
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LARA CAVALARI SANTELLO

**ANÁLISE DO POTENCIAL INDUTOR DE
ESTEATOSE HEPÁTICA DOS
FITOSSANITÁRIOS CURBIX® 200 SC E
REGENT® 80 WG EM LINHAGEM CELULAR
HEPG2**

LARA CAVALARI SANTELLO

ANÁLISE DO POTENCIAL INDUTOR DE ESTEATOSE HEPÁTICA
DOS FITOSSANITÁRIOS CURBIX® 200 SC E REGENT® 80 WG EM
LINHAGEM CELULAR HEPG2

Orientador: Prof.^a Dr.^a KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2020

S234a

Santello, Lara Cavalari

Análise do potencial indutor de esteatose hepática dos fitossanitários CURBIX® 200 SC e REGENT® 80 WG em linhagem celular HEPG2 / Lara Cavalari Santello. -- Rio Claro, 2020

46 f. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Karen Cristiane Martinez de Moares

1. esteatose hepática. 2. fitossanitários. 3. células HEPG2. 4. fipronil. 5. ethiprole. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, e principalmente meus pais, Antonio e Rosali e a minha irmã, Bruna, que sempre souberam a carreira que eu gostaria de seguir, e me apoiaram desde o início com muito amor, nesse caminho do curso de Ciências Biológicas que eu escolhi.

À professora Dr^a Karen, pela oportunidade, confiança e paciência dada nesse processo importante da graduação, que me permitiu o amadurecimento tanto profissional quanto pessoal.

Às minhas amigas e parceiras de laboratório, Camila, Letícia, Lígia e Thais, também pela experiência, pelo aprendizado, pelos desesperos e risadas compartilhadas.

Aos meus amigos, os quais infelizmente não consigo descrever todos aqui e também a bateria Porcaria, por me proporcionarem diversas experiências e estarem comigo parte deste caminho e que com certeza me concederam as melhores histórias e risadas que a graduação poderia oferecer.

Ao meu namorado, Joacks, por todo o apoio nessa fase final do trabalho, e também uma das mais turbulentas, por ser meu amigo e companheiro e estar sempre ao meu lado.

Agradeço a todos do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, seja pela troca de conhecimento ou pela disponibilização dos equipamentos para a realização dos ensaios necessários.

Agradeço a FAPESP (Processos 2013/21186-5 e 2018/05286-3) e ao Programa de Educação Tutorial (PET) pelo apoio financeiro proporcionado que ajudou na conclusão desse trabalho.

Por fim, agradeço à todos, que de forma direta ou indireta, me ajudaram na escrita e conclusão deste trabalho e da minha construção pessoal e profissional.

RESUMO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a esteatose hepática é considerada um grave problema de saúde pública, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura no fígado, sendo este principalmente em forma de gotículas de lipídios. Várias são as etiologias correlatas ao aparecimento das anomalias e os agrotóxicos, chamados atualmente de fitossanitários, potencializam a lista de reagentes químicos que podem causar alterações metabólicas e consequentemente anomalias hepáticas nas populações. Neste estudo, foi investigada a atuação de dois fenilpirazóis: o fipronil, presente na composição do fitossanitário REGENT® 800 WG, e o ethiprole, presente no fitossanitário CURBIX® 200 SC. Os fitossanitários foram escolhidos considerando-se a popularidade dos mesmos e pelo fato de que o uso incorreto dos mesmos pode desencadear a, contaminação da água e do solo, além de poder causar uma variedade de efeitos tóxicos em animais e humanos. Para o desenvolvimento deste trabalho, avaliou-se inicialmente a citotoxicidade dos fitossanitários na linhagem celular hepáticas (HEPG2, ATCC® HB-8065™) que são altamente metabolizadoras. A escolha dessa linhagem permitiu avaliar os efeitos celulares dos fitossanitários no metabolismo lipídico. Após a otimização das concentrações de estudo, análises de microscopia de fluorescência e a mensuração de lipídeos neutros para se avaliar o potencial de indução da esteatose hepática a partir destes fitossanitários. Além disso foram também mensurados os lipídeos totais em análises de espectroscopia de infravermelho. Nas concentrações de uso utilizadas nos ensaios para ambos os fitossanitários (0,2 µM e 2 µM), diferentemente do esperado, o fitossanitário CURBIX® 200 SC (considerado uma opção menos tóxica que o fitossanitário REGENT® 800 WG) foi o que mais causou alterações negativas às células, reduzindo a viabilidade em 55%, além de alterar significativamente os níveis de lipídeos neutros e totais presentes no interior da célula. Todas essas alterações sugeriram possíveis alterações metabólicas nas células HEPG2, frente a incubação com o fitossanitário. Por outro lado, o fitossanitário REGENT® 800 WG, conhecido por ser mais tóxicos ao organismo, apresentou alterações significativas apenas na mensuração dos lipídios totais, mas sem apresentar citotoxicidade em nenhum dos ensaios realizados. Assim, baseado nos resultados obtidos em nosso modelo de estudo, observa-se a necessidade de um maior detalhamento mecanístico da atuação de ambos os fitossanitários.

Palavras-chave: esteatose hepática, fitossanitários, células HEPG2, fipronil, ethiprole.

ABREVIACÕES

ACLY – ATP citrato liase

AG - Ácidos graxos

CoA - Coenzima A

CPT1 - Carnitina palmitoil transferase 1

CS - Citrato sintase

CYP450 - Proteína CYP3A4 do citocromo P450

DAPI - Corante 4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

DGE - Expressão gênica digital

DHGA - Doença hepática gordurosa não alcoólica

EHNA - Esteatose hepática alcoólica

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FASN - Ácido graxo sintase

GABA - Ácido γ -aminobutírico

GL - Gotículas de lipídeos

HCC - Carcinoma hepatocelular

HEPG2 - Células de hepatocarcinoma

MCD ou **MLYCD** - Malonil-CoA descarboxilase

Nº - Número

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Tampão salino-fosfatado

PPAR - Receptores ativados por proliferador de peroxissoma

PPAR α - Receptores ativados por proliferador de peroxissoma do tipo α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1. Fígado e doenças hepáticas gordurosas: Um problema de saúde pública	6
1.2. A relação da esteatose hepática com o metabolismo de lipídio	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. Agrotóxicos: Inimigos silenciosos da saúde pública	11
2.2. O início da utilização dos fitossanitários: da guerra aos campos	12
2.3. Brasil e Fitossanitários	14
2.4. A família dos fenilpirazóis	18
2.5. Fipronil e Ethiprole: Conhecendo o princípio ativo dos fitossanitários.....	19
2.5.1. Fipronil	19
2.5.2. Ethiprole	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivos Gerais	23
3.2. Objetivos Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Cultura Celular	23
4.2. Ensaio de citotoxicidade (MTT)	24
4.3. Microscopia de fluorescência: a marcação de lipídeos através da coloração com Vermelho do Nilo (<i>Nile Red</i>).....	24
4.4. Análise de lipídeos totais	25
4.5. Análises Estatísticas	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1. Análise do ensaio de citotoxicidade (MTT) com as diferentes concentrações dos fitossanitários ethiprole e fipronil	25
5.2. Análise de microscopia de fluorescência: a marcação de lipídeos pela coloração com Vermelho do Nilo (<i>Nile Red</i>).....	28

5.3. Análise da mensuração de lipídeos totais	32
6. CONCLUSÕES.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
8. ANEXO 1. Folder – O que você precisa saber sobre os fitossanitários	43

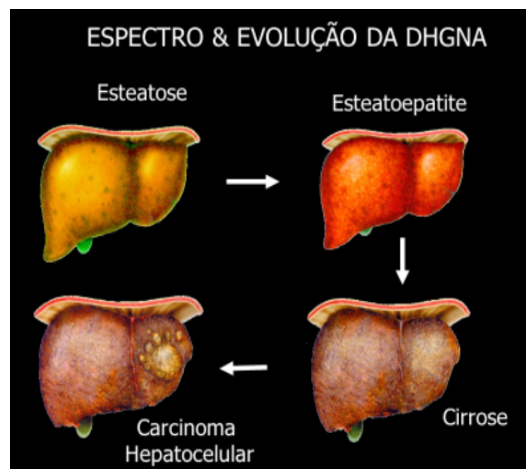
1. INTRODUÇÃO

1.1. Fígado e doenças hepáticas gordurosas: Um problema de saúde pública

O fígado é o maior órgão glandular do corpo humano e é responsável pela manutenção da homeostase do organismo e pelo metabolismo primário de muitas substâncias. Doenças ou lesões no órgão podem comprometer este processo e levar a acumulação de compostos tóxicos no organismo (CHACKO; SAMANTA, 2016). Estruturalmente, o fígado é organizado em células parenquimatosas (hepatócitos) e não parenquimatosas (células de Kupffer, células endoteliais sinusoidais, células estreladas hepáticas) (RUI, 2014; TARASENKO; MCGUIRE, 2017) sendo os hepatócitos as células presentes em maior quantidade (~80%). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que doenças relacionadas a este órgão ainda são consideradas um grave problema de saúde pública e uma das principais causas de morte no mundo, totalizando 13% das 7,6 milhões de mortes anuais (OMS, 2017).

Com relação às doenças do fígado, de acordo com a Sociedade Brasileira de Hepatologia (SBH, 2019), a esteatose hepática pode ser classificada em dois grandes grupos, sendo o primeiro grupo ocasionado pelo consumo excessivo de bebidas alcoólicas (EHNA - esteatose hepática alcoólica) e o segundo denominado pela doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), sendo esta caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura no fígado, podendo ser em forma de gotículas de lipídeos (ZHAO et al., 2014; GAO; BATALLER, 2015; WALLACE; MANN; FRIEDMAN, 2015). Em relação às características clínicas dos indivíduos acometidos pela esteatose, na maioria dos pacientes é assintomática, apresentando apenas alguns sinais vagos como fadiga, mal-estar e um leve desconforto na região do abdômen (ADAMS, L.A, 2015) sendo seu diagnóstico observado por alterações bioquímicas, como o aumento dos marcadores alanina-aminotransferase, aspartatoaminotransferase e gama-glutamiltanspeptidase, sendo estas resistentes à insulina (FELDMAN, M, 2002). A DHGNA é causada por outros fatores de risco, como a obesidade, diabetes mellitus, dislipidemia, medicamentos à base de corticosteroides, estrógenos, amiodarona, entre outros. Durante sua progressão, os indivíduos podem apresentar quadros mais graves de inflamação crônica, fibrose hepática e cirrose, que em conjunto podem favorecer o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC) (SBH, 2018). A Figura 1 apresenta resumidamente a evolução das doenças hepáticas não alcoólicas e a progressão do HCC.

Figura 1. Evolução do hepatocarcinoma.



Fonte: <http://sbhepatologia.org.br/imprensa/esteatose-hepatica/>

Devido ao estilo de vida da população, nos últimos anos houve um aumento nos casos de doenças gordurosas hepáticas, assumindo, assim, proporções alarmantes que as caracterizam como um grave problema de saúde pública (DAMASO, 2006; DUARTE, 2011). Sabe-se que a mudança no estilo de vida populacional mundial, no que diz respeito aos hábitos alimentares e a prática de exercícios, aumentou o número de pessoas acima do peso (MENDONÇA, 2013), podendo acarretar doenças do fígado e como consequência elevar a predisposição para o acúmulo de gordura no órgão (NADER; MATTOS; BASTOS, 2014).

De acordo com esse fato, alguns estudos demonstram uma correlação entre a obesidade e a presença de doenças hepáticas, além de apontarem que a maioria dos pacientes com quadro de doença hepática gordurosa primária pode desenvolver uma piora no quadro clínico, como aparecimento de fibrose e cirrose, que podem aumentar taxas de mortalidade (SEIXAS, 2010; ARSLAN, 2014; COREY; KAPLAN, 2014). Nesse contexto, investigar aspectos celulares e moleculares do metabolismo lipídico e sua correlação com o processo pró-esteatótico hepático é pertinente.

1.2. A relação da esteatose hepática com o metabolismo de lipídio

Lipídios são moléculas complexas e essenciais que são utilizadas pelo organismo principalmente como fontes de energia. Tais moléculas pertencem a diferentes classes e podem desempenhar diversas funções no organismo, como os fosfolipídios que constituem as membranas; os triglicerídeos que podem ser usados como fonte de energia e colesterol que auxiliam a síntese de hormônios (GAGGINI et al., 2013; NELSON, 2014). Seu acúmulo no

tecido hepático, pode acarretar alterações metabólicas e consequentemente doenças hepáticas, tais como as DHGNA (SZABO, 2013).

Atualmente, junto com os fatores citados acima, soma-se a utilização indiscriminada de fitossanitários na agricultura em diversos locais do mundo, que são responsáveis por alterações fisiológicas, podendo causar desequilíbrios no metabolismo de lipídeo (PREZA; AUGUSTO, 2011). Ainda, alguns estudos investigaram a relação dos agricultores com os fitossanitários e apontaram que durante a utilização desses químicos, muitos trabalhadores apresentam condições precárias de segurança de trabalhos em nenhuma assistência técnica ou fiscalização adequada para orientar sobre o modo de manipulação e utilização dos fitossanitários. Com isso os trabalhadores ficam expostos a essas substâncias, que podem vir a comprometer sua saúde (HADDAD; RIBAS, 2019). Consequentemente, estima-se que ocorram aproximadamente três milhões de intoxicações agudas em agricultores, que são responsáveis por 220 mil mortes anualmente, sendo 70% provenientes dos países em desenvolvimento, local em que se encontra o Brasil (OMS, 2017).

Embora os agrotóxicos sejam produzidos para atingir alvos específicos, esta seletividade nunca é atingida, pois de acordo com a história evolutiva dos seres vivos, muitos dos componentes celulares ou das vias metabólicas que são alvos dos princípios ativos, estão relacionados às características bioquímicas e fisiológicas dos seres humanos (PREZA, C; LUCCA, D, 2012). Sendo assim, indivíduos expostos a agrotóxicos em altas doses ou a pequenas doses diariamente apresentam reações fisiológicas tais como, tremores no corpo, indisposição, dor de cabeça, tonturas, náuseas, vômitos, cólicas abdominais, queimaduras e alterações da pele e alteração do funcionamento dos rins e do fígado (INCA, 2019). Considerando-se as alterações no funcionamento do fígado, o uso dos fitossanitários da classe dos organoclorados, levou a efeitos deletérios no metabolismo de carboidratos e lipídeos. (ABDOLLAHI; RAHIMI, 2010; LIU, Q, 2017). Corroborando essas análises, outros estudos demonstraram que esses fitossanitários podem elevar as taxas de triacilglicerol e da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (JACOBS; STEFFES; RAMBABU; RAO, 2007; ABDOLLAHI, 2010), que agredem o órgão e o tornam suscetível a lesões e ao desenvolvimento de patologias tais como a esteatose, que se não identificada prontamente pode progredir a quadros de maior comprometimento fisiológico tais como cirrose e até mesmo hepatocarcinoma (GOMES, 2013; CAMPOS, 2018).

Reforçando as observações de que organoclorados alteram o metabolismo de lipídeos, Lia *et al* (2015) analisou a exposição de 150 trabalhadores a compostos organoclorados produzidos pela Unidade Química de Cubatão – UQC em ensaios de avaliação toxicológica.

Os autores observaram que aproximadamente 17,5% dos indivíduos apresentavam acúmulo de gordura no fígado, caracterizando a esteatose hepática (AUGUSTO, 2015). Além disso, outro estudo mais recente, realizado por Liu (2017), demonstrou um acúmulo elevado de lipídios em células HEP-G2 humanas, após exposição a p, p'-diclorodifenildicloroetileno (p, p'-DDE) e β -hexaclorociclo-hexano (β -HCH), dois metabólitos predominantes dos fitossanitários organoclorados. Esses compostos químicos já foram descritos como agentes associados a distúrbios do metabolismo dos ácidos graxos, reforçando ainda mais danos à saúde causados por essas substâncias (LIU, Q, 2017).

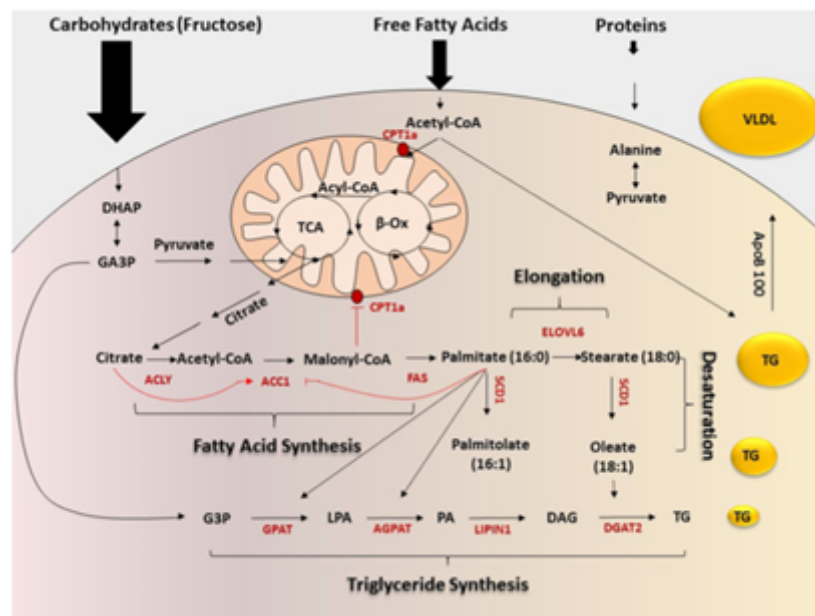
Nas disfunções hepáticas, as alterações no metabolismo de lipídeo podem ocorrer tanto na fase de síntese, quanto na de degradação dessas moléculas. A etapa de produção pode se iniciar de diversas maneiras, através da obtenção de AG, provenientes da alimentação do indivíduo, dos quilomícrons e da síntese *de novo*. Enquanto que na fase de degradação, pode ser da disfunção na utilização das moléculas pelo próprio organismo, e principalmente, através da β -oxidação no interior das mitocôndrias e dos peroxissomos (RODRIGUEZ; KERSTEN, 2017; HOWELL, 2018).

Na via de biossíntese de lipídeos os AGs livres são metabolizados e resultam em moléculas de acetil-CoA. Posteriormente, os ácidos graxos podem ser esterificados com cadeias de glicerol ou esterol originando os triacilgliceróis, para serem armazenados na forma de gotículas de lipídeos (GL) em uma sequência concatenada de reações metabólicas (CURRIE et al., 2013; SOFTIC, 2016).

Nas DHGNA a biossíntese *de novo* assume papel fundamental, considerando-se o desequilíbrio sistêmico do organismo, que favorece a síntese de novas moléculas de lipídeos. A Figura 2 apresenta um esquema representativo da biossíntese lipídica. Inicialmente, a molécula de acetil-coA pode seguir duas vias diferentes, sendo a primeira, a reação de carboxilação, através da adição de uma molécula de carbono pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC) e ser transformado em malonil-CoA (CURRIE et al., 2013; RODRIGUEZ; KERSTEN, 2017). Tal molécula quando encontrada em elevadas concentrações, inibem alostericamente a proteína carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), responsável pelo transporte de ácidos graxos para o interior da mitocôndria iniciando processos energéticos β -oxidativos. Essa inibição, garante e intensifica a segunda via do acetil-CoA, a qual através de reações mediadas pela ação da enzima ácido graxo sintase (FASN), leva a produção de uma grande quantidade de AG. Esses ácidos graxos sintetizados podem ser direcionados a formação de moléculas sinalizadoras, armazenadas em gotículas de lipídeos ou oxidados para geração de energia (CURRIE et al., 2013; SOFTIC, COHEN, KAHN, 2016).

Somada a via descrita acima, alguns mecanismos dependentes de transcrição também podem estar envolvidos na biossíntese lipídica, como os fatores de transcrição proteína ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBP), mediadores pró-inflamatórios como o fator de ativação de plaquetas (PAF) e os fatores de transcrição ativados por proliferados de peroxissoma (PPARs, PPAR α e γ). Esses fatores transcricionais atuam no controle da expressão de genes essenciais para o metabolismo de lipídeos, promovendo a absorção de AG, diferenciação de adipócitos, armazenamento lipídico em adipócitos maduros e regulador da β -oxidação e gasto energético (WANG, 2003; PETINELLI, 2011; ROSEN, 2011).

Figura 2. Visão Geral da biossíntese de novo no interior das células hepáticas



Legenda: enzima fosfato de diidroxiacetona (DHAP), enzima trifostado (GA3P), ATP citrato liase (ACL), Acetil-CoA carboxilase (ACC), Ácidos graxos sintase (FAS), elongases de ácidos graxos de cadeia longa (ELOVL6), Estearoil-CoA desaturase 1 (SCD1), Glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT), fosfato de glicerol-3 (G3P), ácido lisofosfatídico (LPA), 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase (AGPAT), ácido fosfatídico (AF), 1,2-diacilglicerol (DAG), Diacilglicerol aciltransferase (DGAT), triglicerídeos (TG).

Fonte: SOFTIC, COHEN, KAHN, 2016.

Como mencionado, o equilíbrio do metabolismo lipídico depende também da β -oxidação, processo no qual os ácidos graxos são utilizados na geração de ATP, quando o organismo necessita de uma demanda energética. Para que isso ocorra, AGs ativados pela adição de grupamentos acetil-CoA são metabolizados na matriz mitocondrial. A oxidação lipídica se dá, pela retirada sucessiva de uma dupla de carbonos da cadeia do ácido graxo. O

processo de oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e para que isso se inicie, o ácido graxo-CoA, é associado à enzima carnitina, a qual tem o papel de auxiliar nesse transporte do ácido graxo para a matriz mitocondrial. A oxidação dos ácidos graxos, até acetil-CoA, ocorre através de 4 reações sequenciais, o primeiro dos passos é a quebra do acil-CoA para enoil-CoA, com a transferência dos hidrogênios dessa reação ao cofator FAD, o qual é reduzido para FADH₂. O segundo passo da reação ocorre a adição de uma molécula de água e há a formação de 3-hidroxiacil-CoA através da reação enzimática da enoil-CoA hidratase (EHHADM). No terceiro passo, a molécula produzida é oxidada resultando em uma beta cetoacil-CoA e NADH mediados pela enzima a β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (HADHB). O último passo das reações bioquímicas é a interação da molécula formada com uma CoA-livre, esse, é catalisado pela acil-CoA acetil transferase (ACAT1). Essas reações então, separam dois átomos de carbono da cadeia original do ácido graxo, gerando o acetil-CoA. Por fim, os elétrons provenientes das etapas iniciais e o acetil-CoA metabolizados no ciclo do citrato, fornecem as matérias-primas para que as células produzam ATP através da fosforilação oxidativa (TALBOT, 2008; NELSON, 2014).

Portanto, como foi mostrado acima, essas vias fazem parte de um delicado equilíbrio metabólico, o qual pode sofrer alterações nos usuários em contato com os fitossanitários, levando ao aparecimento de lesões no fígado e conseqüentemente ao desenvolvimento de quadros de esteatose hepática (LIU, 2017). Considerando-se essas informações, é necessária uma melhor avaliação dos efeitos dos fitossanitários na indução da esteatose hepática, o que justifica o presente estudo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agrotóxicos: Inimigos silenciosos da saúde pública

Agrotóxicos, também conhecidos como fitossanitários, pesticidas, fungicidas, inseticidas, herbicidas e praguicidas são considerados extremamente agressivos ao meio ambiente e à saúde humana, sendo atualmente responsáveis pela movimentação de milhares de dólares em todo o mundo (MOREIRA, 2002; GRISOLIA, 2005; TAVARES, 2015). A liberação de um número cada vez maior destes químicos sintéticos no meio ambiente pode levar a vários efeitos prejudiciais ao solo, água e também ao ar (TAVARES, 2015). Segundo Grisolia (2005) as fontes de poluição ligadas a esses agentes químicos, são de difícil controle pois não permanecem limitados às áreas nos quais os mesmos foram aplicados, podendo

assim alcançar outras regiões, causando efeitos adversos em vários organismos vivos (GRISOLIA, 2005). Portanto, as agências governamentais e as comunidades civil e científica têm se preocupado há décadas com o impacto que esses contaminantes vêm causando ao ambiente e, conseqüentemente, sobre as populações humanas (AU; RIBEIRO, 2003).

Esses impactos foram estudados e dados estatísticos demonstraram intoxicações diretas e indiretas pelos fitossanitários em humanos. Tal intoxicação direta pode ser devido ao manuseio dos produtos sem as normas corretas e os equipamentos de proteção adequados. Considerando-se a contaminação indireta pode ocorrer através da contaminação dos alimentos, do leite materno, do solo e da água (SILVA, 2014; PALMA, 2014). Em um estudo realizado no período de 2012 a 2016 pela Secretaria do Estado de São Paulo, foram registradas aproximadamente 4 mil ocorrências de intoxicação por agrotóxicos, sendo que 72,6% dos casos foram por utilização dos fitossanitários na agricultura e o restante pela ingestão de alimentos contaminados. (Secretaria..., 2018, p.19)

2.2. O início da utilização dos fitossanitários: da guerra aos campos

Os fitossanitários utilizados atualmente na agricultura foram desenvolvidos durante as duas guerras mundiais e seus princípios ativos foram inicialmente utilizados como armas químicas (ARAÚJO, 2009; COLASSO, AZEVEDO, 2011). Naquela época, viu-se que os agentes químicos empregados nas guerras apresentavam mecanismos neurotóxicos nos seres humanos, além de ação em todos organismos através de toxinas, tais como, cianeto de hidrogênio, cloreto de cianogênio, fosgênio, cloro, ricina, entre outros. Muitos dos quais além de provocarem lesões imediatas, estão associados a morbidades e problemas psicológicos em longo prazo (ARAÚJO, 2009).

Durante a primeira guerra mundial no século XX, a Alemanha era considerada um dos maiores centros tecnológicos e armamentistas do mundo, pois era cientificamente bem desenvolvido na área química. Além disso, contava com a participação de cientistas brilhantes em seus laboratórios, como o químico alemão. Viktor Meyer, o qual sintetizou o dicloroetilsulfeto, nomeado depois como agente mostarda, que teve grande utilização como “arma química” Carl Scheele, um químico sueco, descobriu o átomo de cloro, muito utilizado nos primeiros ataques militares, uma vez que causavam irritação e ressecamento das vias respiratórias, podendo levar a edemas no corpo do soldado (BURRESON e COUTEUR, 2006). Além disso, Scheele também determinou as propriedades e composição do cianeto de

hidrogênio, conhecido posteriormente como gás da morte e utilizado nas câmaras de gases em campos de concentração (COLASSO e AZEVEDO, 2011).

Entretanto, após a Primeira Guerra, a Alemanha acabou perdendo lugar na economia e no cenário industrial frente a dificuldades financeiras de grandes empresas farmacêuticas alemãs, que se uniram em um conglomerado chamado Interessengemeinschaft Farbenindustrie (Sindicato da Corporação da Indústria de Matérias Corantes) – IG Farben, que posteriormente originou um grande cartel químico (BURRESON e COUTEUR, 2006). Nessa época, a IG Farben possuía grandes pesquisadores, entre eles o alemão Gerhard Schrader, que na tentativa de produzir um inseticida com base em substâncias orgânicas e fósforo em sua composição, em 1936 descobriu acidentalmente o tabun e estabeleceu a fórmula geral dos organofosforados. Tal substância, atua na inibição da enzima acetilcolinesterase, responsável pela hidrólise da acetilcolina, composto que permite a transmissão dos impulsos nervosos entre as células nervosas e nas junções neuromusculares, além de apresentar uma alta letalidade, podendo ser fatais mesmo em pequenas quantidades e por esse motivo, o seu uso foi recomendado como arma química (DELFINO; RIBEIRO, 2008).

Devido a essas descobertas e com a ocorrência da Segunda Guerra Mundial, a pesquisa e a produção de armas químicas foram intensificadas proporcionando outras descobertas, como a fixação do azoto atmosférico sob a forma de amoníaco, por Fritz Haber. Essa descoberta possibilitou a criação de adubos químicos importantes, que segundo ele, poderiam ser usados no campo resultando em um aumento da produção agrícola, já que inibiria a ação de agentes externos, que compromettesse a produção (AGUIAR, 1990). Após esses conhecimentos, mais organossintéticos que até então eram utilizados como armas químicas, passaram a ter utilização no meio rural como fitossanitários, apesar de exibirem propriedades químicas causadoras de danos irreversíveis (FIGUEROA-VILLAR, 2009).

Com a popularização dos fitossanitários em plena Segunda Guerra Mundial, houve o desenvolvimento do diclorodifeniltricloroetano (DDT), um dos principais defensivos produzidos até então, que viabilizou uma revolução no que diz respeito ao controle de pragas na agricultura (ALAVANJA, 2014). O grande sucesso desse produto no combate às pragas fez com que novos compostos organossintéticos fossem produzidos, fortalecendo a grande indústria de agroquímicos presentes nos dias de hoje. O crescimento do uso desses compostos químicos somado a um processo de desenvolvimento e ampla difusão desses produtos ficou conhecido como a “revolução verde” (BULL & HATHAWAY, 1986; MOREIRA, 2002; COX, 2005). Entretanto, a conscientização sobre seus efeitos nocivos, deu-se a partir da década de 60, com a obra “Primavera Silenciosa”, escrito por Rachel Carson. Nessa obra se

trouxe à tona os efeitos adversos da utilização de pesticidas e inseticidas químicos sintéticos, principalmente o DDT (LOPES, 2016). Particularmente, o DDT tem a capacidade de penetrar na cadeia alimentar, além de acumular no tecido adiposo dos mamíferos, podendo levar a um risco de câncer e danos genéticos nos humanos. Além disso, este composto também atua em um número incontável de outras espécies e apresenta capacidade de permanecer agindo por anos no ambiente, mesmo quando diluído devido às chuvas naquele local (COLOSSO, 2003; ALAVANJA, 2014).

Em suma, é importante destacar que a grande parte dos fitossanitários vendidos atualmente podem contribuir para a ocorrência de intoxicações, desenvolvimento de doenças respiratórias, cardíacas, alérgicas, reprodutivas, degenerativas e até mesmo o câncer (ANVISA, 2011). Estas adversidades decorrem do fato de alguns componentes químicos, presentes nos agrotóxicos, apresentarem características genotóxicas e/ou mutagênicas, que os tornam capazes de interagir com o DNA, podendo promover nos organismos expostos, alterações numéricas ou estruturais nos cromossomos e ativação ou inativação de genes, anormalidade da produção de hormônios da tireoide, ovários e próstata, podendo até levar uma alteração do funcionamento do fígado (PIRES, 2005; CARNEIRO, 2012).

Diante desses dados, é crescente a preocupação de pesquisadores em relação à potencialidade dos agrotóxicos na contaminação do ambiente, dos animais e seres humanos, sendo necessário saber cada vez mais de tais produtos e as consequências de um uso prolongado.

2.3. Brasil e Fitossanitários

A exposição prolongada aos agrotóxicos pode causar uma série de doenças, como já foi mencionado anteriormente, dependentemente do produto que foi utilizado, do tempo de exposição e quantidade do produto que é absorvido pelo organismo (COLOSSO et al., 2003; ALAVANJA, 2013). A alta taxa de utilização dos fitossanitários tem uma origem atrelada ao processo de modernização da agricultura experimentada inicialmente na década de 50. Nessa época buscou-se utilizar substâncias químicas que foram desenvolvidas e utilizadas durante as guerras.

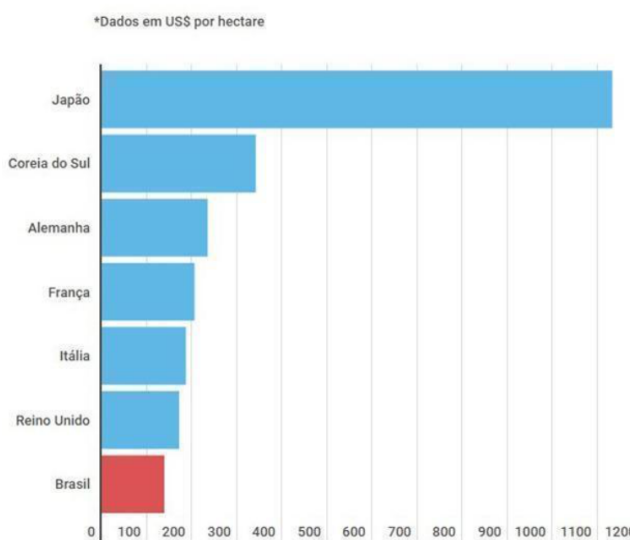
A partir dos anos 60, iniciou-se no Brasil um processo de urbanização da agricultura que se espelhou na experiência da “Revolução Verde” ocorrida nos Estados Unidos (SANTOS, 2013). Nesse processo, foram implementadas novas tecnologias de plantio e manejo agrícolas e uso extensivo de agentes químicos, para o controle de doenças, proteção

contra insetos e aumento da produtividade agrícola da região (SANTOS, 2013). Considerando-se os resultados obtido na chamada “Revolução Verde”, as grandes indústrias químicas multinacionais, vislumbraram o grande potencial agrícola brasileiro e a partir dos anos 80 houve a utilização massiva dos fitossanitários, principalmente no eixo sul-sudeste brasileiro que continua até os dias atuais (PERES, 1999).

Com a alta taxa de utilização de maquinários e fitossanitários, o Brasil tornou-se o sétimo maior consumidor de agrotóxicos por hectare do mundo (Figura 3), de acordo com dados da ANVISA. Atualmente, gasta-se 137 US\$/ hectare nas plantações do território brasileiro, resultando em um gasto de aproximadamente 560 reais por hectare (ANVISA, 2019). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), por causa das altas taxas de utilização desses produtos são registradas aproximadamente 20 mil mortes por ano decorrentes do consumo direto e indireto de agrotóxicos (PERES, 2003; SANTOS, 2013).

Figura 3. Maiores consumidores de agrotóxicos do mundo por hectare

Consumo por área cultivada



Fonte: FAO/Consultoria Phillips McDougall/UNESP/ANDEF

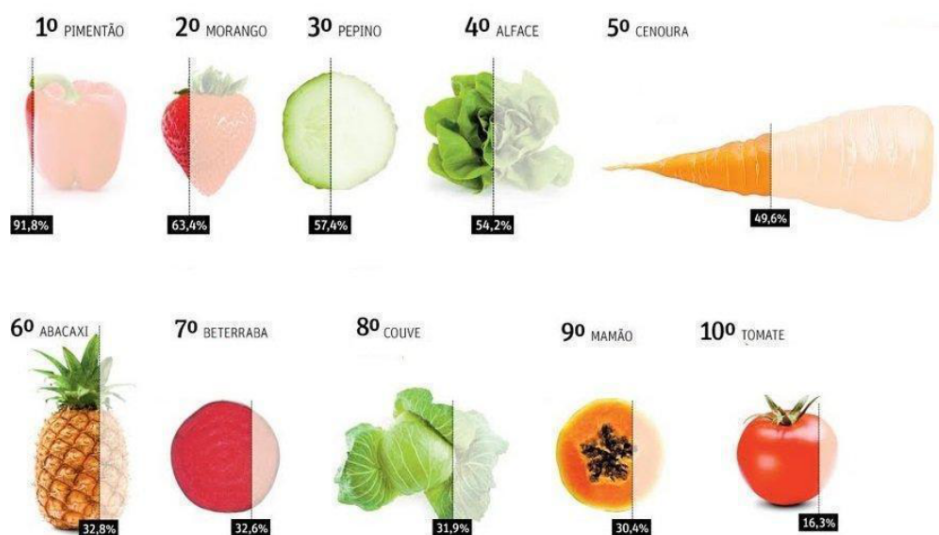
Fonte: ANVISA (2019)

Devido a elevada taxa de utilização de tais substâncias e o modelo do agronegócio, associado ao uso intensivo de agrotóxicos, ocorreram elevados níveis de contaminação humana e ambiental nas regiões agrícolas no Brasil. Devido a isso, gerou-se diversas consequências negativas para a comunidade local agrícola, além de ocasionar doenças e mortes que poderiam ser evitadas (PORTO, SOARES, 2012). Traduzidos em números, são a

cada ano, aproximadamente 100 mil pessoas intoxicadas por fitossanitários, das quais entre três mil são levadas a óbito (AUSUBEL, 2002).

Na tentativa de demonstrar tal contaminação de uma maneira mais prática podemos observar na Figura 4, a classificação de alimentos contendo porcentagens de fitossanitários, consideradas inadequadas para o consumo, segundo a ANVISA (ANVISA, 2018). Uma análise de amostras de alimentos coletadas em todos os estados do Brasil, realizada pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA, demonstrou que parte dos alimentos consumidos diariamente pelos brasileiros está contaminado pelos agrotóxicos. Desses aproximadamente 30% dos mesmos apresentaram ingredientes ativos não autorizados para o cultivo e/ ou ultrapassaram os limites máximos de resíduos que são considerados aceitáveis ao consumo humano e animal. Como é mostrado na Figura 4, o caso mais grave é o do pimentão com praticamente 92% das amostras irregulares, seguidos pelos 63% dos morangos, 57% do pepino, 54% das amostras de alface e 50% de cenoura. O tomate, que foi considerado um dos casos mais preocupantes, apresenta hoje contaminação de aproximadamente 16% das amostras (ANVISA, 2018).

Figura 4. Alimentos e sua porcentagem de agrotóxicos



Fonte: ANVISA (2018)

No Brasil, estima-se que dois terços da população estejam expostos a contaminação e aos efeitos nocivos desses agentes químicos em diferentes níveis. Boa parcela dessas

contaminações se dá pelo manuseio e pela aplicação do produto sem o uso de equipamentos de segurança adequados (BOLOGNESI, 2003; PERES, 2005). O grupo dos fitossanitários merece destaque pelo amplo uso em culturas que ocupam grandes extensões de terra tais como a cana-de-açúcar, milho, soja entre outras, que se utilizam segundo destes defensivos agrícolas muitas vezes de forma inadequada (IBAMA, 2018).

No geral, de acordo com suas estruturas químicas, os fitossanitários são classificados nos seguintes grupos: inseticidas de origem vegetal, inseticidas inorgânicos e inseticidas organossintéticos (LARINI, 1999; ANDREI, 2005). Especialmente os inseticidas organossintéticos pertencem, na sua maioria, aos grupos químicos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Parte desses fitossanitários apresentam ação neurotóxica nos insetos, além de serem imunotóxicos, hepatotóxicos aos humanos (ALAVANJA, 2014; LOPES, 2016). A Tabela 1 apresenta os ingredientes ativos presentes nos fitossanitários mais utilizados atualmente no Brasil com autorização da ANVISA. O número (nº) CAS refere-se a *Chemical Abstract Service*, ou seja, número de registro utilizado pela ANVISA.

Tabela 1. Lista de ingredientes ativos de grande consumo no Brasil com autorização da ANVISA

NOME	Nº CAS	GRUPO	Classificação Toxicológica (ANVISA)
2,4-D	94-75-7	Herbicida	Classe I Extremamente Tóxico
ACEFATO	30560-19-1	Inseticida	Classe III Medianamente Tóxico
ATRAZINA	1912-24-9	Herbicida	Classe III Medianamente Tóxico
CLORPIRIFÓS	2921-88-2	Inseticida	Classe II Altamente Tóxico
DIAZINONA	333-41-5	Inseticida	Classe II Altamente Tóxico
DIURON	330-54-1	Herbicida	Classe III Medianamente Tóxico
GLIFOSATO	1071-83-6	Herbicida	Classe IV Pouco tóxico
MALATION	121-75-5	Inseticida	Classe III Medianamente Tóxico
MANCOZEBE	8018-01-7	Fungicida	Classe III
METOMIL	16752-77-5	Inseticida	Classe I Extremamente Tóxico
FIPRONIL	120068-37-3	Inseticida	Classe II Altamente Tóxico
ETHIPROLE	181587-01-9	Inseticida	Classe III Medianamente Tóxico

Fonte: ANVISA (2019)

Portanto, percebe-se o vasto leque de substâncias químicas utilizados para a formulação dos fitossanitários utilizados atualmente no Brasil. Considerando-se a alta toxicidade, persistência e bioacumulação no meio ambiente de alguns desses fitossanitários, a sua utilização agrícola ou doméstica deve ser constantemente monitorada, de acordo com a Convenção da Organização das Nações Unidas para o Meio Ambiente Programa, realizada em 2014 (ALAVANJA, 2014).

2.4. A família dos fenilpirazóis

Os fitossanitários representam uma grande proporção dos compostos sintetizados pela indústria química para uso doméstico e na agricultura. No entanto, devido ao aumento da resistência das pragas aos antigos pesticidas e sua delicada implicação para a saúde pública, as famílias mais antigas estão sendo progressivamente substituídas por novas famílias de fitossanitários (BIJLEVELD VAN LEXMOND, 2015; BONMATIN, 2015). Dentre eles, os fenilpirazóis vêm se destacando na indústria agroquímica nos últimos dez anos, chegando a ser hoje uma das famílias mais utilizadas entre os inseticidas por todo o mundo (LAILIANG, 2007; WANG, X, 2017).

Os fenilpirazóis pertencem à classe dos organofosforados e foram desenvolvidos na década de 1980, introduzidos no mercado por volta dos anos 90, com indicação para uso na agricultura e na medicina veterinária (CHANDLER, 2004). Em menos de 10 anos de utilização, o fipronil, representante da família dos fenilpirazóis, foi considerado como uma das melhores alternativas dentre os fitossanitários e contemplou o posto dos químicos mais utilizados no mundo. Entretanto, considerando-se seus efeitos prejudiciais ao meio ambiente, o fipronil é atualmente alvo de discussões de órgãos governamentais e da comunidade científica na busca de sua suspensão de utilização mundial (PISA et al., 2015; SIMON-DELISO, 2015; VAN DER SLUIJS, 2015).

Neste sentido, Arthur (2002) e Caboni et al. (2003) realizaram estudos comparados sobre a eficiência de um novo membro da família fenilpirazol, o ethiprole. Segundo os autores, mesmo com sua menor lipofilicidade e menor toxicidade, o inseticida se apresentou basicamente tão efetivo quanto seu análogo fipronil. Então, em 2010 foi produzido o CURBIX® 200 SC, composto comercial do ethiprole, que segundo o fabricante conta com três grandes diferenciais: rápido efeito no controle de pragas, manutenção dos níveis de infestação da praga, além de pertencer a um novo grupo químico para controle de cigarrinhas

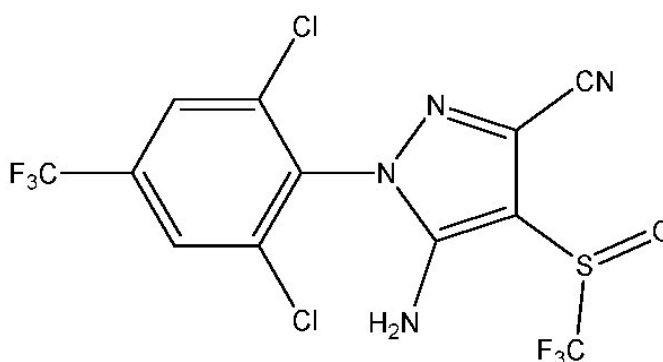
(*Mahanarva fimbriolata*). Este inseticida tem sido largamente utilizado em monoculturas como cana-de-açúcar, arroz, milho, algodão, batata e entre outros comercializado como um inseticida foliar e de solo, também utilizado no tratamento de sementes (USEPA, 2011; LAMBERTH; DINGES, 2012).

2.5. Fipronil e Ethiprole: Conhecendo o princípio ativo dos fitossanitários

2.5.1. Fipronil

O fipronil é um inseticida quiral altamente eficaz empregado mundialmente em diversas culturas, como arroz, batata, cana-de-açúcar, sorgo e trigo. Além disso, o fitossanitário é utilizado também em áreas de controle de pragas veterinárias e controle de higiene pública (SIMON-DELSO, 2015, WOLFAND, 2019). Utilizado em larga escala desde 1987, como o primeiro inseticida fenilpirazólico, inicialmente produzido pela companhia Rhône-Poulenc Agro (TINGLE, 2003). Sua estrutura molecular é apresentada abaixo (Figura 5) (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil) fenil] -4-[(trifluorometil)sulfinil] -H-pirazol-3-carbonitril).

Figura 5. Fórmula estrutural do fipronil



Fonte: <https://www.chemservice.com/fipronil-n-11971-100mg.html>

O fipronil pertencente à segunda geração de inseticidas que atuam no bloqueio do canal clorídrico do receptor GABA, e é comercialmente registrado sob diversas formas e denominações (PISA, 2015; SIMON-DELSO, 2015; VAN DER SLUIJS, 2015). Este fitossanitário é um inseticida cuja classificação toxicológica é de classe II (altamente tóxico), caracterizado como um composto de contato e ingestão, com modo de ação que varia de espécie para espécie. Em algumas espécies é ingerido, enquanto em outras o mecanismo de

ação se dá pelo contato com o fitossanitário (CABONI, 2013). Ainda, esse composto é aproveitado na clínica veterinária, sendo utilizado no tratamento de ectoparasitas de animais, como pulgas e carrapatos (IKEDA, 2001; TINGLE, 2003; THEODORIDIS, 2006).

Embora apresente uma alta eficácia como agente químico, existe ainda uma grande possibilidade de contaminação ambiental, aumentando assim o risco de exposição e contaminação de organismos não-alvo, incluindo os seres humanos (BONMATIN, 2014). Estudos de contaminação relataram a presença de fipronil em alimentos e em escoamento de águas residenciais (GUO, 2018; ZHANG, 2018) o que justifica a necessidade de monitoramento de sua utilização e dos riscos que esse composto oferece a animais e ao meio ambiente. Evidências já mostraram que este inseticida pode causar uma variedade de efeitos tóxicos como sequelas neurotóxicas, hepatotóxicas, nefrotóxicas, entre outras aos organismos não alvo (CHATON, 2002; BICHON, 2008; WANG, 2016). Esses organismos não-alvos podem apresentar diferenças em seus processos bioquímicos e na metabolização dos fitossanitários que desencadeiam processos tóxicos nesses mesmos organismos. Um exemplo disso, é o caso citado no artigo de Carrão (2019), o qual mostra que a enzima CYP3A4 do citocromo P450 apresentou alterações quando exposta ao composto fipronil. Verificou-se ainda, no mesmo estudo, que a citocromo P450 (CYP450) é membro de uma superfamília de hemoproteínas presentes nos seres vivos, cuja principal atividade é a de metabolizar xenobióticos presentes no organismo. Em humanos, o fígado é a principal fonte da enzima CYP450 e, portanto, principal órgão responsável pelas reações do metabolismo (ASHA, 2010). Além disso, essa enzima é responsável pelo metabolismo de quase 90% dos fármacos no mercado e pelo metabolismo da maioria dos pesticidas (ARORA et al., 2015; CHENG, 2018). Consequentemente, a presença de pesticidas no corpo pode alterar a atividade da enzima CYP450, seja pela diminuição ou pelo aumento de sua atividade que pode impactar diretamente a concentração de outros xenobióticos e causar efeitos adversos ao organismo.

Em um artigo recente, Cam (2018) demonstra novamente os diversos danos causados pela ação do fipronil no organismo. Entre os resultados, o autor apresenta a relação das concentrações do fitossanitário com o aumento da produção de placas amiloides A β 42/ A β 43 em ratos *Wistar*. Essas proteínas estão presentes nos neurônios e em grandes quantidades podem aumentar as chances do desenvolvimento da doença de Alzheimer. Sabe-se que o fipronil quando administrado oralmente nos animais (MERKOWSKY, 2016) é rapidamente metabolizado e pode se acumular nos tecidos adiposo e neural, o que justifica o aumento da produção de peptídeos A β 42 / A β 43 tóxicos, os quais podem se agregar, contribuindo assim para a propagação do processo da Doença de Alzheimer. (CAM; BONDIN, 2018).

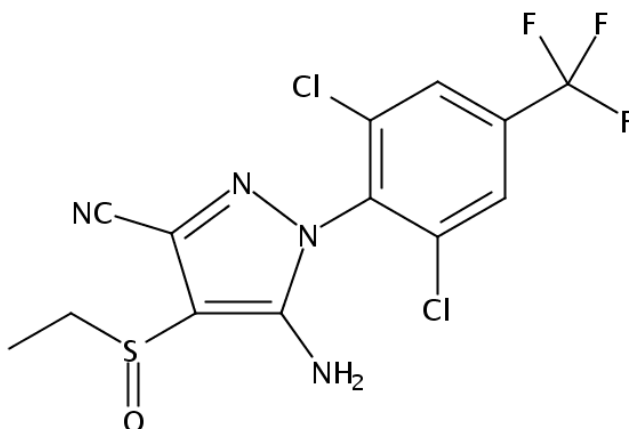
No conjunto, os estudos evidenciam a importância de se monitorar a utilização de fenilpirazóis presentes em alguns tipos de fitossanitários. Atualmente, essa classe de compostos químicos são alvos de críticas mundiais e algumas agências regulamentadoras e a comunidade científica buscam a redução na utilização dos mesmos.

2.5.2. Ethiprole

O ethiprole, 5-amino-1- [2,6-dicloro-4- (trifluorometil) fenil] -4-etilsulfinilpirazole-3-carbonitrila, é um novo inseticida da família dos fenilpirazóis. Muito semelhante ao fipronil na estrutura química, fotoquímica, atividade metabólica e atividade inseticida (CABONI, 2003), o ethiprole atua nos receptores GABA dos insetos bloqueando as sinalizações químicas, sendo assim amplamente utilizado em pragas de arroz e grãos armazenados (GUOSHENG, 2004). Consequentemente, vem sendo utilizado em vários países entre eles China, Japão e Brasil, como um agente alternativo ao fipronil, sendo igualmente efetivo no controle das pragas, mas com menor toxicidade (ARTHUR, 2002; CABONI, 2003; MERKOWSKY, 2016).

Desse modo, em 2010 foi lançado o CURBIX® 200 SC pela empresa Agro Bayer. Esse é o composto comercial do ethiprole, que segundo informações fornecidas pelo próprio fabricante, apresentam com grandes diferenciais em relação ao fipronil, como, por exemplo, a rápida atuação do fitossanitário no campo (USEPA, 2011; LAMBERTH; DINGES, 2012). O CURBIX® 200 SC é caracterizado pelo fabricante como um inseticida de contato e ingestão de classificação toxicológica III (medianamente tóxico). Este agente é comercializado para o controle de pulgões, gafanhotos, bicho mineiro, vaquinha, percevejos, cupins e gorgulhos como um inseticida foliar e de solo, e para o uso do tratamento de sementes (LAMBERTH; DINGES, 2012).

Figura 5. Fórmula estrutural do composto ethiprole



Fonte: <https://www.chemservice.com/ethiprole-n-12870-100mg.html>

Devido a ação e proximidade estrutural com o fipronil e de sua recente inserção no mercado agrícola, há infelizmente uma escassez de dados encontrados sobre este composto. Caboni (2003) realizou um dos poucos estudos publicados que compara a ação dessas duas substâncias com base na potência inseticida e na sua ação no receptor do ácido γ -aminobutírico (GABA) dos insetos. No estudo foi possível observar que a ação metabólica, frente a utilização do fitossanitário, aconteceu de forma mais rápida no ethiprole do que no fipronil, atestando assim uma maior toxicidade (CABONI, 2003). Corroborando os resultados da pesquisa acima, Tanaka (2017) realizou um estudo baseado em parâmetros neurocomportamentais de camundongos. No estudo foi demonstrado que um tratamento dose-dependente do ethiprole, foram induzidos vários efeitos adversos nos comportamentos destes camundongos, os quais tiveram perda de movimentos de alguns membros. (TANAKA, 2017). Assim, os resultados sugerem, que o ethiprole não é uma substituição tão positiva, da maneira que se esperava.

Portanto, considerando-se os efeitos tóxicos dos fitossanitários e o potencial dos mesmos no desenvolvimento de patologias e no desequilíbrio sistêmico de diversos animais (alvos ou não), é pertinente a realização de um estudo mais detalhado sobre a atuação dos fitossanitários fipronil e ethiprole no metabolismo de células hepáticas. Para isso células da linhagem hepática HEPG2, derivadas de hepatocarcinoma humano foram escolhidas para serem utilizadas como modelo, baseando-se no fato de serem altamente metabolizadoras (QIU et al, 2015; KNASMULLER et al, 2004). Além disso, as células HEPG2 mantêm algumas características comuns aos hepatócitos humanos normais, como a expressão de receptores

específicos da superfície celular, síntese de secreção de proteínas plasmáticas e algumas enzimas de metabolização relacionadas à ativação e detoxificação de substâncias mutagênicas e genotóxicas (HOSHINA et al, 2013) que as caracterizam com um bom modelo de investigação, para a avaliação dos efeitos dos fitossanitários no metabolismo lipídico, visto que podem induzir o aparecimento de quadros pró-esteatóticos, nos trabalhadores, contribuindo ainda mais com as estatísticas mundiais de pessoas acometidas por doenças hepáticas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Avaliar o potencial indutor de esteatose hepática dos fitossanitários CURBIX® 200 SC e REGENT® 800 WG na linhagem celular HEPG2

3.2. Objetivos Específicos

- Analisar a citotoxicidade dos fitossanitários CURBIX® 200 SC e REGENT® 800 WG em células hepáticas de linhagem HEPG2;
- Avaliar o efeito dos fitossanitários em estudo na modulação do metabolismo lipídico em análises biofísicas, bioquímicas e celulares;
- Fazer uma revisão da literatura: fitossanitários e o uso indiscriminado no Brasil.
- Elaboração de um folder educativo sobre a utilização dos fitossanitários. (Anexo 1 – Folder – O que você precisa saber sobre os fitossanitários).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura Celular

Células da linhagem celular HEPG2 (ATCC® HB-8065™) derivadas de hepatocarcinoma humano foram crescidas em meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM) na presença de 10 % soro bovino fetal (SBF) e antibióticos. As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera contendo 5 % de CO₂. Ensaio posteriores foram realizados, utilizando-se células incubadas com diferentes concentrações de REGENT® 800 WG e CURBIX® 200 SC por um intervalo de 24 h em estufa de CO₂ a 37 °C.

4.2. Ensaio de citotoxicidade (MTT)

Para se avaliar o potencial citotóxico dos fitossanitários REGENT® 800 WG e CURBIX® 200 SC foram realizados ensaios se utilizando a técnica descrita em Mosmann (1983), utilizando-se o reagente sal de tetrazólio, 3- (4,5-dimetil-tiazol-2-il) -2,5-diphenyltetrazo-Lium brometo (MTT, Merck-Millipore). Para tal, 5×10^3 células foram crescidas na presença de 10 % de FBS em microplacas de 96 poços durante 24 horas, para que houvesse a adesão celular antes do tratamento ou não com os fitossanitários. Posteriormente, preparou-se uma solução estoque dos fitossanitários (1 mM) em água, seguida de esterilização por filtração e os reagentes foram adicionados às células em cultura celular (0,2 μ M, 2 μ M, 20 μ M e 100 μ M). Em seguida as culturas celulares foram incubadas em estufa por um intervalo de 72 horas, nas condições de cultivos regulares. Após o período de incubação, meio de cultura fresco contendo solução de MTT na concentração de 0,5 mg/ ml foi adicionado em cada poço da microplaca contendo as culturas celulares. As culturas foram novamente incubadas a 37 °C overnight até a metabolização do composto e a formação dos cristais de formazana. Em seguida foi adicionado 150 μ L de DMSO puro para solubilizar os cristais, os resultados dos ensaios foram avaliados em leitor de ELISA de microplaca com absorbância a $\lambda = 570$ nm. Com esse procedimento pode-se inferir a viabilidade celular frente a incubação com os fitossanitários, quando em comparação com a condição considerada controle experimental, aonde não foram adicionados fitossanitários. Os tratamentos foram feitos em triplicatas: 1. Poços da microplaca contendo somente meio de cultura; 2. Células cultivadas, mas não incubadas com os fitossanitários. Com esse ensaio, objetivou-se encontrar uma concentração de cada um dos fitossanitário que garantisse a sobrevivência de pelo menos 70% de células em cultura visando as análises posteriores.

4.3. Microscopia de fluorescência: a marcação de lipídeos através da coloração com Vermelho do Nilo (*Nile Red*)

Para se analisar o perfil das gotículas lipídicas intracelulares, análises de microscopia de fluorescência foram realizadas. Para as análises, $1,7 \times 10^4$ células foram semeadas sobre lamínulas circulares em placas de 24 poços, nas concentrações de 0,2 μ M e 2 μ M de ambos os fitossanitários, em condições regulares de 37°C em 5% de CO₂. As células foram incubadas com os fitossanitários por um intervalo de 72 horas, até atingirem aproximadamente 70% de confluência. Em seguida, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído a 1,34%, e posteriormente o núcleo foi corado com o marcador fluorescente DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato, Merck-Millipore) na concentração final de 3,33 ng/ mL durante 3

minutos, e as gotículas de lipídios coradas com solução denominada Vermelho do Nilo (Thermo Fisher Scientific) na concentração estoque de 20 mg/ mL, seguindo metodologia padronizada em laboratório. Em seguida, as lamínulas foram analisadas com o microscópio de fluorescência BX51 OLYMPUS, utilizando-se filtros apropriados. Para a quantificação dos lipídios foi utilizado o software ImageJ (<https://imagej.nih.gov>) e em seguida a intensidade desses lipídeos foi dividida pelo número total de células em cada experimento.

4.4. Análise de lipídeos totais

Para avaliação dos lipídeos totais $1,1 \times 10^5$ células HEPG2 foram cultivadas em placas de 6 poços, sob condições normais em estufa a 37°C a 5% de CO₂, nas mesmas condições descritas do item 4.2. Após atingirem 80% de confluência, as células foram coletadas e ressuspensas em 100 uL de PBS (Solução tampão fosfato-salino). O volume total foi depositado sobre uma lâmina de vidro e levado a uma estufa a 37 °C para secagem por 2 dias. Após a secagem, foram realizadas leituras das amostras em aparelho Nicolet iS10 FT-IR Spectrometer (Thermo Fisher Scientific) na luz infravermelha -32 scans, e o espectro de cada amostra foi obtido em absorbância. Os picos utilizados nas análises foram os da amida II (1560-1530 cm⁻¹) e 4 picos correspondentes aos lipídeos (2956, 2920, 2870, 2850 cm⁻¹) de acordo com Stuart (2004) e Sakane et al. (2013). Os cálculos foram realizados somando a área dos 4 picos correspondentes aos lipídeos e dividindo esse valor pela área do pico da amida II.

4.5. Análises Estatísticas

Análises estatísticas foram geradas através do programa GraphPad versão 5.0 (Prism Inc.), adotando o valor $p < 0,05$ de significância estatística, para confirmar as diferenças entre as médias dos tratamentos, utilizando cálculos de variância simples (One-Way ANOVA). Além disso, testes post-hoc de Tukey foram realizados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise do ensaio de citotoxicidade (MTT) com as diferentes concentrações dos fitossanitários ethiprole e fipronil

O ensaio de MTT é conhecido por ser um ensaio de viabilidade celular, sendo um método colorimétrico rápido e barato, utilizado para avaliar a atividade metabólica, proliferação e citotoxicidade celular frente a compostos naturais e/ou sintéticos incubados com as células (MOSMAN, 1983). Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por

endocitose. No interior celular é modificado através da redução do anel tetrazólico, resultando na formação de cristais de formazan de cor azul nas cristas mitocondriais das células vivas, refletindo assim o número de células viáveis presentes no ensaio realizado (LIU et al, 1997).

A Figura 6 ilustra o ensaio e os resultados obtidos nos experimentos. A Figura 6A representa o ensaio visto a olho nú, e na 6B são visualizados os cristais de *formazan* que foram formados e após 72 horas de incubação das células com ambos os fitossanitários analisados, após a redução anel tetrazólico presente no sal de MTT. Os resultados após o final do experimento foram avaliados em leitor de ELISA de microplaca com absorbância a $\lambda = 570$ nm. A Figura 7 apresenta os resultados tabulados em gráficos pelo programa *GraphPad Prism 5*.

Figure 6 – Imagem do ensaio de citotoxicidade (MTT). A) A figura apresenta o número de células vivas de acordo com a concentração dos fitossanitários (CURBIX® 200 SC e REGENT® 800 WG) utilizados na linhagem celular HEPG2. B) Imagem dos cristais de formazan formados no ensaio de citotoxicidade (MTT).

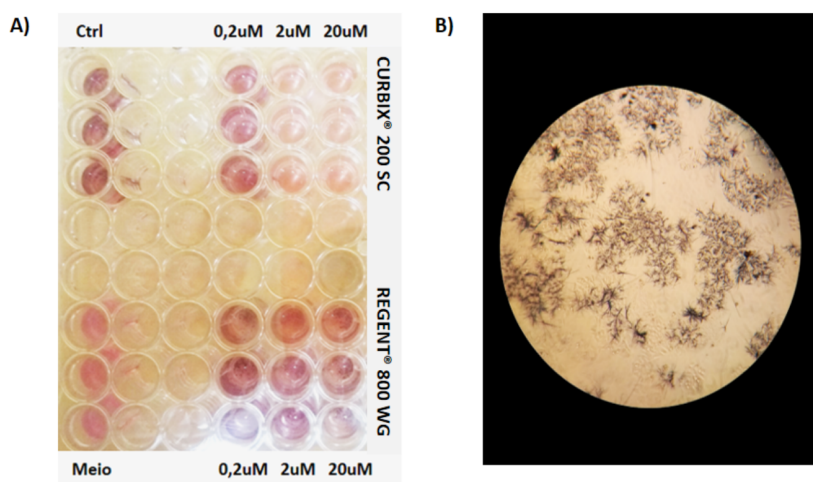
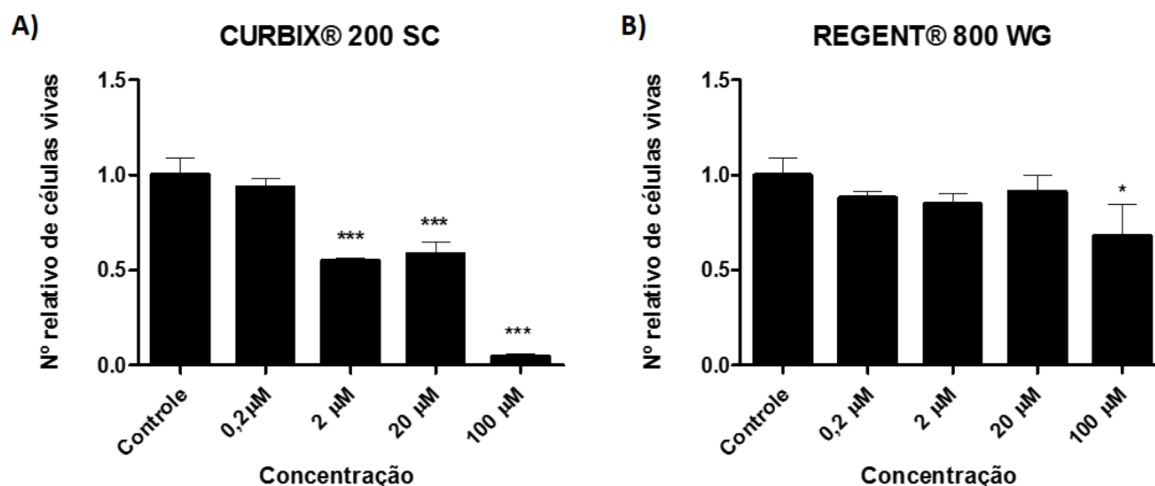


Figure 7 – Ensaio de citotoxicidade (MTT). A) CURBIX® 200 SC e B) REGENT® 800 WG. Análise estatística realizada em *One way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey, onde *** $p \leq 0.0005$, ** $p \leq 0.005$ e * $p \leq 0.05$.



Baseado nos resultados obtidos e apresentados na Figura 7A, foi possível verificar que as células tratadas com o fitossanitário CURBIX® 200 SC nas concentrações 2 µM e 20 µM, apresentaram uma diminuição significativa na quantidade de células viáveis, em comparação às células utilizadas na condição controle. A concentração de 100 µM praticamente matou todas as células, inviabilizando a sua utilização nos ensaios futuros. Considerando-se as concentrações 2 µM e 20 µM a viabilidade das culturas ficou em aproximadamente 55%, o que viabilizou as análises subsequentes. Esse resultado corrobora com dados encontrados no estudo realizados recentemente por Sheng et al (2019), que demonstrou a neurotoxicidade do composto em abelhas *Apis mellifera* L., mesmo em pequenas doses (7,99 a 13,59 nM), levando posteriormente à morte neural.

No que diz respeito ao REGENT® 800 WG (Figura 7B), este apresentou citotoxicidade reduzida às células nas concentrações em que foram incubadas. Em relação ao controle, as diferentes culturas apresentaram viabilidade média de aproximadamente 88%, quando incubadas com o fitossanitário. Entretanto, os resultados obtidos, contrariam o que foi descrito na pesquisa de Vidau (2011), que utilizou células de adenocarcinoma epitelial da linhagem Caco-2 e demonstrou que o fipronil induziu processos apoptóticos nas células nas concentrações em que foram incubadas (25 µM a 150 µM). Esses eventos ocorreram devido a alterações celulares como o colapso do equilíbrio do potencial da mitocôndria, condensação do núcleo, liberação do citocromo c e ativação da caspase-3, sendo estes, agentes relacionados ao processo de apoptose celular (VIDAU, 2011). Além disso, estudos relacionados ao composto fipronil, demonstram que quando em contato ou ingerido pelos

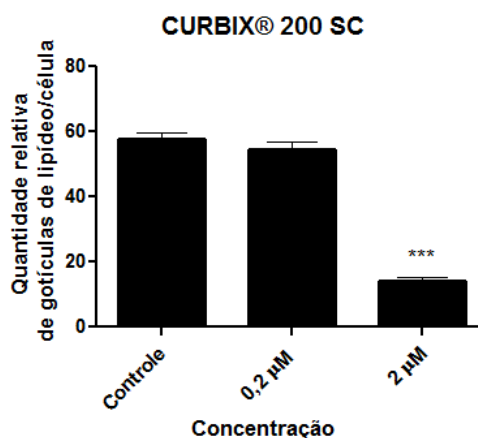
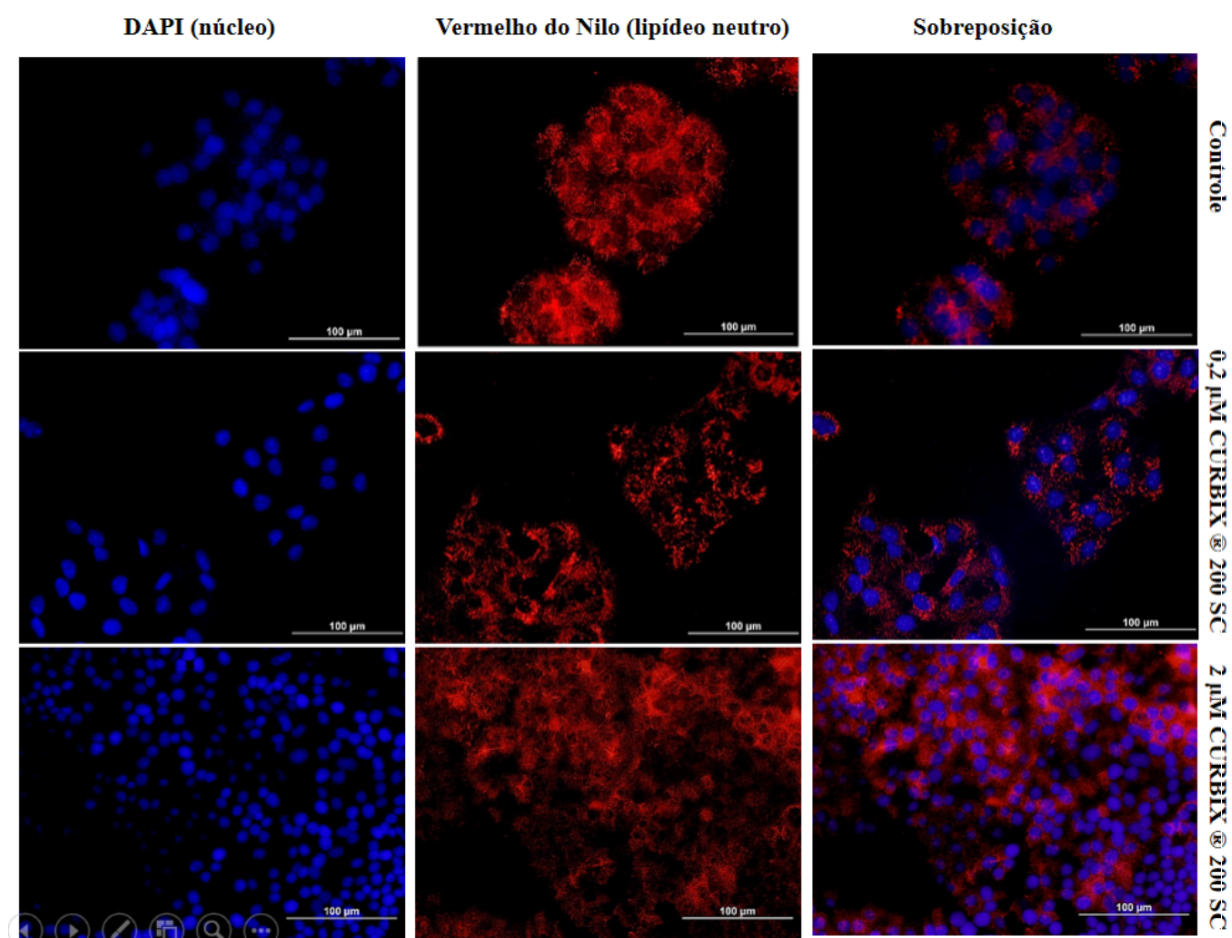
humanos e/ ou animais, o fitossanitário apresenta ação neurotóxica, através da inibição da produção de ATP e do receptor GABA, eventos que podem levar a quadros de apoptose celular (VIDAU, 2011; QU, 2016; KARTHEEK, 2018). Portanto, as diferenças encontradas nos diferentes estudos provavelmente se correlacionam com o metabolismo inato de cada célula e/ ou organismo analisado.

Baseado nos resultados obtidos em nossas análises, as concentrações de 0,2 μM e 2 μM foram escolhidas para serem analisadas nos ensaios subsequentes, utilizando-se ambos os fitossanitários, considerando-se que a concentração de 0,2 μM não alterou a viabilidade celular

5.2. Análise de microscopia de fluorescência: a marcação de lipídeos pela coloração com Vermelho do Nilo (Nile Red).

Para se avaliar os efeitos dos fitossanitários no metabolismo lipídico das células da linhagem HEPG2 foram realizados ensaios de microscopia de fluorescência, utilizando-se a técnica de coloração do Vermelho do Nilo. Este fluoróforo, marca gotículas de lipídeo neutras presentes no interior da célula. A contra coloração com o marcador nuclear DAPI viabiliza a análise da morfologia nuclear, que pode nos inferir processos de estresse e toxicidade celular. Os resultados da microscopia são apresentados na Figura 8 e 9 e todos apresentam a mesma magnitude de amplificação (100 μm). As concentrações de fitossanitários utilizadas são apresentadas nas imagens.

Figura 8 - Imagem microscopia de fluorescência com a técnica Vermelho do Nilo de células HEPG2, controle e incubadas com o fitossanitário CURBIX® 200 SC na concentração de 0,2 μM e 2 μM e com aumento de 100 μm e coradas com DAPI (núcleo em azul), Vermelho do Nilo (gotículas lipídicas em vermelho) e imagens sobrepostas. B) Quantificação da sobreposição. Os gráficos foram feitos utilizando-se o software *Graph Pad Prism 5*. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de Tukey, onde *** $p < 0.0005$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$.

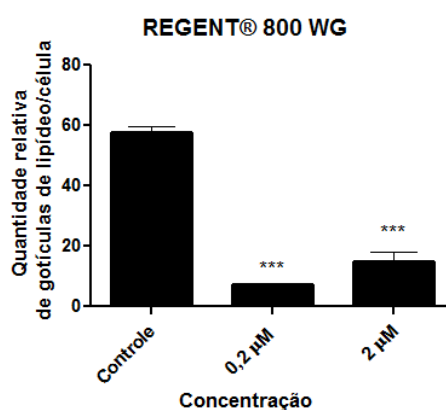
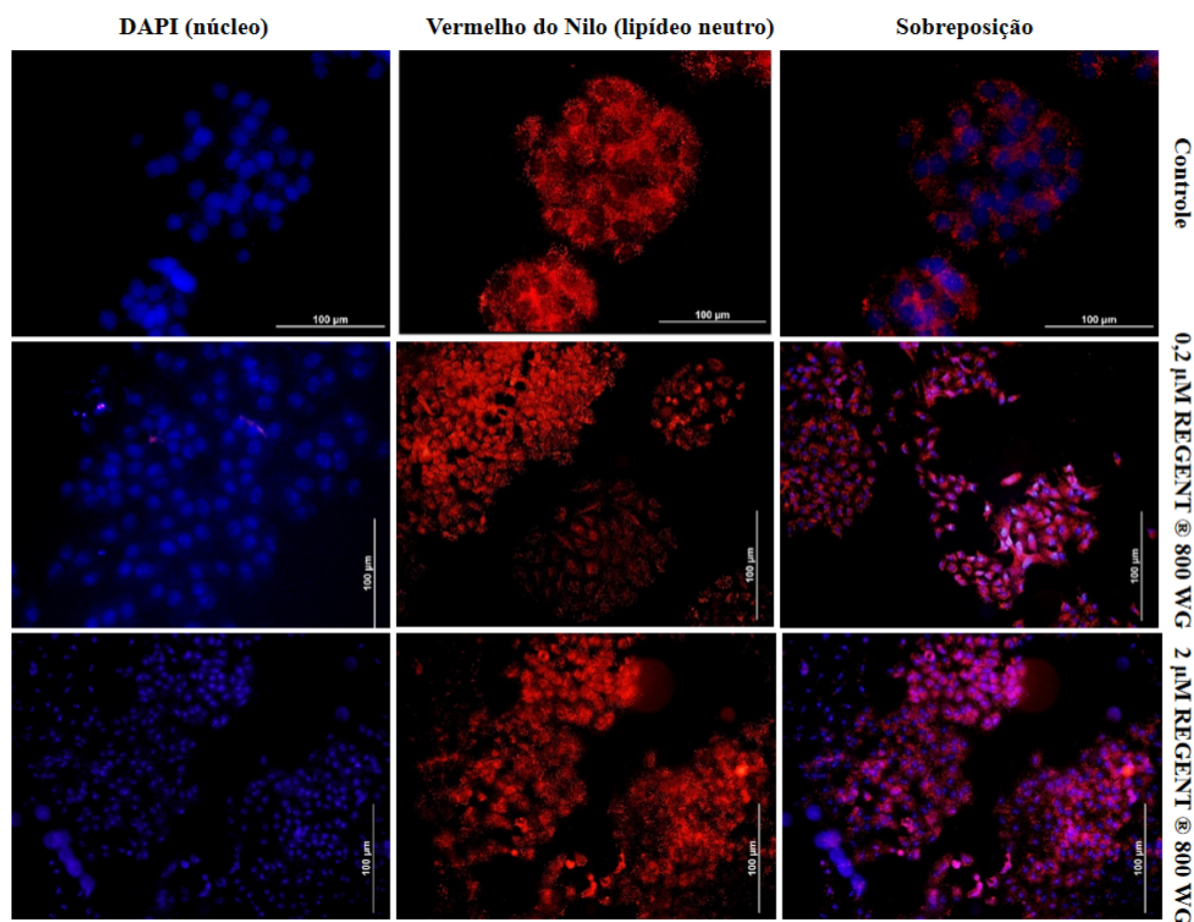


A análise da Figura 8 sugere clara alteração comportamental no metabolismo celular frente a utilização do fitossanitário de maneira dose-dependente. Na concentração 0,2 µM as células se mantêm semelhantes ao controle, tanto em número de células por campo microscópico analisado, como em relação ao padrão das gotículas lipídicas presentes nas culturas. Entretanto, as análises das imagens para as células incubadas com 2 µM do fitossanitário CURBIX® 200 SC demonstram um aumento no número de células e uma redução do tamanho celular, em cada um dos campos analisados, sugerindo alterações

metabólicas nas células. A quantificação relativa de lipídeos/ célula no grupo incubado com 2 μM do composto químico demonstrou uma diminuição de aproximadamente 75% da quantidade relativa de lipídeos neutros em relação ao controle. Somando-se a isso, foi observado nos ensaios de MTT (Figura 7) uma redução da viabilidade celular nas células HEPG2 incubadas com o fitossanitário na referida concentração. Com isso, podemos inferir que na concentração de 2 μM , nos nossos ensaios, o CURBIX® 200 SC está sendo tóxico, levando a alterações metabólicas que ativem processo oxidativos e/ ou inibam a síntese de novo de lipídeos, pois existe uma redução dos lipídeos neutros, que são considerados lipídeos de reserva energética. Por outro lado, em Vidau et.al (2009), estudos realizados utilizando-se fitossanitários o ethiprole, na concentração de 0,2 μM , não induziu nenhuma mudança na proliferação celular ou no metabolismo de lipídeo. Infelizmente, artigos publicados relacionados ao ethiprole e sua ação no metabolismo de lipídeo são escassos, tornando assim de difícil compreensão os resultados encontrados neste trabalho. Cabe uma avaliação mais detalhada, considerando-se que é amplamente divulgado a sua menor toxicidade.

Para as células incubada com o fitossanitário REGENT® 800 WG, as análises de microscopia são apresentadas na figura abaixo (Figura 9).

Figura 9 – Imagem microscopia de fluorescência com a técnica Vermelho do Nilo de células HEPG2, controle e incubadas com o fitossanitário REGENT® 800 WG na concentração de 0,2 μM e 2 μM , com aumento de 100 μm e coradas com DAPI (núcleo em azul), Vermelho do Nilo (gotículas lipídicas em vermelho) e imagens sobrepostas. B) Quantificação da sobreposição. Os gráficos foram feitos utilizando-se o software *Graph Pad Prism 5*. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de Tukey, onde *** $p < 0.0005$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$.



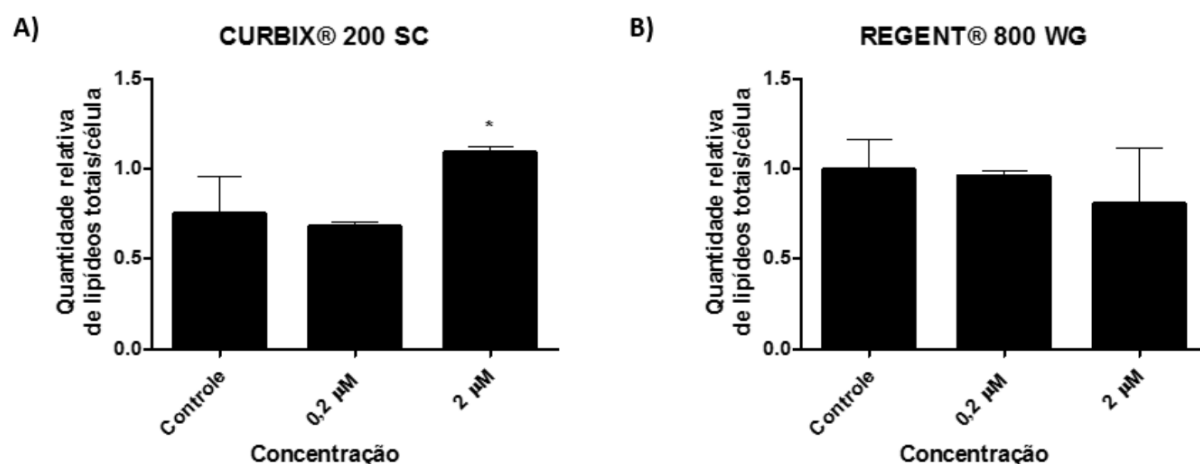
A análise dos resultados aponta claramente que nas duas concentrações de fitossanitários avaliadas nas culturas celulares (0,2 µM e 2 µM) ocorreu uma diminuição de aproximadamente 85% na quantidade relativa de gotículas de lipídicas no interior dessas células quando comparadas ao controle. Paralelamente, observa-se, também, uma redução no tamanho celular e um aumento no número das células presentes por campo microscópico. Por outro lado, o REGENT® 800 WG não alterou significativamente a viabilidade celular nas concentrações em análise (Figura 7) o que sugere, que apesar do estresse metabólico que provavelmente ocorre, a célula desencadeia cadeias bioquímicas que a mantém viva.

Ao longo dos anos, diversos estudos foram realizados para que se comprovasse o efeito tóxico do princípio ativo fipronil no organismo, dando-se maior atenção aos danos hepáticos, considerando-se a função detoxificadora do órgão (SAMANTA, 2016). Entretanto, contrapondo o que foi visto em nossos ensaios, um estudo realizado por Oliveira (2010) demonstrou que, os hepatócitos incubados com concentrações crescentes do composto fipronil induziram o aumento de lipídeo em seu interior (OLIVEIRA, 2010; FERREIRA, 2010). Esse aumento de gotículas de lipídeo no citoplasma é conhecido como esteatose, a qual em muitos casos, pode ser uma alteração inicial de algum trauma ocorrido com o organismo podendo levar a condições patológicas mais sérias, como uma inflamação crônica do tecido hepático, e até mesmo um caso de fibrose hepática, caso a injúria permaneça (TRAUSER; ARRESE; WAGNER, 2010). Outras pesquisas relacionadas a este composto indicam que animais expostos ao fipronil apresentam desorganização hepática, uma vacuolização citoplasmática e aumento excessivo de lipídios no interior das células (CARVALHO e COLARES-BUZATO, 2005; GRIPP, 2017). O aumento tanto da taxa de lipídios, pode ser o resultado de uma sobrecarga metabólica na tentativa de inativar agentes tóxicos presentes no interior da célula (GUÉL, 2004; GRIPP, 2017). Esse aumento de lipídios/ células não foi observado em nossas análises, o que merece atenção futura.

5.3. Análise da mensuração de lipídeos totais

Para se avaliar os efeitos dos fitossanitários na quantidade relativa de lipídeos totais presentes no interior das células HEPG2 tratadas com diferentes concentrações (0,2 μM e 2 μM) dos fitossanitários foi utilizada a técnica de FT-IR. Nas células. A técnica de FT-IR é uma análise biofísica que quantifica ligações moleculares e atômicas presentes nos átomos de uma molécula, específica. Cada tipo de composto orgânico apresenta seu padrão de ligação molecular que os classificam de maneira singular. A Figura 10 apresenta os resultados.

Figura 10 – Gráfico da mensuração de lipídios totais considerando-se a viabilidade celular. Análise estatística realizada em One way ANOVA seguido pelo teste de *Tukey*, onde *** $p \leq 0.0005$, ** $p \leq 0.005$ e * $p \leq 0.05$.



A análise da Figura 10A mostra que a concentração de 2 µM do CURBIX® 200 SC, aumenta os lipídeos totais no interior da célula HEPG2. Nessa concentração, foi possível observar que houve um aumento significativo de aproximadamente 30% dos lipídeos totais, quando comparados às concentrações com as células não incubadas com o fitossanitário. Somando-se a isso, foram observados nos experimentos realizados anteriormente (MTT e Microscopia de fluorescência com Vermelho do Nilo) que o ethiprole também induziu alterações no metabolismo da célula nas mesmas concentrações deste ensaio. No que se relaciona ao ensaio de MTT, houve uma diminuição de 55% das células viáveis, sendo, portanto tóxico. Paralelamente, houve uma diminuição nas reservas de energia observados nas análises de microscopia. O conjunto dos resultados sugere toxicidade do CURBIX® 200 SC: diminui a viabilidade e as reservas energéticas, sugerindo forte atuação em processos oxidativos (gasto das reservas energéticas), que podem ser decorrentes do próprio processo de toxicidade ao mesmo tempo que desregula a síntese lipídica, pois ocorre um aumento de lipídeos totais, sugerindo atuação negativa do fitossanitário. Essas análises contrariam novamente os estudos publicados que afirmam que este composto apresenta menor citotoxicidade ao seu análogo fipronil (MERKOWSKY, 2016). Cabe uma melhor investigação da atuação de tal fitossanitário em trabalhadores expostos por longo tempo ao mesmo.

A Figura 10 B apresenta a mensuração total de lipídeos nos grupos celulares incubados ou não com o REGENT® 800 WG. As análises não mostraram nenhuma alteração significativa em relação aos lipídios totais, nas concentrações em que foram testadas. Contrapondo o que foi observado no ensaio do Vermelho do Nilo, no qual houve uma grande diminuição na quantidade relativa dos lipídeos neutros ali presentes em ambas as

concentrações utilizadas com o fipronil. Lipídeos neutros são estoques energéticos, como abordado anteriormente, por outro lado, os lipídeos totais fazem parte da própria estrutura celular e de processos de sinalização metabólica. Considerando-se que a viabilidade celular das células incubadas com o fipronil foi alta, não apresentando alterações significativas entre os grupos, percebe-se que esse fitossanitário não desencadeou grandes alterações metabólicas a ponto de matar a células, embora tenha consumido reservas energéticas, sugerindo mecanismos de estresse celular, porém, com menor intensidade que o desencadeado pelo CURBIX® 200 SC, pelo menos nas 72 horas iniciais de incubação com o fitossanitário, como apresentado nesse estudo. Para explicar essa diminuição das reservas de energia, o estudo de Elzaki (2017) demonstram alterações na via da glicólise, o que pode ter contribuído para a diminuição das gotículas em nossos ensaios, uma vez que essa reserva energética foi utilizada para a manutenção da viabilidade celular. Cabem certamente novas investigações sobre a toxicidade do fitossanitário, para uma explicação mais detalhada de sua atuação mecanística no metabolismo energético celular.

6. CONCLUSÕES

Agrotóxicos conhecidos recentemente como fitossanitários, são considerados extremamente agressivos ao meio ambiente e à saúde humana. Atualmente utilizados majoritariamente na agricultura, estes compostos foram desenvolvidos durante as duas guerras mundiais e seus princípios ativos utilizados inicialmente como armas químicas (AZEVEDO, 2011). Naquela época, viu-se que os agentes químicos empregados nas guerras apresentavam-se tóxicos aos seres humanos, além de provocarem lesões imediatas e estarem associados a casos de esteatose hepática e outros problemas sistêmicos a longo prazo (ARAUJO, 2009). Dentro deste contexto, neste estudo foram utilizados os fitossanitários CURBIX® 200 SC e REGENT® 800 WG, que apresentam respectivamente, o ethiprole e o fipronil, substâncias análogas como princípios ativos destes compostos, na linhagem celular HEPG2, na tentativa de entender um pouco mais o mecanismo de atuação destes compostos nas células humanas e seus efeitos.

Com os resultados obtidos, foi possível verificar que o fitossanitário CURBIX® 200 SC apresentou grande citotoxicidade às células humanas incubadas nas menores concentrações (2 μ M e 20 μ M) levando a uma diminuição significativa na quantidade células em comparação as presentes na condição controle. Por outro lado, nas mesmas concentrações testadas com o REGENT® 800 WG, foi visto que, diferente do que se esperava, este apresentou citotoxicidade reduzida às células que foram incubadas, em comparação com seu

análogo, o ethiprole. Somado a isso, ensaios para mensuração de lipídios neutros e totais presentes no interior das células foram realizados sequencialmente e demonstraram que na concentração de 2 μM do fitossanitário CURBIX® 200 SC, houve uma diminuição dos lipídeos neutros, aumento no número de células e redução do tamanho celular, além do aumento dos lipídeos totais no interior celular. Essas alterações sugerem a presença de alterações metabólicas nas células e efeitos citotóxicos que podem ativar processos oxidativos, fomentando os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular. Além disso, a análise dos resultados utilizando o fitossanitário REGENT® 800 WG mostrou claramente que nas duas concentrações de fitossanitários avaliadas nas culturas celulares (0,2 μM e 2 μM) levou a uma diminuição significativa na quantidade relativa de gotículas de lipídicas no interior dessas células quando comparadas ao controle. Entretanto, como foi visto no ensaio de viabilidade celular e de mensuração dos lipídios totais, não houve alterações significativas, nas concentrações em que foram analisadas, sugerindo, que apesar do estresse metabólico que provavelmente ocorre, a célula desencadeia totais bioquímicas que a mantém viva e mantém o nível de lipídeos totais em seu interior.

Portanto, o conjunto dos resultados obtidos neste estudo através dos ensaios realizados, o composto comercial CURBIX® 200 SC, apresentou-se citotóxico às células HEPG2 nas concentrações testadas, quando comparadas ao seu análogo fipronil, presente no composto do REGENT® 800 WG, já que levou a uma diminuição da viabilidade celular e de suas reservas energéticas, sugerindo uma forte atuação em processos oxidativos, que podem ser decorrentes do processo de toxicidade ao mesmo tempo que desregula toda a síntese lipídica (MERKOWSKY, 2016). Infelizmente, como já dito anteriormente, artigos publicados relacionados ao ethiprole e sua ação no metabolismo de lipídio são escassos, tornando assim de difícil compreensão alguns resultados encontrados neste trabalho, cabendo assim uma melhor investigação da atuação de tal fitossanitário em trabalhadores expostos por longo tempo ao mesmo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHI, M; KARAMI-MOHAJERI, S. Abdollahi, M. **Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A systematic review.** Human & Experimental Toxicology. 2010.
- ALAVANJA, M C. **Characteristics of persons who self-reported a high pesticide exposure event in the Agricultural Health Study.** Environ Res. p. 180-186. 2014.
- ARSLAN, N. **Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota.** World Journal Of Gastroenterology, v. 20, n. 44, 2014.
- AUGUSTO, Lia. **Exposição ocupacional e organoclorados em industria quimica de Cubatão - Estado de São Paulo: avaliação do efeito clastogenico pelo teste de Micronucleos.** Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciencias Medicas, Campinas, SP. 2015. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/308627>>. Acessado em: 20 de dezembro de 2019.
- AUSUBEL, D. P. **A aprendizagem significativa: a teoria de David Ausubel.** São Paulo: Moraes, 2002.
- BATALLER, R. **Liver Fibrosis in Alcoholic Liver Disease.** Seminars In Liver Disease, v. 35, n. 02, p. 146-56, 2015.
- BISSELL, D. **Inflammation and Hepatic Fibrosis.** Seminars In Liver Disease, v. 30, n. 03, p. 211-4, 2010.
- BRAUMBECK, T. **Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo an in vitro sublethal exposure to xenobiotics – structural biomarkers of environmental contamination.** Fish Ecotoxicology. Birkhäuser: Berlin, p. 61-140.1998.
- CABONI, P; SAMMELSON, R, R; CASIDA, J, E. **Phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABAergic action: ethiprole compared with fipronil.** J. Agric. 2003.
- CABONI, R, E; **Phenylpyrazole Insecticide Photochemistry, Metabolism, and GABAergic Action: Ethiprole Compared with Fipronil.** Environmental Chemistry and Toxicology Laboratory, Department of Environmental Science, Policy and Management, University of California, Berkeley, California. 2003.
- CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M. et al. **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde.** Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.

CHANDLER, G.T.; CARY, T.L.; VOLZ, D.C. et al. **Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96- well microplate format**. *Enviroment. Toxicol. Chemistry*, v.23, p.117-124, 2004.

COLASSO, Camilla; AZEVEDO, Fausto Antônio de; **Riscos da utilização de Armas Químicas. Parte I - Histórico**. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 137- 172, 2011.

COLOSSO, C; TIRAMAMI, M; MARONI, M. **Neurobehavioral effects of pesticides: state of the art**. *Neurotoxicology*. Vol. 24. p. 577-591. 2003.

COREY, K. E.; KAPLAN, L. M. **Obesity and Liver Disease**. *Clinics In Liver Disease*, v. 18, n. 1, p.1-18, 2014.

D.B. STEVEN. **Mechanisms of action, resistance and toxicity of insecticides targeting GABA receptors**. 2017.

DAS, P.C., CAO, Y., CHERRINGTON, N., HODGSON, E., ROSE, R.L. **Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes**. *Chemico-Biological Interactions* 164, 200–214. 2006

De OLIVEIRA, P, R; BECHARA, G, H; DENARDI, G, H; MATHIAS, M, I, C. **Cytotoxicity of fipronil on mice liver cells**. *Microscopy Research and Technique*, p. 28–35. 2012.

DELFINO, Reinaldo T.; RIBEIRO, Tatiana S.; FIGUEROA-VILLAR, José D.; **Compostos organofosforados como agentes químicos de guerra: uma revisão**. *Revista da sociedade Brasileira de Química*. São Paulo, v. 20. n. 3, p. 1-32, 2009.

DOU. **Diário Oficial - República Federativa do Brasil. Imprensa Nacional**. Brasília - DF. Nº. 240. Seção 1. p. 202. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 5.243. 2012.

EISENBRAND, G; POOL-ZOLBEL, B; BAKER, V; BALLS, M, BLAAUBOER, B, J; BOOBIS, A; CARERE, A. **Methods of in vitro toxicology**. *Food and Chemical. Toxicology*. 2002.

ELZAKI, M, E, A; ZHANG, W. **Cytochrome P450 CYP4DE1 and CYP6CW3v2 contribute to ethiprole resistance in *Laodelphax striatellus***. *Insect Molecular Biology*. 2017.

FELDMAN, M; FRIEDMAN, L, S. SLEISENGER, M, H. **Nonalcoholic fatty liver disease. In: Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management**, 7th.ed. Philadelphia. 2002.

FORAWI, H, A; TCHOUNWOU, P, B; McMURRAY, R, W. **Xenoestrogen modulation of the immune system: effects of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and 2,3,7,8-**

tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Reviews on Environmental Health v. 19, p. 1–13. 2004.

GALLOWAY, T; HANDY, R. **Immunotoxicity of organophosphorus pesticides.** Ecotoxicology. 2003.

GONZALEZ, G; CRESPO, S; BRUSKE, J. **Histo-cytological study of the liver of the cabrilla sea bass, *Serranus cabrilla* (Teleostei, Serranidae), an available model for marine fish experimental studies.** Jour. of Fish Biol. v.43, p. 363-373. 1993.

GRIPP, H, S; FREITAS, J, S; ALMEIDA, E. A; MOREIRA, A. B.X. **Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae).** Ecotoxicology and Environmental Safety, V. 136, P. 173–179. 2007.

GUO, C; QIAO, J; ZHANG, S; LI, M. **Elaeagnus mollis Oil Attenuates Non-alcoholic Fatty Disease in High-fat Diet Induced Obese Mice via Modifying the Expression of Lipid Metabolism-related Genes.** Journal of Oleo Science. 2019.

GUOSHENG, Z. **Recent advance on the development of pyrazole & pyrrole insecticides.** Pesticide Sci. 2004.

HAMSAN, H; HO, Y, B; ZAIDON, S, Z; HASHIM, Z. **Occurrence of commonly used pesticides in personal air samples and their associated health risk among paddy farmers.** Science of The Total Environment, p. 381–389. 2017.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S. L. **Pathogenesis of Liver Fibrosis.** Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, v. 6, n. 1, p. 425-56, 2011.

HOROWITZ, J. M. et al. **Evaluation of hepatic fibrosis: a review from the society of abdominal radiology disease focus panel.** Abdominal Radiology, v. 42, n. 8, p. 2037-2053, 2017.

HU, Z; MINH-RONG, Q; XIN-QUAN, W; FEI, L. **Determination of ethiprole enantiomers residue in rices using solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry.** China. Journal. Anal. Chemistry. 2012.

HUANG, J; CUI, J, R; GUO, Y; SUN, J. **Roles of LsCYP4DE1 in wheat adaptation and ethiprole tolerance in *Laodelphax striatellus*.** Insect Biochemistry and Molecular Biology. v. 101. P. 14–23. 2018.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). **Ethiprole.** Disponível em <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/1227.htm>> acessado em 15 de agosto de 2019.

KARTHEEK, RM, & David, M. **Avaliação da toxicidade do fipronil em ratos wistar: uma perspectiva hepatotóxica.** Toxicology Reports. 2018.

LEDIRAC, N; ANTHERIEU, S; CARON, J, C; RAHMANI, R. **Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species.** Toxicological Sciences. v. 86. p. 444–452. 2005.

LEE, D, H; PORTA, M; STEFFES, M; JACOBS, D, R. **Relationship between serum concentrations of persistent organic pollutants and the prevalence of metabolic syndrome among non-diabetic adults.** National Health and Nutrition Examination Survey. Diabetologia. 2007.

LIU, Q; WANG, Q; XU, C. *et al.* **Organochloride pesticides impaired mitochondrial function in hepatocytes and aggravated disorders of fatty acid metabolism.** Sci Rep. 2017.

LOPES, C; ALBUQUERQUE, G. **Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. Agrochemicals and their impacts on human and environmental health.** Saúde Debate. Rio de Janeiro. Vol. 42. Nº 117. p. 518-534. 2018

MAHLER, B, J; VAN MESTRE, J, T; WILSON, M; MUSGROVE, S, D. **Fipronil and its degradates in indoor and outdoor dust.** Environ. Sci. Technol. 2009.

MANGIA C; VISMARRA, A; GENCHI, M, EPIS, S; BANDI, C; GRANDI, G. **Exposure to amitraz, fipronil and permethrin affects cell viability and ABC transporter gene expression in an Ixodes ricinus cell line.** Parasites & Vectors. 2018.

MERKOWSKY, K; SETHI, R, S; GILL, J, P S. **Fipronil induces lung inflammation in vivo and cell death in vitro.** Journal of Occupational Medicine and Toxicology. .2016.

MITCHELL III, R, D; WALLACE, A, D; HODGSON, E; ROE, R, M. **Differential Expression Profile of lncRNAs from Primary Human Hepatocytes Following DEET and Fipronil Exposure.** International Journal of Molecular Sciences. 2017.

MOHAMED, F; SENARATHNA, L; PERCY, A CHENG, R; AZHER, S. **Acute human self-poisoning with the N-phenylpyrazole insecticide fipronil chloride channel blocker.** J. Toxicol. Clin. Toxicol. p 955–963. 2004.

MOREIRA J.C. *et al.* **Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ.** Ciência e Saúde coletiva. Vol. 7. p. 299-311.2002.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Fosforilação oxidativa e fotofosforilação.** In: Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5. ed. Porto Alegre: Artmed. p.707-772. 2011

OLIVEIRA, P.R. **Avaliação dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do Frontline®) nos ovários de carrapatos Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) e no sangue periférico de roedores.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2010

PORTO, Marcelo; SOARES, Wagner. **Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora.** Revista Brasileira de Saúde Ocupacional, São Paulo, v. 37, n. 125, p. 46-49, 2012.

P.S. MILLER; A, R; ARICESCU. **Crystal structure of a human GABAA receptor**. Nature. p. 270-275. 2014.

PERES F, MOREIRA J.C; DUBOIS G.S. **Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema**. Fiocruz, Rio de Janeiro. 2003.

PIRES, D. X.; CALDAS, E. D.; RECENA, M. C. P. **Uso de agrotóxicos e suicídios no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil**. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.21, n.2, p.598-605, 2005.

RAMBABU, J, P. RAO, M, B. **Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid, and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Muller)**. Bull Environ Contam Toxicology. 1994.

HOWELL, G; McDEVITT, E; HENEIN, L; MULLIGAN, C; YOUNG, D. **Alterations in cellular lipid metabolism produce neutral lipid accumulation following exposure to the organochlorine compound trans-nonachlor in rat primary hepatocytes**. Department of Basic Sciences, Mississippi State University College of Veterinary Medicine, Mississippi State, Mississippi. Environmental Toxicology. 2018.

RINN, J, L; CHANG, H, Y. **Genome regulation by long noncoding RNAs**. Rev. Biochem. v. 81, p. 145–166. 2012.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia: Em correlação com biologia celular e molecular**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RUANGJAROON, T; CHOKCHAICHAMANANKIT, D; SRISOMSAP, C; SVASTI, J. **Involvement of vimentin in neurite outgrowth damage induced by fipronil in SH-SY5Y cells**. Biochemical and Biophysical Research Communications. p. 652–658. 2017.

RUI, L. **Energy Metabolism in the Liver**. Comprehensive Physiology, v. 4, n. 1, p. 177-97, 2014.

SANTOS, S. L. **Avaliação de parâmetros da imunidade celular em trabalhadores rurais expostos ocupacionalmente a agrotóxicos em Minas Gerais**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2003.

SEIXAS, R. B. P. de M. **Avaliação da esteatose hepática em crianças e adolescentes obesos e com sobrepeso e sua associação com a resistência à insulina**. Dissertação (Mestrado), 95 f., Universidade de Brasília, 2010.

SEKI, E.; BRENNER, D.A. **Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis**. Journal Of Hepato-biliary-pancreatic Sciences, v. 22, n. 7, p. 512-8, 2015.

SENOO, H. et al. **Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative –past, present and future**. Cell Biology International, v. 34, n. 12, p. 1247-72, 2010.

SHENG, C, W; CASIDA, J, E; DURKIN, K, A; CHEN, F; HAN, Z, J. **Fiprole insecticide resistance of *Laodelphax striatellus*: electrophysiological and molecular docking characterization of A2'N RDL GABA receptors.** Insect Biochemistry and Molecular Biology 2018.

Sociedade Brasileira de Hepatologia. **Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil.** Disponível em <<http://sbhepatologia.org.br/imprensa/esteatose-hepatica/>>. Acessado dia < 10/02/2019.

TANAKA, T; INOMATA, A. **Reproductive and Neurobehavioral Effects of Ethiprole Administered to Mice in the Diet.** Birth Defects Research, p. 1568–1585. 2017.

TANG, J.; USMANI, K.A.; HODGSON, E.; ROSE, R.L. **In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam.** Chemico-Biological Interactions, v.147, p.319-329. 2004.

TARASENKO, T. N.; MCGUIRE, P. J. **The liver is a metabolic and immunologic organ: A reconsideration of metabolic decompensation due to infection in inborn errors of metabolism (IEM).** Molecular Genetics And Metabolism, v. 121, n. 4, p. 283-288, 2017.

TRAUSER, M. ARRESE, M. WAGNER, M. **Fatty liver and lipotoxicity.** Biochimica et Biophysica Acta. v.1801, p.299-310. 2010.

USEPA (US Environmental Protection Agency), 2011. Pesticide Fact Sheet: **Ethiprole.** Disponível em <www.alanwood.net/pesticides/ethiprole.html>. Acessado em 15 de agosto de 2019.

USEPA (US Environmental Protection Agency). **Pesticide Fact Sheet: Ethiprole.** Disponível em <www.alanwood.net/pesticides/ethiprole.html>. Acessado em 15 de agosto de 2019. Chemical Hazard Classification and Labeling. 2011.

VIDAU, C., González-Polo, R. A., Niso-Santano, M., Gómez-Sánchez, R., Bravo-San Pedro, J. M., Pizarro-Estrella, E., ... Fuentes, J. M. **Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y.** NeuroToxicology. 2011.

WAGNER, M.; ZOLLNER, G.; TRAUNER, M. **Nuclear receptors in liver disease.** Hepatology, v. 53, n. 3, p.1023-1034, 2011.

WALLACE, M.; MANN, D.; FRIEDMAN, S. **Emerging and Disease-Specific Mechanisms of Hepatic Stellate Cell Activation.** Seminars In Liver Disease, v. 35, n. 02, p. 107-18, 2015.

WANG, X, Q; LI, Y, G; ZHONG, H; WANG, X, Y. **Oxidative injury is involved in fipronil-induced G2/M phase arrest and apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cell line.** Pesticide Biochem Physiol 105. 2013

WHO, **World Health Organization** -. Brazil Health Profile. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html>>. Acesso em: outubro, 2017.

WU, J. **Utilization of animal models to investigate nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma**. Oncotarget, 2015.

XU, H; LIU, X; JIA, Y; DONG, F; XU, J. **Fipronil-induced toxic effects in zebrafish (Danio rerio) larvae by using digital gene expression profiling**. Science of The Total Environment, 639, 550–559. 2018.

XU, L, C; LIU, L; REN, X, M; ZHANG, M, R. **Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of some pesticides in vitro**. Toxicology. 2008

ZHANG, B; XU, Z; CHENG, J. **Fipronil induces apoptosis through caspase-dependent mitochondrial pathways in Drosophila S2 cells**. Pesticide Biochemistry and Physiology, V. 119, p. 81–89. 2015.

ZHANG, Y; CAO, X. **Long noncoding RNAs in innate immunity**. Cell. Mol. Immunol. v. 13, p. 138–147. 2016.

ZHAO, B; SHEN, H; LIU, F. et al. **Exposure to organochlorine pesticides is an independent risk factor of hepatocellular carcinoma: A case-control study**. J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol. Vol. 22. p. 541–548. 2012

ZHAO, J. et al. **Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment**. Hepatology, v. 59, n. 4, p. 1331-42, 2014.

ZHAO, Q; LI, Y; XIONG, L; WNG, Q. **Design, synthesis and insecticidal activity of novel phenylpyrazoles containing a 2, 2, 2-trichloro-1-alkoxyethyl moiety**. J. Agric. Food Chem. 2010.

8. ANEXO 1. Folder – O que você precisa saber sobre os fitossanitários.

NÃO SE ESQUEÇA!

Após utilizar, faça o descarte correto de embalagens vazias de fitossanitários:

- 1- Lave bem as embalagens utilizadas;
- 2- Corte e faça furos para que não sejam utilizadas novamente;
- 3- Leve a embalagem a um local apropriado;
- 4- Devolva os recipientes;
- 5- Guarde o comprovante de devolução das embalagens.





Referências:

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Atenção à Saúde do Trabalhador.

Cartilha: BRASIL. Ministério da Saúde. RIO GRANDE DO SUL. Conselho Estadual de Saúde. A saúde no trabalho: a exposição a agrotóxicos. 4 ed. 2014.

Imagem: Cartilha: SINDUNEG. Sindicato Nacional da Indústria de produtos para a defesa vegetal. O que você precisa saber sobre os defensivos agrícolas. 1 ed. 2018.

Imagem: ANVISA. Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos de Alimentos. Disponível no site http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/Pyxpdq77bu/content/divulgado-relatorio-sobre-residuos-de-agrototoxicos-em-alimentos/219201/_langua=pt-BR > Acessado em 13 de agosto de 2019.

Imagem: CIDADSC. Canal Rural. Disponível no site <<https://www.canalrural.com.br/agronegocio/saiba-graos-igv/>> Acessado em 13 de fevereiro de 2020.

O QUE VOCÊ PRECISA SABER SOBRE FITOSSANITÁRIOS (Agrotóxicos)



Fonte: CIDADSC. (2019)



O que é fitossanitário?

Fitossanitários, chamados anteriormente de agrotóxicos, são produtos químicos largamente utilizados no setor de produção agrícola, garantindo a produtividade da lavoura, pois seu uso preserva as espécies cultivadas



Fonte: SINDIVES (2018)

Surgimento do fitossanitário:

O fitossanitário utilizado nas lavouras em larga escala atualmente, teve seu surgimento durante as duas guerras mundiais no séc. XX, já que seus princípios ativos foram inicialmente utilizados como armas químicas.



Como os fitossanitários são utilizados atualmente no Brasil em larga escala, apesar dos benefícios oferecidos por tal, são encontrados em vários alimentos que são consumidos diariamente



Fonte: ANVISA (2018)

Formas de intoxicação:

- Contato direto: no preparo, aplicação ou qualquer tipo de manuseio com o produto.
- Contato indireto: contaminação de água e alimentos ingeridos

Os compostos químicos entram no corpo por meio de contato com a pele, mucosa, pela respiração e ingestão

Sintomas:

Quando em contato ou ingeridos em grande quantidade, pode apresentar alguns sintomas de intoxicação, como: Irritação ou nervosismo, tremores no corpo, indisposição, fraqueza e mal-estar, dor de cabeça, tontura, vômitos, diarreia, coma, podendo chegar até a morte

Tratamento:

Ao aparecerem os sintomas, é importante procurar um serviço de saúde mais próximo, fazer repouso e ingerir bastante líquido.

Após os primeiros socorros deve-se procurar os serviços de saúde mais próximos, levando o rótulo ou embalagem do agrotóxico e o receituário agrônomo. Telefone imediatamente para o Centro de Informações Toxicológicas (CIT) – 0800 722 6001 que atende em todo o Brasil

Como prevenir acidentes:

- Comprar fitossanitário somente com receita agrônoma;
- Ler e seguir rigorosamente as recomendações do rótulo;
- Não carregar nem armazenar junto com alimentos;
- Não utilizar embalagens vazias;
- Não utilizar utensílios domésticos na mistura de produtos;
- Crianças, gestantes e mulheres que estão amamentando não podem ter contato com agrotóxicos;
- Utilizar EPI's recomendados para a aplicação;
- Lavar as roupas de trabalho e equipamentos de uso diário após o trabalho



Lara C. Santello

09/10/20

Discente: Lara C. Santello

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'K. Moraes', enclosed within a rectangular box.

12/10/2010

Docente: prof. Dra. KAren Cristiane Martinez de Moraes
UNESP - IB - Departamento de Biologia Geral e
Aplicada