

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 23/08/2018.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Exposição subcrônica de ratos ao benzoato de emamectina: toxicidade neurocomportamental e hepática

Daniel França Horta

Orientador: Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Angélica Henrique Fernandes

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia IBB/UNESP

Botucatu - SP

2017

DANIEL FRANÇA HORTA

**Exposição subcrônica de ratos ao benzoato de
emamectina: toxicidade neurocomportamental e hepática**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Biotecnologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Angélica Henrique Fernandes

Botucatu - SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Horta, Daniel França.

Exposição subcrônica de ratos ao benzoato de emamectina
: toxicidade neurocomportamental e hepática / Daniel
França Horta. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Antonio Francisco Godinho

Coorientador: Ana Angélica Henrique Fernandes

Capes: 21007004

1. Benzoatos. 2. Stress oxidativo. 3. Pesticidas -
Toxicologia. 4. Toxicidade - Testes. 5. Rato como animal
de laboratório.

Palavras-chave: Benzoato de emamectina; Estresse
oxidativo; Hepatotoxicidade; Neurotoxicidade; Praguicida.

Dedico este trabalho a minha família e amigos, os quais sempre estiveram ao meu lado me fornecendo suporte, amor e amizade para encarar melhor o mundo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais Ari Antunes Horta e Regina Célia Elias França Horta e meus irmãos Monica e Guilherme, que me deram todo o apoio, amor e carinho para chegar nesta etapa que estou finalizando.

Ao meu orientador Dr. Antonio Francisco Godinho pela orientação e amizade desenvolvida durante esses dois anos, e pela disponibilidade para conversas para sanar diversas dúvidas, gerando muitos conselhos para o projeto e para a vida, muito obrigado.

A todos os funcionários do CEATOX, Dr. Alaor Aparecido Almeida, Fábio Iachel da Silva, João Leandro Chaguri, Sarah Setznagl, Juliano da Silva Otoni, Josie Michelle Juvencio, Rita de Cássia Ferrari pelo apoio e pela colaboração na execução deste projeto.

Aos meus queridos amigos de laboratório de Botucatu que me auxiliaram na execução do projeto Daniel de Fraia, Fabio Anselmo, Christian Savio Silva, Anderson Kiyoshi Kaga, Meyre Mieko Yassuda, Daniela Alessandra Fossato da Silva, Jessica Dorador Kawashima, obrigado pela disposição e principalmente pela amizade.

A Prof^a. Dr^a. Ana Angélica Henrique Fernandes minha coorientadora a qual me auxiliou na execução desse projeto e sempre foi muito atenciosa e solicita as minhas dúvidas e pedidos.

A equipe do laboratório de patologia clínica do hospital veterinário da Universidade Estadual de Londrina e a Prof^a. Dr^a. Karina Keller Marques da Costa Flaiban pela ajuda e disposição na execução das análises, e por toda a amizade que compartilhamos desde os anos de faculdade em Londrina.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço a todos por terem feito parte desta minha trajetória.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab1a – Desmetil emamectina
ACA - Arena de campo aberto
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BE – Benzoato de emamectina
BHE – Barreira hematoencefálica
CAT - Catalase
CYP450 – Complexo enzimático citocromo P450
DL 50 – Dose letal em 50 % dos animais
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERO – Espécies reativas de oxigênio
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GSHPX – Glutathione peroxidase
HB - Hole-board
INCA – Instituto Nacional do Câncer
IV – Via intra venosa
LCE - Labirinto em cruz elevada
MAB1a - Fração AB1a do benzoato de emamectina
SOD – Superóxido dismutase
VO – Via oral

RESUMO

HORTA, D. F. **Exposição sub-crônica de ratos ao benzoato de emamectina: toxicidade neurocomportamental e hepática.** 2017. 53f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.

O Benzoato de emamectina é um inseticida da classe das avermectinas, os quais apresentam seu mecanismo de ação através de interações com o receptor ácido gama aminobutírico (GABA), e também por alterações do estresse oxidativo em tecidos o qual tem sido associado a diversas doenças crônicas. O objetivo deste projeto foi o de avaliar as alterações geradas pela exposição subcrônica (28 dias) a baixas doses do benzoato de emamectina, sobre os parâmetros neurocomportamentais, do estresse oxidativo em cérebro e fígado e biomarcadores séricos da função hepática e renal. Foram utilizados 64 ratos Wistar adultos machos, os quais receberam oralmente (gavage), diariamente, por 28 dias um dos seguintes tratamentos: Água destilada (controle); benzoato de emamectina 0.5 mg/Kg (BE0.5); benzoato de emamectina 1 mg/Kg (BE1); benzoato de emamectina 2 mg/Kg (BE2). No dia após a última exposição aos tratamentos os animais foram avaliados para atividade neurocomportamental, com o auxílio dos seguintes equipamentos: labirinto em cruz elevada (LCE) teste da arena de campo aberto (ACA) e o hole-board (HB). No dia seguinte os animais foram eutanasiados e coletadas amostras de fígado e cérebro para a avaliação do estresse oxidativo, via mensuração do hidróperóxido de lipídeo e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSHPx) e sangue para a obtenção do plasma para análise dos biomarcadores da função hepática e renal. Os animais expostos ao BE nos testes neurocomportamentais apresentaram alterações comportamentais de caráter ansiolítico nos teste da ACA e LCE e prejuízo da coordenação motora no teste do hole board. Na avaliação do estresse oxidativo a exposição ao BE provocou estresse oxidativo nos tecidos cerebrais e hepáticos e redução na atividade das enzimas antioxidantes dos ratos expostos ao BE. Os biomarcadores da função hepática e renal não foram elevados pela exposição ao BE. A exposição subcrônica a baixas doses de benzoato de emamectina gerou alterações comportamentais do tipo ansiolítico, prejuízo da coordenação motora e estresse oxidativo nos tecidos cerebral e hepático em ratos.

Palavras-chave: benzoato de emamectina, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, estresse oxidativo, praguicida.

ABSTRACT

HORTA, D. F. **Sub-chronic emamectin benzoate exposure in rats: neurobehavioral and hepatic toxicity.** 2017. 53f. Thesis (Master) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.

The emamectin benzoate is an insecticide of avermetins class which exerts your action mechanism by interactions with GABA receptors, and also by tissue oxidative balance alterations which can be associated with chronic diseases development. The purpose of this project was to evaluate possible alterations caused by sub-chronic exposure (28 days) to emamectin benzoate (EB) low doses, on the neurobehavioral parameters, brain and liver oxidative stress and liver and kidney function serum biomarkers. Was utilized 64 adult (70 days) Wistar male rats which received, daily, by gavage, during 28 days, one of the following treatments: distilled water (control); 0.5 mg/Kg of emamectin benzoate (EB0.5); 1 mg/Kg of emamectin benzoate (EB1); 2 mg/Kg of emamectin benzoate (EB2). The day after the last exposure, animals were assayed for neurobehavioral activity utilizing the following apparatus: elevated plus-maze, open-field and hole-board test. After behavioral evaluation, animals were euthanized, liver and brain samples were collected to evaluate oxidative stress, through the measurement of lipid hidroperoxide (LH) and the activity of antioxidants enzymes, superoxidodismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathiona peroxidase (GSHPx). Blood also was collected for plasm biomarkers assay of kidney and liver function. Animals exposed to EB presented behavioral alterations with anxiolytic profile during the ACA and LCE tasks, and impairment of motor coordination, during the hole-board task. The EB exposure provoked oxidative stress demonstrated by the increase of LH in brain and hepatic tissues, and decreases of the activity of antioxidant enzymes. The kidney and liver function biomarkers were not elevated in plasm by the EB exposure. The sub-chronic EB low dose exposure provoked behavioral alterations with anxiolytic like behavior profile, impairment of motor coordination, and increase of liver and brain tissues oxidative stress of rats.

Keywords: emamectin benzoate, neurotoxicity, hepatotoxicity, oxidative stress, pesticide.

SUMÁRIO

1. Introdução	6
1.1. PANORAMA DO USO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL	6
1.2. EMERGÊNCIA FITOSSANITÁRIA E A "NECESSIDADE" DO BENZOATO DE EMAMECTINA NO BRASIL..	7
1.3. AS MOLÉCULAS DA CLASSE DAS AVERMECTINAS E O BENZOATO DE EMAMECTINA.....	8
1.4. TOXICOCINÉTICA E TOXICODINÂMICA DO BENZOATO DE EMAMECTINA	9
1.5. METABOLIZAÇÃO DO BENZOATO DE EMAMECTINA	10
1.6. MECANISMO DE AÇÃO E TOXICIDADE DO BENZOATO DE EMAMECTINA.....	13
1.7. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	16
2. Objetivo	17
3. Artigos referentes à dissertação	18
3.1. ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA TOXICOLOGY (ELSEVIER, ISSN 0300-483x)	18
SUB-CHRONIC EMAMECTIN BENZOATE EXPOSURE AFFECTS ANXIETY, MOTOR COORDINATION, AND DISTURBS BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN RAT BRAIN TISSUE	
3.2. ARTIGO QUE SERÁ SUBMETIDO À REVISTA FREE RADICAL RESEARCH (TAYLOR E FRANCIS, ISSN 1071-5762)	35
SUB-CHRONIC EMAMECTIN BENZOATE EXPOSURE DISTURBS LIVER OXIDATIVE STRESS BUT NOT HEPATIC AND RENAL FUNCTION BIOMARKERS	
4. Conclusão geral	48
5. Referências	49

1. Introdução

1.1. Panorama do uso de agrotóxicos no Brasil

O Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos desde 2008, ultrapassando os Estados Unidos. No ano de 2009 o consumo continuou aumentando, observando-se uma média de uso de 5,2 Kg de agrotóxicos por habitante. O consumo não parou de crescer e no ano de 2011 foram consumidos 852,8 milhões de litros. Este crescente aumento no uso de agrotóxicos é de se alarmar, pois o efeito deletério causado por estes produtos já é conhecido, podendo gerar tanto intoxicações agudas como ter relações com doenças crônicas como a diabetes, câncer e neurodegenerativas (ANVISA, 2009; LONDRES, 2011; IBGE, 2012).

Devido à elevada utilização de agrotóxicos no Brasil e aos seus comprovados efeitos deletérios, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) se posicionou contra as atuais práticas de uso de agrotóxicos e ressaltou seus riscos à saúde e principalmente à exposição crônica, a qual pode gerar infertilidade, impotência, abortos, malformações, neurotoxicidade, desregulação hormonal, efeitos sobre o sistema imunológico e câncer (INCA, 2015).

Os agrotóxicos mais aplicados atualmente no Brasil são os herbicidas, seguido pelos inseticidas, fungicidas e acaricidas. Diversas formulações utilizadas aqui são proibidas em países da Europa, devido a sua toxicidade ou às alterações que promovem no ambiente, como a morte de insetos como exemplo, as abelhas, que são benéficas ao cultivo, e outros organismos não alvo (IBGE, 2012; CARNEIRO et al., 2015).

Alguns dados do censo agropecuário de 2006 tornam o assunto ainda mais preocupante, pois 77,6% dos responsáveis pelos estabelecimentos agropecuários tinham apenas o ensino fundamental incompleto, baixo percentual de adoção de práticas alternativas no controle de pragas e doenças, elevado número de estabelecimentos que não utilizam equipamento de proteção individual (21,3%) e o altíssimo número de estabelecimentos que utilizam o pulverizador costal (70,7%), equipamento que gera o maior potencial de exposição ocupacional aos agrotóxicos (IBGE, 2009; IBGE, 2012).

Devido ao uso incorreto dos agrotóxicos não se utilizando de boas práticas agrícolas, cada vez mais as espécies alvo tem tido uma maior resistência

aos princípios ativos presentes no mercado, induzindo os produtores a exigir novos princípios ativos para sanar seus prejuízos (EMBRAPA, 2013).

1.2. Emergência fitossanitária e a "necessidade" do benzoato de emamectina no Brasil

No ano de 2013 foi permitida a importação para alguns estados do Brasil do princípio ativo emamectina, o qual não obteve registro e sua comercialização não foi autorizada no país em 2007 pela ANVISA. Foi alegado que a emamectina apresenta um perfil toxicológico bastante desfavorável, tanto pelo ponto de vista agudo quanto crônico, devido à sua neurotoxicidade (ANVISA, 2007; BRASIL, 2013a; CARNEIRO et al., 2015).

Porém, em razão da emergência fitossanitária gerada em alguns estados brasileiros pela infestação da praga *Helicoverpa armigera* em diversas culturas, foi solicitada a importação e utilização deste produto mesmo sem registro no Brasil, em caráter emergencial, e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento permitiu a importação desse princípio ativo através da Lei nº 12873/2013. No ano de 2013 foi declarada emergência fitossanitária no oeste da Bahia, seguida de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Mato Grosso do Sul, Alagoas e Maranhão (BRASIL, 2013a; BRASIL, 2013b; CARNEIRO et al., 2015).

No ano de 2014 foi relatada a presença da *Helicoverpa* por todo o Brasil e alguns estados como Alagoas, Bahia, Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Piauí tiveram o uso emergencial prorrogado até 18 de março de 2016. No estado do Rio Grande do Sul essa solicitação do uso da emamectina foi negada, relatando-se que outros produtos agrícolas são menos tóxicos e mesmo assim eficazes contra a praga, e que a utilização de boas práticas agrícolas têm sido eficiente no controle das infestações (BRASIL, 2015; PIAUÍ, 2015; RIO GRANDE DO SUL, 2014).

Porém, em dezembro do ano de 2016 o prazo para o uso do benzoato de emamectina em caso de emergência fitossanitária foi novamente prorrogado através da Portaria Nº 273 de 21 de dezembro de 2016, sendo prorrogado por mais um ano a partir de 15 de janeiro de 2017, podendo ser utilizado na safra 2016/2017 (BRASIL, 2016).

1.3. As moléculas da classe das avermectinas e o benzoato de emamectina

As moléculas da classe das avermectinas são um grupo de agentes anti-helmínticos produzidos por um actinomiceto do solo o *Streptomyces Avermitilis*. O qual foi primeiramente isolado pelo instituto Kitasato (Japão) de uma amostra de solo de um campo de golfe na cidade de Ito no Japão (BURG et al, 1979; CRUMP; OMURA, 2011).

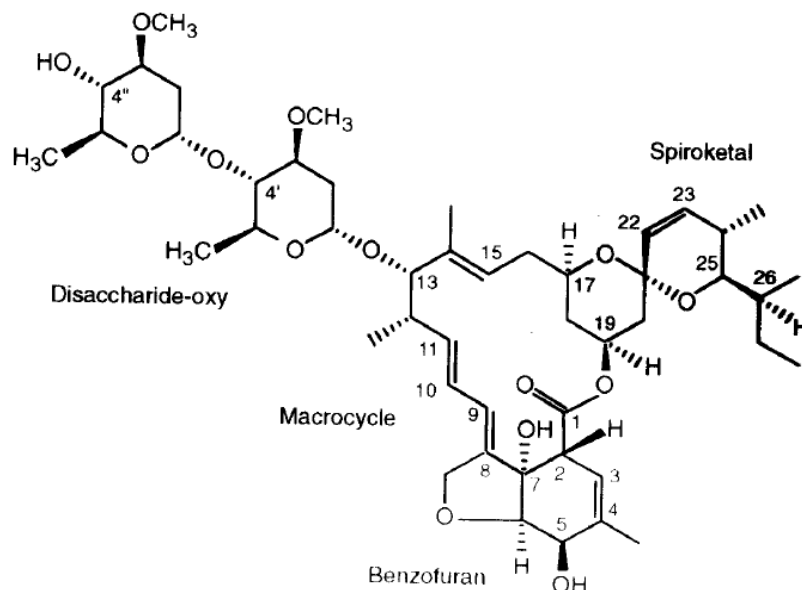
Os princípios ativos do grupo das Avermectinas podem ser formados pela associação de oito diferentes produtos da fermentação do *Streptomyces Avermitilis*. Esses compostos são A1_a, A1_b, A2_a, A2_b, B1_a, B1_b, B2_a e B2_b, os quais têm diferentes espectros de ação e toxicidade nos seus organismos alvos. (BURG et al, 1979).

Dos oito homólogos da abamectina que são produzidos pelo *Streptomyces Avermitilis* apenas a A2_a, B1_a e B2_a são produzidos em quantidade significativa pela fermentação do fungo. O homólogo B1 apresenta maior potência e maior espectro de ação, sendo seguido pelo B2, porém o B2 apresenta maior segurança. A estimativa da dose letal 50 (DL50) em ratos é de aproximadamente 15mg/Kg para B1 e 50 mg/KG para B2 (SHOOP; MROZIK; FISHER, 1995). As moléculas da classe das avermectinas apresentam atividade acaricida, inseticida e nematicida e contém diversos princípios ativos como a abamectina, ivermectina, doramectina o benzoato de emamectina dentre outros (LASOTA; DYBAS, 1991; DANAHER et al., 1996).

O benzoato de emamectina (4''R)-4''-deoxy-4''-(methylamino) avermectin B1 benzoate deve conter não mais de 90% 4''epimethylamino-4''-deoxyavermectin B1_a (AB1_a) benzoato (1008,3 Kda) e não mais que 10% de 4''epimethylamino-4''deoxyavermectin B1_b (AB1_b) benzoato (994.2 Kda) (FAO/WHO, 2011).

O Benzoato de emamectina é uma lactona macrocíclica semissintética a qual é sintetizada quimicamente a partir da abamectina pela substituição de um grupamento aminomethyl (-NCH₃) por um hidroxyl (-OH) na 4'' posição do dissacarídeo (MUSHTAQ et al., 1996). As principais estruturas das moléculas da classe das avermectinas são representadas na Figura 1.

Figura 1 - Avermectina B_{1a}, o componente mais abundante na fermentação do *Streptomyces Avermitilis*, mostrando as principais estruturas da molécula.



Fonte: SHOOP et al., 1995.

As lactonas macrocíclicas foram inicialmente introduzidas como uma droga veterinária para o controle de parasitas em animais de produção e de companhia, e depois passaram a ser utilizadas como praguicidas em plantações e para o controle de parasitas em humanos, neste último caso principalmente a ivermectina no controle de filaríoses (CRUMP; OMURA, 2011).

1.4. Toxicocinética e Toxicodinâmica do benzoato de emamectina

A absorção, distribuição, excreção e metabolismo das moléculas de xenobióticos podem variar por diversos fatores como a via de exposição, formulação, espécie animal, idade e outros fatores (CANGA et al., 2009). O BE é uma molécula com alto peso molecular, sendo esperado que seja excretada principalmente pela via fecal e apresente uma baixa absorção pela via dermal, como o observado no trabalho de Wrzesinski et al. (1997) em macacos Rhesus.

Para analisar se há diferenças no metabolismo do BE pelo sexo ou via de exposição de ratos, Mushtaq et al. (1996) avaliaram a absorção, distribuição e excreção do BE em ambos os sexos e pelas vias de exposição intra venosa (IV) e via oral (VO). O Benzoato foi eliminado quase inteiramente nas fezes e se observou uma meia vida plasmática de 27 horas pela via IV e 22 horas pela VO.

O pico plasmático da VO ocorreu após 12 horas da exposição e o da IV antes de 2 horas pós a administração.

A exposição dermal e IV em macacos Rhesus foi analisada por Wrzesinski et al. (1997). A penetração dermal do BE foi muito baixa (1,6%) e os níveis plasmáticos permaneceram abaixo do limite de detecção do teste. Porém a exposição IV obteve um pico plasmático da droga com 5 minutos da administração o qual passou a cair até 15 minutos, sugerindo que o composto é removido rapidamente da circulação. Depois permaneceu até 8 horas pós-exposição em um estado de platô passando a declinar, estando presente no plasma até 10 dias.

A principal via de excreção do BE em ratos encontrada nos trabalhos de Zeng et al. (1996a) e Mushtaq et al. (1996) foi a fecal contendo mais de 98% dos resíduos do BE radiomarcado, um resultado esperado visto que o BE é um composto de alto peso molecular sendo preferencialmente excretado pela via hepatobiliar. Wrzesinski et al. (1997) também observaram a via fecal como a principal via de excreção em macacos *Rhesus* tanto pela exposição pela VO e IV. O pico de excreção do BE nas fezes dos animais expostos por via IV foi com 2 dias após a exposição e na dérmica entre 3 e 4 dias.

A emamectina apresenta diferentes dinâmicas entre os animais e respostas a diferentes concentrações. Mushtaq et al. (1996) analisaram os resíduos do BE pela exposição aguda a baixa dose de BE (0.5 mg/Kg do peso animal) pela via IV e VO e observou resíduos em uma concentração mais expressiva no rim, fígado e gordura os quais declinaram a níveis muito baixos após 7 dias. No entanto a exposição à alta dose do BE (20 mg/Kg do peso animal) gerou uma quantidade de resíduos relativamente alta após 7 dias da exposição, estando principalmente localizados no pulmão e baço.

A exposição de caprinos lactantes ao BE gerou resíduos em órgãos na seguinte ordem: fígado, rim e gordura. A concentração plasmática e do leite foi muito menor que a encontrada nos tecidos, e a concentração de resíduos no leite foram maiores 1.2-1.6 vezes que a do plasma (MUSHTAQ et al., 1997).

1.5. Metabolização do benzoato de emamectina

Uma das propriedades físicas de muitos xenobióticos para serem absorvidos pela pele, pulmão ou intestino é a lipofilicidade, porém é também um

obstáculo para sua excreção, pois estes compostos podem ficar sendo reabsorvidos. A biotransformação é a conversão metabólica de compostos endógenos e xenobióticos a compostos mais polares e mais solúveis em água para favorecer sua excreção (PARKINSON, 2001).

Esta biotransformação apresenta duas fases: Reações da fase I que envolvem hidrólise, redução e oxidação, estas reações introduzem um grupamento funcional ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, ou $-\text{COOH}$) a molécula, e usualmente resultam em um baixo aumento da hidrofiliabilidade; Reações de fase II da biotransformação envolvem glicuronidação, sulfonação, acetilação, metilação e conjugação com a glutatona, as quais resultam em aumento na hidrofiliabilidade e excreção do composto (PARKINSON; OGILVIE, 2010).

As transformações mais comuns que ocorrem na fase I da biotransformação são as reações oxidativas envolvendo o complexo enzimático citocromo P450 (CYP450), o qual contém oxidases, redutases e hidroxilases. As enzimas do CYP450 estão presentes nos hepatócitos do fígado, epitélio intestinal e também nos túbulos proximais renais (MITTAL et al., 2015).

As enzimas do CYP450 são também as principais envolvidas na metabolização das avermectinas em ratos (ZENG et al., 1996b; SKÁLOVÁ et al., 2000), humanos (ZENG et al., 1998), e aves (ZHU et al., 2014). Wrzesinski et al. (1998) observaram que as aves apresentam maior metabolização do BE e associou isto a maior atividade do CYP450 nestas.

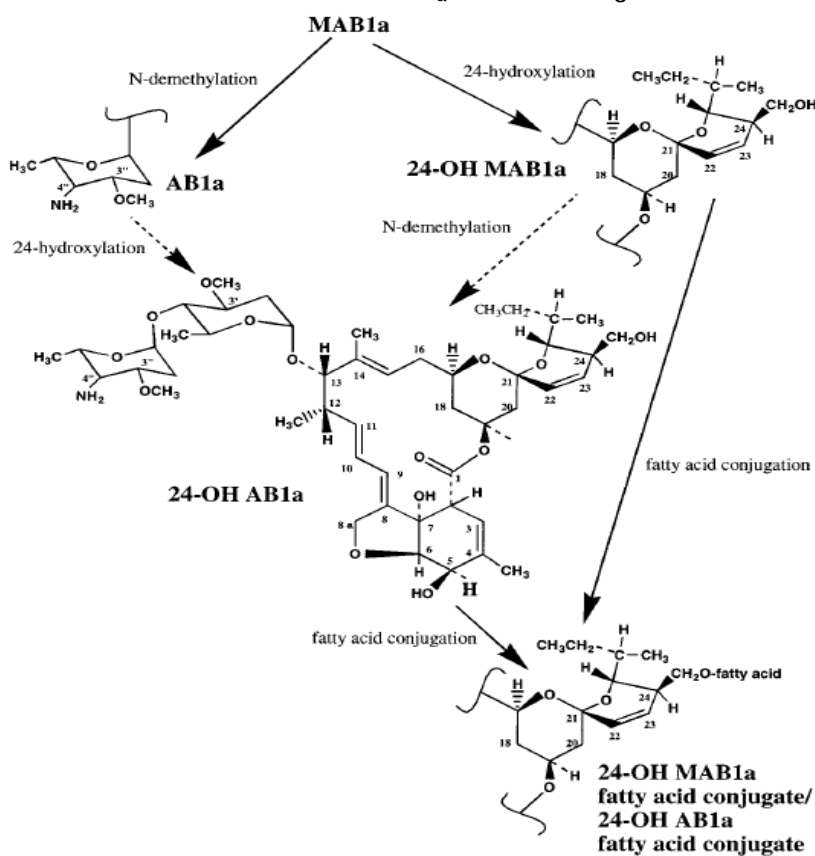
Os resíduos encontrados em fezes, leite e tecidos dos caprinos consistiam principalmente da fração AB1a (MAB1a) do benzoato de emamectina e o metabólico gerado pela N-desmetilação do BE (AB1a). Também foram encontrados outros dois metabólitos mais polares em concentrações muito pequenas os quais não foram caracterizados (MUSHTAQ et al., 1997).

A desmetil emamectina (AB1a) também é considerada o principal metabólito em ratos (MUSHTAQ et al., 1996). Zeng et al. (1996a) identificou a maioria dos resíduos em fezes e tecidos como sendo o homólogo da emamectina B1a e o AB1a no entanto encontrou outros 5 diferentes metabólitos os quais não foram identificados. A metabolização do BE apresentou diferenças entre os sexos sendo encontrada uma maior quantidade do metabólito em tecidos nas fêmeas, mostrando que elas apresentam maior velocidade de metabolização.

Salmões expostos durante sete dias ao BE por VO, apresentaram resíduos do BE em rim, fígado, pele, músculo e ossos até 90 dias após a exposição, sendo os principais resíduos a emamectina B1a, desmetil emamectina B1a e traços do metabólito formil emamectina B1a em amostras de músculos (KIM-KANG et al., 2009).

Nestes trabalhos com mamíferos e salmões o principal resíduo encontrado foi a fração AB1a do BE mostrando que este não é completamente metabolizado e o único metabólito expressivo foi o AB1a. Em aves o principal resíduo também foi a fração AB1a do BE, porém a emamectina foi mais intensamente metabolizada tendo como principais metabólitos o 24-hydroxymethyl derivado do MAB1a (24-OH-MAB1a – 33%), uma quantidade menor comparada aos outros animais do AB1a (2-7%) e o derivado N-demetilado do 24-OH-MAB1a (24-OH-AB1a – 1%). Estes metabólitos estão exemplificados na Figura 2 (WRZESINSKI et al., 1998).

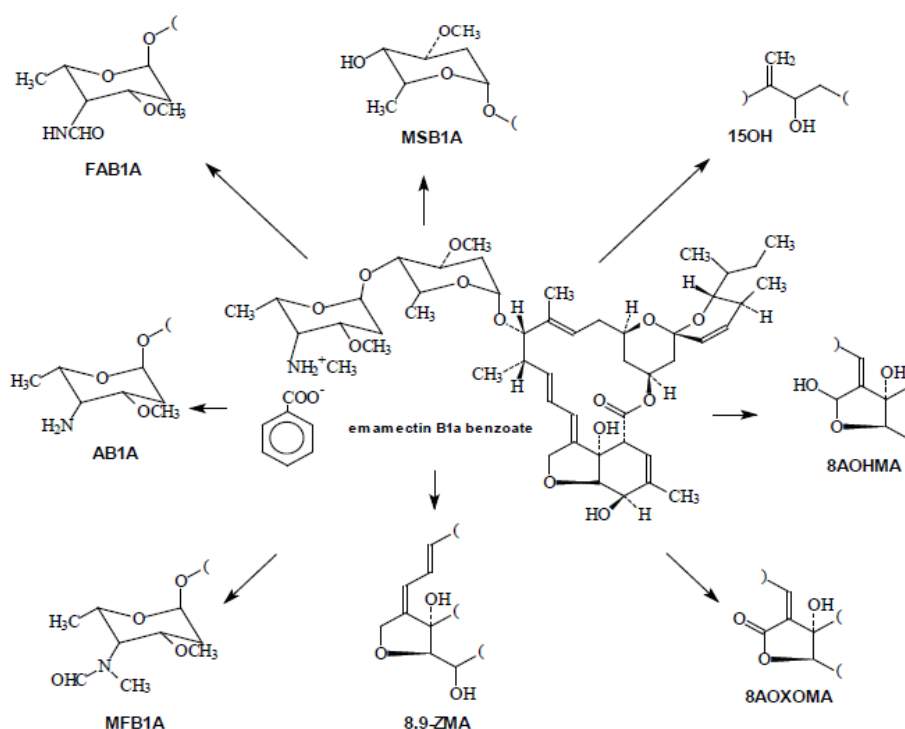
Figura 2 - Síntese do metabolismo in vivo do MAB1_a benzoato em galinhas.



Fonte: Wrzensinski et al., 1998.

Drogas que são menos metabolizadas normalmente permanecem por um período maior no corpo e apresentam meia vida de eliminação maior que drogas que são rapidamente metabolizadas, se estas não são eliminadas por outro mecanismo (BENEDITE, 2009). Existem também diversos outros metabólitos do BE porem sua presença não foi relatada em animais, sendo encontrados em trabalhos da fotodegradação do BE e metabólitos presentes em plantas, água e solo e representados na Figura 3 (FAO/WHO, 2011).

Figura 3 - Esquema da degradação primária do benzoato B1_a em partes da folha de culturas folhosas (alface, repolho) e cereais (forragem de milho). A abreviação "—" na formula estrutural indica que o resto da molécula é idêntica ao benzoato de emamectina B1_a.



Fonte: FAO/WHO, 2011.

1.6. Mecanismo de ação e Toxicidade do benzoato de emamectina

A classe das avermectinas apresenta seu mecanismo de ação em mamíferos através da interação com receptores GABA_A dos canais de cloreto agindo como um agonista parcial. Esta ativação dos canais de cloro promovem hiperpolarização do neurônio e consequente inibição da propagação do potencial de ação inibindo a neurotransmissão (ABALIS, et al., 1986). No entanto o mecanismo de ação das avermectinas não é tão específico podendo afetar uma variedade de outros canais de cloro ligantes e voltagem dependentes (STEVENS;

BRECKENRIDGE, 2001). Xu et al. (2016) em seu trabalho demonstrou que a emamectina também afeta outros canais iônicos dependentes de ligante, sendo dois receptores nicotínicos seletivos a cátions ($\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$ nAChR) e outros dois canais de cloreto GABA dependentes ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA_A e $\rho 1$ GABA_C).

Segundo Turner e Schaeffer (1989) a classe das avermectinas apresentam diferenças em sua ação sistêmica em vertebrados e invertebrados. Os mamíferos são menos sensíveis as avermectinas, pois elas possuem menor afinidade pelos receptores e uma relativa inabilidade de cruzar a barreira hematoencefálica (BHE) devido seu alto peso molecular.

Nos animais invertebrados as avermectinas agem nos canais de cloreto controlados por glutamato localizados no tecido periférico, podendo ser na junção interneuronal ou na junção neuromuscular, enquanto nos mamíferos estes sítios de ação estão compreendidos no sistema nervoso central (ALMEIDA; AYRES, 2006.).

Porém, algumas espécies podem apresentar alteração na glicoproteína P por uma mutação no gene MDR1 (ABCB1). Esta glicoproteína pode ser encontrada em tecidos que promovam absorção ou tenham função de barreira, em variados epitélios e tecidos excretórios como pulmão, BHE, fígado, rim e ductos biliares. Na BHE de mamíferos sua função mais importante é a presença desta no lúmen da membrana plasmática do endotélio capilar, facilitando a prevenção de numerosos xenobióticos e compostos endógenos de cruzar a barreira hematoencefálica. Esta proteína também está correlacionada com a capacidade de alguns parasitas em desenvolverem resistência a alguns princípios ativos (ALMEIDA; AYRES, 2006; CÁRCAMO, 2011; KENNEDY; TIERNEY; MITTELSTADT, 2014).

Mesmo o BE apresentando dificuldade em ultrapassar a BHE pelo seu alto peso molecular, resíduos da emamectina foram encontrados na medula espinhal e cérebro de ratos por Mushtaq et al. (1996). Wise et al. (1997) avaliaram o potencial da exposição gestacional ao BE em produzir neurotoxicidade em prole de ratos. Foi observado que a exposição gestacional de ratos produziu evidências de neurotoxicidade na prole F1 e causou alterações comportamentais observadas na atividade locomotora e na resposta ao estímulo sonoro.

Existem poucos estudos com a avaliação neurocomportamental de animais expostos ao BE. Porém, a exposição a outras moléculas da classe das

avermectinas como a ivermectina e doramectina provocaram alterações ansiolíticas, prejuízo da coordenação motora e alterações na atividade locomotora. Spinosa et al. (2000) encontrou alterações nas neurotransmissões dopaminérgica, noradrenérgica e serotoninérgica no sistema nervoso central de ratos expostos a doramectina, e consideraram como consequência do fortalecimento na neurotransmissão Gabaérgica induzida pela doramectina.

Alterações histopatológicas em cérebro foram observadas em pombos expostos a avermectina no trabalho de Li et al. (2013), os quais sugeriram que o mecanismo que causou estas alterações foi que a exposição ao praguicida induziu o estresse oxidativo o qual alterou biomacromoléculas, função e estrutura dos tecidos, que por último irá influenciar as atividades fisiológicas normais da célula.

A estimulação da produção de radicais livres, prejuízo da capacidade antioxidante e a peroxidação lipídica são mecanismos de toxicidade dos pesticidas, e tem sido associado ao desenvolvimento de doenças pela exposição a praguicidas. E é reconhecido que o estresse oxidativo tem papel importante na etiologia e progressão de doenças crônicas (ABDOLLAHI et al., 2004; SOLTANINEJAD; ABDOLLAHI, 2009; RAJENDRAN, 2014).

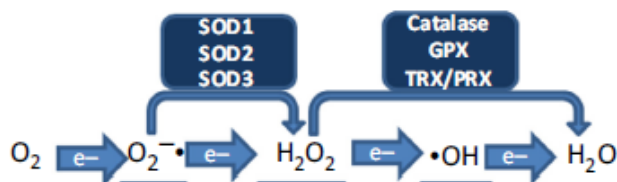
O estresse oxidativo ocorre quando a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) que são geradas excede a capacidade antioxidante da célula, o qual pode resultar em danos a componentes celulares como lipídeos de membrana, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outras pequenas moléculas (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; RAJENDRAN, 2014).

O sistema antioxidante é dividido em enzimático e não enzimático sendo responsável por neutralizar as espécies reativas de oxigênio. As enzimas SOD, CAT e GSHPx pertencem ao sistema antioxidante enzimático, e estão envolvidas na manutenção do balanço REDOX e por neutralizar as ERO, como vemos na Figura 4. Porém, quando ocorre aumento no estresse oxidativo a capacidade de defesa contra as ERO pode colapsar (BIRBEN et al., 2012; NWANI et al., 2016).

A exposição de ratos ao BE no trabalho de EL-Sheik e Galal (2015) provocou um aumento da peroxidação lipídica em tecido hepático associado a redução da atividade da enzima antioxidante SOD. Li et al. (2013) também observaram aumento do estresse oxidativo em tecido cerebral de pombos

expostos ao BE, indução da peroxidação lipídica e redução da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GSHPx.

Figura 4. Redução sequencial do O_2 pelas enzimas antioxidantes.



Fonte: Patel, 2016.

1.7. Estrutura da dissertação

Esta dissertação de mestrado foi elaborada seguindo estrutura de artigo científico, a qual possibilitou a elaboração de dois artigos científicos.

O primeiro artigo foi submetido à revista *Toxicology*, intitulado “Sub-chronic emamectin benzoate exposure affects anxiety, motor coordination, and disturbs biomarkers of oxidative stress in rat brain tissue”. Ele consistiu em uma avaliação das alterações comportamentais provocadas pelo BE e alterações do estresse oxidativo em cérebro de ratos.

O segundo artigo será submetido à revista *Free Radical Research*, intitulado “Sub-chronic emamectin benzoate exposure disturbs liver oxidative stress but not hepatic and renal function biomarkers”. Ele consistiu em uma avaliação da influência do BE sobre o estresse oxidativo em tecido hepático de ratos e sobre as enzimas da função hepática e renal nesses animais.

No final é apresentada uma conclusão geral dos resultados obtidos.

4. Conclusão geral

O presente trabalho de pesquisa permitiu avaliar os efeitos da exposição subcrônica de ratos ao BE, com a elaboração de dois artigos científicos. O primeiro artigo descreveu a avaliação da neurotoxicidade causada pela exposição ao BE e o segundo, a hepatotoxicidade e a quantificação dos biomarcadores da função hepática e renal. Juntos, os artigos demonstraram que a exposição subcrônica de ratos ao BE provocou alterações neurocomportamentais com um perfil ansiolítico, prejuízo da coordenação motora e estresse oxidativo nos tecidos cerebral e renal, sem aumentar a concentração sérica de biomarcadores das funções hepática e renal.

Estes resultados reforçam a relação entre a exposição à praguicidas e o desenvolvimento de doenças crônicas e neurodegenerativas, visto que alterações do estresse oxidativo e tais doenças têm sido correlacionadas.

São necessários trabalhos adicionais para melhor compreensão do mecanismo de ação determinante para as alterações comportamentais aqui observadas, incluindo pesquisas sobre neurotransmissores e estresse oxidativo em regiões cerebrais específicas responsáveis pela modulação comportamental e elucidação das vias moleculares específicas responsáveis pelas alterações oxidativas observadas.

5. Referências

ABALIS, I. M.; ELDEFAWI, A. T.; ELDEFAWI, M. E. Actions of avermectin B 1 a on the gamma-aminobutyric acid A receptor and chloride channels in rat brain. **Journal of Biochemical Toxicology**, Hoboken, v.1, p. 69-82, 1986.

ABDOLLAHI, M. et al. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, Smithtown, v. 10, RA141-A147, 2004.

ALMEIDA, M.A.O.; AYRES, M.C.C. Agentes antinematódeos. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 543-547.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Parecer técnico indeferimento do produto técnico a base do ingrediente ativo benzoato de emamectina**. Brasília, 2007. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/880a100047457e298a06de3fbc4c6735/parecer_indeferimento_ativo_benzoato_emamectin.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15 abr. 2015.

BENEDETTI, M.S. et al. Drug metabolism and pharmacokinetics. **Drug Metabolism Reviews**, Philadelphia, v. 41, n. 3, p. 344–390, 2009.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ. Journal**, London, UK, v. 5, p. 9–19, 2012.

BRASIL. Lei nº 12873/13, de 24 de outubro de 2013. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 de outubro de 2013a. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Portaria nº 1.109, de 6 de novembro de 2013. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 7 de novembro de 2013b. Seção 1, p. 5.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Portaria nº 273, de 21 de dezembro de 2016. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de dezembro de 2016. Nº246, Seção 1, p. 88. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=88&data=23/12/2016>. Acesso em: 15 jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Produtos para combater a Helicoverpa Armigera tiveram o uso prorrogado**. 19 de março de 2015. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2015/03/produtos-para-combater-a-helicoverpa-armigera-tiveram-o-uso-prorrogado>>. Acesso em: 08 maio 2015.

BURG, R.W. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrob Agents Chemother**, Oxford, UK, v. 15, p. 361–367, 1979.

CANGA, A.G. et al. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. **The Veterinary Journal**, Leon, v. 179, p. 25-37, 2009. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.07.011

CÁRCAMO, J.C. et. al. Effect of emamectin benzoate on transcriptional expression of cytochromes P450 and the multidrug transporters (Pgp and MRP1) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the sea lice *Caligus rogercresseyi*. **Aquaculture**, Oxford, v. 321, p. 207-215, 2011.

CARNEIRO, F.F. (Coord) et. al **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624 p.

CRUMP, A.; ÔMURA, S. Ivermectin, “wonder drug” from Japan: the human use perspective. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Science**, Tokio, v. 87, p. 13–28, 2011.

DANAHER, M. et al. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **Journal of Chromatography B : Analytical Technology Biomedical Life Science**, Amsterdam, v. 844, p. 175–203, 2006. doi:10.1016/j.jchromb.2006.07.035

EL-SHEIKH, E.-S.A.; GALAL, A.A. Toxic effects of sub-chronic exposure of male albino rats to emamectin benzoate and possible ameliorative role of *Foeniculum vulgare* essential oil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 39, p. 1177-1188, 2015. doi: 10.1016/j.etap.2015.04.008.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. MAPA. **Ações emergenciais propostas pela EMBRAPA para o manejo integrado de *helicoverpa spp.* em áreas agrícolas**. 2013. 5 p. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Manejo-Helicoverpa%20\(2\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Manejo-Helicoverpa%20(2).pdf)>. Acesso em: 09 maio 2015.

FAO.WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. In: _____. **Pesticide residues in food 2011**; Fao plant production and protection paper 2011. Roma, 2011. Disponível em: <http://apps.who.int/pesticide-residues-jmpr-database/Document/213>. Acesso em: 10 jan. 2017.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores de desenvolvimento sustentável brasil 2012**. Rio de Janeiro: IBGE, 2012.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA . **Censo agropecuário 2006**: Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro: IBGE; 2009. 777 p.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA . **Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Acerca dos Agrotóxicos**. Ministério da Saúde, 06 de abr. de

2015. Disponível em: <
http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf>. Acesso em: 3 maio 2015.

KENNEDY, C.J.; TIERNEY, K.B.; MITTELSTADT, M. Inhibition of P-glycoprotein in the blood–brain barrier alters avermectin neurotoxicity and swimming performance in rainbowtrout. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 146, p.176-185, 2014.

KIM-KANG, H. et al. Tissue distribution, metabolism, and residue depletion study in Atlantic Salmon following oral administration of [3-H] Emamectin Benzoate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 7, p. 2108–2118, 2004.

LASOTA, J.A.; DYBAS, R.A. A Vermectins, a novel class of compounds: implications for use in Arthropod Pest Control. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 36, p. 91–17, 1991. doi:10.1146/annurev.ento.36.1.91

LI, M. et al. Antioxidant response and histopathological changes in brain tissue of pigeon exposed to avermectin. **Ecotoxicology**, New York, v. 22, p. 1241–1254, 2013. doi:10.1007/s10646-013-1112-7

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: ANA e RBJA, 2011. 190 p. Disponível em: <
<http://br.boell.org/sites/default/files/agrotoxicos-no-brasil-mobile.pdf>>. Acesso em: 1 maio 2015.

MITTAL et al. Cytochrome P450 in cancer susceptibility and treatment. **Advances in Clinical Chemistry**, v.71, p. 77-139, 2015.

MUSHTAQ, M. et al. Absorption, tissue distribution, excretion, and metabolism of ³H and ¹⁴C-labeled emamectin benzoate in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 3342-3349, 1996.

MUSHTAQ, M. et al. Fate of ³H-and ¹⁴C- Labeled emamectin benzoate in lactating goats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, p. 253-259, 1997.

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

NWANI, C.D. et al. Toxicological effects of carbosulfan in rats: antioxidant, enzymological, biochemical, and hematological responses. **Toxicol and Industrial Health**, London, UK, v. 32, p. 1335–1343, 2016.

PATTEL M. et al. Targeting oxidative stress in central nervous system disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.37, n. 9, p. 768-778, 2016.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: CASARETT, L.J.; DOULL,

J.; KLAASEN, C.D. **Casarett and doull's toxicology**: the basic science of poisons. New York : McGraw-Hill, 2001. Chap. 6, p. 133-224.

PARKINSON, B., OGILVIE, B.W. Biotransformation of xenobiotics. In: KLAASEN, C.D.; WATKINGS III, J.B. **Casarett e Doull's essentials of toxicology**. 2nd. ed. New York: McGraw-Hill, 2010. Chap. 6.

PIAUÍ-ADAPI. Instrução Normativa N° 15204-01/2015 – DG ADAPI, de 13 de fevereiro de 2015. **Diário Oficial do Estado do Piauí**, Poder Executivo, Teresina, PI, 24 de fevereiro de 2015. P. 13.

RAJENDRAN, P. et al. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 436, p. 332–347, 2014.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Agricultura e Agronegócio, Departamento de Defesa Agropecuária, Gerência de Defesa Vegetal. **Nota Técnica sobre a praga *Helicoverpa Armigera***. Rio Grande do Sul, 2014.

SHOOP, W.L.; MROZIK, H.; FISHER, M.H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 59, p. 139-156, 1995.

SKÁLOVÁ et al. Effect of ivermectin on induction of cytochromes P450 in male rats. **Chemical Papers**, Bratislava, v.54, v.4, p. 249-253. 2000.

SOLTANINEJAD, K.; ABDOLLAHI, M. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. **Medical Science Monitor**, v. 15, p. RA75-A90, 2009.

SPINOSA, H.S., GERENUTTI, M., BERNARDI, M.M. Anxiolytic and anticonvulsant properties of doramectin in rats: behavioral and neurochemistic evaluations. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Philadelphia, v. 129, p. 359-366, 2000.

STEVENS, J.; BRECKENRIDGE, C.B. The Avermectins: insecticidal and antiparasitic agents. In: KRIEGER, R.I.; KRIEGER, W.C. **Handbook of pesticide toxicology**. 2nd. ed. New York: Elsevier, 2001. p. 1157–1167. doi:10.1016/B978-012426260-7.50059-8

TURNER, M. J.; SCHAEFFER, J. M. Mode of action of Ivermectin. In: CAMPBELL, W. C. Ed. **Ivermectin and Abamectin**. New York: Springer-Verlag, 1989. p. 73–88.

XU, X. et al. Emamectin is a non-selective allosteric activator of nicotinic acetylcholine receptors and GABA_{A/C} receptors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Philadelphia, v. 473, p. 795-800, 2016. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.03.097

WISE, L.D. et al. Developmental neurotoxicity evaluation of the Avermectin pesticide, Emamectin Benzoate, in Sprague–Dawley Rats. **Neurotoxicology and Teratology**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 315–326, 1997.

WRZESINSKI, C.L. et. al. Dermal penetration of 4''-(*epi*-methylamino)-4''-deoxyavermectin B_{1a} Benzoate in the Rhesus Monkey. **Food and chemical toxicology**, Oxford, v. 35, p. 1085-1089, 1997.

WRZESINSKI, C.L. et. al. Metabolism of ³H/¹⁴C- Labeled 4''-deoxy 4''-epimethylaminoavermectin B_{1a} Benzoate in chickens. **Drug metabolism and distribution**, Washington, v.26, n.85, p. 786-794, 1998.

ZENG, Z. et al. Fate of 4''- epiacetyl amino – 4''- deoxyavermectin B₁ in rats. **Drug metabolism and distribution**, Philadelphia, v.24, n. 5, p. 572-578, 1996a.

ZENG, Z. et al. Role of cytochrome P450 isoforms in the metabolism of abamectin and ivermectin in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, p. 3374-3378, 1996b.

ZENG, Z. et al. Identification of cytochrome P4503A as the major enzyme responsible for the metabolism of ivermectin by human liver microsomes. **Xenobiotics**, Pavia, v.28, n.3, p. 313-321,1998.

ZHU, W.J. et al. Effects of avermectin on microsomal cytochrome P450 enzyme in the liver and kidneys of pigeons. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 38, p. 562-569, 2014.