão e 18,9% para a formulação comercial. O aumento dos níveis de peroxidação lipídica pode ser atribuído a falta da atividade antioxidante dos enzimas de primeira defesa pela presença de contaminantes, levando a alterações na integridade da membrana (BOELSTERLI, 2007).

A peroxidação lipídica é importante para avaliar o estresse oxidativo gerado no organismo pelo contaminante. Para a fotólise, leves alterações foram registradas. No processo UV/H₂O₂, para ambas as formulações houve um aumento da atividade, sendo atribuída a ausência das enzimas de primeira defesa do organismo, levando a alterações na integridade da membrana celular.

Os resultados para a atividade da superóxido dismutase são mostrados na Figura 25, para a fotólise e processo UV/H₂O₂ para ambas as formulações em 15 minutos de tratamento.

Figura 25 - Atividade da superóxido dismutase em mosquitos de *Stegomyia aegypti* para a fotólise e processo UV/H₂O₂ em 15 minutos de tratamento.



Fonte: O autor (2023).

Com base nos resultados apresentados na Figura 25, atividade da superóxido dismutase para a fotólise mostrou uma diminuição de 13,4% para o padrão e aumento e 38,5% para a formulação comercial. Já para o processo UV/H₂O₂, houve uma diminuição de 2,4% para o padrão e 13,9% para a formulação comercial.

Portanto, para a superóxido dismutase, as maiores alterações foram registradas para a fotólise na formulação comercial, indicando que o sistema antioxidante não foi capaz de eliminar excesso o radical superóxido causado pelo malathion.

Rebechi et al (2021) avaliou a atividade enzimática do malathion e para concentrações baixas do pesticida (1 µg L⁻¹), um aumento da atividade da superóxido dismutase foi registrada, indicando que os organismos são mais susceptíveis ao radical superóxido em concentrações específicas de malathion. Danos oxidativos medidos pela peroxidação lipídica foram registrados após a exposição letal as concentrações de malathion (REBECHI et al., 2021).

A tabela 13 mostra um resumo dos resultados obtidos para os marcadores bioquímicos em *Stegomyia aegypti* após 15 minutos de fotólise ou processo UV/H₂O₂.

Tabela 13 – Resumo dos resultados para os marcadores bioquímicos.

Enzima	Processo	Formulação	Efeito observado
AChE	UVC	Padrão	Inibição (12,2%)
		Comercial	Inibição (20,4%)
	UV/H ₂ O ₂	Padrão	Inibição (9,6%)
		Comercial	Inibição (10,2%)
GST	UVC	Padrão	Redução (10,1%)
		Comercial	Aumento (47,8%)
	UV/H ₂ O ₂	Padrão	Aumento (15,2%)
		Comercial	Sem alterações
EST-α	UVC	Padrão	Sem alterações
		Comercial	Sem alterações
	UV/H ₂ O ₂	Padrão	Redução (4,3%)
		Comercial	Redução (11,5%)
EST-β	UVC	Padrão	Redução (12,9%)
		Comercial	Redução (4,3%)
	UV/H ₂ O ₂	Padrão	Aumento (68,5%)
		Comercial	Aumento (73,6%)
LPO	UVC	Padrão	Aumento (10,4%)
		Comercial	Redução (3,1%)
	UV/H ₂ O ₂	Padrão	Aumento (62,6%)
		Comercial	Aumento (13,9%)

SOD	UVC	Padrão	Redução (13,4%)
		Comercial	Aumento (38,5%)
	UV/H ₂ O ₂	Padrão	Redução (2,4%)
		Comercial	Redução (13,9)

Fonte: O autor (2023).

Portanto, os resultados encontrados neste estudo mostraram que, apesar de algumas alterações registradas, o processo UV/H₂O₂ foi eficiente para degradação do malathion e que a formação dos subprodutos não aumentou a toxicidade da solução.

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento do método cromatográfico para detecção do malathion por cromatografia líquida mostrou-se eficiente, apresentando valores de detecção e quantificação de, 0,03 e 0,11 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A extração em fase sólida para o composto padrão teve percentual de recuperação de 76% (5,38), dentro dos limites preconizados pela legislação da Anvisa.

A determinação dos subprodutos por GC-MS/MS identificou 21 compostos, entre eles os mais relatados no literatura como o malaoxon, isomalathion, diethyl maleate, diethyl fumarate e diethyl malate em ambos os processos. Para o processo UV/H₂O₂, a maior parte dos subprodutos detectados foram ácidos carboxílicos, comprovando a eficiência do processo. Alguns dos subprodutos observados foram originados dos produtos adicionais colocados para aumentar a solubilidade do malathion em água e foram relacionados a isso já que no padrão não foram observados os compostos.

Nos bioensaios, para a atividade larvicida em *Stegomyia aegypti*, as amostras mais tóxicas foram no tempo inicial para ambos os processos avaliados. Para a fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa*, na fotólise, as amostras apresentaram oscilação na resposta de crescimento da radícula para o padrão e inibição no crescimento para a formulação comercial. Já no processo UV/H₂O₂, com exceção da amostra padrão em 45 minutos que demonstrou estimulação no crescimento, não foram observados efeitos no crescimento da radícula do restante das amostras.

Os marcadores bioquímicos avaliados mostraram diferentes respostas para as formulações e processos, porém, nenhuma das respostas foi significativa quando comparada ao controle. Portanto, os resultados dos bioensaios demonstraram a aplicabilidade de fotólise e do processo UV/H₂O₂ para degradação do malathion, já que seu uso ainda não foi proibido e tem como objetivo controlar insetos e em excesso no ambiente pode levar a um desbalanço ecológico.

REFERÊNCIAS

- ABU-QARE, A. W.; ABOU-DONIA, M. B. Simultaneous determination of malathion, permethrin, DEET (N,N-diethyl-m-toluamide), and their metabolites in rat plasma and urine using high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 2, p. 291–299, 2001.
- ADAMS, E. et al. Ecotoxicity of Malathion® 500 CE before and after UVC radiation and UV/H₂O₂ treatment. **Ecletica Quimica**, v. 43, n. 2, p. 44–50, 2018.
- ADHIKARI, K.; KHANIKOR, B. Gradual reduction of susceptibility and enhanced detoxifying enzyme activities of laboratory-reared *Stegomyia aegypti* under exposure of temephos for 28 generations. **Toxicology Reports**, v. 8, p. 1883–1891, 1 jan. 2021.
- AJIBOYE, T. O. et al. Organophosphorus pesticides: Impacts, detection and removal strategies. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 17, 2022.
- ALBUQUERQUE, A. F. et al. Pesticides in Brazilian freshwaters: A critical review. **Environmental Science: Processes and Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779–787, 2016.
- ANDREOZZI, R. et al. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. **Catalysis Today**, v. 53, n. 1, p. 51–59, 1999.
- ANGELI, S. et al. Toxicity Assays of Commercial Chlorpyrifos Under UV/H₂O₂ and UVC Photolysis Treatments. **Water, Air, and Soil Pollution**, p. 1–11, 2021.
- ANVISA. Índice monográfico Malathion. p. 3–5, 2012a.
- ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 4, de 18 de janeiro de 2012. **Dispõe sobre os critérios para a realização de estudos de resíduos de agrotóxicos para fins de registro de agrotóxicos no Brasil.**, 2012b.
- ANVISA. Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de Julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.**, v. 2017, p. 1–21, 2017a.
- ANVISA. Guia para tratamento estatístico da validação analítica - Guia nº 10, de 30 de agosto de 2017. p. 1–19, 2017b.
- ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166 de 24 de julho de 2017 - Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, p. 1–21, 2017c.
- BAR, A.; ANDREW, J. Morphology and Morphometry of *Stegomyia aegypti* Larvae. **Annual Review & Research in Biology**, v. 3, n. 1, p. 1–21, 2013.
- BOELSTERLI, U. A. **Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets.**

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos r. **Diário oficial da união**, p. 11459–11460, 1989.

BRASIL. CONAMA Resolução nº 357. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, p. 59–63, 2005a.

BRASIL. CONAMA Resolução nº 357. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, p. 59–63, 2005b.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução Nº 430, De 13 De Maio De 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Diário Oficial da União**, p. 8, 2011.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

CACCIATORE, L. C.; VERRENGIA GUERRERO, N.; COCHÓN, A. C. Cholinesterase and carboxylesterase inhibition in *Planorbarius corneus* exposed to binary mixtures of azinphos-methyl and chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology**, v. 128–129, p. 124–134, 5 mar. 2013.

CÁCERES, T. et al. Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: The influence of microbial degradation in natural water. **Water Research**, v. 41, p. 4497–4503, 2007.

CARDOSO, M. H. W. M. et al. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 63–72, 2010.

CEDILLO-HERRERA, C. I. G. et al. Efficient Malathion removal in constructed wetlands coupled to UV/H₂O₂ pretreatment. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 10, p. 1–14, 2020.

CETESB. Diagnóstico da contaminação de águas superficiais, subterrâneas e sedimentos por agrotóxicos. **Companhia Ambiental de São Paulo**, 2019.

COLEONE, A. C. et al. Validação de método analítico e de extração do malation em água e solo após nebulização de combate ao *Stegomyia aegypti*. **Revista Ambiente e Agua**, v. 12, p. 426–434, 2017a.

COLEONE, A. C. et al. Validação de método analítico e de extração do malation em água e solo após nebulização de combate ao *Stegomyia aegypti*. **Revista Ambiente e Agua**, v. 12, p. 426–434, 2017b.

CRITTENDEN, J. C. et al. A kinetic model for H₂O₂/UV process in a completely mixed batch reactor. **Water Research**, v. 33, n. 10, p. 2315–2328, 1999.

CULLINEY, T. W.; PIMENTEL, D.; PIMENTEL, M. H. Pesticides and natural toxicants in foods. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 41, n. 3–4, p. 297–320, 1992.

DENG, Y.; ZHAO, R. Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Wastewater Treatment. **Current Pollution Reports**, v. 1, n. 3, p. 167–176, 2015.

DÍAZ-GARDUÑO, B et al. Are combined AOPs effective for toxicity reduction in receiving marine environment Suitability of battery of bioassays for wastewater treatment plant (WWTP) effluent as an ecotoxicological assessment. v. 114, p. 1–11, 2016.

DRUGBANK. Malathion: Uses, Interactions, Mechanism of action.
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Malathion>>, 2021.

DUTTAGUPTA, S. et al. Wide exposure of persistent organic pollutants (PoPs) in natural waters and sediments of the densely populated Western Bengal basin, India. **Science of the Total Environment**, v. 717, p. 137187, 2020.

ECOBICHON, D. ; et al. Organophosphorus insecticides: a general introduction.
<<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc63.htm>>, 2008.

ELLMAN, G. L. et al. A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

FADAEI, A. et al. Degradation of organophosphorus pesticides in water during UV/H₂O₂ treatment: Role of sulphate and bicarbonate ions. **E-Journal of Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 2015–2022, 2012.

FERHI, S. et al. Pilot-scale direct UV-C photodegradation of pesticides in groundwater and recycled wastewater for agricultural use. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, 2021.

FLORES, A. V. et al. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente e Sociedade**, v. 7, 2004a.

FLORES, A. V. et al. Organoclorados : um problema de saúde pública. **Ambiente e Sociedade**, v. 7, 2004b.

FULTON, M. H.; KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 37–45, 2001.

GALLOWAY, T.; HANDY, R. Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides. **Ecotoxicology**, v. 12, 2003.

GAO, R. et al. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, p. 41–45, 1998.

GARCIA, J. C. et al. Evolutive follow-up of the photocatalytic degradation of real textile effluents in TiO₂ and TiO₂/H₂O₂ systems and their toxic effects on *Lactuca sativa* seedlings. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, p. 1589–1597, 2009.

GOES, E. J. A. et al. Validação de método espectrofotométrico de análise para a quantificação de ácido acetilsalicílico em formulações farmacêuticas: uma proposta de aula experimental para análise instrumental. **Química Nova**, v. 42, n. 1, p. 99–104, 2019.

GUERRA-RODRÍGUEZ, S. et al. Assessment of sulfate radical-based advanced oxidation processes for water and wastewater treatment: A review. **Water (Switzerland)**, v. 10, n. 12, 2018.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. [s.l.] International Union of Crystallography, 2015.

HEALTH CANADA. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality - Summary Table. **Water and Air Quality Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch**, p. 1–16, 2019.

HEALTH CANADA. **Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document**.

HEALTH CANADA. Guideline for Canadian drinking water - Malathion. 2023.

HIGUCHI, Y. **Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress**. Biochemical Pharmacology. **Anais...**15 out. 2003.

HULBERT, A. J. et al. Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. **Physiological Reviews**, 2007.

IARC. **Some organophosphate insecticides and herbicides**. v. 112

IARC/WHO. IARC Monographs - 112 - Malathion. **Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer**, n. Group 3, p. 124, 2015a.

IARC/WHO. IARC Monographs - 112 - Malathion. **Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer**, n. Group 3, p. 124, 2015b.

IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>, 2021.

IKE, I. A. et al. Critical review of the science and sustainability of persulphate advanced oxidation processes. **Chemical Engineering Journal**, v. 338, n. October 2017, p. 651–669, 2018.

IKEHATA, K.; EL-DIN, M. G. Aqueous pesticide degradation by hydrogen peroxide/ultraviolet irradiation and Fenton-type advanced oxidation processes: A review. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 5, n. 2, p. 81–135, 2006.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ/FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (IOC/FIOCRUZ). Nota técnica n. 2/2011 - Recomendação técnica sobre a interrupção do uso de inseticidas piretróides no controle do *Stegomyia aegypti* no Brasil. 2011.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ/FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (IOC/FIOCRUZ). Nota técnica n. 4/2016 - Considerações técnicas sobre a aplicação aérea de inseticidas em área urbana. 2016.

JIANG, Z.-Y.; HUNT, J. V; WOLFF, S. P. Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 202, p. 384–389, 1992.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.

KRALJ, M. B. et al. Comparison of photocatalysis and photolysis of malathion, isomalathion, malaoxon, and commercial malathion-Products and toxicity studies. **Water Research**, v. 41, n. 19, p. 4504–4514, 2007.

KRALJ, M. B.; FRANKO, M.; TREBŠE, P. Photodegradation of organophosphorus insecticides - Investigations of products and their toxicity using gas chromatography-mass spectrometry and AChE-thermal lens spectrometric bioassay. **Chemosphere**, v. 67, n. 1, p. 99–107, 2007.

KRALJ, M. B.; TREBŠE, P.; FRANKO, M. Applications of bioanalytical techniques in evaluating advanced oxidation processes in pesticide degradation. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1020–1031, 2007.

KRSTIĆ, D. Z. et al. Inhibition of AChE by malathion and some structurally similar compounds. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 562–573, ago. 2008.

LANDRIGAN, P. J.; BELPOGGI, F. The need for independent research on the health effects of glyphosate-based herbicides. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 17, n. 1, p. 1–4, 2018.

LEANDRO, A. DE S. et al. Malathion insecticide resistance in *Stegomyia aegypti*: laboratory conditions and in situ experimental approach through adult entomological surveillance. **Tropical Medicine and International Health**, v. 25, n. 10, p. 1271–1282, 2020.

LEE, M. Y. et al. Applications of UV/H₂O₂, UV/persulfate, and UV/persulfate/Cu²⁺ for the elimination of reverse osmosis concentrate generated from municipal wastewater reclamation treatment plant: Toxicity, transformation products, and disinfection byproducts. **Science of the Total Environment**, v. 762, 2021.

LEME, T. S. et al. Avaliação da vestimenta utilizada como equipamento de proteção individual pelos aplicadores de malathion no controle da dengue em São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saude Publica**, v. 30, n. 3, p. 567–576, 2014.

LI, W. et al. Transformation pathway and toxicity assessment of malathion in aqueous solution during UV photolysis and photocatalysis. **Chemosphere**, v. 234, p. 204–214, 2019.

LI, W. et al. A consecutive chlorination and alkaline hydrolysis process for rapid degradation and detoxication of malathion in aqueous solution. **Chemical Engineering Journal**, v. 392, 15 jul. 2020.

LIMA, R. M. DE. Avaliação da radiação UVC, processos UV/H₂O₂ Foto- Fenton na degradação do agrotóxico clorpirifós com acompanhamento da ecotoxicidade. **Dissertação de mestrado**, p. 91f, 2017.

LOURES, C. C. A. et al. Advanced Oxidative Degradation Processes: Fundamentals and Applications. **International Review of Chemical Engineering (IRECHE)**, v. 5, n. 2, p. 102, 2013.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 5 dez. 2014.

MACHADO, G. C. X. M. P. Tratamento de efluente de serviço de saúde por processos oxidativos avançados. p. 122, 2014.

MACORIS, M. D. L. G. et al. Alteration in susceptibility response of *Stegomyia aegypti* organophosphates in cities in the state of S. Paulo, Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 33, n. 5, p. 521–522, 1999.

MAGNUSSON, B.; ORNEMARK, U. Eurachem guide: The fitness for purpose of analytical methods - a laboratory guide to method validation and related topics. **Eurachem Guide**, p. 1–70, 2014.

MARSON, B. M. ; et al. Validation of analytical methods in pharmaceutical quality system: an overview focused on HPLC methods. **Quimica**, v. 43, n. 8, p. 1190–1203, 2020.

MEKONEN, S. et al. Pesticide residues in drinking water and associated risk to consumers in Ethiopia. **Chemosphere**, v. 162, p. 252–260, 2016.

MIKLOS, D. B. et al. Evaluation of advanced oxidation processes for water and wastewater treatment – A critical review. **Water Research**, v. 139, p. 118–131, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Nota informativa nº 77/2019-CGPNCMD/DEVIT/SVS/MS. p. 1–5, 2019a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Nota informativa nº 103/2019-CGAR/DEIDT/SVS/MS. 2019b.

MIOT, H. A. Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 16, n. 2, p. 88–91, 2017.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, n. 2, p. 157–177, 2013.

MUTURI, E. J. Larval rearing temperature influences the effect of malathion on *Stegomyia aegypti* life history traits and immune responses. **Chemosphere**, v. 92, n. 9, p. 1111–1116, 2013.

NHMRC. Australian Drinking Water Guidelines Version 3.6. **National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth of Australia**, 2021.

OECD. **Guideline 208 for the testing of chemicals: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test** Organisation for Economic Co-operation and Development.

OECD. **Guideline 211 for the testing of chemicals: Daphnia magna reproduction test** Organisation for Economic Co-operation and Development.

OLIVEIRA, A. G. DE. Remoção Do Agrotóxico Organofosforado Clorpirifós Usando Processo Oxidativo Avançado. p. 81, 2011.

OLIVEIRA, M. DE et al. Um novo método espectrofotométrico para detectar níveis residuais de peróxido após o reprocessamento de filtros de hemodiálise hemodialysis filters. v. 9, p. 70–74, 2011.

PALAKSHA; SHAKUNTHALA, V. Variations in the esterase expression pattern with respect to different light regimes in *Drosophila agumbensis* and *Drosophila nagarholensis*. **Biological Rhythm Research**, v. 46, n. 4, p. 553–564, 4 jul. 2015.

PANG, Y.-P. et al. Novel and Viable Acetylcholinesterase Target Site for Developing Effective and Environmentally Safe Insecticides. **Current Drug Targets**, v. 13, p. 471–482, 2012.

PARA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, p. ABNT, 2019.

PARKER, A. M. et al. UV/H₂O₂ advanced oxidation for abatement of organophosphorous pesticides and the effects on various toxicity screening assays. **Chemosphere**, v. 182, p. 477–482, 2017.

- PARRA-ARROYO, L. et al. Highly hazardous pesticides and related pollutants: Toxicological, regulatory, and analytical aspects. **Science of the Total Environment**, v. 807, p. 18–26, 2022.
- PEHKONEN, S. O.; ZHANG, Q. The Degradation of Organophosphorus Pesticides in Natural Waters: A Critical Review. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 17–72, 2002a.
- PEHKONEN, S. O.; ZHANG, Q. The Degradation of Organophosphorus Pesticides in Natural Waters: A Critical Review. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 17–72, 2002b.
- PEREIRA LIMA, J. B. et al. Resistance of *Stegomyia aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 3, p. 329–333, 2003.
- PERGAL, M. V. et al. Degradation Products, Mineralization, and Toxicity Assessment of Pesticides Malathion and Fenitrothion. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 231, n. 8, 2020.
- PERIS-VICENTE, J.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview. **Analytical Separation Science**, p. 1757–1808, 2015.
- PHILIP J. BRANDHUBER, G. K. **Methods for the Detection of Residual Concentrations of Hydrogen Peroxide in Advanced Oxidation Processes.**
- PHILIP J. BRANDHUBER, G. K. et al. Efficient removal of endosulfan from aqueous solution by UV-C/peroxides: A comparative study. **Chemical Engineering Journal**, v. 187, n. 3, p. 584–592, 2021.
- PIOVEZAN, R. et al. Effect of heavy-equipment aided environmental nebulization on *Stegomyia aegypti* vectors of Dengue, Zika and Chikungunya in São Paulo, Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, v. 107, n. 4, p. 478–486, 2017.
- PRIAC, A.; BADOT, P. M.; CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, p. 188–194, 2017.
- PRIETO-RODRÍGUEZ, L. et al. Solar photo-Fenton optimization for the treatment of MWTP effluents containing emerging contaminants. **Catalysis Today**, v. 209, p. 188–194, 2013.
- PRINTES, L. B.; FERNANDES, M. N.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Laboratory measurements of biomarkers and individual performances in *Chironomus xanthus* to evaluate pesticide contamination of sediments in a river of southeastern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 424–430, mar. 2011.
- PUBCHEM. Malathion - Compound Summary. 2021.
- PUPO NOGUEIRA, R. F. et al. Fundamentals and environmental applications of Fenton and photo-Fenton processes. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 400–408, 2007.

- RAKOTONDRAVELO, M. L. et al. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 3, p. 360–366, out. 2006.
- RAZALI, N. M.; WAH, Y. B. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. **Journal of Statistical Modeling and Analytics**, v. 2, n. 1, p. 21–33, 2011.
- REBECHI, D. et al. Low malathion concentrations influence metabolism in *Chironomus sancticarloi* (Diptera, Chironomidae) in acute and chronic toxicity tests. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, n. 3, p. 296–301, 2014.
- REBECHI, D. et al. Molecular and biochemical evaluation of effects of malathion, phenanthrene and cadmium on *Chironomus sancticarloi* (Diptera: Chironomidae) larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 211, n. 111953, 15 mar. 2021.
- REDDY, A. V. B. et al. Simultaneous determination of three organophosphorus pesticides in different food commodities by gas chromatography with mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 12, p. 2276–2283, 2016.
- REDDY, P. V. L.; KIM, K. H. A review of photochemical approaches for the treatment of a wide range of pesticides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 325–335, 2015.
- REED, N. R.; RUBIN, A. L. Malathion. **Encyclopedia of Toxicology: Third Edition**, v. 3, p. 133–137, 2014.
- REMUCAL, C. K. The role of indirect photochemical degradation in the environmental fate of pesticides: A review. **Environmental Sciences: Processes and Impacts**, v. 16, n. 4, p. 628–653, 2014.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- RIBEIRO, M. L.; PEREIRA, S. Y.; MARCHI, M. R. R. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 688–694, 2007a.
- RIBEIRO, M. L.; PEREIRA, S. Y.; MARCHI, M. R. R. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 688–694, 2007b.
- ROBERTS, JAMES R.; REIGART, J. R. Recognition and management of pesticide poisonings. v. Sixth Edit, p. 277, 2013.
- RODRIGUES-SILVA, F. et al. Removal of micropollutants by UASB reactor and post-treatment by Fenton and photo-Fenton: Matrix effect and toxicity responses. **Environmental Pollution**, v. 212, 2022.
- ROMÉO, M. et al. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**.

SANCHES, S. M. et al. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Ecotoxicidade e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53–58, 2003a.

SANCHES, S. M. et al. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Ecotoxicidade e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53–58, 2003b.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika Trust**, v. 52, n. 3, p. 591–611, 1965.

SHARMA, A.; AHMAD, J.; FLORA, S. J. S. Application of advanced oxidation processes and toxicity assessment of transformation products. **Environmental Research**, v. 167, n. July, p. 223–233, 2018.

SHI, H. et al. Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. **Genomics**, v. 100, n. 5, p. 327–335, nov. 2012.

SINGH, B.; KAUR, J.; SINGH, K. Microbial degradation of an organophosphate pesticide, malathion. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 146–154, maio 2014.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa*. **Imta**, p. 55–67, 2004.

SUDHAIK, A. et al. Metal-free photo-activation of peroxymonosulfate using graphene supported graphitic carbon nitride for enhancing photocatalytic activity. **Materials Letters**, v. 277, 2020.

TEIXEIRA, C. P. D. A. B.; JARDIM, W. D. F. Processos Oxidativos Avançados: conceitos teóricos. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2004, v. 3, 83 p. **Caderno Temático**, v. 03, p. 83, 2004.

THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Directive (EU) 2020/2184, EU (revised) Drinking Water Directive. Annex 1. Part B. **Official Journal of the European Communities**, v. 2019, n. December, p. 35, 2020.

TIWARI, G.; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: An updated review. **Pharmaceutical Methods**, v. 1, n. 1, p. 25, 2010.

TONY, A. M. et al. Degradation of Malathion in Aqueous Solutions using Advanced Oxidation Processes and Chemical Oxidation. **Scientia Agriculturae**, v. 20, n. 2, p. 174–185, 2017.

U.S DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry. p. 1–44, 2018.

U.S DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Mosquito Life Cycle. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2020a.

U.S DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Mosquito Life Cycle. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2020b.

UTZIG, L. M. et al. Ecotoxicity response of chlorpyrifos in *Stegomyia aegypti* larvae and *Lactuca sativa* seeds after UV/H₂O₂ and UVC oxidation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, n. November 2018, p. 449–456, 2019.

VAGI, M. C.; PETSAS, A. S. Recent advances on the removal of priority organochlorine and organophosphorus biorecalcitrant pesticides defined by Directive 2013/39/EU from environmental matrices by using advanced oxidation processes: An overview (2007-2018). **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 1, p. 102940, 2020.

VALENTE, N. I. P. et al. Analysis of organophosphorus pesticides in whole blood by GC-MS- μ ECD with forensic purposes. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 33, p. 28–34, 2015.

VALLE, D. et al. Quantification Methodology for Enzyme Activity Related to Insecticide Resistance in *Stegomyia aegypti*. **Fundação Oswaldo Cruz**, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57–149, 2003.

VASSEGHIAN, Y. et al. Pesticide decontamination using UV/ferrous-activated persulfate with the aid neuro-fuzzy modeling: A case study of Malathion. **Food Research International**, v. 137, n. July, p. 109557, 2020.

VASSEGHIAN, Y. et al. Decontamination of toxic Malathion pesticide in aqueous solutions by Fenton-based processes: Degradation pathway, toxicity assessment and health risk assessment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 423, n. PA, p. 127016, 2022a.

VASSEGHIAN, Y. et al. Decontamination of toxic Malathion pesticide in aqueous solutions by Fenton-based processes: Degradation pathway, toxicity assessment and health risk assessment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 423, 2022b.

VELA, N. et al. Removal of Pesticides with Endocrine Disruptor Activity in Wastewater Effluent by Solar Heterogeneous Photocatalysis Using ZnO/Na₂S₂O₈. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 230, n. 6, p. 1–11, 2019.

VELKOSKA-MARKOVSKA, L.; PETANOVSKA-ILIEVSKA, B. Optimization and development of a SPE-HPLC-DAD method for the determination of atrazine, malathion, fenitrothion, and parathion pesticide residues in apple juice. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 32, n. 2, p. 299–308, 2013.

VELKOSKA-MARKOVSKA, L.; PETANOVSKA-ILIEVSKA, B. Determination of malathion in pesticide formulation by high-performance liquid chromatography. **Agriculture and Forestry**, v. 66, n. 4, p. 171–181, 2020.

WACŁAWEK, S. et al. Chemistry of persulfates in water and wastewater treatment: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 330, n. June, p. 44–62, 2017.

WANG, X. et al. Acute trimethyltin exposure induces oxidative stress response and neuronal apoptosis in *Sebastiscus marmoratus*. **Aquatic Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 58–64, 20 out. 2008.

WHO. **World Health Organization - Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides.** 1981.

WHO. Flame retardants: tris(chloropropyl) phosphate and tris(2-chloroethyl) phosphate. **World Health Organization**, p. 1–129, 2004.

WILSON, J. D. ; et al. Toxicological Profile for Malathion. **U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, n. September, 2003.

WU, H. et al. Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). **Chemosphere**, v. 83, n. 4, p. 599–604, 2011.

YOUNG, B. J. et al. Ecotoxicology and environmental safety toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182–186, 2012.

ZHANG, Y. et al. The degradation of chlorpyrifos and diazinon in aqueous solution by ultrasonic irradiation: Effect of parameters and degradation pathway. v. 82, p. 1109–1115, 2011.

ZHANG, Y.; PAGILLA, K. Treatment of malathion pesticide wastewater with nanofiltration and photo-Fenton oxidation. **Desalination**, v. 263, n. 1–3, p. 36–44, 2010.