



Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho -

UNESP

**Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de
Materiais**

Jaqueline Nascimento da Silva

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ETEFON SOBRE MODELOS DE
BIOMEMBRANAS E SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTIVA DE RATOS MACHOS**

Presidente Prudente - SP
2023

Jaqueline Nascimento da Silva

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ETEFON SOBRE MODELOS DE BIOMEMBRANAS E SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTIVA DE RATOS MACHOS

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutora junto à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT), área de Ciência dos Materiais, sob orientação do Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino e coorientação da Prof^a. Dra. Ana Paula Alves Favareto e Prof. Dr. Wallance Moreira Pazin.

Presidente Prudente - SP
2023

Silva, Jaqueline Nascimento da.

Avaliação dos efeitos da exposição ao etefon
sobre modelos de biomembranas e sobre a função
reprodutiva de ratos machos / Jaqueline
Nascimento da Silva. - Bauru, 2023

96 . : il.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru
Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino
Coorientadora: Ana Paula Alves Favareto
Coorientador: Wallance Moreira Pazin

1. Etefon. 2. Modelos de membrana. 3. Filmes
de Langmuir. 4. Reprodução. 5. Rato. I.
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE JAQUELINE NASCIMENTO DA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 09 dias do mês de outubro do ano de 2023, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de JAQUELINE NASCIMENTO DA SILVA, intitulada **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ETEFON SOBRE MODELOS DE BIOMEMBRANAS E SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTIVA DE RATOS MACHOS**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia/Caampus de Presidente Prudente, Profa. Dra. ARIELLE CRISTINA ARENA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu, Prof. Dr. WELLERSON RODRIGO SCARANO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Setor de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Profa. Dra. CLARISSA DE ALMEIDA OLIVATI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciência e Tecnologia - Unesp/ Câmpus de Presidente Prudente, Prof. Dr. PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - Unesp/Câmpus de Assis. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO



Documento assinado digitalmente
CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO
Data: 09/10/2023 21:40:37-0900
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

*Dedico esse trabalho in memoriam ao meu irmão Junior
Hey mano eu estou virando doutora e com certeza você
seria o primeiro a querer comemorar essa vitória comigo
Você faz falta aqui...*

Agradecimentos

À Deus, que é meu refúgio, proteção e me sustentou em diversas situações até aqui.

Ao meu orientador, Casé, e meus coorientadores Ana Paula e Wallance. Esse parágrafo não seria suficiente para expressar minha gratidão por tudo que aprendi com vocês durante esses anos. Além de ensinamentos teóricos, agradeço também aos ensinamentos para a vida que vieram em forma de puxão de orelha ou de conselho em um momento de descontração. Por onde eu for sempre levarei comigo tudo que aprendi com vocês.

À minha mãe Luzia e meu padrasto Antonio por sempre me apoiarem minhas decisões e me incentivarem. Agradeço também as diversas vezes que vocês se sacrificaram para que esse dia se tornasse uma realidade e por compreenderem minha ausência em momentos que não pude participar com vocês por estar “ocupada com as minhas coisas” como vocês dizem.

Aos meus amigos Angélica, Lívia, Daniel e Luis que sempre me apoiaram e estiveram dispostos a escutar quando os resultados davam certo e, também, quando dava tudo errado. À Angelica um agradecimento especial, pois por alguns finais de semana me ajudou no biotério com os animais. E ao Daniel também que me auxiliou na eutanásia. Literalmente amigos para todas as horas.

À Grazi, Tati e Maíza que dividiram muitos cafés, alguns vinhos também, e se tornaram boas amigas nesse período. Com certeza levarei vocês comigo além da pós graduação.

Ao meus queridos ex-alunos Naiara, Marcos, Bruna e Mylena que tanto me ajudaram na exposição e cuidado com os animais.

Ao grupo Noix, especialmente ao Mateus (famoso Mzão) e Luis Fernando por me auxiliarem com as medidas de PM-IRRAS. A Cibely pelo auxílio no biotério e a Gilia pelo auxílio com as GUVs e discussão dos resultados.

Ao prof. Chu da USP de São Carlos pela disponibilização do laboratório.

Aos professores e funcionários do POSMAT, especialmente a Letícia e Ingrid que sempre estiveram dispostas a ajudar.

Aos professores e funcionários do DFQB, especialmente a Angelica e ao Paulo que tanto me ajudaram nesses anos.

À professora Ana Flora por ter sido minha tutora durante o estágio docência, por todos os conselhos que me dava e por todo incentivo.

Ao suporte financeiro dado pela FAPESP, CNPq, INCT/INEO e UNIVESP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

*Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas.
Pessoas transformam o mundo.*

Paulo Freire

SILVA, J. N. de. **Avaliação dos efeitos da exposição ao etefon: um estudo em modelo animal e sistemas miméticos de membrana celular**. 2023. 96p. Tese (Doutora em Ciência e Tecnologia de Materiais) - UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2023.

RESUMO

Avaliação dos efeitos da exposição ao etefon sobre modelos de biomembranas e sobre a função reprodutiva de ratos machos

Os agrotóxicos constituem hoje um importante problema de saúde pública e dentre os possíveis efeitos adversos causados à saúde humana e animal, destacam-se as alterações reprodutivas. Os fosfolipídios são materiais muito aplicados como sistema mimético da estrutura lipídica da membrana celular para investigar a ação de diversos compostos sobre tal estrutura. O etefon é um regulador de crescimento do grupo químico etileno, utilizado para fortalecer cereais, promover maturação de frutas e hortaliças, entre outras funções. Esta tese tem como objetivo avaliar os efeitos do etefon sobre a morfofisiologia reprodutiva de ratos machos adultos e investigar os efeitos do etefon sobre sistemas miméticos da estrutura lipídica da membrana celular. Para avaliar os efeitos do etefon sobre a morfofisiologia reprodutiva, 40 ratos machos adultos foram expostos oralmente a 0 (controle), 150 (E150), 200 (E200) e 400 mg/kg/dia (E400) de etefon comercial por 30 dias consecutivos. Os parâmetros espermáticos foram alterados nos grupos expostos. Produção diária de espermatozoides diminuiu nos grupos expostos quando comparados ao controle. Observou-se uma redução na porcentagem de espermatozoides móveis com trajetória progressiva e um aumento no número de espermatozoides com trajetória não progressiva nos três grupos expostos. No grupo E200 houve aumento na porcentagem de espermatozoides imóveis comparado ao grupo controle. Ocorreu uma diminuição na porcentagem de espermatozoides normais nos grupos E200 e E400 em relação ao controle e nos três grupos houve aumento de cabeças isoladas e caudas dobradas e isoladas. Na análise da histologia do testículo dos grupos expostos notou-se a presença de esfoliação de células germinativas na luz do túbulo seminífero, vacuolização e regiões com intensa perda de células germinativas. Na análise da histologia do epidídimo observou-se grande número de células claras, inclusive hiperplásicas, massa de células descamadas no lúmen, vacuolização e hiperplasia cribriforme. A integridade de membrana plasmática e acrossomal foi reduzida nos grupos E200 e E400 quando comparados ao controle. A interação do etefon com sistemas miméticos formados pelos fosfolipídios DPPC, POPC e DOPC foi investigada por meio de vesículas unilamelares gigantes (GUVs – bicamadas lipídicas) e filmes de Langmuir (monocamadas lipídicas). As GUVs de DPPC foram as menos afetadas na presença do etefon. Já as GUVs de POPC apresentaram maior percentual de alterações morfológicas (perda de contraste de fase, formato pera e *buds*), inclusive rompimento de vesículas com cerca de 5 a 11 minutos de exposição ao etefon. Para os filmes de Langmuir, as isotermas π -A mostraram que o etefon interage na interface ar/água com o POPC e DOPC causando deslocamento nas isotermas. O PM-IRRAS mostrou que, embora não se observem deslocamentos nas isotermas de DPPC, há interação do etefon com os grupos-cabeça colina e fosfato. Para o DOPC observam-se deslocamentos semelhantes ao do POPC. Para os três fosfolipídios, o PM-IRRAS mostrou que o etefon gera uma desordem nas cadeias. Diante disso, pode-se concluir que o etefon pode gerar danos à saúde geral, à saúde reprodutiva e a membrana celular. Tais resultados evidenciam a importância de estudos que avaliem a toxicidade geral e reprodutiva de agrotóxicos, principalmente do etefon que apresenta poucos estudos.

Palavras-chave: Etefon; modelos de membrana; filmes de Langmuir; reprodução; rato.

SILVA, J. N. de. **Avaliação dos efeitos da exposição ao etefon: um estudo em modelo animal e sistemas miméticos de membrana celular**. 2023. 96p. Tese (Doutora em Ciência e Tecnologia de Materiais) - UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2023.

ABSTRACT

Evaluation of the effects of exposure to etefon on biomembrane models and on the reproductive function of male rats

Pesticides today constitute an important public health problem and among the possible adverse effects caused to human and animal health, reproductive changes stand out. Phospholipids are materials widely used as a mimetic system for the lipid structure of the cell membrane to investigate the action of various compounds on this structure. Ethephon is a growth regulator of the chemical group ethylene, used to strengthen cereals, promote the ripening of fruits and vegetables, among other functions. This thesis aims to evaluate the effects of ethephon on the reproductive morphophysiology of adult male rats and investigate the effects of ethephon on mimetic systems of the lipid structure of the cell membrane. To evaluate the effects of ethephon on reproductive morphophysiology, 40 adult male rats were orally exposed to 0 (control), 150 (E150), 200 (E200) and 400 mg/kg/day (E400) of commercial ethephon for 30 consecutive days. . Sperm parameters were altered in the exposed groups. Daily sperm production decreased in exposed groups when compared to control. A reduction in the percentage of motile sperm with a progressive trajectory and an increase in the number of sperm with a non-progressive trajectory was observed in the three exposed groups. In the E200 group there was an increase in the percentage of immobile sperm compared to the control group. There was a decrease in the percentage of normal sperm in the E200 and E400 groups in relation to the control and in the three groups there was an increase in isolated heads and folded and isolated tails. In the analysis of the histology of the testicle of the exposed groups, the presence of exfoliation of germ cells in the lumen of the seminiferous tubule, vacuolization and regions with intense loss of germ cells were noted. In the analysis of the histology of the epididymis, a large number of clear cells were observed, including hyperplastic ones, a mass of desquamated cells in the lumen, vacuolization and cribriform hyperplasia. Plasma and acrosomal membrane integrity was reduced in the E200 and E400 groups when compared to the control. The interaction of ethephon with mimetic systems formed by the phospholipids DPPC, POPC and DOPC was investigated using giant unilamellar vesicles (GUVs – lipid bilayers) and Langmuir films (lipid monolayers). DPPC GUVs were the least affected in the presence of ethephon. POPC GUVs, on the other hand, showed a higher percentage of morphological changes (loss of phase contrast, pear shape and buds), including rupture of vesicles after approximately 5 to 11 minutes of exposure to ethephon. For Langmuir films, the π -A isotherms showed that ethephon interacts at the air/water interface with POPC and DOPC causing displacement in the isotherms. PM-IRRAS showed that, although no shifts are observed in the DPPC isotherms, there is an interaction of ethephon with the choline and phosphate head groups. For DOPC, displacements similar to those for POPC are observed. For the three phospholipids, PM-IRRAS showed that ethephon generates disorder in the chains. Given this, it can be concluded that ethephon can cause damage to general health, reproductive health and the cell membrane. Such results highlight the importance of studies that evaluate the general and reproductive toxicity of pesticides, especially ethephon, which has few studies.

Keywords: Ethephon; membrane models; Langmuir films; reproduction; rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Comercialização de agrotóxicos e afins (em toneladas de ingredientes ativos) de 2009 a 2020 no Brasil.....	21
Figura 2 -	Registro de agrotóxicos, componentes e afins no Brasil por ano.....	22
Figura 3 -	Classes toxicológicas dos agrotóxicos.....	23
Figura 4 -	Processo de desprotonação do etefon.....	29
Figura 5 -	Ilustração das fases de uma bicamada composta por um único fosfolípido.....	31
Figura 6 -	Ilustração das fases da compressão de filmes de Langmuir e organização das moléculas durante a compressão.....	34
Figura 7 -	Representação do tamanho das vesículas lipídicas unilamelares.....	35
Figura 8 -	Representação das estruturas químicas dos materiais utilizados.....	37
Figura 9 -	Consumos de água (mL) e ração (g) dos ratos dos grupos controle expostos a 150 (E150), 200 (E200) e 400mg/kg (E400) de etefon.....	47
Figura 10 -	Fotomicrografias de secções transversais de testículo de ratos dos grupos controle (A – C) e expostos a 150 (E150 - D, E), 200 (E200 - F, H, I) e 400 mg/kg (E400 - G, J - L) de etefon.....	49
Figura 11 -	Fotomicrografias de secções longitudinais dos segmentos cabeça e cauda do epidídimo dos ratos dos grupos controle (A - D) e expostos a 150 (E150 - E - J), 200 (E200 - K - L) e 400 mg/kg (E400 - M - O) de etefon.....	52
Figura 12 -	Motilidade e morfologia de espermatozoides dos ratos dos grupos controle e expostos a 150 (E150), 200 (E200) e 400mg/kg (E400) de etefon.....	56
Figura 13 -	Integridade da membrana plasmática (A) e acrossomal (B) dos ratos dos grupos controle e expostos a 150 (E150), 200 (E200) e 400mg/kg (E400) de etefon.....	57
Figura 14 -	GUVs de DPPC, POPC e DOPC na ausência de etefon, após 30 min de observação.....	58
Figura 15 -	Imagens de microscopia de contraste de fase de GUVs de DPPC, após 30 minutos de exposição ao etefon.....	59

Figura 16 -	Imagens de microscopia de contraste de fase de GUVs de POPC expostas ao etefon.....	60
Figura 17 -	Isotermas π -A de DPPC na ausência e presença de etefon em diferentes concentrações.....	62
Figura 18 -	Esquema representativo da estruturação da monocamada de DPPC na fase condensada para as subfases contendo etefon.....	63
Figura 19 -	Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície de DPPC na ausência e presença de etefon em diferentes concentrações.....	64
Figura 20 -	Isotermas π -A de POPC na ausência e presença de etefon em diferentes concentrações.....	65
Figura 21 -	Esquema representativo da estruturação da monocamada de POPC nas fases líquida e condensada para as subfases contendo etefon.....	66
Figura 22 -	Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície de POPC na ausência e presença de etefon em diferentes concentrações.....	67
Figura 23 -	Isotermas π -A de DOPC na ausência e presença de etefon em diferentes concentrações.....	68
Figura 24 -	Esquema representativo da estruturação da monocamada de DOPC nas fases líquida e condensada para as subfases contendo etefon.....	69
Figura 25 -	Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície de DOPC na ausência e presença de etefon em diferentes concentrações.....	70
Figura 26 -	Ciclos de compressão-descompressão e curvas de estabilidade das monocamadas de DPPC na ausência e presença de etefon.....	71
Figura 27 -	Ciclos de compressão-descompressão e curvas de estabilidade das monocamadas de POPC na ausência e presença de etefon.....	72
Figura 28 -	Ciclos de compressão-descompressão das monocamadas de DOPC na ausência e presença de etefon.....	74
Figura 29 -	Esquema representativo da oxidação de fosfolípido insaturado e formação de aldeído.....	75
Figura 30 -	Espectros de PM-IRRAs do fosfolípido DPPC na ausência e presença de etefon.....	76
Figura 31 -	Espectros de PM-IRRAs do fosfolípido POPC na ausência e presença de etefon.....	78

Figura 32 - Espectros de PM-IRRAs do fosfolipídio DOPC na ausência e presença de etefon.....	80
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fases e valores de módulo compressional.....	43
Tabela 2 -	Peso final, ganho de peso e peso dos órgãos reprodutores, fígado e rim dos ratos dos grupos controle e expostos a 150 (E150), 200 (E200) e 400 mg/kg (E400) de etefon.....	46
Tabela 3 -	Contagens de espermatozoides no testículo e epidídimo em ratos dos grupos controle e expostos a 150 (E150), 200 (E200) e 400 mg/kg (E400) de etefon.....	54
Tabela 4 -	Valores de módulo compressional em 30 mN/m para as monocamadas de DPPC na ausência e presença de etefon nas diferentes concentrações.....	64
Tabela 5 -	Valores de módulo compressional em 30 mN/m para as monocamadas de POPC na ausência e presença de etefon nas diferentes concentrações.....	67
Tabela 6 -	Valores de módulo compressional em 30 mN/m para as monocamadas de DOPC na ausência e presença de etefon nas diferentes concentrações.....	70
Tabela 7 -	Atribuições das principais bandas de vibração da cabeça do DPPC na ausência e presença de etefon na subfase.....	76
Tabela 8 -	Atribuições das principais bandas de vibração da cabeça do POPC na ausência e presença de etefon na subfase.....	78
Tabela 9 -	Atribuições das principais bandas de vibração da cabeça do DOPC na ausência e presença de etefon na subfase.....	80

LISTA DE ABREVIACÕES

µL – Microlitro

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

cm – Centímetro

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DOPC - 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina

DPPC - 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina

ETF- - Etefon desprotonado

g - Gramas

GUV – Vesícula unilamelar gigante

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IDA – Ingestão diária aceitável

kg – Quilograma

LMR – Limite máximo de resíduo

LUV – vesícula unilamelar grande

L α – Fase fluída

L β – Fase gel

M – Molar

mg – Miligrama

mL - Mililitro

mN/m – Mili Newton por metro

NaCl – Cloreto de sódio

nm – Nanometro

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PDE – Produção diária de espermatozoides

POPC - 2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicerol-3- fosfatidilcolina

P β – Fase ripple

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SUV – vesícula unilamelar pequena

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2.	OBJETIVOS	19
3.	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1.	Agrotóxicos e meio ambiente.....	20
3.2.	Toxicidade dos agrotóxicos.....	23
3.3.	Sistema reprodutor masculino	24
3.4.	Toxicidade reprodutiva dos agrotóxicos	26
3.5.	Etefon.....	27
3.6.	Membrana celular	30
3.7.	Sistemas miméticos de membrana celular	32
3.7.1.	Filmes de Langmuir.....	32
3.7.2.	Vesículas unilamelares gigantes (GUVs).....	35
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1.	Materiais de estudo	37
4.2.	Protocolo animal.....	37
4.2.1.	Animais e ambiente de experimentação.....	37
4.2.2.	Delineamento experimental e exposição.....	38
4.2.3.	Coleta de materiais biológicos	38
4.2.4.	Análise histopatológica	39
4.2.5.	Cálculo da produção diária de espermatozoides por testículo	39
4.2.6.	Contagem do número e cálculo do tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo.....	40
4.2.7.	Análise da motilidade espermática.....	40
4.2.8.	Análise da morfologia espermática	40
4.2.9.	Análise da integridade de membrana plasmática	40
4.2.10.	Determinação da integridade da membrana acrossomal	41
4.2.11.	Forma de análise de resultados.....	41
4.3.	Modelos miméticos de membrana celular.....	41
4.3.1.	GUVs.....	41

4.3.2.	Isotermas π -A	42
4.3.3.	Módulo compressional (Cs^{-1})	43
4.3.4.	Estudo da estabilidade	43
4.3.5.	Espectroscopia de absorção de reflexão infravermelha de modulação de polarização (PM-IRRAS)	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1.	Avaliação da saúde geral e reprodutiva dos ratos.....	45
5.1.1.	Toxicidade geral	45
5.1.2.	Análise histopatológica	47
5.1.3.	Avaliação espermática.....	53
5.2.	Estudo da interação molecular entre fosfatidilcolinas e etefon.....	58
5.2.1.	Interação de bicamadas lipídicas com etefon	58
5.2.2.	Interação das monocamadas lipídicas com etefon	61
5.2.3.	Estudo da histerese e estabilidade das monocamadas lipídicas	71
5.2.4.	PM-IRRAS	75
6.	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
	ANEXO - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO CEUA	90

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A agricultura é uma prática que foi descoberta pela humanidade a muito tempo e proporcionou o desenvolvimento e surgimento da sociedade atual mediante o aumento da produção de alimento. Porém esse aumento na oferta de alimentos, favoreceu o aparecimento de insetos, fungos, ervas daninhas, entre outras pragas. A partir da dificuldade de controlar essas pragas, surge uma preocupação e estudos constantes para encontrar formas de controlá-las (KING, 2017; LIMA; SILVA; IWATA, 2019).

Tradicionalmente, substâncias químicas são utilizadas no controle de pragas. Os sumérios utilizavam enxofre para combater insetos a 2500 a.C, por exemplo. No entanto, a partir dos séculos XVIII e XIX, com a Revolução Industrial, teve início a mecanização do campo e, conseqüentemente, o aumento da produção agrícola. A partir desse momento surge o primeiro produto considerado agrotóxico, chamado de Bordeaux Mixture ou calda bordelesa. Esse composto surgiu em necessidade das grandes perdas agrícolas causadas pelo míldio-da-videira (MOURA, 2018).

A indústria de agrotóxicos a nível mundial surgiu após a Primeira Guerra. No Brasil as primeiras unidades produtivas desses compostos chegaram em meadas da década de 1940 (TAVEIRA; ALBUQUERQUE, 2018). O Brasil é um dos países que mais consome agrotóxicos na atualidade, devido a sua extensa área agricultável, disponibilidade de culturas, boa localização geográfica e condições climáticas (PIGNATI; OLIVEIRA; SILVA, 2019).

Agrotóxicos são compostos de natureza química, utilizadas em larga escala para melhorar a produção agrícola. Porém, esses compostos são persistentes nos compartimentos ambientais e podem se acumular ou bioacumular no meio ambiente como um todo (FATMA et al., 2017). Os agrotóxicos podem ser classificados em quatro grupos principais, sendo eles piretróides, organoclorados, carbamatos e organofosforados. Esses compostos atuam através de mecanismos que difere a função de cada um deles. Alguns são considerados reguladores de crescimento, tendo a função de estimular ou retardar o crescimento de pragas ou até mesmo de plantas, os repelentes tem a função de repelir pragas, os atrativos de atrair as pragas e os quimioesterilizantes de esterilizar as pragas (ABUBAKAR et al., 2020).

O uso indiscriminado de agrotóxicos resulta em exposição dos agricultores, seu grupo familiar e da população em geral. Essa exposição pode acontecer de diferentes formas, destacando a exposição ocupacional, ambiental, acidental e a alimentar. Ambas podem resultar na contaminação dos trabalhadores e da população, gerando agravos à saúde (PIGNATI; OLIVEIRA; SILVA, 2019).

Dentre os agrotóxicos disponíveis hoje, temo o etefon (ácido 2-cloroetilfosfônico) que é um regulador de crescimento do grupo químico etileno. As vias de exposição mais comuns para esse pesticida são oral, dérmica e inalatória (BAYER, 2023). Esse pesticida é um regulador de crescimento, utilizado para auxiliar na maturação, estímulo de floração, entre outros (TAHERI et al., 2012; MOUSTAKIME; HAZZOUMI; JOUTEI, 2018).

Apesar de bastante utilizado na agricultura, estudos toxicológicos com o etefon são escassos. E os estudos encontrados até o momento abordam o impacto da exposição ao etefon sobre a fertilidade masculina (ABD ELDAIM et al., 2018; JAHANGIRFARD et al., 2021). Considerando que a população em geral estaria exposta a este composto e aos seus potenciais efeitos sobre a fertilidade masculina, identificar possíveis prejuízos à qualidade espermática se torna fundamental.

Um dos parâmetros utilizados para avaliar a qualidade espermática é a integridade da membrana plasmática. Essa membrana consiste em uma estrutura predominantemente fluida, onde macromoléculas interagem de forma sinérgica, conferindo adaptabilidade a diferentes estímulos ambientais (INGRAM, 1976; YAYANOS; DIETZ; VAN BOXTEL, 1979; ROMANTSOV, GUAN, WOOD, 2009). A fluidez da membrana plasmática está relacionada com as propriedades físico-químicas de seus constituintes, sendo eles os fosfolipídios, colesterol e glicopeptídeos (VIEIRA; ROCHA; RIBEIRO, 2022).

A membrana celular funciona como uma barreira que separa o meio intracelular do meio extracelular, mantendo, assim, a compartimentalização e garantindo a atividade celular sem que haja dispersão das moléculas essenciais para o metabolismo celular (GERSHFELD, 1976). Por ser uma barreira protetora, a membrana celular é frequentemente atacada por contaminantes, como os agrotóxicos. Sendo assim é importante compreender quais as interações moleculares que ocorrem entre esses contaminantes e os fosfolipídios presentes na membrana celular.

Devido à dificuldade de utilizar membranas *in vivo* para estudar interações moleculares entre os fosfolipídios presentes na membrana com contaminantes (GARBETA et al., 2015), faz-se necessário a utilização de sistemas miméticos de membranas celular para compreensão primária dos possíveis efeitos que podem ocorrer sobre o organismo vivo. Portanto, os modelos miméticos de membrana são amplamente utilizados nos estudos de interação, a fim de entender o comportamento celular e as propriedades da membrana biológica (AYE; ROTH; AKPA, 2016; JING et al., 2016).

Os sistemas miméticos de membranas produzidos através de filmes de Langmuir são amplamente estudados (COLLIER, 2015; HASSAN et al., 2016). Além desses, as vesículas unilamelares gigantes (GUVs) também são empregadas devido a eficiência como modelos de

membrana (ZHU et al., 2016). As GUVs apresentam estruturas lipídicas automontadas em bicamadas e, dentre as vantagens apresentadas, permitem a observação direta de suas estruturas em microscopia óptica, como as de contraste de fase, fluorescência e confocal (HE et al., 2016).

O sistema reprodutor masculino é, normalmente, suscetível a ação de diversos contaminantes ambientais, inclusive agrotóxicos. Tem sido amplamente relatado na literatura os efeitos sobre esse sistema, entre eles as implicações sobre a fertilização. Um dos parâmetros avaliados na qualidade espermática é a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides. A membrana plasmática também é susceptível a ação dos contaminantes ambientais, que podem interferir em sua organização e gerar danos as células. Sendo assim, o presente trabalho avaliou os efeitos da exposição ao etefon sobre a morfofisiologia do sistema reprodutor masculino e sobre as interações moleculares com a fosfatilcolina presente nas membranas celulares dos espermatozoides.

2. OBJETIVOS

Este estudo de doutorado possui como objetivo geral avaliar os efeitos do etefon sobre a morfofisiologia reprodutiva de ratos machos adultos e sobre sistemas miméticos da estrutura lipídica da membrana celular.

No estudo dos efeitos *in vivo* avaliou-se o potencial toxicológico da exposição de ratos machos adultos ao etefon nas doses de 150, 200 e 400 mg/kg/dia, com ênfase nos possíveis impactos sobre a morfofisiologia reprodutiva. Dentre os parâmetros morfofisiológicos avaliados, está a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides. A partir dos resultados da avaliação dessa membrana, sentiu-se a necessidade de investigar os efeitos do etefon sobre modelos simples de membrana celular, a fim de compreender as interações moleculares entre os fosfatidilcolinas presentes na membrana celular e o etefon.

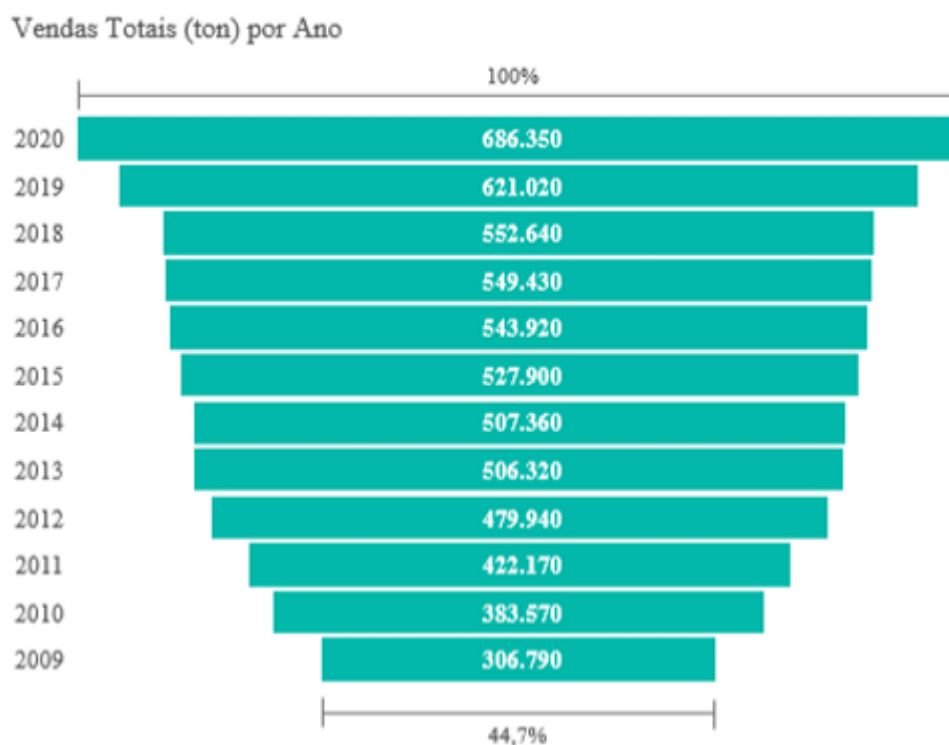
3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Agrotóxicos e meio ambiente

De acordo com o Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989, o Brasil define agrotóxico como sendo produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas. O uso destes compostos ocorre em pastagens na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989).

O aumento da demanda por alimentos e, conseqüentemente, a necessidade de aumentar a produtividade das culturas levaram ao uso generalizado de agrotóxicos em todo o mundo (POPP; PETŐ; NAGY, 2013; HANDFORD; ELLIOTT; CAMPBELL, 2015). O mercado brasileiro de defensivos agrícolas expandiu rapidamente na década de 2010 (190%), num ritmo de crescimento maior que o dobro do apresentado pelo mercado global (93%) (CARNEIRO et al., 2015). Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (2021), as vendas totais de agrotóxicos no Brasil de 2009 a 2020 passou de 306,79 para 686,35 mil toneladas (Figura 1), apresentando um aumento de mais de 123% no período avaliado.

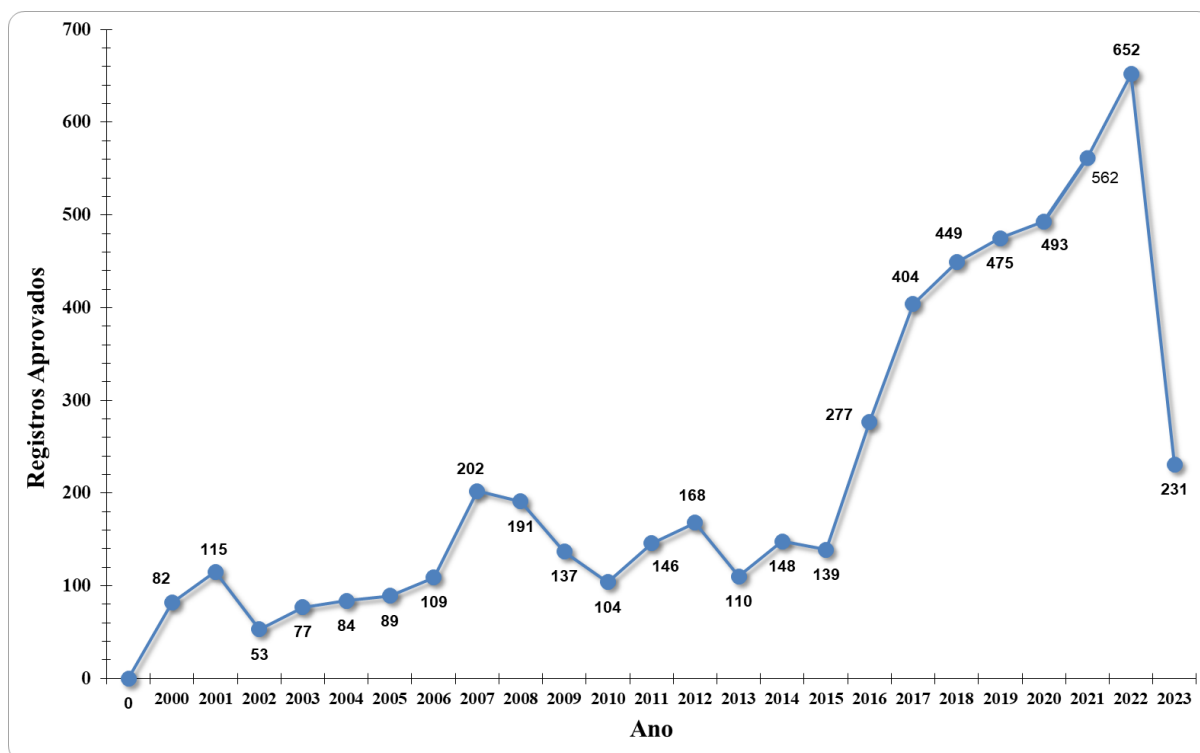
Figura 1 – Comercialização de agrotóxicos e afins (em toneladas de ingredientes ativos) de 2009 a 2020 no Brasil



Fonte: IBAMA, 2021.

O aumento na demanda por agrotóxicos tem promovido um aumento no número de registros destes compostos no Brasil. A Figura 2 mostra que no ano de 2021 o governo federal aprovou o registro de 562 agrotóxicos, já no ano de 2022 o número de aprovações subiu para 652 e as aprovações vêm crescendo anualmente. Até agosto de 2023 já foram 231 compostos aprovados (MAPA, 2023).

Figura 2 – Registro de agrotóxicos, componentes e afins no Brasil por ano



Fonte: MAPA (2023)

O uso intensivo de agrotóxicos acarreta uma série de problemas ao meio ambiente, como a degradação do solo, a contaminação das águas (LOPES; ALBUQUERQUE, 2021), a contaminação de organismos terrestres (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2008) e também de organismos aquáticos (ALMEIDA et al., 2022).

Para o uso dos agrotóxicos, tipicamente, leva-se em consideração o custo e a eficácia do princípio ativo. Entretanto, o comportamento do composto no solo, que define o destino final e o impacto ambiente, normalmente não é avaliado. Desse modo, o destino de um agrotóxico pode resultar em interações complexas, devido as propriedades físicas e químicas do composto, as condições ambientais e as características do solo (BEDMAR et al., 2017)

Estes compostos constituem hoje um importante problema de saúde pública, tendo em vista a amplitude da população exposta durante a fabricação dos compostos (exposição ocupacional e da população do entorno das fábricas), na agricultura, no combate às endemias e em outros setores nas proximidades de áreas agrícolas. Além disso, a população de maneira geral, mesmo sem contato direto com estes setores, pode estar exposta por meio do ar, água e alimentos contaminados.

3.2. Toxicidade dos agrotóxicos

Os agrotóxicos podem ser categorizados de acordo com a sua aplicação, organismo alvo e natureza química. Com base na aplicação, temos os agrotóxicos utilizados na agricultura (utilizados para proteger culturas de pragas e insetos), na saúde pública (para combater vetores que causam doenças) e os de uso doméstico (utilizados para matar insetos). Com base no organismo alvo, os agrotóxicos podem ser inseticidas (combater insetos), fungicidas (combater fungos), herbicidas (combater ervas daninhas), rodenticidas (combater roedores), fumigantes (combate de pragas) e repelentes de inseto. Com base na natureza química, os agrotóxicos são classificados como organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, triazínicos, entre outras (JAYARAJ; MEGHA; SREEDEV, 2016).

Além das categorias já citadas, os agrotóxicos são classificados, também, quanto a sua toxicidade. Para essa classificação, considera-se a DL₅₀ (dose letal mediana) oral, dérmica e inalatória. No Brasil o órgão responsável por fazer essa classificação é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Recentemente os agrotóxicos foram reclassificados, aumentado de quatro para cinco categorias de classificação (Figura 3), com o objetivo de tornar mais claro os critérios de avaliação da classificação toxicológica no Brasil (ANVISA, 2019).

Figura 3 – Classes toxicológicas dos agrotóxicos

	CATEGORIA 1	CATEGORIA 2	CATEGORIA 3	CATEGORIA 4	CATEGORIA 5	NÃO CLASSIFICADO
	EXTREMAMENTE TÓXICO	ALTAMENTE TÓXICO	MODERAMENTE TÓXICO	POUCO TÓXICO	IMPROVÁVEL DE CAUSAR DANO AGUDO	NÃO CLASSIFICADO
PICTOGRAMA					Sem símbolo	Sem símbolo
PALAVRA DE ADVERTÊNCIA	PERIGO	PERIGO	PERIGO	CUIDADO	CUIDADO	Sem advertência
CLASSE DE PERIGO						
Oral	Fatal se ingerido	Fatal se ingerido	Tóxico se ingerido	Nocivo se ingerido	Pode ser perigoso se ingerido	-
Dérmica	Fatal em contato com a pele	Fatal em contato com a pele	Tóxico em contato com a pele	Nocivo em contato com a pele	Pode ser perigoso em contato com a pele	-
Inalatória	Fatal se inalado	Fatal se inalado	Tóxico se inalado	Nocivo se inalado	Pode ser perigoso se inalado	-
COR DA FAIXA	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Azul	Azul	Verde
	PMS Red 199 C	PMS Red 199 C	PMS Yellow C	PMS Blue 293 C	PMS Blue 293 C	PMS Green 347 C

Fonte: ANVISA (2019)

A Lei nº 7.802 de 1989, também conhecida como Lei dos Agrotóxicos, regulamenta que é obrigatório constar nos rótulos destes produtos informações como composição, classificação toxicológica, efeitos causados à saúde humana, símbolos que alertem o perigo da substância, instruções de primeiros socorros, precauções, entre outras informações. Essa obrigatoriedade

de informações deve-se ao fato de que muitos efeitos nocivos à saúde humana já foram observados ou associados a utilização de agrotóxicos (BRASIL, 1989).

Os trabalhadores envolvidos na fabricação dos agrotóxicos e na aplicação no campo são os principais afetados pela exposição a esses compostos (RANI et al., 2021). Entre 2007 e 2018 foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 9.799 casos de intoxicação por agrotóxicos em geral no estado de São Paulo, representando 4,0% do total de notificações que envolvem medicamentos, drogas de abuso, entre outros produtos (PEREIRA et al., 2019). A problemática é ainda maior quando se trata de avaliar os efeitos crônicos dos agrotóxicos diante do progressivo aumento do consumo e intensificação do uso dessas substâncias no país (RIGOTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014).

Vários problemas de saúde, incluindo câncer, diabetes, distúrbios respiratórios e neurológicos e síndromes reprodutivas são causados pela exposição direta, manuseio ou resíduos de agrotóxicos presentes na água ou nos alimentos. A exposição direta aos agrotóxicos é frequentemente associada ao aparecimento de câncer, tornando-se uma questão de preocupação global e atraindo pesquisadores de todo o mundo (SAMANIC et al., 2008). A associação entre exposição a agrotóxicos e desenvolvimento de câncer gera polêmicas, porque a população está exposta a diversas substâncias e ainda tem fatores genéticos que influenciam no processo da doença. Porém estudos vêm demonstrando a relação entre a exposição a agrotóxicos e o desenvolvimento de câncer de pele, cavidade nasal, pâncreas, leucemia, entre outros (INCA, 2022).

Estudos relacionados a alterações em organismos vivos causadas por agrotóxicos são de extrema importância para a compreensão das interações que ocorrem entre essas substâncias químicas e os organismos vivos. Esses estudos podem contribuir para que se avance na identificação dos mecanismos que levam à toxicidade e no desenvolvimento de tratamentos e medidas preventivas de intoxicações. Além disso, contribui na tomada de decisões do poder público na criação de leis e políticas públicas que visem o bem-estar da população exposta aos defensivos agrícolas (SILVA; ANTUNES; FAVARETO, 2014).

3.3. Sistema reprodutor masculino

O aparelho reprodutor do rato, bem como da maioria dos mamíferos, é composto por testículos, epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais acessórias (próstata e glândula seminal) e pênis. Os testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias são órgãos andrógeno-dependentes, ou seja, qualquer agente tóxico que atue desordenando a interação do eixo hipotálamo-hipófise-testículo pode causar anormalidades reprodutivas (SOKOL, 1997).

Os testículos podem ser divididos em duas partes histológicas e funcionais, sendo elas o tecido intersticial e túbulos seminíferos responsáveis pela esteroidogênese e pela espermatogênese, respectivamente (RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999). O tecido intersticial está localizado entre os túbulos seminíferos e possui vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e as células intersticiais chamadas de células de Leydig, que são responsáveis pela produção de andrógenos e fonte para uma variedade de outros esteroides (RUSSELL et al., 1990). Os túbulos seminíferos são constituídos de tecido peritubular e epitélio seminífero, onde se encontra as células de Sertoli e células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides). O processo de espermatogênese é o processo pelo qual as células-tronco espermatogoniais transformam-se em células haploides altamente diferenciadas, também chamadas de espermatozoides (CLERMONT, 1972).

A célula de Sertoli é uma célula somática que se estende desde a lâmina basal até a luz do túbulo seminífero. Essas células são responsáveis por diversas funções importantes para o processo espermatogênico, com destaque para o suporte estrutural e nutricional às células germinativas em desenvolvimento, formação de barreira hematotesticular através de junções intercelulares, fagocitose, secreção de fluido e hormônios (FOLEY, 2001). Alterações na estrutura ou função ou no número desse tipo de célula podem resultar em danos ao epitélio germinativo e, conseqüentemente, comprometer a espermatogênese (BOEKELHEIDE; JOHNSON; RICHBURG, 2005), pois o número de células de Sertoli está intimamente ligado ao tamanho testicular no indivíduo adulto e com a produção espermática (CHAPIN et al., 1996).

No epitélio seminífero de um rato adulto é possível encontrar uma ou duas gerações de espermatogônias, espermatócitos e espermátides. Cada uma dessas gerações representa um grupo de células em um mesmo estágio de desenvolvimento, ou seja, apresenta células que foram produzidas de maneira sincronizada. As diferentes gerações de células germinativas presentes no epitélio seminífero não estão organizadas aleatoriamente, mas sim agrupadas em associações celulares de composição fixa que correspondem aos estágios do ciclo espermatogênico (CLERMONT, 1972).

O ciclo da espermatogênese de ratos dura aproximadamente 12 dias e é composto por 14 estágios. Uma espermatogônia necessita de 4,5 ciclos para formar um espermatozoide, o que significa que a espermatogênese completa de rato tem duração de 52 a 53,2 dias, dependendo da linhagem animal avaliado (CLERMONT, 1972). A duração desse processo é regulada pelo genótipo das células germinativas, sendo geralmente constante entre indivíduos de uma mesma espécie (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005).

Os espermatozoides saem dos testículos imóveis e incapazes de fertilizar um ovócito. A motilidade e a capacidade de fertilizar um ovócito é adquirida após sua passagem pelo ducto epididimário (SHUM et al., 2009). O epidídimo dos mamíferos é um órgão formado por um ducto único e enovelado que liga os ductos eferentes ao ducto deferente (HERMO; ROBAIRE, 2002), sendo anatomicamente dividido em três regiões principais: cabeça (com o segmento inicial), corpo e cauda (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005).

A função primária do epidídimo é o transporte dos espermatozoides que chegam do testículo (BROOKS, 1983). Além do transporte, o epidídimo é responsável pela estocagem, proteção, concentração e maturação dos gametas (HERMO; ROBAIRE, 2002), regulando o desenvolvimento da motilidade, a aquisição da capacidade de sofrer reação acrossômica e tornando-os capazes de fertilizar um ovócito II (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005). Em adição, o epidídimo protege os espermatozoides de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estoca os gametas maduros na região da cauda (HERMO; ROBAIRE, 2002).

3.4. Toxicidade reprodutiva dos agrotóxicos

Os efeitos nocivos do uso de agrotóxicos para a saúde humana têm sido objeto de diversos estudos que apontam a possibilidade de ocorrência de anomalias congênitas, de câncer, doenças mentais e disfunções na reprodução e fertilidade humana. Dentre os possíveis efeitos adversos causados à saúde humana e animal, destacam-se as alterações reprodutivas, muitas vezes, associadas à desregulação endócrina causada por agrotóxicos (ZHOU et al., 2019; YAWER et al., 2020).

Nos anos 70 teve início um debate sobre o possível declínio dos espermatozoides humanos, o que foi revisto nos anos 90 e causa inquietação em pesquisadores. Considera-se que durante os últimos 50 anos a média de contagem dos espermatozoides tenha diminuído em 50%, apesar de não estar claro o motivo desta diminuição. Acredita-se que possa decorrer de fatores ambientais tais como poluição (MULTIGNER; OLIVA, 2002).

A infertilidade pode ocorrer por várias causas relacionadas ao meio ambiente, entre elas pode-se citar contaminação por contato com agrotóxicos, solventes orgânicos, metais pesados entre outros. O processo de infertilidade muitas vezes acontece por efeito citotóxico direto nas células germinativas masculinas, mas também pode ocorrer por interferência dos chamados desreguladores endócrinos (DE) que podem afetar o desenvolvimento reprodutor e sexual através de mecanismos diversos, tanto mediados por receptores como por mecanismos bioquímicos (PETRELLI; MANTOVANI, 2002; HEINDEL, 2019).

A relação entre contato no meio ambiente e no trabalho com agrotóxicos foi amplamente analisada e as avaliações confirmaram que o contato pode produzir distúrbios de fertilidade em mulheres e homens (HANKE; JUREWICZ, 2004; KUMAR, 2004). A infertilidade é um problema de saúde pública global que envolve países desenvolvidos e em desenvolvimento (CLEMENTI et al., 2008). Liu e colaboradores (2019) relataram que as taxas de infertilidade variavam entre 7 e 8% na década de 1960 e aumentaram drasticamente para 20 a 35% na última década. Falando especificamente de infertilidade masculina, vários fatores podem contribuir para essa condição, dentre eles temos desequilíbrios hormonais, questões anatômicas, infecções sexualmente transmissíveis, fatores genéticos, ambiente e estilo de vida (BABAKHANZADEH et al., 2020; MURSHIDI; CHOY; EISENBERG, 2020). Entre os fatores, encontra-se também a exposição ambiental ou ocupacional a substâncias tóxicas, como agrotóxicos (AGARWAL et al., 2021)

A espermatogênese é um processo que requer uma regulação precisa das populações de células somáticas, células de Leydig, Sertoli e mióides, que juntamente com as células germinativas, representam os principais tipos de células testiculares (ZHOU et al., 2019; YAWER et al., 2020). Essas células possuem diferentes características e funções, porém todas são suscetíveis a fatores internos e externos, como fatores ambientais, desregulação hormonal, doenças em geral e estresse oxidativo (RATO et al., 2012; WANG et al., 2017; YAWER et al., 2020). Levando em consideração exclusivamente os agrotóxicos, eles podem prejudicar o sistema reprodutor masculino de várias formas: i) toxicidade reprodutiva causando danos direto a estrutura celular; ii) alterações na estrutura do DNA, que podem levar a mutações genéticas e causar defeitos congênitos ou infertilidade; iii) efeitos epigenéticos onde as modificações no genoma são herdadas de pai para filho (VAN CAUWENBERGH et al., 2020).

Estudos acerca da exposição masculina a agrotóxicos demonstram que o contato com esses compostos pode influenciar os hormônios sexuais, morfologia, concentração, motilidade e qualidade espermática. Além disso, foi observado uma redução na contagem de espermatozoides em homens que trabalhavam aplicando agrotóxico há mais de dez anos (JUREWICZ; HANKE, 2007; BRETVELD et al., 2007; ROELEVELD; BRETVELD, 2008; JUREWICZ; HANKE; MAKOWIEC-DABROWSKA, 2008; PERRY et al., 2011; SAADI; ABDOLLAHI, 2012).

3.5. Etefon

O etefon (ácido 2-cloroetilfosfônico) é um regulador de crescimento que desempenha sua função através da liberação de etileno. Apresenta classificação toxicológica IV (produto

pouco tóxico) e classificação de risco ambiental III (produto perigoso). As vias de exposição mais comuns para esse pesticida são oral, dérmica e inalatória. O limite de ingestão diária aceitável (IDA) do etefon é de 0,05 mg/kg e o limite máximo de resíduo (LMR) varia de 0,1 a 2,0 mg/kg em alimentos (BAYER, 2022). Esse pesticida é utilizado para fortalecer cereais, promover a maturação de frutas e hortaliças, estimular floração, ramificação lateral e redução da altura de plantas ornamentais. Além disso, também é utilizado para melhorar a desfolhação, aumentar o rendimento e reduzir o consumo de casca no algodão. Para aplicação no campo a quantidade de etefon utilizada varia em função da cultura onde será aplicado. Em geral utiliza-se de 7 a 670 de etefon comercial por litros de água ou hectare (BAYER, 2022).

O etefon pertencente ao grupo químico dos organofosforados. Após a proibição dos agrotóxicos organoclorados, os agrotóxicos organofosforados têm sido amplamente utilizados na agricultura, sendo um dos principais produtos para o controle de pragas (SOLTANINEJAD; SHADNIA, 2014; COSTA, 2018). Os organofosforados possuem mecanismo de ação conhecido em organismo vivo, atuando sobre a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que é importante e crítica para a indução do impulso nervoso. A inibição da AChE faz com que a acetilcolina não seja quebrada, permanecendo ativa por um tempo maior na fenda sináptica, sem que haja a receptação, resultando em convulsões, parada respiratória e até mesmo a morte do organismo exposto (GONZÁLEZ-ALZAGA et al., 2014; COSTA, 2018).

O mecanismo de liberação do etefon no ambiente funciona de maneira direta, onde uma vez que o composto encontre o pH ideal para sua degradação, inicia-se a liberação de etileno. Os pKa1 e pKa2 do etefon são, respectivamente, 2,5 e 7,2, indicando que este composto existirá na forma de ânions no ambiente. Os ânions formados pelo etefon geralmente não adsorvem muito fortemente em solos contendo carbono orgânico e argila. E, se liberado na água, acredita-se que o etefon seja adsorvido a sólidos suspensos e sedimentos. Essas características conferem ao etefon um tempo de meia vida curto, em torno de 1,0 a 2,4 dias e, por isso, a população em geral não está exposta ao etefon devido a sua rápida degradação em condições ambientais (HSDB, 2022). O processo de desprotonação do etefon nos respectivos valores de pKa é mostrado na Figura 4.

contagem de espermatozoides, a vitalidade, a motilidade total e a motilidade progressiva. Além disso, aumentaram significativamente as anormalidades dos espermatozoides, os danos no tecido testicular e no DNA, a mobilidade não progressiva e os espermatozoides imóveis.

3.6. Membrana celular

Os primeiros estudos que demonstraram a existência de uma barreira que separava o interior e o exterior das células foram realizados no século XIX, sendo o principal pesquisador o botânico alemão Wilhelm Pfeffer. Descobriu-se que havia uma camada fina que permitia a entrada de água por osmose, mas não permitia a passagem de moléculas como a glicose. Esta barreira foi chamada de membrana plasmática e desencadeou uma série de estudos que levaram às descobertas do que sabemos hoje sobre a membrana plasmática (HEIMBURG, 2008; SEZGIN; SCHWILLE; 2012).

Segundo Singer e Nicholson (1972) o modelo de membrana celular é constituído por uma dupla camada de fosfolipídios fluídica, onde as proteínas podem estar do lado interno, externo ou atravessando a membrana, como se fossem peças de um mosaico. Este modelo recebe o nome de modelo do mosaico fluido devido ao fato de admitir que a membrana não é uma estrutura rígida. Ou seja, existe movimento das moléculas que constituem a membrana, devido a sua fluidez, que está relacionada ao tipo de ligação intermolecular existente na membrana. É constituída por lipídios, fosfolipídios, glicolipídios, oligossacarídeos, esteróis, colesterol e proteínas. Sua função é regular diversos processos fisiológicos a partir do fluxo de entrada e saída de substâncias em sistemas celulares.

Os fosfolipídios que estão presentes na composição da membrana plasmática possuem caráter anfifílico, onde parte de sua estrutura química apresenta afinidade com a água (hidrofílica) e outra parte repulsão (hidrofóbica). Os fosfolipídios são moléculas que possuem duas cadeias de hidrocarbonetos hidrofóbicas e terminação com cabeça polar (hidrofílica), que inclui o grupo fosfato (LIPOWSKY; SACKMANN, 1995). Dentre os diversos fosfolipídios existentes, as fosfatidilcolinas (PC) estão em maior quantidade na composição da membrana plasmática dos mamíferos, sendo importante sua aplicação em estudos de membrana biológica (GONG; WINNIK, 2012; BHATIA et al., 2015; JURAK et al., 2015).

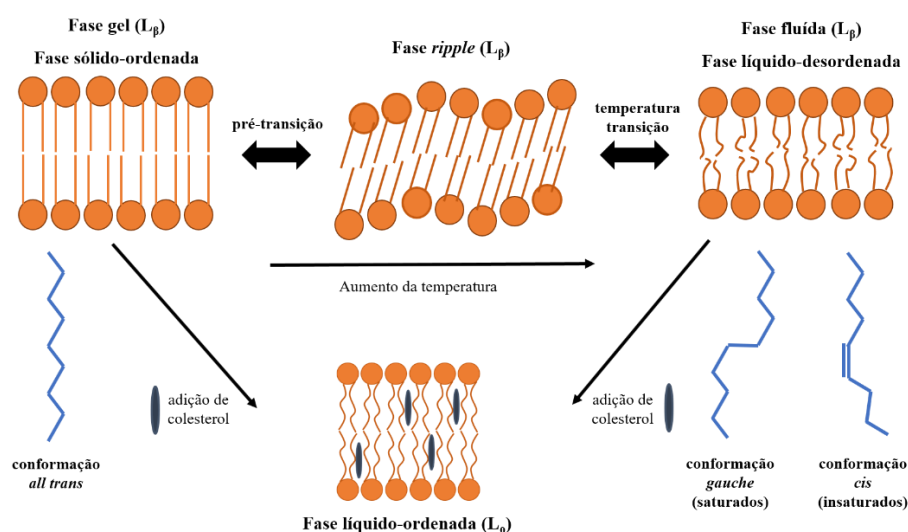
Para o bom funcionamento da célula e manutenção da vida celular é essencial a manutenção da organização da membrana plasmática, bem como de suas propriedades mecânicas e termodinâmicas e a manutenção do grau de fluidez adequado para a bicamada lipídica. Diversos processos celulares envolvem a deformação mecânica e alterações na

curvatura da membrana plasmática, entre eles tem-se os processos de endocitose que desempenham papel importante na manutenção da vida celular (RAPHAEL; WAUGH, 1996).

As fases de ordenamento das bicamadas lipídicas têm seu comportamento relacionado com a temperatura. Quando as bicamadas são formadas por um único lipídio, as principais fases podem ser descritas como fase gel (L_β) ou sólido-ordenada e fase fluida (L_α) ou líquido-desordenada (Figura 5). O que determina a transição de fases dos fosfolipídios é a temperatura, chamada de temperatura de transição de fase. Abaixo da temperatura de transição de fase os fosfolipídios estão na fase gel, ou seja, os fosfolipídios possuem cadeias carbônicas ordenadas e estendidas, características da configuração *all trans*. Acima da temperatura de transição de fase os fosfolipídios encontram-se na fase fluida, onde as cadeias carbônicas apresentam dobras, estão desordenadas e distribuídas aleatoriamente, características da configuração *gauche* para cadeias saturadas e *cis* para cadeias insaturadas (MARSH, 2010). A temperatura de transição de fase é diferente para cada fosfolipídio e essa variação está relacionada com os grupos-cabeça existentes na região polar da molécula, tamanho da cadeia carbônica e quantidade de insaturações presentes na cauda do fosfolipídio (PIGNATELLO, et al., 2011).

É relatado na literatura que além das duas fases principais há ainda a existência de uma fase de pré-transição entre as fases gel e fluída chamada de fase *ripple* (P_β). Nesta fase as cadeias carbônicas ainda estão na fase gel, porém surgem ondulações na superfície da bicamada (Figura 5) (MELLO, 2004). Além das fases já citadas, há ainda a ocorrência da fase líquido-ordenada, que acontece a partir da adição de colesterol nas bicamadas lipídicas e permite que o esterol atue como regulador das fases principais (fases gel e fluída) (Figura 5) (MARSH, 2010).

Figura 5 – Ilustração das fases de uma bicamada composta por um único fosfolipídio



Fonte: Adaptado de RUIZ (2020)

3.7. Sistemas miméticos de membrana celular

Devido à dificuldade de utilizar membranas *in vivo* para estudar interações com contaminantes, faz-se necessário a utilização de sistemas miméticos de membranas celular para compreensão primária dos possíveis efeitos que podem ocorrer sobre o organismo vivo (SOFÍŃSKA et al., 2022). Portanto, os sistemas miméticos de membrana são amplamente utilizados nos estudos de interação, a fim de entender o comportamento celular e as propriedades da membrana biológica (ELDERDFI; SIKORSKI, 2018). Os sistemas miméticos de membranas produzidos através de filmes de Langmuir e vesículas unilamelares gigantes (GUVs) fazem parte deste contexto (RODRÍGUEZ; DYNAROWICZ-LATKA; CONDE, 2020; SOFÍŃSKA et al., 2022).

3.7.1. Filmes de Langmuir

Os filmes de Langmuir servem como um modelo físico simples de uma membrana celular onde é possível estudar a interação de diversas substâncias com os componentes da membrana separadamente ou em conjunto. Uma vantagem do uso de filmes de Langmuir para sistemas miméticos de membrana é a possibilidade de modificar a composição da membrana que é espalhada na interface ar/água facilmente. Desse modo, é possível iniciar pesquisas a partir de um sistema simplificado e aumentar sua complexidade (RODRÍGUEZ; DYNAROWICZ-LATKA; CONDE, 2020). Diversos estudos comprovam a aplicação bem sucedida de filmes de Langmuir para sistemas miméticos de membrana celular de vários tipos de células. Dentre eles temos modelagem de membrana de leucócitos normais e com leucemia (HAC-WYDRO; DYNAROWICZ-LATKA, 2010), células do sistema nervoso (ROSETTI; MAGGIO; OLIVEIRA, 2008), membranas bacterianas (WYDRO, 2013; WYDRO; FLASIŃSKI; BRONIATOWSKI, 2012), pulmonares (DE LA SERNA et al., 2013), entre outros.

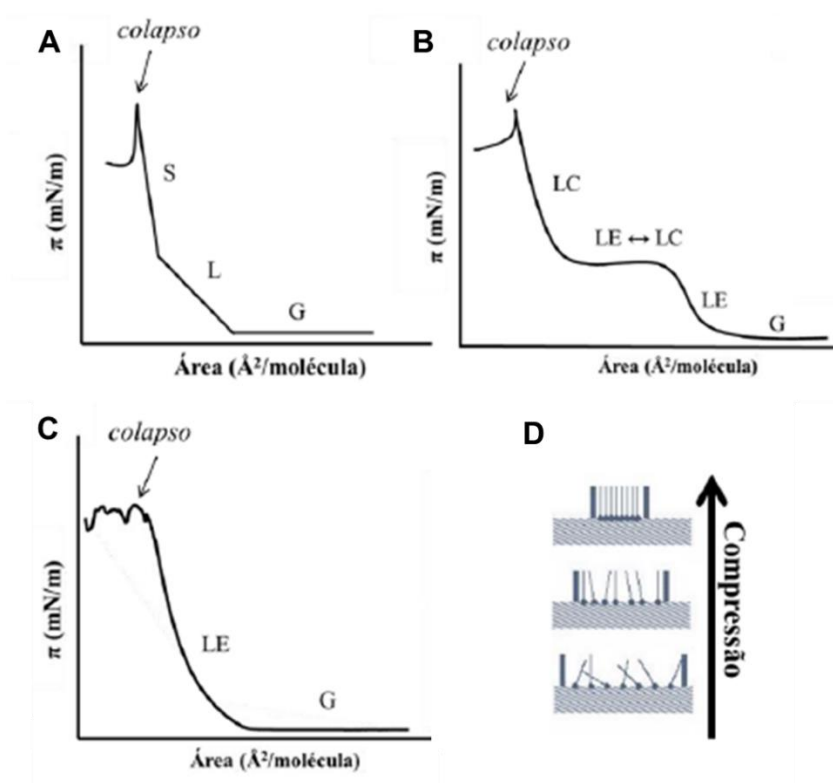
Os filmes ou monocamadas de Langmuir são obtidos em uma cuba de Langmuir fabricada em teflon e que contém um par de barreiras móveis e um sensor que mede a tensão superficial da subfase aquosa. As barreiras móveis são responsáveis pela compressão das moléculas e formação da monocamada na interface ar/água, sendo esse processo acompanhado através de isotermas π -A que relaciona a pressão de superfície (π) e a área molecular média ocupada pelas moléculas (A). A pressão de superfície (π) é calculada pela diferença entre a tensão superficial da subfase aquosa (γ_0) e a tensão superficial da subfase aquosa com a monocamada (γ). Para isso utiliza-se a seguinte fórmula: $\pi = \gamma_0 - \gamma$ (PENG; BARNES; GENTLE, 2001). Para obter o valor da tensão superficial utiliza-se comumente o método de

Wilhelmy, o qual utiliza-se um sensor de papel de filtro ou fio de platina conectado a uma eletrobalança, que permite calcular a variação de pressão superficial (BARNES; GENTLE, 2011).

Para a fabricação de um filme na interface ar/água é necessário que a molécula seja anfifílica, tendo parte da molécula afinidade pela água (hidrofílica) e outra parte não (hidrofóbica). Desse modo, a parte hidrofílica é responsável pelo espalhamento das moléculas na superfície da água e a parte hidrofóbica pela permanência das moléculas na interface ar/água. A molécula de estudo é solubilizada em solvente orgânico altamente volátil, como clorofórmio, para que ocorra a evaporação rápida e completa do solvente na interface ar/água, restando apenas a molécula de interesse. As moléculas são espalhadas na superfície de água e após o processo de evaporação do solvente as barreiras são comprimidas organizando as moléculas presentes na interface ar/água e formando o filme ou monocamada de Langmuir.

Ao longo da compressão as barreiras móveis promovem a diminuição da área na superfície, fazendo com que as isotermas π -A apresente essencialmente três fases distintas, sendo elas bem características para moléculas como ácidos graxos esteárico ou araquídico, por exemplo: i) fase gasosa (G), onde as moléculas estão bastante dispersas e não há interação entre elas; ii) fase líquida (L), na qual começa haver uma pequena interação entre as moléculas e a área disponível por molécula diminui e iii) fase sólida (S), em que a monocamada atinge o nível máximo de organização e maior empacotamento, como ilustra a Figura 6. No caso de moléculas anfifílicas com estrutura mais complexa que os ácidos graxos, outros perfis de isoterma π -A e outras fases podem ser observadas para os fosfolipídios saturados e insaturados, por exemplo (Figura 6).

Figura 6 – Ilustração das fases da compressão de filmes de Langmuir e organização das moléculas durante a compressão



A – Isotherma π -A de ácido graxo. B – Isotherma π -A de fosfolipídio saturado. C – Isotherma π -A de fosfolipídio insaturado. D – Organização das moléculas durante a compressão. G – fase gasosa. L – fase líquida. S – fase sólida. LE – fase líquido-expandida. LC – fase líquido-condensada.

Fonte: Adaptado de RUIZ (2020)

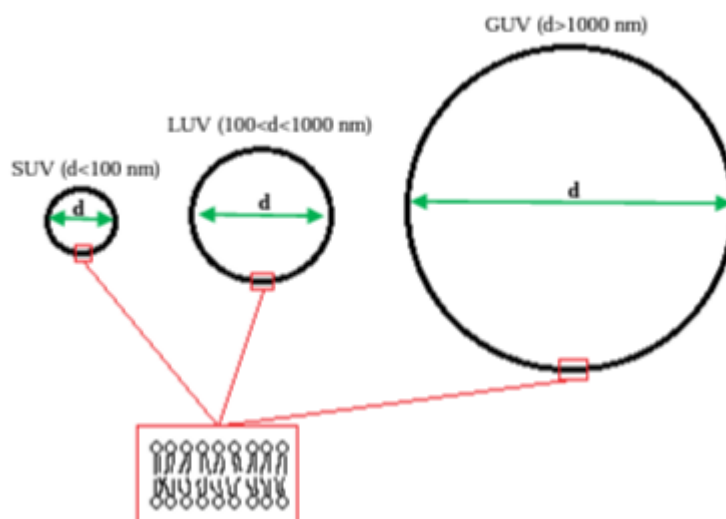
Na medida de isoterma π -A, a pressão superficial que corresponde a pressão das condições das membranas celulares é 30 mN/m (MARSH, 1996), sendo importante avaliar o comportamento dos fosfolipídios nessa pressão. Os fosfolipídios insaturados à 30 mN/m, em temperatura ambiente, encontram-se na fase fluída, pois sua temperatura de transição de fase está abaixo da temperatura ambiente. Na fase fluída temos cadeias mais desordenadas, não sendo possível alcançar a fase líquido-condensada nas isotermas π -A. Ou seja, em 30 mN/m é possível avaliar o comportamento do fosfolipídio na fase líquido-expandida (SENNATO et al., 2005; AOKI et al., 2016). Os fosfolipídios saturados à 30 mN/m e temperatura ambiente encontram-se na fase gel, pois sua temperatura de transição de fase é acima da temperatura ambiente. Na fase gel as moléculas estão mais empacotadas e possuem um grau de organização maior. Para esses lipídios, em 30 mN/m avaliar o comportamento do fosfolipídio na fase líquido-condensada.

3.7.2. Vesículas unilamelares gigantes (GUVs)

As vesículas lipídicas são estruturas que apresentam formato esférico e seu diâmetro pode variar de 20 nm a dezenas de μm . Essas estruturas mimetizam a organização dos fosfolipídios nas membranas celular, pois podem ser constituídas por uma ou mais bicamadas de fosfolipídios, sendo chamadas de unilamelar e multilamelar, respectivamente. As vesículas lipídicas são amplamente utilizadas para estudar fenômenos físico-químicos de processos biológicos (KASZÁS et al., 2013; WORCH et al., 2016; BOYTSOV et al., 2016).

Dentre as vesículas multilamelares, as mais utilizadas são as vesículas multilamelares (MLV - *multilamellar vesicle*) e as vesículas oligoméricas (OLV - *oligolamellar vesicles*). Além das lamelas, outra forma de classificar as vesículas é em relação ao seu tamanho, conforme representado na Figura 7.

Figura 7 – Representação do tamanho das vesículas lipídicas unilamelares



Fonte: PAZIN, 2016.

As vesículas unilamelares são divididas em pequenas (SUV - *small unilamellar vesicles*), grandes (LUV - *large unilamellar vesicles*) e gigantes (GUV - *giant unilamellar vesicles*). As GUVs possuem algumas vantagens, entre elas a capacidade de encapsular moléculas grandes e permitir que a observação seja realizada de modo direto, utilizando microscopia óptica, como as de contraste de fase, fluorescência e confocal (SIMONS; VAZ, 2004; BAGATOLLI, 2010; ZAN et al., 2012). Outra vantagem muito importante das GUVs é que são formadas com tamanho comparável ao de uma célula eucariótica (NIEH; HEBERLE; KATSARAS, 2019). Com dimensões superiores a 1000 nm, esse tipo de vesícula unilamelar é utilizado em estudos que investigam as propriedades das membranas plasmáticas e os

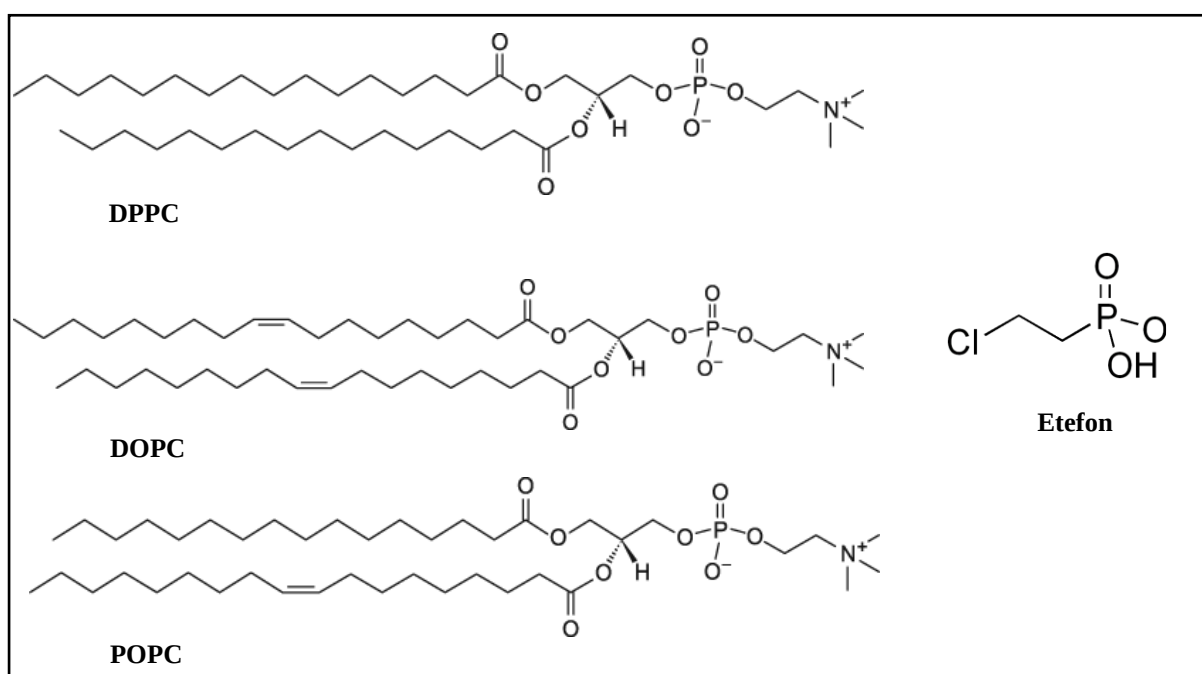
mecanismos de interação com moléculas de interesse (HALUSKA et al., 2008; KASZÁS et al., 2013).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais de estudo

Os fosfolipídios zwitteriônicos DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina) e DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina) foram adquiridos da Avanti Polar Lipids Inc. O fosfolipídio zwitteriônico POPC (2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina) e o etefon foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. As estruturas moleculares dos fosfolipídios e do etefon (no pH de estudo) estão representadas na Figura 8.

Figura 8 - Representação das estruturas químicas dos materiais utilizados



4.2. Protocolo animal

4.2.1. Animais e ambiente de experimentação

Para este estudo foram utilizados 40 ratos machos (com 75 dias de idade e aproximadamente 300 g de peso corpóreo) da linhagem Wistar. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em Biotério de Experimentação, em gaiolas de polipropileno, sob condições controladas de luminosidade (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura (média de 25 °C), e receberam água e ração comercial para roedores à vontade. Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, regulamentados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

(CONCEA). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob protocolo nº 5533 (Anexo – Protocolo de Aprovação - CEUA).

4.2.2. Delineamento experimental e exposição

Os ratos foram previamente pesados e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n = 10/grupo): controle e expostos a três diferentes doses de etefon, por 30 dias consecutivos, via gavagem.

A formulação comercial do etefon, Ethrel 720 fabricado pela Bayer, contendo 720 g/L de etefon, utilizado para a exposição dos animais, foi adquirido em comércio especializado na cidade de Presidente Prudente-SP.

As doses de etefon utilizadas foram baseadas no estudo de Abd Eldaim e colaboradores (2018) e no valor da LOEL (menor dose em que se observa efeito) (150 mg/kg/dia) proposto pela *Environmental Protection Agency* (USEPA, 1995). As doses foram distribuídas entre os grupos da seguinte forma:

- Grupo controle: apenas veículo (água destilada).
- Grupo E150: 150 mg/kg/dia de etefon;
- Grupo E200: 200 mg/kg/dia de etefon;
- Grupo E400: 400 mg/kg/dia de etefon;

Os animais foram pesados a cada três dias e o consumo diário de água e ração foram estimados (em mililitros e gramas, respectivamente). O ganho de peso foi calculado usando a seguinte fórmula: $((P_f - P_i)/P_i) \times 100$, onde P_i é peso inicial e P_f é o peso final. Além disso, foram observados sinais clínicos indicativos de toxicidade, tais como, piloereção, alteração no padrão de deambulação no interior da gaiola, ocorrência de diarreia e vocalização (CHRISTIAN, 2001). Os animais do grupo controle receberam água destilada, no mesmo protocolo de administração que os grupos expostos ao etefon.

4.2.3. Coleta de materiais biológicos

Ao término do período de exposição, os ratos sofreram eutanásia com 100 mg/kg de tiopental sódico (ip., Syntec, EUA). O testículo e epidídimo direito foram retirados e pesados em balança analítica e congelados a -20 °C para posterior determinação do número de células germinativas. O ducto deferente direito foi pesado e utilizado para a obtenção dos espermatozoides para a análise morfológica. O ducto deferente esquerdo foi utilizado para a obtenção dos espermatozoides para a avaliação da motilidade. O testículo e o epidídimo

esquerdos foram coletados para posterior processamento e análise histopatológica. A próstata ventral, as glândulas seminais (cheias e vazias, sem a glândula coaguladora), fígado e rins foram retirados e pesados em balança analítica.

4.2.4. Análise histopatológica

Testículos e epidídimos esquerdos foram colhidos, limpos e imersos em solução fixadora formalina tamponada a 10%. Após uma pré-fixação de 24 horas, os órgãos foram removidos do fixador e recortados, retornando em seguida ao fixador. Após 24 horas, as peças foram lavadas e a solução foi substituída por álcool 70%, onde as peças permaneceram até o processamento, que consistiu na inclusão do material em Paraplast, obtenção de cortes com espessura de 5 μ m e coloração com hematoxilina e eosina para avaliação histopatológica realizada em microscópio óptico Leica DM750. As fotomicrografias foram obtidas no mesmo microscópio, com câmara acoplada (ICC50HD), a partir do software Leica LAS V4.2.

Cortes transversais de túbulos seminíferos foram avaliados quanto à presença de alterações como: presença de células acidófilas, células multinucleadas, espermátides retidas, degeneração de tipos celulares, depleção de células, vacuolização do epitélio ou esfoliação de células na luz. Cortes longitudinais dos segmentos cabeça e cauda do epidídimo foram avaliados quanto à presença de hiperplasia cribriforme no epitélio, vacuolização epitelial, infiltrado inflamatório no tecido intersticial, quantidade e aspecto dos espermatozoides no lúmen e de células claras no epitélio (KEMPINAS; KLINEFELTER, 2014).

4.2.5. Cálculo da produção diária de espermatozoides por testículo

Os testículos direitos, descapsulados e pesados logo após a coleta, permaneceram congelados até a homogeneização, que foi realizada segundo método descrito por Robb e colaboradores (1978) com as adaptações de Fernandes e colaboradores (2007). O parênquima testicular foi descongelado e homogeneizado numa mistura de NaCl (9 g), Triton X-100 (0,5 ml).

Após diluição de 10 vezes na mistura contendo Triton X-100, uma pequena amostra foi transferida para câmaras de Neubauer (4 campos por animal), procedendo-se a contagem das espermátides resistentes ao processo de homogeneização (estágio 19 da espermiogênese), utilizando microscópio óptico (Nikon YS2-T).

Para o cálculo da produção diária de espermatozoides (PDE), a concentração de espermatozoides por testículo foi dividida por 6,1, que é o número de dias em que as espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) estão presentes no epitélio seminífero.

4.2.6. Contagem do número e cálculo do tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo

Os epidídimos direitos tiveram as porções cabeça/corpo e caudas separadas logo após a coleta e permaneceram congeladas até a homogeneização, conforme descrito para o testículo. Após diluição de 20 vezes, procedeu-se a contagem de espermatozoides em câmaras de Neubauer, utilizando microscópio óptico (Nikon YS2-T).

A média aritmética dos campos contados resultou no número de espermatozoides expresso em milhões por mL, que multiplicado pelas diluições utilizadas, resultou no número de espermatozoides/órgão que, dividido pela PDE, expressa o tempo de trânsito dos espermatozoides (número de dias requeridos para que eles atravessem as diferentes porções epididimárias), em dias.

4.2.7. Análise da motilidade espermática

Imediatamente após a eutanásia dos animais, os espermatozoides foram obtidos do ducto deferente esquerdo, sendo liberados com ajuda de uma seringa, no meio PBS a 34°C. A avaliação da motilidade dos espermatozoides foi realizada em câmaras de Neubauer utilizando microscópio óptico (Nikon YS2-T) em aumento de 200X. Os gametas foram classificados em: móvel, com trajetória progressiva; móvel, sem progressão e imóvel de acordo com Perobelli e colaboradores (2012). Avaliaram-se 200 espermatozoides por animal em duplicata.

4.2.8. Análise da morfologia espermática

Os espermatozoides foram obtidos do ducto deferente direito, sendo liberados com ajuda de uma seringa e fixados em formol-salina a 10%. A seguir foram feitos esfregaços em lâminas histológicas, que foram deixadas secar ao ar livre por 90 minutos e então observadas em microscópio óptico (Nikon YS2-T) (SEED et al., 1996). Analisaram-se 200 espermatozoides por animal e as anormalidades morfológicas encontradas foram classificadas em duas categorias: a) anormalidades da cabeça (sem curvatura característica, em forma de alfinete ou isolada) e b) anormalidades da cauda (enrolada, quebrada, dobrada e isolada) (FILLER, 1993).

4.2.9. Análise da integridade de membrana plasmática

Para a análise da integridade de membrana plasmática (vitalidade), uma gota de solução espermática em tampão fosfato-salino (PBS) e duas gotas de solução de coloração eosina/nigrosina foram colocadas em uma lâmina histológica, e com o auxílio de outra lâmina

realizou-se o esfregaço. Duzentos espermatozoides foram contados em microscópio óptico (Nikon YS2-T), utilizando a objetiva de 40X e classificados como: não corados (intacto, vivo) e com coloração vermelha (com membrana danificada).

4.2.10. Determinação da integridade da membrana acrossomal

A membrana acrossomal foi analisada pela coloração de Pope (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991). Para isso, preparou-se a solução para a coloração com 1% (p/v) de Rosa Bengala, 1% (p/v) de Fast Green FCF e 40% de etanol em tampão de McIlvaine's (0,1 M de ácido cítrico e 0,2 M de fosfato dissódico), ajustando o pH da solução final entre 7,2 e 7,3.

As amostras espermáticas foram coletadas da cauda do epidídimo (5 µL) e adicionadas a 45 µL de citrato de sódio 2,9% em solução fisiológica 0,9%. A essa mistura, foi adicionada a solução de coloração (1:1) e, após setenta segundos em temperatura ambiente, foram realizados esfregaços em lâminas utilizando de 5 a 10 µL da solução final. As lâminas secaram à temperatura de 37 °C.

Observaram-se 200 espermatozoides por lâmina, em microscópio óptico (Nikon YS2-T), em objetiva 40X, caracterizando-os em íntegros e não íntegros, conforme sua aparência. A não integridade da membrana acrossomal foi identificada pela porção anterior da cabeça do espermatozoide levemente mais clara que a porção posterior.

4.2.11. Forma de análise de resultados

Para comparação dos resultados foram utilizados os testes estatísticos de Kruskal-Wallis, com o teste “a posteriori” de Dunn, e ANOVA com o teste “a posteriori” de Tukey, dependendo das características de cada variável. Foi considerado como nível de significância estatística o limite de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram feitas utilizando o software estatístico InStat 5.0 da GraphPad Software. Os gráficos foram feitos utilizando o software Origin 8.5 da Originlab.

4.3. Modelos miméticos de membrana celular

4.3.1. GUVs

As GUVs foram preparadas utilizando o método gel descrito por Weinberg et al. (2013). O fundo de um béquer de 5 mL foi preenchido com 200 µL de uma solução de PVA ($1 \cdot 10^{-5}$ M) e seco em estufa com temperatura entre 50 e 75 °C até que se formasse um filme de PVA no fundo do béquer. Após a secagem foram espalhados, separadamente, 10 µL de solução dos

lipídios DPPC, POPC e DOPC diluídos em clorofórmio e concentração 1.10^{-3} M. O sistema foi deixado em vácuo por uma hora e trinta minutos para a remoção total solvente. Ao término da secagem, adicionou-se 1 mL da solução de sacarose (0,2 M) no béquer e a formação das vesículas se deu em uma hora e meia. Para a formação das GUVs de DPPC, a solução de sacarose foi pré-aquecida à temperatura de 55°C , i.e., acima da temperatura de transição do lipídio, e a formação das vesículas se deu em banho maria com temperatura controlada em 60°C .

Para estudar a interação das GUVs com o etefon, alíquotas de 50 μL de solução de GUVs foram adicionadas a um suporte de vidro de oito poços (Ibidi, Munique, Alemanha) contendo 200 μL de solução de glicose (0,2 M) na ausência e na presença de etefon (1.10^{-4} M). As soluções de glicose e sacarose, de mesma osmolaridade, foram preparadas em água ultrapura. As vesículas foram observadas em um microscópio confocal (Nikon C2/C2si Eclipse Ti-E, Kyoto, Japão), usando uma objetiva de ar de 40x, NA 0,6 através da técnica de contraste de fase. Vídeos de ao menos 30 min foram adquiridos e várias coletas de imagem foram feitas para medida, a fim de quantificar o número de GUVs afetadas por etefon. As medidas foram realizadas em triplicata e as imagens foram analisadas pelo software ImageJ.

4.3.2. Isotermas π -A

O fosfolipídio fosfatidilcolina (PC) representa a maior parte dos glicerolipídios presentes na parede da membrana celular de espermatozoides de mamíferos (GULAYA et al., 2001). Sendo assim, foram estudadas monocamadas de DPPC, POPC e DOPC. As monocamadas dos fosfolipídios DPPC, DOPC e POPC foram formadas em uma cuba de Langmuir KSV NIMA LB de 200 mL a 23°C . Para isso foram preparadas soluções dos fosfolipídios de concentração 1.10^{-3} M, utilizando clorofórmio como solvente. Foram espalhados 30 μL das soluções dos fosfolipídios, separadamente, na interface ar/água. Após o espalhamento, aguardou-se cerca de 15 minutos para a evaporação do solvente, e então a monocamada foi comprimida mecanicamente, e de forma simétrica, por barreiras móveis a uma velocidade de 10 mm/min, registrando assim a isoterma π -A. Este procedimento foi realizado em subfase aquosa, contendo água ultrapura, e em subfase contendo etefon em diferentes concentrações, sendo elas 1.10^{-6} , 1.10^{-5} e 1.10^{-4} M, afim de observar se há mudanças nas isotermas π -A em baixas concentrações. As soluções de etefon utilizadas na subfase estavam em pH 5,0, indicando que em todas as medidas realizadas o etefon estava inteiramente na forma de ânion, ou seja, desprotonado.

4.3.3. Módulo compressional (C_s^{-1})

O módulo compressional foi calculado por $C_s^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T$, sendo A a área molecular e π a pressão superficial. Os dados utilizados no cálculo foram coletados das isotermas π - A para os casos analisados. Este método permite verificar possíveis mudanças estruturais durante a compactação da monocamada e como a presença do etefon na subfase pode afetar as propriedades mecânicas das monocamadas dos fosfolípidios DPPC, DOPC e POPC.

Através do módulo compressional é possível determinar a susceptibilidade da monocamada a compressão, além de ser útil na determinação das transições de fase. Quanto maior o aumento da pressão de superfície devido a compressão, mais compactada estarão as moléculas na monocamada e, conseqüentemente, maior será o valor de C_s^{-1} (VOLLHARDT; FAINERMAN, 2006). A Tabela 1 mostra as fases e intervalos que são atribuídos a cada uma delas.

Tabela 1 – Fases e valores de módulo compressional

Fase da monocamada	Valor de C_s^{-1} (mN/m)
Ausência de monocamada	0
Líquido-expandida	10 – 100
Líquido-condensada	100 – 250
Sólido	1000 – 2000

Fonte: ORTIZ-COLLAZOS (2016)

4.3.4. Estudo da estabilidade

Em uma cuba de Langmuir contendo 200 mL de água ultrapura foram espalhados, separadamente, 30 μ L das soluções de DPPC, DOPC e POPC, todas em concentração de $1 \cdot 10^{-3}$ M. Após a completa evaporação do solvente (cerca de 15 minutos), as barreiras foram comprimidas até o filme apresentar uma pressão de superfície de 30 mN/m. Esta pressão de superfície foi mantida constante pela movimentação compensatória das barreiras (controladas via *software*), durante o tempo de 4800 segundos (1h e 20min). O mesmo procedimento foi realizado com 200 mL de etefon ($1 \cdot 10^{-4}$ M) na subfase. A estabilidade do filme foi avaliada pela variação da área média ocupada pelas moléculas na superfície e os procedimentos utilizados foram realizados em triplicata.

4.3.5. Espectroscopia de absorção de reflexão infravermelha de modulação de polarização (PM-IRRAS)

Os espectros de PM-IRRAS foram obtidos no Laboratório do Grupo de Polímeros Bernhard Gross no Instituto de Física da USP – São Carlos, utilizando um espectrofotômetro modelo PMI550 da KSV Instruments. O espectro foi coletado no intervalo de 800 a 4200 cm^{-1} e resolução espectral de 8 cm^{-1} . Este equipamento é equipado com um detector HgCdTe modelo PCI-3TE-10.6, com área ativa de 1x1 mm^2 .

As medidas foram realizadas com o ângulo rasante de 80° à 23 °C, sendo os espectros obtidos na pressão superficial de 30 mN/m, pressão correspondente à pressão lateral interna das membranas celulares sob pressão atmosférica e livre de interferentes externos (MARSH, 1996). A membrana celular tende a manter uma densidade específica de empacotamento lipídico em 30 mN.m^{-1} (JANMEY; KINNUNEN, 2006). A pressão lateral também regula o funcionamento de determinadas classes de proteínas presentes na membrana, que podem sofrer alterações de acordo com as variações do conteúdo lipídico (CANTOR, 1997).

Foram obtidos espectros para os fosfolipídios DPPC (1.10^{-3} M) na ausência e presença de etefon (1.10^{-4} M). O sinal PM-IRRAS (S) é obtido pela diferença entre os espectros s e p, usando a equação: $S = \Delta R/R = (R_p - R_s)/(R_p + R_s)$ (BLAUDEZ et al., 1993; NAKAHARA; LEE; SHIBATA, 2010), onde R_p e R_s são as reflectâncias polarizadas paralela (p) e perpendicular (s) ao plano de incidência, respectivamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da saúde geral e reprodutiva dos ratos

5.1.1. Toxicidade geral

As preocupações acerca dos riscos potenciais à saúde causados pela exposição a agrotóxicos são eminentes (MARONI et al. 2006; GILDEN et al. 2010; SYAFRUDIN et al., 2021). Porém, apesar dessa preocupação, observa-se que alguns compostos ainda apresentam poucos estudos sobre seus efeitos e toxicidade para a saúde geral e reprodutiva, como é o caso do etefon.

Durante o período de exposição, não foram observados sinais clínicos de intoxicação, entretanto, algumas modificações no padrão de consumo de água e ração foram identificadas. No consumo diário de água, houve um aumento ($p < 0,05$) no grupo E400 em relação ao grupo controle e ao grupo E200 no 9º dia de exposição. E no 27º dia, ocorreu um aumento ($p < 0,05$) no consumo de água no grupo E400 em relação ao grupo controle (Figura 9A).

O consumo de ração apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em 5 dias no decorrer da exposição. No 6º dia houve um aumento no consumo de ração no grupo E200 quando comparado ao grupo E150 e observou-se um aumento no consumo do grupo E400 em relação ao grupo E200. Esta mesma situação foi observada no 9º dia de exposição. Nos dias 12 e 27 ocorreu um aumento no consumo do grupo E400 em relação ao grupo E200. E no 21º dia de exposição, observou-se um aumento no consumo de ração para o grupo E400 em comparação ao grupo controle (Figura 9B).

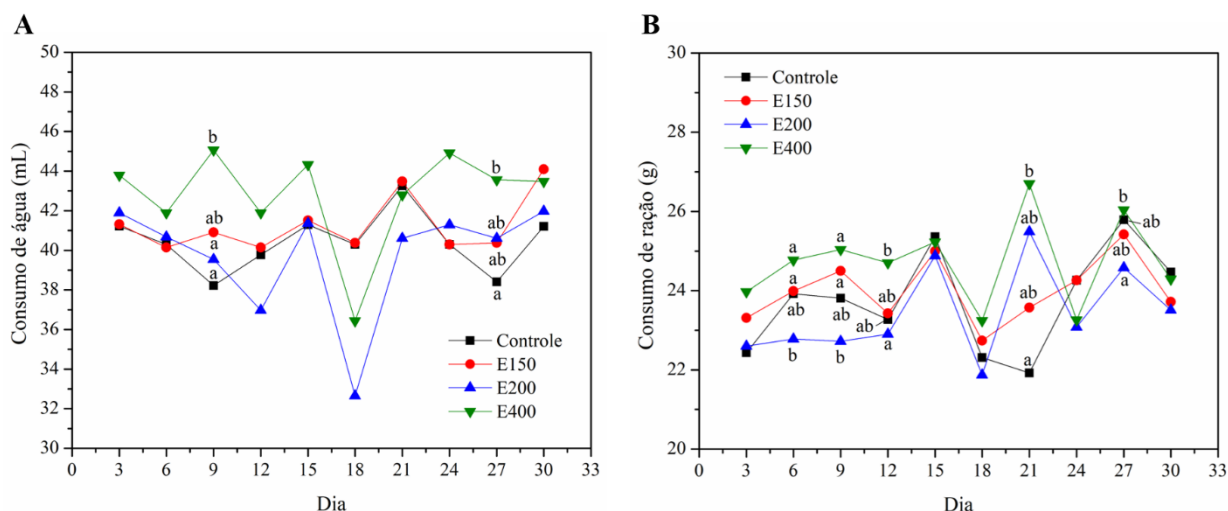
Apesar das diferenças observadas no consumo diário de água e ingestão de ração, estes não comprometeram o peso final e o ganho de peso (Tabela x) dos animais expostos. Além disso, os pesos dos órgãos reprodutivos, fígado e rins não foram afetados pela exposição ao etefon (Tabela 2). Tais resultados corroboram com um estudo de toxicidade dérmica de 21 dias (0, 25, 75 e 150 mg/kg/dia de etefon) com coelhos machos e fêmeas. Efeitos cutâneos foram observados em todas as doses, mas não foram observadas alterações no peso corporal e peso dos órgãos (USEPA, 1995).

Tabela 2 – Peso final, ganho de peso e peso dos órgãos reprodutores, fígado e rim dos ratos dos grupos controle e expostos a 150 (E150), 200 (E200) e 400 mg/kg (E400) de etefon

	Controle	Grupos expostos ao etefon		
		E150	E200	E400
Peso final dos animais (g) ¹	352,14 ± 30,09	358,78 ± 23,19	360,36 ± 32,28	360,74 ± 29,59
Ganho de peso (%) ²	10,19 (8,82-11,06)	9,92 (5,45-10,99)	8,62 (5,41-13,25)	7,33 (5,94-10,54)
Testículo (g) ¹	1,39 ± 2,57	1,44 ± 1,23	1,50 ± 1,94	1,44 ± 2,32
Epidídimo (mg) ¹	611,45 ± 51,42	601,00 ± 49,99	590,91 ± 80,74	571,64 ± 151,01
Próstata (mg) ¹	484,00 ± 147,16	465,82 ± 180,31	386,09 ± 121,84	442,27 ± 195,56
Glândula seminal cheia (g) ¹	1,21 ± 3,16	1,14 ± 1,94	0,99 ± 3,30	1,05 ± 2,15
Glândula seminal vazia (mg) ¹	593,09 ± 150,82	545,45 ± 98,36	510,64 ± 137,40	515,64 ± 161,56
Fígado (g) ¹	17,46 ± 2,10	17,56 ± 2,81	17,13 ± 3,46	18,61 ± 1,68
Rim direito (g) ¹	1,45 ± 1,96	1,41 ± 1,15	1,44 ± 2,29	1,51 ± 1,20

¹ Valores expressos em média ± DP. ANOVA com teste a posteriori Tukey. ² Valores expressos como mediana (Q1 - Q3). Teste Kruskall-Wallis, com teste “a posteriori” de Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (p <0,05).

Figura 9 – Consumos de água (mL) e ração (g) dos ratos dos grupos controle e expostos a 150 (E150), 200 (E200) e 400mg/kg (E400) de etefon



A – Consumo de água. B – Consumo de ração. Valores expressos em média. ANOVA com teste a posteriori Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

5.1.2. Análise histopatológica

Na análise histopatológica do testículo é possível observar que o grupo controle apresentou estrutura normal dos túbulos seminíferos e tecido intersticial (Figura 10A e 10B). E, também, epitélio germinativo testicular íntegro com diferentes tipos de células germinativas e células de Sertoli e espermatozoides na luz do túbulo seminífero (Figura 10C).

Os animais dos grupos expostos ao etefon apresentaram alterações testiculares focais e com variabilidade interindividual. A alteração mais frequente nos animais dos três grupos expostos foi a esfoliação de células germinativas na luz dos túbulos seminíferos (Figura 10D – 10G). Na Figura 2E, observa-se a presença de diferentes tipos de células germinativas imaturas descamadas na luz dos túbulos seminíferos. Túbulos seminíferos com vacuolização intraepitelial (Figura 10H – 10J) foram observados em quatro animais dos grupos E200 e E400.

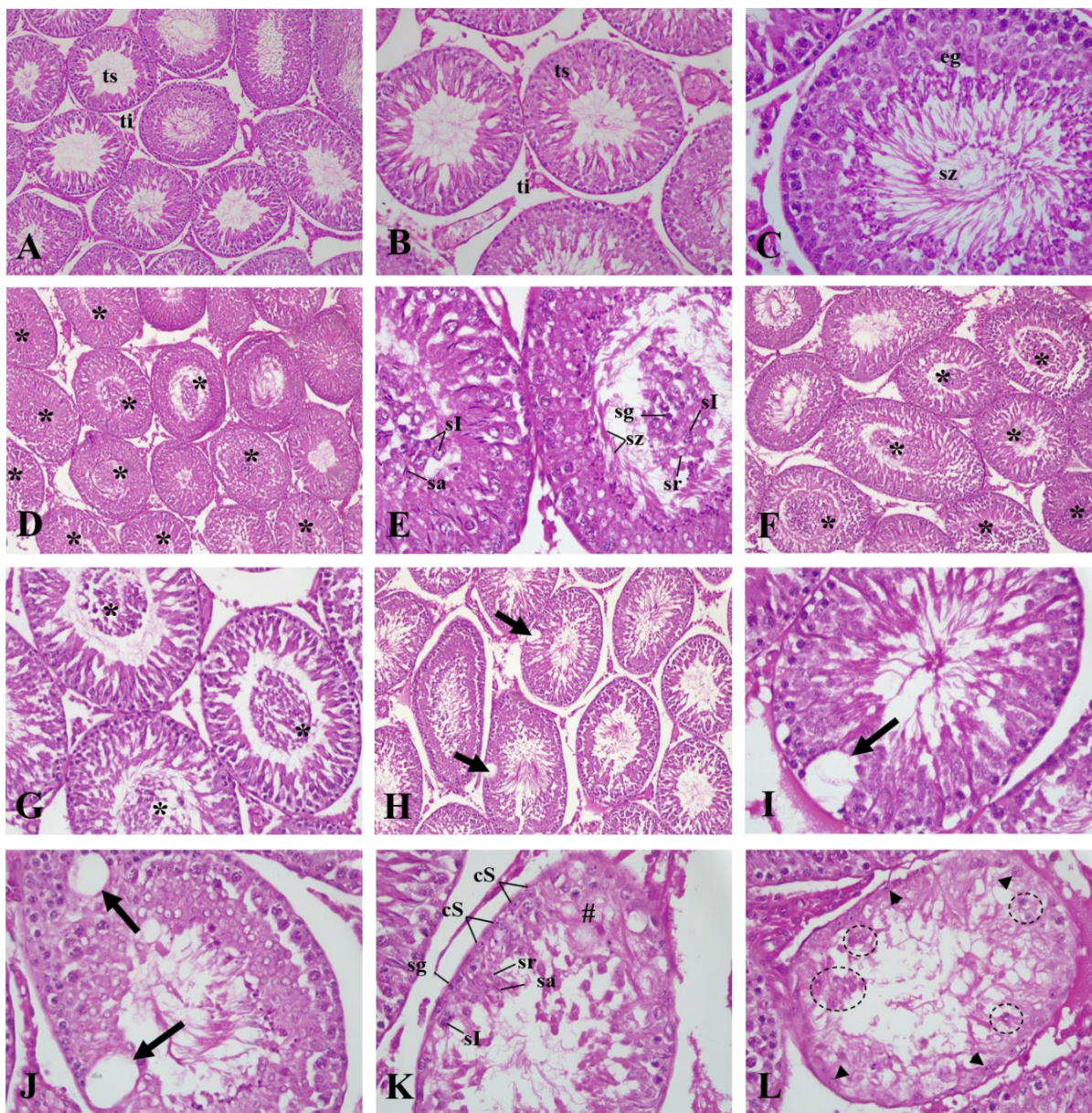
A vacuolização no epitélio seminífero é a resposta morfológica das células de Sertoli contra várias lesões, entre eles a exposição a agentes tóxicos (CREASY, 2001). Essas células exercem funções essenciais para garantir o sucesso da espermatogênese, ou seja, manutenção da integridade do epitélio seminífero, barreira hematotesticular e nutrição do epitélio seminífero (RUSSEL et al., 1993). Assim, lesões nessas células podem impactar fortemente a espermatogênese.

Em dois animais do grupo E400 também ocorreu perda da integridade estrutural do epitélio seminífero, com túbulos seminíferos com focos de perda intensa de células germinativas, restando apenas células de Sertoli em toda a periferia da seção tubular e

pequenos grupos de células germinativas (Figura 10K e 10L). Este resultado corrobora com o resultado da contagem dos espermatozoides no testículo para o grupo E400, onde observou-se que a exposição ao etefon diminuiu o número, a produção diária e o número de espermatozoides por grama de testículo. A intensa perda de células germinativas observada na análise histopatológica pode ter influenciado na quantidade de espermatozoides no testículo.

Estudos indicam que o etefon pode afetar a multiplicação e diferenciação celular, devido à diminuição da expressão da proteína PCNA na espermatogônia, que é essencial para a replicação do DNA e crescimento e proliferação celular (KELMAN, 1997; WONG et al., 2000; ABD ELDAIM et al., 2018), o que pode estar relacionado à redução da produção espermática e alterações testiculares que foram observadas. Resultados semelhantes ao desse estudo foram obtidos por Abd Eldaim e colaboradores (2018) que observaram diminuição na contagem de espermatozoides em ratos expostos a 200 mg/kg de etefon. Outro estudo expondo ratos Wistar a 10 e 100 mg/kg/dia de clorpirifós, também observou diminuição no número de espermatozoides (EL-TAWIL, 2014).

Figura 10 - Fotomicrografias de secções transversais de testículo de ratos dos grupos controle (A – C) e expostos a 150 (E150 - D, E), 200 (E200 - F, H, I) e 400 mg/kg (E400 - G, J - L) de etefon



A – C) Grupo controle. D e E) Grupo E150. F, H e I) Grupo E200. G, J – L) Grupo E400. A e B - Estrutura normal dos túbulos seminíferos (ts) e tecido intersticial (ti). C - Epitélio germinativo (eg) testicular íntegro com diferentes tipos de células germinativas e células de Sertoli e luz do túbulo seminífero com espermatozoides (sz). D, F, G - Presença de intensa esfoliação de células germinativas na luz de vários túbulos seminíferos (*). E - Nota-se a presença de diferentes tipos de células germinativas imaturas descamadas na luz dos túbulos seminíferos. H, I, J - Presença de túbulos seminíferos com vacuolização intraepitelial (setas). K - Perda de integridade estrutural do epitélio seminífero, com focos de intensa perda de células germinativas (#). L - Epitélio seminífero com presença de células de Sertoli (cabeça de seta) em toda a periferia da secção tubular e apenas pequenos grupos de células germinativas (círculos). sg: espermatogônia. sl: espermatócito primário. sr: espermátide redonda. sa: espermátide em alongamento. sz: espermatozoide. A, D, F, H: Aumento de 100x. B, G: Aumento de 200x. C, E, I – L: Aumento de 400x. Hematoxilina - eosina (HE).

Na análise histopatológica do epidídimo observa-se que o grupo controle apresentou epitélio do ducto epididimário com integridade morfológica, interstício normal e lúmen com espermatozoides nos segmentos cabeça (Figura 11A e 11B) e cauda (Figura 11C e 11D). Entretanto, os grupos expostos ao etefon apresentaram alterações nas três doses estudadas.

Assim como observado no testículo, as lesões epididimárias apresentaram diferenças interindividuais e intergrupos. Animais do grupo E150 apresentaram epitélio da região da cauda epididimária com grande número de células claras (Figura 11E), inclusive com presença de célula clara hiperplásica (Figura 11F).

As células claras estão presentes por todo o epidídimo e desempenham a função de fagocitar as gotículas citoplasmáticas que são liberadas do espermatozoide em maturação e, também, fagocita outros detritos luminais. O aumento das células claras pode ser causado pelo aumento do número de lisossomos no citoplasma envolvidos na endocitose, devido ao aumento do acúmulo de detritos no lúmen (KEMPINAS; KLINEFELTER, 2014). Nesse estudo, notou-se a presença de massas de células epiteliais descamadas e célula germinativa acidófila no lúmen, caracterizando um aumento de detritos na região. Tal fato, pode estar associado ao aumento das células claras observado e, também, ao aparecimento de células claras hiperplásicas, uma vez que pode ter ocorrido um aumento da endocitose, devido a presença das células esfoliadas.

Nos grupos E150 e E200 foi possível observar a presença de vacuolização intraepitelial (Figura 11I e 11K) e célula germinativa acidófila esfoliada no lúmen entre os espermatozoides (Figuras 11J e 11K) em seis e quatro animais, respectivamente. Em um animal do grupo E200, notou-se a presença de corpo celular acidófilo multinucleado no lúmen (Figura 11L). A presença da vacuolização intraepitelial, assim como no testículo, sinaliza uma perturbação no ambiente luminal dos ratos dos grupos expostos ao etefon.

Já no grupo E400, observou-se a presença de hiperplasia cribriforme na cauda do ducto epididimário (Figura 11M – 11O) em um animal. Nas Figuras 11N e 11O é possível observar o epitélio hiperplásico dobrando-se sobre si mesmo, formando estruturas pseudoglandulares. Além disso, destaca-se a ausência de espermatozoides no lúmen do ducto epididimário na região de hiperplasia epitelial (Figura 11N). A hiperplasia cribriforme é uma alteração hiperplásica no epitélio, onde este, normalmente, dobra-se sobre si mesmo e forma estruturas pseudoglandulares. Essa alteração, em ratos tem sido associada a toxicidades testiculares e o dobramento do epitélio pode ser uma resposta a falta de espermatozoides e fluido testicular e atrofia do epidídimo. Tais situações levam a uma ruptura do microambiente epididimal. A hiperplasia cribriforme é frequentemente relacionada com a depleção androgênica,

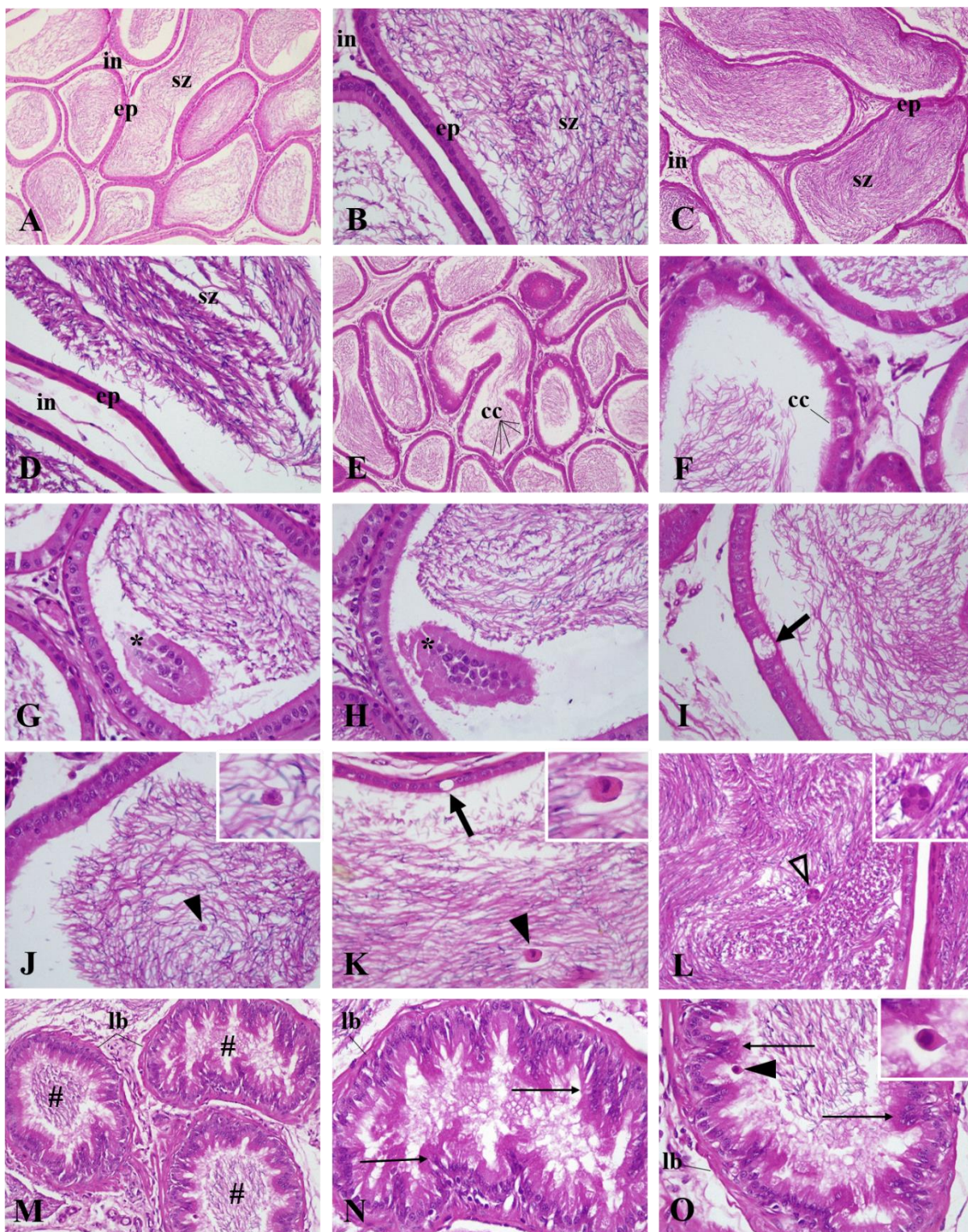
envelhecimento, atrofia testicular, criptorquidia e tumores (KEMPINAS; KLINEFELTER, 2014).

Segundo Abd Eldaim e colaboradores (2018), o etefon reduz significativamente os níveis de testosterona, ou seja, induz a depleção androgênica. Desse modo, a presença de hiperplasia cribriforme observada poderia estar associada a depleção de testosterona causada pela exposição ao etefon. Entretanto, no presente estudo o peso da próstata ventral e glândula seminal, que são andrógeno-dependentes, não foram afetados pela exposição ao agrotóxico.

Foi observado espessamento da lâmina basal no ducto epididimário no grupo E400 (Figura 11M – 11O), que pode estar associado a um aumento de células mioides. A presença de aquaporinas 1 (AQP-1) nas células mioides contribui para a reabsorção de líquidos e solutos, com um papel fundamental na regulação do fluxo de fluido transcelular (DOMENICONI et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2012). E pode apresentar relação com redução na quantidade de fluidos no lúmen epididimário e consequente hiperplasia cribriforme (KEMPINAS; KLINEFELTER, 2014). Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, houve um aumento de 20.75% (cabeça-corpo) e 15.21% (cauda) no tempo de trânsito espermático no epidídimo no grupo E400 em relação ao grupo controle. Desta forma, não há indícios de aumento da contração do ducto epididimario e do transporte luminal.

Além disso, notou-se a presença de massa de células epiteliais descamadas no lúmen da região da cabeça epididimária de um animal (Figura 11G e 11H). Não foi encontrado na literatura uma descrição dessa alteração em epidídimo, mas na literatura é reportada a presença dessa alteração na próstata. Ferruci e colaboradores (2017), em um estudo sobre a descamação de células na próstata, relatou que as células são descamadas da membrana basal e não interagem com as células vizinhas. Além disso, a maioria das células descamadas possuem membrana plasmática intacta.

Figura 11 - Fotomicrografias de secções longitudinais dos segmentos cabeça e cauda do epidídimo dos ratos dos grupos controle (A - D) e expostos a 150 (E150 - E - J), 200 (E200 - K - L) e 400 mg/kg (E400 - M - O) de etefon



A - D) Grupo controle. E - J) Grupo E150. K - L) Grupo E200. M - O) Grupo E400. A - D - Integridade morfológica do epitélio do ducto epididimário (ep), interstício (in) e lúmen com espermatozoides (sz) nos segmentos cabeça (A e B) e cauda (C e D). E e F - Epitélio da região da cauda epididimária com grande número de células claras (cc). Em F, observa-se presença de célula clara hiperplásica. G e H - Presença de massa de células epiteliais descamadas no lúmen (*) da região da cabeça epididimária. I e K - Presença de vacuolização intraepitelia

(seta). J e K - Presença de célula germinativa acidófila esfoliada no lúmen (cabeça de seta) entre os espermatozoides. L - Presença de corpo celular acidófilo multinucleado no lúmen (cabeça de seta) entre os espermatozoides. M - Região do ducto epididimário do segmento cauda com hiperplasia cribriforme (#). N – O - Detalhe do epitélio hiperplásico, dobrando-se sobre si mesmo, com formação de estruturas pseudoglandulares (setas). Em N, observa-se a ausência de espermatozoides no lúmen, que pode ter levado ao dobramento epitelial. M – O – Observa-se o espessamento da lâmina basal (lb). A, B, G - J (secção da cabeça do epidídimo). C, D, F, K – O (secção da cauda do epidídimo). A, C, E: Aumento de 100x. M: Aumento de 200x. B, D, F – L, N, O: Aumento de 400x. Hematoxilina - eosina (HE).

5.1.3. Avaliação espermática

Estudos vem sendo desenvolvidos a fim de avaliar anomalias qualitativas, incluindo motilidade e vitalidade. Esses parâmetros desempenham papel importante na penetração do espermatozoide para fecundação (PALOMO et al., 2010) e, conseqüentemente, nos processos envolvidos na fertilidade (AUGER et al., 2000). No presente estudo a qualidade espermática dos grupos expostos ao etefon foi prejudicada. Apesar da ausência de impacto sobre o tempo de trânsito espermático na cabeça/corpo do epidídimo, a maturação espermática pode ter sido afetada pela exposição ao etefon, considerando o comprometimento da motilidade dos espermatozoides.

A exposição ao etefon afetou a contagem de espermatozoides no testículo (Tabela 3). O número de espermatozoides no testículo e a produção diária de espermatozoides diminuíram ($p < 0,05$) no grupo E400 em comparação ao grupo controle e E150. O número de espermatozoides por grama de testículo também sofreu uma diminuição no grupo E400 em relação ao grupo controle apenas. A contagem de espermatozoides no epidídimo e o tempo de trânsito espermático foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os grupos de exposição.

Tabela 3 - Contagens de espermatozoides no testículo e epidídimo em ratos dos grupos controle e expostos a 150 (E150), 200 (E200) e 400 mg/kg (E400) de etefon

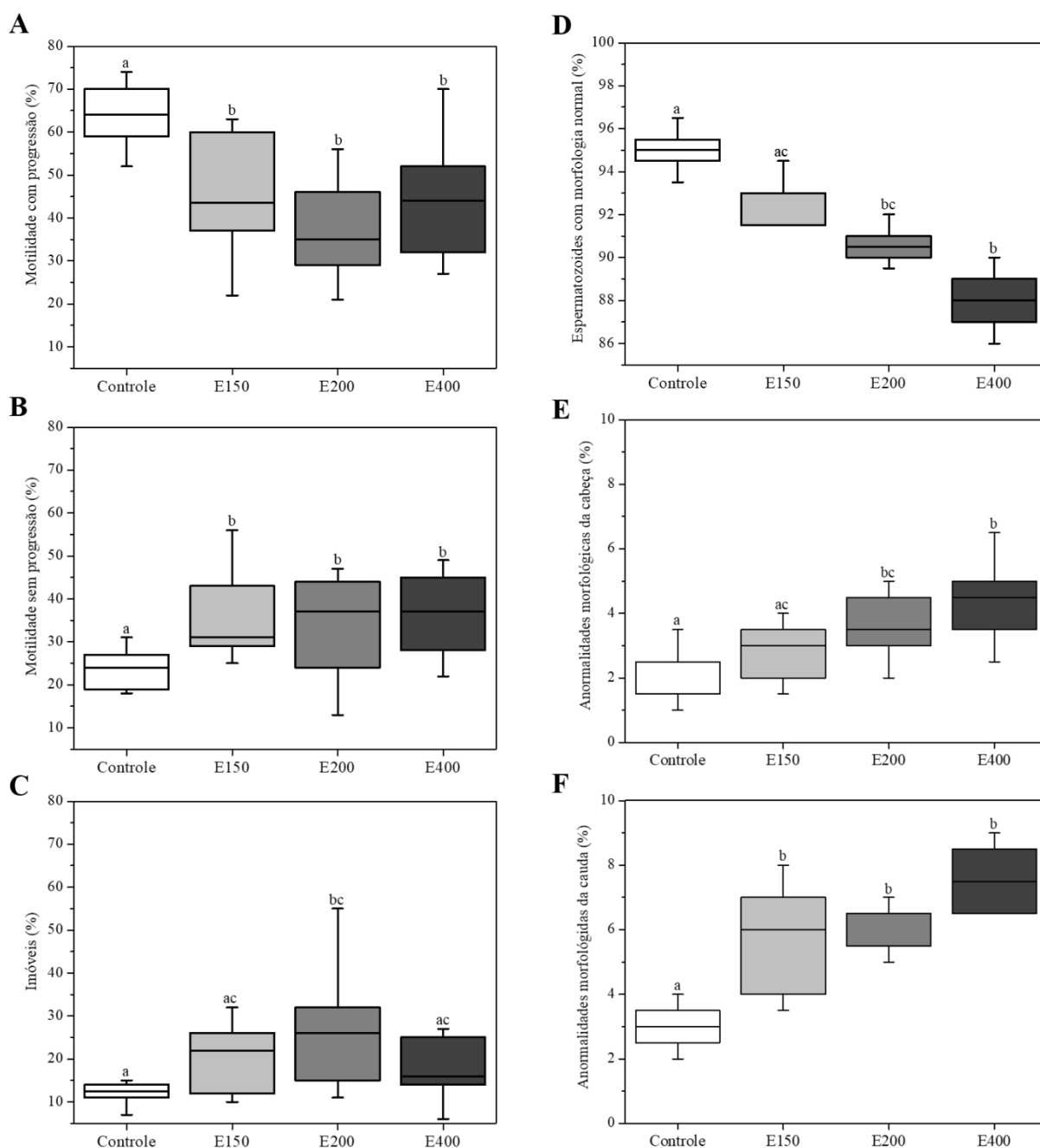
Parâmetro	Controle	Grupos expostos ao etefon		
		E150	E200	E400
<i>Contagem de espermatozoides no testículo</i>				
Número de espermatozoides (x 10 ⁶)	141,35 ± 11,26a	135,61 ± 12,34a	133,24 ± 9,79ac	121,99 ± 11,58bc
Número de espermatozoides por grama de órgão (x 10 ⁶ /g)	109,74 ± 12,18a	105,48 ± 13,61ac	102,40 ± 11,84ac	92,54 ± 10,87bc
Produção diária de espermatozoides (x 10 ⁶ /testículo/dia)	23,17 ± 1,85a	22,23 ± 2,03a	21,84 ± 1,61ac	19,99 ± 1,90bc
<i>Contagem de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo</i>				
Número de espermatozoides (x 10 ⁶)	103,33 ± 16,10	103,57 ± 27,69	95,50 ± 22,32	108,24 ± 16,46
Número de espermatozoides por grama de órgão (x 10 ⁶ /g)	309,32 ± 38,71	328,93 ± 91,84	306,21 ± 39,96	333,30 ± 34,99
Trânsito espermático (dias)	4,48 ± 0,84	4,70 ± 1,46	4,37 ± 0,98	5,41 ± 0,65
<i>Contagem de espermatozoides na cauda do epidídimo</i>				
Número de espermatozoides (x 10 ⁶)	146,00 ± 24,39	141,45 ± 19,23	142,58 ± 37,99	144,58 ± 23,36
Número de espermatozoides por grama de órgão (x 10 ⁶ /g)	601,24 ± 54,15	579,37 ± 62,71	618,75 ± 108,09	631,87 ± 84,70
Trânsito espermático (dias)	6,31 ± 0,96	6,44 ± 1,28	6,51 ± 1,65	7,27 ± 1,32

Valores expressos em média $\pm$ DP. ANOVA com teste a posteriori Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Os resultados demonstram que ocorreu uma redução significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva (Figura 12A) nos três grupos expostos em relação ao grupo controle. Consequentemente, houve um aumento ($p < 0,05$) da motilidade não progressiva (Figura 12B) nesses grupos. Já a porcentagem de espermatozoides imóveis (Figura 12C) apresentou um aumento ($p < 0,05$) apenas no grupo E200 em relação ao grupo controle.

Houve redução significativa ($p < 0,05$) no percentual de espermatozoides morfolologicamente normais nos grupos E200 e E400 (Figura 12D). Além disso, o grupo E400 apresentou mais ($p < 0,05$) anormalidades quando comparado ao grupo E150 (Figura 12D). A morfologia da cabeça do espermatozoide sofreu o mesmo padrão de alteração descrito anteriormente (Figura 12E) e a alteração mais observada foi presença de cabeça espermática isolada. Já a porcentagem de espermatozoides com alterações na cauda aumentou ($p < 0,05$) nos três grupos expostos em relação ao grupo controle (Figura 12F). A alteração mais frequentemente observada foi a presença de cauda espermática dobrada, seguida de cauda isolada.

Figura 12 - Motilidade e morfologia de espermatozoides dos ratos dos grupos controle e expostos a 150 (E150), 200 (E200) e 400mg/kg (E400) de etefon

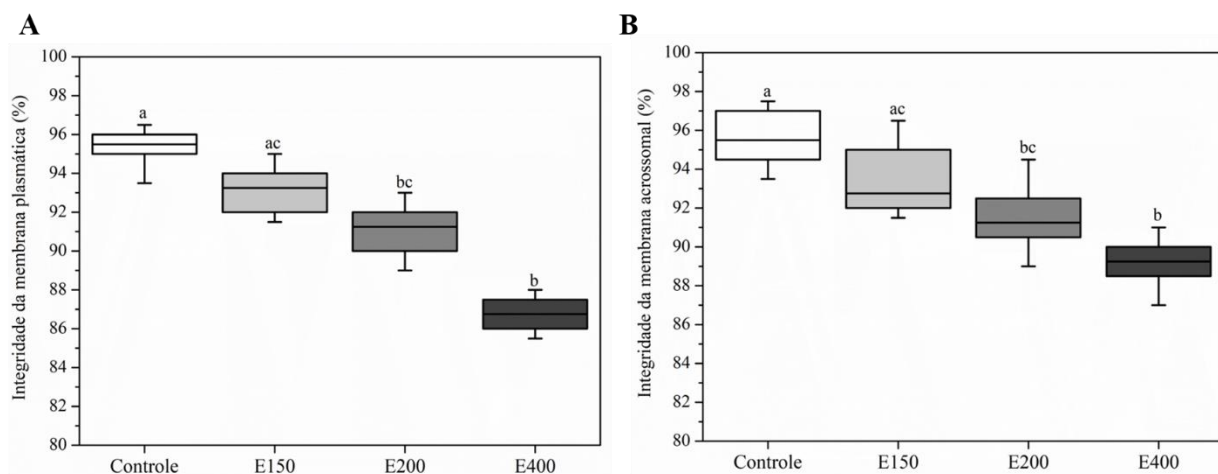


A – Motilidade com progressão. B – Motilidade sem progressão. C – Imóveis. D – Espermatozoides com morfologia normal. E – Anormalidades morfológicas da cabeça. F – Anormalidades morfológicas da cauda. Valores expressos como mediana (Q1 - Q3). Teste Kruskal-Wallis, com teste “a posteriori” de Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra sofreu redução ($p < 0,05$) nos grupos E200 e E400 em relação ao grupo controle e entre os grupos E150 e E400

(Figura 13A). O mesmo resultado foi observado para a integridade de membrana acrossomal dos espermatozoides (Figura 13B).

Figura 13 - Integridade da membrana plasmática (A) e acrossomal (B) dos ratos dos grupos controle e expostos a 150 (E150), 200 (E200) e 400mg/kg (E400) de etefon



Valores expressos como mediana (Q1 - Q3). Teste Kruskal-Wallis, com teste “a posteriori” de Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A redução da motilidade progressiva e, conseqüentemente, o aumento da motilidade não progressiva e no número de espermatozoides imóveis observados corroboram com a diminuição do número de espermatozoides com membrana plasmática intacta. A morfologia espermática também foi comprometida com a exposição ao etefon. O número de espermatozoides morfolologicamente normais diminuiu nos grupos expostos e ocorreu um aumento de anormalidades na cabeça e cauda nos espermatozoides desses grupos.

Tais resultados são semelhantes aos obtidos por Abd Eldaim e colaboradores (2018), onde animais expostos ao etefon apresentaram diminuição significativa na vitalidade, motilidade total, motilidade progressiva e contagem espermática. Além disso, aumentaram significativamente as anormalidades dos espermatozoides, os danos no tecido testicular e no DNA e os espermatozoides imóveis.

O acrossoma dos espermatozoides é uma organela derivada do complexo de Golgi que forma uma espécie de capa sobre a parte anterior do núcleo e contém enzimas digestivas. Tais enzimas são liberadas durante a reação acrossômica, um evento exocitótico, e decompõem a membrana plasmática do ovócito, permitindo assim a penetração do espermatozoide no ovócito II (ROTEM et al., 1992). Nesse estudo o etefon reduziu o número de espermatozoides com a membrana acrossomal íntegra nos grupos E200 e E400 em relação ao grupo controle. Também

houve uma redução significativa entre os grupos E150 e E400. Anormalidades morfológicas ou no acrossoma podem comprometer a fertilização (MENKVELD et al., 1996; GARRETT et al., 1997), no presente estudo o aumento do número de anormalidades morfológicas e a redução do número de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegra podem refletir em prejuízos para a fertilidade.

Outros estudos foram desenvolvidos afim de avaliar a exposição a agrotóxicos e os efeitos sobre a integridade da membrana acrossomal. Segundo Saalfeld e colaboradores (2018), a exposição de camundongos a 10 mg/kg de atrazina por 21 dias, também ocasiona uma diminuição no número de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra. Em um estudo de exposição de ratos Wistar adultos a fipronil por 28 dias, constatou-se uma diminuição de 20 e 24% na integridade da membrana acrossomal nos grupos expostos a 5 e 10 mg/kg, respectivamente (KHAN et al., 2015).

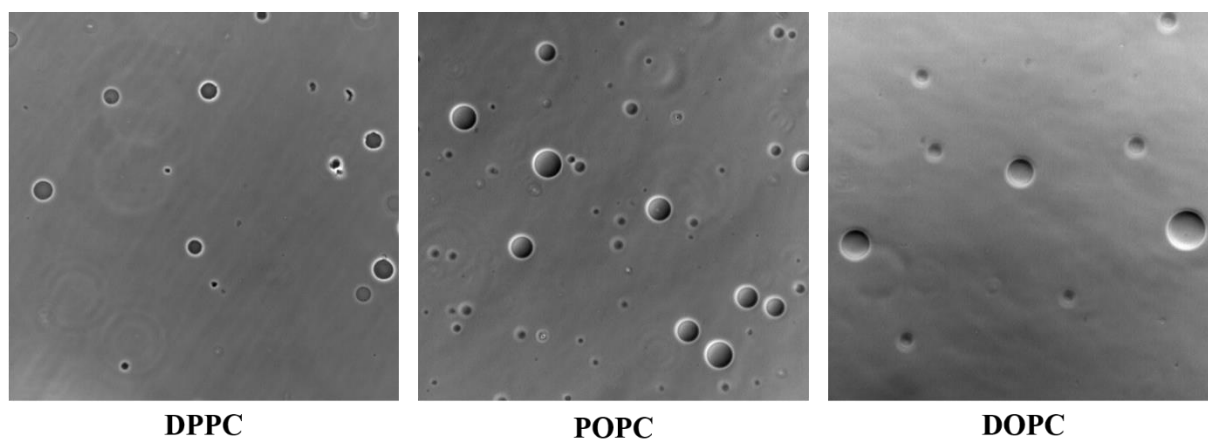
5.2. Estudo da interação molecular entre fosfatidilcolinas e etefon

A partir dos resultados observados para a membrana plasmática dos espermatozoides, deu-se início ao estudo molecular da interação entre as fosfatidilcolinas DPPC, POPC e DOPC e etefon (1.10^{-4} M).

5.2.1. Interação de bicamadas lipídicas com etefon

Para o estudo da interação das bicamadas lipídicas com etefon, foram utilizadas GUVs obtidas com DPPC, POPC e DOPC (Figura 14). Essas vesículas foram observadas quanto à sua formação e os efeitos adversos na ausência e na presença de etefon (1.10^{-4} M).

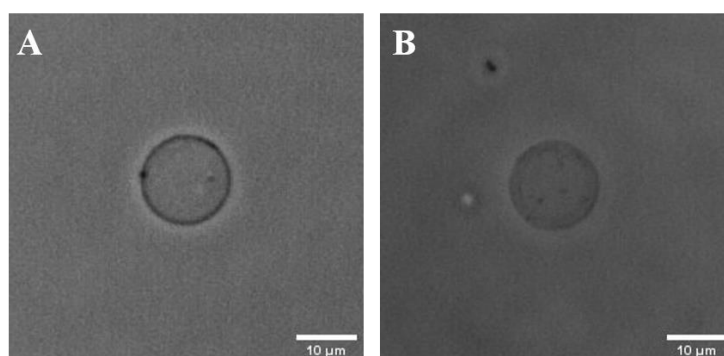
Figura 14 – GUVs de DPPC, POPC e DOPC na ausência de etefon, após 30 min de observação



As GUVs em sua formação apresentam curvatura espontânea, que é uma propriedade relacionada as diferenças na composição dos lipídios ou na composição da solução através da membrana. Quando o sistema é perturbado, ocorre mudanças nessa curvatura. Nesse caso, a curvatura espontânea pode ser positiva, apresentando estruturas externas, ou pode ser negativa, com estruturas internas. As diferentes curvaturas são assumidas pelo sistema após a perturbação, com o objetivo de minimizar a energia termodinâmica do sistema (DIMOVA, 2019). Os efeitos morfológicos observados, estão relacionados a esse processo.

Para o DPPC foram obtidas GUVs com conformação estável e na fase gel - L_β na temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). (NAGARAJAN et al., 2012). Na ausência de etefon, apenas 1,8% das GUVs formadas perderam o contraste de fase após 30 minutos de observação. Já na presença de etefon, 6,7% das GUVs expostas sofreram algum dano em sua estrutura, sendo a perda do contraste de fase o efeito mais observado (5,7%) (Figura 15), seguido do formato pera em apenas 1% das GUVs alteradas.

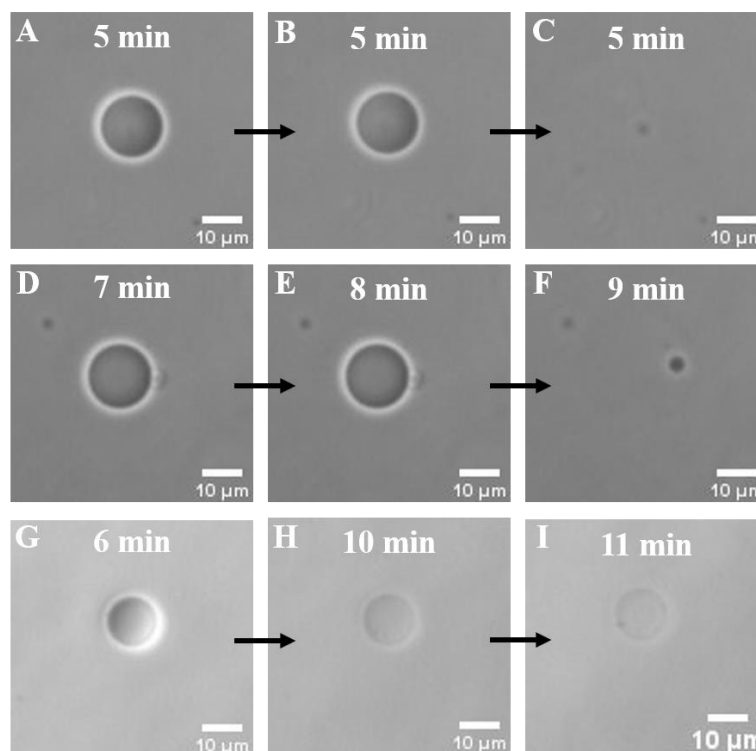
Figura 15 – Imagens de microscopia de contraste de fase de GUVs de DPPC, após 30 minutos de exposição ao etefon



A e B – GUVs de DPPC com ausência de contraste de fase.

As GUVs de POPC apresentaram-se em formato esférico e, nas condições analisadas, não foram percebidas flutuações na forma das vesículas. Na ausência do etefon, apenas 1,8% das GUVs formadas apresentaram algum dano em sua estrutura, sendo a formação de *buds* e a perda do contraste de fase os danos observados. A presença do etefon no sistema afetou 58,4% das GUVs expostas. Os dois efeitos mais observados foram a perda do contraste de fase (57%) e a explosão de vesículas (Figura 16). Outros efeitos como GUVs no formato pera e *bud* também foram observados em menor quantidade.

Figura 16 – Imagens de microscopia de contraste de fase de GUVs de POPC expostas ao etefon



A à F – Explosão de vesículas. G à I – Processo de perda do contraste de fase. O tempo de análise é mostrado na parte superior de cada imagem capturada.

As GUVs de DOPC apresentaram-se em formato esférico e, nas condições experimentais utilizadas, não houve flutuações na forma das vesículas. Na ausência de etefon, 3,1% das GUVs formadas por DOPC apresentaram formação de *bud*, sendo este o único efeito observado. Vale destacar que esse efeito é comum na formação de GUVs de DOPC (YU et al., 2010). Já para as GUVs expostas ao etefon esse valor foi de 9,7% de GUVs afetadas e o efeito mais observado foi a perda do contraste de fase, seguido da formação de *buds* e formato pera.

A abertura dos poros e permeabilização da membrana é resultado das quebras das cadeias lipídicas ocasionadas pelas reações de oxidação sofridas naturalmente pelos fosfolipídios insaturados. Desse modo a formação de aldeídos truncados favorece um aumento na distância lipídio-lipídio e, conseqüentemente, a perda de contraste de fase (PAZIN et al., 2021). Neste estudo o etefon pode estar gerando uma desorganização na bicamada lipídica. Essa desorganização pode estar favorecendo o processo de oxidação e ocasionando um aumento na distância lipídio-lipídio, resultando no aumento da perda de contraste de fase observado.

Embora o POPC e DOPC estejam na fase fluida na temperatura de análise (23 ± 1 °C) e sejam insaturados, não observamos no DOPC a mesma intensidade de perda de contraste de fase que observamos para o POPC. Além disso, para o DOPC também não foi observado a explosão de vesículas que se observou para o POPC em poucos minutos de exposição. Esses

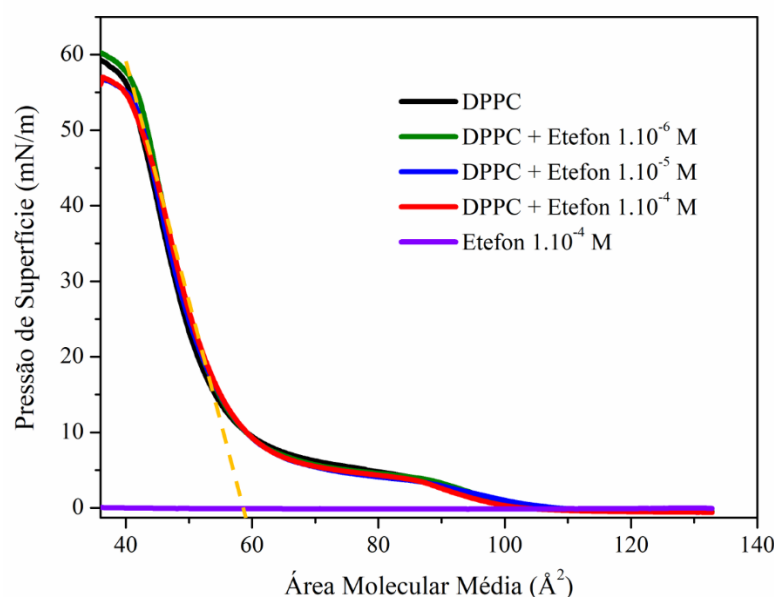
resultados demonstram que os efeitos do etefon podem ser induzidos quimicamente nas vesículas e não de acordo com a fase em que os lipídios estão.

5.2.2. Interação das monocamadas lipídicas com etefon

A partir dos resultados obtidos para as bicamadas, procedeu-se o estudo com as monocamadas a fim de entender as interações entre o etefon e os fosfolipídios em estudo. Na Figura 17 são apresentados os resultados das isotermas π -A para o fosfolipídio DPPC (1.10^{-3} M) em subfase aquosa, na ausência e na presença do etefon, nas concentrações 1.10^{-6} , 1.10^{-5} e 1.10^{-4} M. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente (23°C) e em triplicata e as médias das triplicatas são apresentadas para facilitar a visualização.

A Figura 17 também apresenta a isoterma π -A do estudo realizado afim de identificar a atividade superficial do etefon (1.10^{-4} M) em subfase aquosa. Para isso, as barreiras da cuba foram comprimidas na ausência de lipídios na interface ar/água. Vale salientar que o etefon, nessa mais alta concentração utilizada neste estudo, não apresenta atividade superficial e, portanto, não forma monocamadas. Esta conclusão se dá como base na análise de que o valor da pressão superficial não se alterou durante toda a compressão das barreiras, considerando-se apenas a presença do etefon na subfase.

Figura 17 – Isotermas π -A de DPPC na ausência e presença de etefon em diferentes concentrações

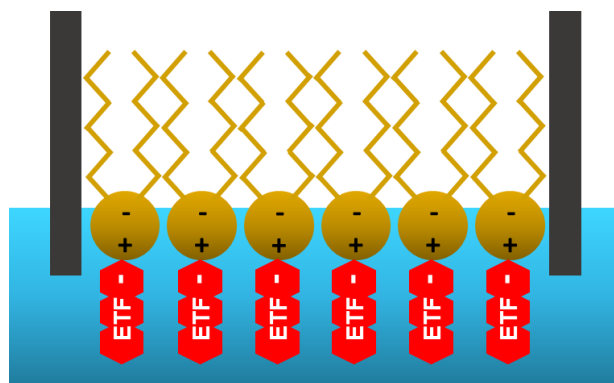


Isotermas π -A obtidas a 23°C para monocamadas de DPPC na subfase contendo água ultrapura e etefon 1.10^{-6} (linha verde), 1.10^{-5} (linha azul) e 1.10^{-4} M (linha vermelha). Isotherma π -A obtidas a 23°C com etefon 1.10^{-4} M em subfase aquosa na ausência de fosfolipídio (linha roxa).

A isoterma π -A em subfase aquosa para o DPPC apresenta perfil característico do fosfolipídio (RUIZ et al., 2017), com valor médio de área extrapolada de $58 \text{ \AA}^2$. A área extrapolada foi determinada traçando uma linha da região de mais alto empacotamento lipídico até a pressão zero. Pode-se observar a presença bem definida das fases gasosa, líquido-expandida e líquido-condensada e o colapso é atingido em 59 mN/m . Observa-se um platô a 7 mN/m que indica a coexistência das fases líquido-expandida e líquido-condensada característico para o fosfolipídio. Para o DPPC, todas as concentrações do etefon não provocaram mudanças no perfil da isoterma π -A, bem como não provocaram deslocamentos significativos.

A diferença de cargas entre o etefon (negativo) e o grupo colina (positivo) pode gerar uma interação de atração eletrostática entre as moléculas. Porém, a ausência de alterações nas isotermas de DPPC pode indicar que o etefon, por possuir alta solubilidade em água e pela carga negativa, permanece na subfase, abaixo da monocamada de DPPC, sem ocupar uma área na interface ar/água, conforme ilustrado na Figura 18.

Figura 18 – Esquema representativo da estruturação da monocamada de DPPC na fase condensada para as subfases contendo etefon



Fonte: Próprio autor

Além da interação atrativa com o grupo colina, outra possível interação do etefon seja com o grupo hidratado fosfato. A presença do grupo fosfato no DPPC promove um ambiente repulsivo para o fosfato presente no etefon. Desse modo, ocorreria uma interação eletrostática repulsiva entre os grupos fosfato do DPPC e do etefon. Essa interação pode ser uma das responsáveis pelo fato do etefon não ocupar uma área na interface ar/água, uma vez que essa repulsão não permite que o etefon interaja com as áreas superiores da cabeça do lipídio.

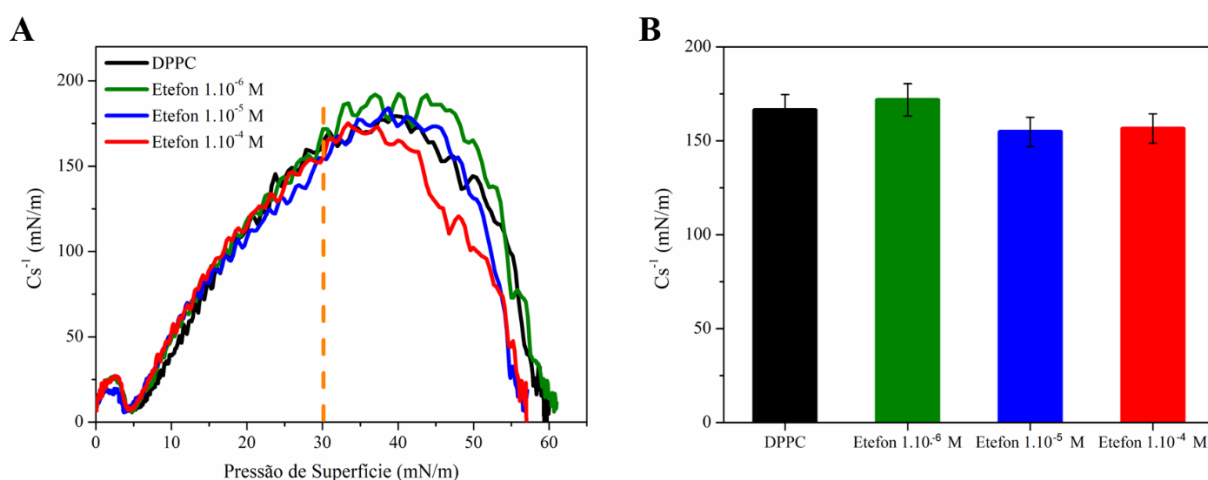
Outra hipótese para o etefon não ocupar uma área na interface ar/água se deve ao empacotamento da monocamada. O DPPC, por não possuir insaturações na cauda, forma uma

monocamada mais organizada. Ou seja, o espaçamento entre os lipídios não deixa espaços livres para o etefon ocupar uma área na interface ar/água.

Resultado semelhante foi obtido por Morato e colaboradores (2021) ao investigarem os efeitos do inseticida organofosforado acefato sobre monocamadas de DPPC. Esse estudo demonstrou ausência de alterações na isoterma π -A de DPPC na presença de acefato. Porém, embora o acefato não tenha deslocado a isoterma π -A, houve interação com os grupos hidratados colina e fosfato.

Complementando os estudos das isotermas π -A, na Figura 19 são apresentados os gráficos de módulo compressional por pressão de superfície para o lipídio DPPC nas subfases contendo água ultrapura e etefon nas concentrações 1.10^{-6} , 1.10^{-5} e 1.10^{-4} M. A Figura 10B apresenta um gráfico comparativo e a Tabela 4 os valores de compressibilidade das monocamadas de DPPC na ausência e presença de etefon na pressão de superfície 30 mN/m, pressão correspondente às condições das membranas celulares (MARSH, 1996).

Figura 19 – Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície de DPPC na ausência e presença de etefon em diferentes concentrações



A – Curvas de Cs^{-1} em função da pressão de superfície para as monocamadas de DPPC obtidas das isotermas π -A nas subfases contendo água ultrapura e etefon 1.10^{-6} (linha verde), 1.10^{-5} (linha azul) e 1.10^{-4} M (linha vermelha). B – Gráfico de barras Cs^{-1} obtido das isotermas π -A de DPPC em $\pi = 30$ mN/m na subfase contendo água ultrapura (barra preta) e etefon 1.10^{-6} (barra verde), 1.10^{-5} (barra azul) e 1.10^{-4} M (barra vermelha).

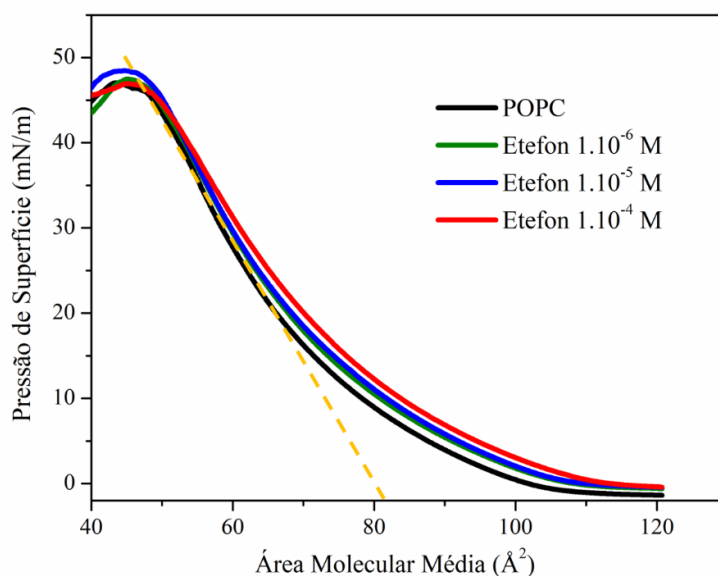
Tabela 4 – Valores de módulo compressional em 30 mN/m para as monocamadas de DPPC na ausência e presença de etefon nas diferentes concentrações

Monocamada	Cs ⁻¹ (mN/m)	Desvio padrão
DPPC	166,3	0,5
DPPC + Etefon 1.10 ⁻⁶ M	171,8	0,4
DPPC + Etefon 1.10 ⁻⁵ M	154,7	0,2
DPPC + Etefon 1.10 ⁻⁴ M	156,5	0,4

O DPPC em subfase aquosa apresentou resultado coerente com o descrito na literatura (STUNGES et al., 2017). Os valores obtidos para 30 mN/m estão dentro da faixa líquido condensada, referente ao intervalo de Cs⁻¹ entre 100 e 250 mN/m (DAVIES; RIDEAL, 1963). A presença do etefon na subfase, nas três concentrações estudadas, não causou mudanças significativas na elasticidade da monocamada. É possível observar que os valores de módulo compressional (Tabela 4) sofreram alterações, porém permanecem no intervalo de Cs⁻¹ referente à fase líquido condensada.

Na Figura 20 são apresentados os resultados das isotermas π -A para o fosfolipídio POPC (1.10⁻³ M) em subfase aquosa, na ausência e na presença do etefon, nas concentrações 1.10⁻⁶, 1.10⁻⁵ e 1.10⁻⁴ M. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente (23 °C) e em triplicata e as médias das triplicatas são apresentadas para facilitar a visualização.

Figura 20 – Isotermas π -A de POPC na ausência e presença de etefon em diferentes concentrações



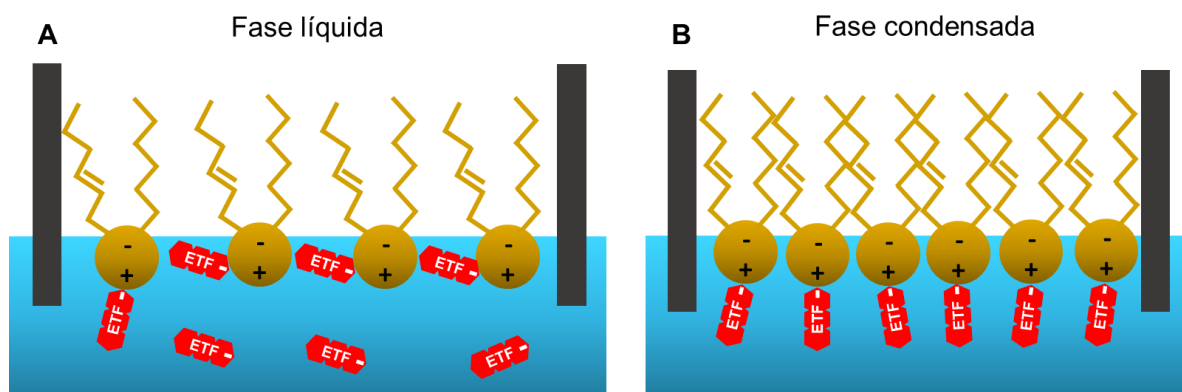
Isotermas π -A obtidas a 23 °C para monocamadas de POPC na subfase contendo água ultrapura e etefon 1.10⁻⁶ (linha verde), 1.10⁻⁵ (linha azul) e 1.10⁻⁴ M (linha vermelha).

A isoterma π -A em subfase aquosa para o POPC apresenta perfil característico do fosfolípido (RUIZ et al., 2021), com valor médio de área extrapolada de $82 \text{ \AA}^2$. O perfil da isoterma não apresenta as transições de fases bem definidas, como observado para o DPPC. A ausência das transições de fase bem definidas está relacionada com as insaturações presentes nas cadeias alifáticas e a temperatura de transição ($-2 \text{ }^\circ\text{C}$) do fosfolípido. Na temperatura em que as isotermas π -A foram obtidas ($23 \text{ }^\circ\text{C}$) o POPC encontra-se na fase fluída, onde as cadeias são mais desordenadas e, por estar muito acima da temperatura de transição, a monocamada não atinge a fase líquido-condensada, sendo possível observar apenas as fases gasosa e líquido-expandida (SENNATO et al., 2005; AOKI et al., 2016).

Em 30 mN/m , as isotermas π -A na presença de etefon 1.10^{-6} e 1.10^{-5} M apresentaram deslocamento pouco significativo, de $2 \text{ \AA}^2$ ($2/82 \rightarrow 2,4\%$). A maior concentração do composto (1.10^{-4} M) apresentou deslocamento de $3 \text{ \AA}^2$ ($3/82 \rightarrow 3,6\%$) em comparação com a monocamada de POPC em água ultrapura. Um estudo desenvolvido por Pereira e colaboradores (2018) identificou a preferência de interação entre a molécula Eosina Y e fosfolípidos insaturados. Ao avaliar a exposição de DPPC, POPC e DOPC à Eosina Y, observou-se maior interação com as fosfatidilcolinas insaturadas. A preferência foi relacionada ao fato de que na temperatura ambiente ($23 \text{ }^\circ\text{C}$), o POPC se encontra na fase fluída e possui cadeias mais desordenadas e menos empacotadas. Esse desordenamento das cadeias facilita a incorporação do composto na interface ar/água, permitindo que ele fique embebido entre as cabeças e, consequentemente, ocupe uma área na interface ar/água. A área ocupada é vista nos deslocamentos apresentados pelas isotermas π -A.

Embora haja deslocamentos na isoterma π -A na presença de etefon, nota-se que em altas pressões esse deslocamento não é mais observado. Isso indica que o etefon não permanece na interface ar/água até o colapso da monocamada. A Figura 21 ilustra as possíveis estruturas que a monocamada de POPC adquire na presença do etefon nas fases líquida e condensada.

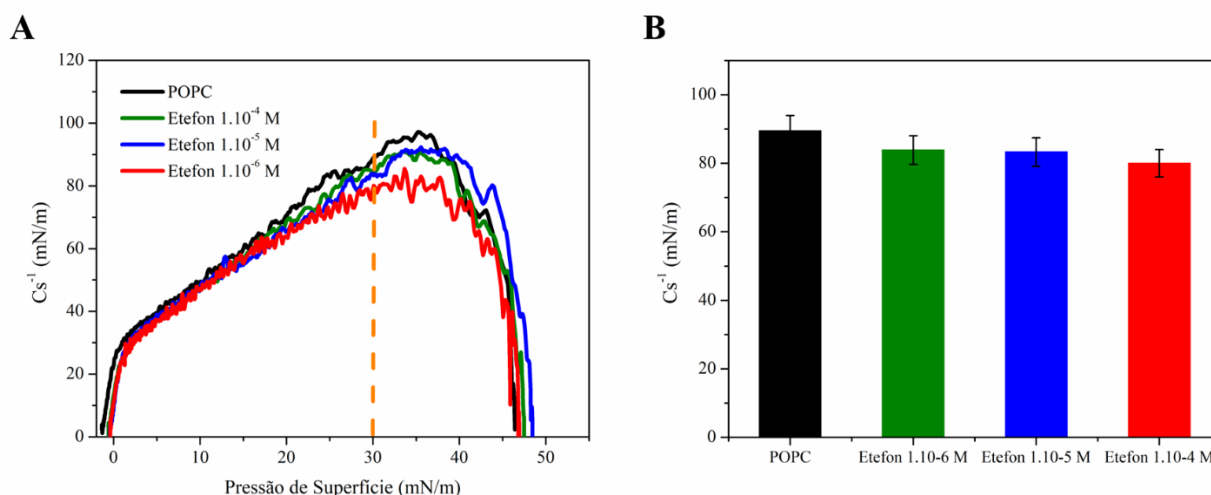
Figura 21 – Esquema representativo da estruturação da monocamada de POPC nas fases líquida e condensada para as subfases contendo etefon



Fonte: Próprio autor

Na Figura 22A são apresentados os gráficos de módulo compressional por pressão de superfície para o lipídio POPC nas subfases contendo água ultrapura e etefon nas diferentes concentrações (1.10^{-6} , 1.10^{-5} e 1.10^{-4} M). A Figura 22B apresenta um gráfico comparativo e a Tabela 5 os valores de compressibilidade das monocamadas de POPC na ausência e presença de etefon na pressão de superfície 30 mN/m.

Figura 22 – Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície de POPC na ausência e presença de etefon em diferentes concentrações



A – Curvas de C_s^{-1} em função da pressão de superfície para as monocamadas de POPC obtidas das isotermas π -A nas subfases contendo água ultrapura e etefon 1.10^{-6} (linha verde), 1.10^{-5} (linha azul) e 1.10^{-4} M (linha vermelha). B – Gráfico de barras C_s^{-1} obtido das isotermas π -A de POPC em $\pi = 30$ mN/m na subfase contendo água ultrapura (barra preta) e etefon 1.10^{-6} (barra verde), 1.10^{-5} (barra azul) e 1.10^{-4} M (barra vermelha).

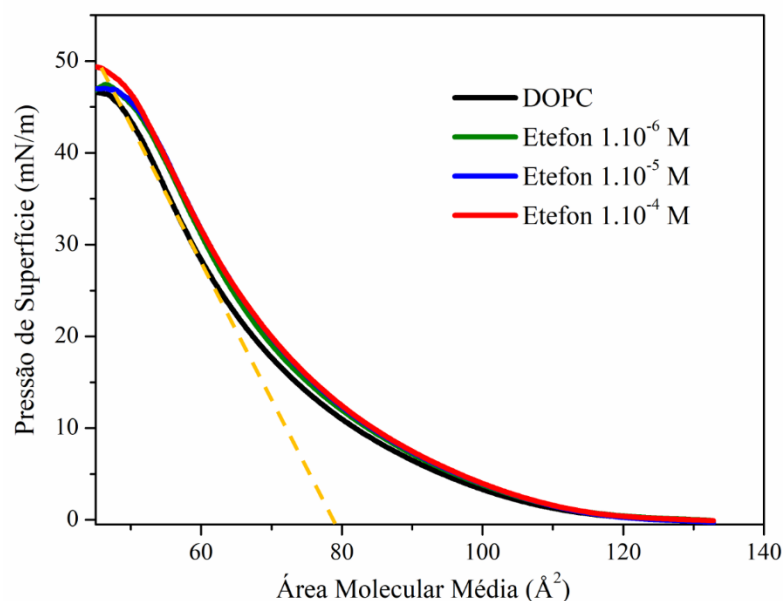
Tabela 5 – Valores de módulo compressional em 30 mN/m para as monocamadas de POPC na ausência e presença de etefon nas diferentes concentrações

Monocamada	Cs⁻¹ (mN/m)	Desvio padrão
POPC	89,5	0,6
POPC + Etefon 1.10 ⁻⁶ M	83,9	1,1
POPC + Etefon 1.10 ⁻⁵ M	83,3	0,6
POPC + Etefon 1.10 ⁻⁴ M	80,0	0,8

O resultado de módulo compressional para o POPC em subfase aquosa é coerente com o descrito na literatura (ANDREEVA et al., 2018). Os valores obtidos para 30 mN/m encontram-se dentro da faixa líquido expandida, com $Cs^{-1} < 100$ mN/m (DAVIES; RIDEAL, 1963). O POPC, quando comparado ao DPPC, apresenta menores valores de Cs^{-1} por ser mais fluído e não apresentar as transições de fase de forma clara. Com a presença de etefon na subfase, nas três concentrações de estudo, as monocamadas não apresentaram mudanças significativas na elasticidade. Observa-se que a variação de valores de Cs^{-1} (Tabela 5) não foi suficiente para promover mudanças de fase nas monocamadas, apesar dos deslocamentos observados nas isotermas π -A.

Na Figura 23 são apresentados os resultados das isotermas π -A para o fosfolipídio DOPC (1.10⁻³ M) em subfase aquosa, na ausência e na presença do etefon, nas concentrações 1.10⁻⁶, 1.10⁻⁵ e 1.10⁻⁴ M. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente (23 °C) e em triplicata e as médias das triplicatas são apresentadas para facilitar a visualização.

Figura 23 – Isotermas π -A de DOPC na ausência e presença de etefon em diferentes concentrações

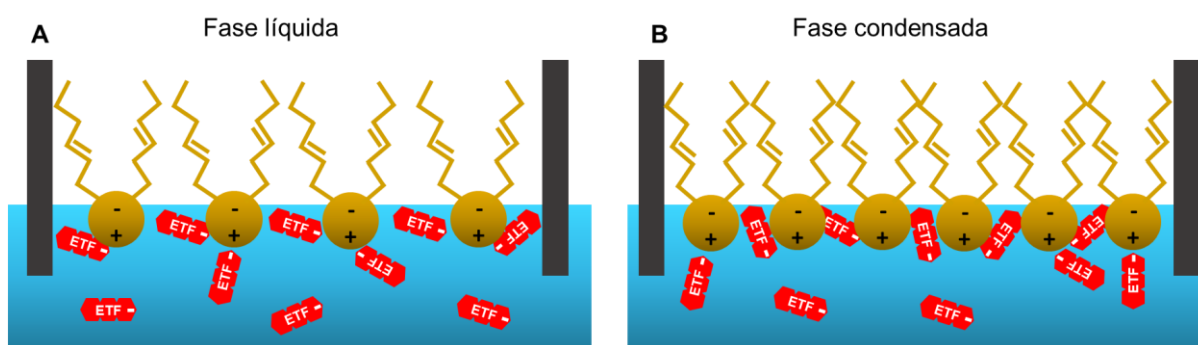


Isotermas π -A obtidas a 23 °C para monocamadas de DOPC na subfase contendo água ultrapura e etefon 1.10^{-6} (linha verde), 1.10^{-5} (linha azul) e 1.10^{-4} M (linha vermelha).

Para a monocamada de DOPC em subfase aquosa, a isoterma π -A apresenta perfil característico do fosfolípido (AOKI et al., 2016; PAZIN et al., 2021), com valor médio de área extrapolada de 79 Å^2 . A monocamada de DOPC também não apresenta as transições de fase bem definidas. Como já dito para o POPC, a ausência das transições bem definidas está relacionada à presença de insaturações nas caudas hidrofóbicas do fosfolípido (SENNATO et al., 2005; AOKI et al., 2016).

As monocamadas de DOPC na presença de etefon nas concentrações do estudo também apresentaram deslocamento pouco significativo, de 3 Å^2 ($3/79 \rightarrow 3,8\%$) em 30 mN/m , quando comparadas com as monocamadas na ausência de etefon. Porém, as alterações decorrentes da presença do etefon são observadas mesmo em altas pressões superficiais, o que não ocorreu para o DPPC ou POPC. Isso indica que o etefon permanece embebido na interface ar/água até o colapso da monocamada. A Figura 24 ilustra as possíveis configurações da monocamada de DOPC na presença de etefon nas fases líquida e condensada.

Figura 24 – Esquema representativo da estruturação da monocamada de DOPC nas fases líquida e condensada para as subfases contendo etefon

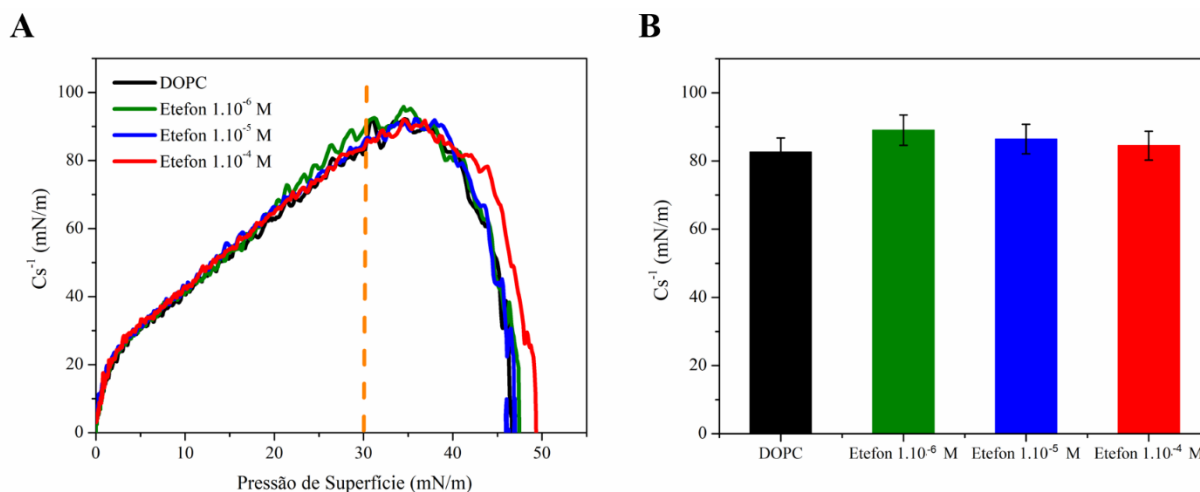


Fonte: Próprio autor

Entre os fosfolipídios utilizados no estudo das monocamadas, o DOPC foi que mostrou mais interagir com o etefon, uma vez que foi o único que apresentou deslocamento nas isotermas π -A em todas as concentrações estudadas. Levando em consideração que os três lipídios estudados apresentam o mesmo grupo fosfatidilcolina, que o DPPC não apresentou deslocamentos nas isotermas π -A na presença do etefon, e o POPC e DOPC apresentaram deslocamentos, reforça-se a hipótese de que as insaturações promovem uma monocamada mais desordenada e facilita a incorporação do etefon na monocamada. O efeito dessa incorporação é mais sentido nas monocamadas de DOPC, pois apresenta duas insaturações, enquanto o POPC apresenta apenas uma.

A Figura 25A apresenta os gráficos de módulo compressional por pressão de superfície para o lipídio DOPC nas subfases contendo água ultrapura e etefon nas diferentes concentrações (1.10^{-6} , 1.10^{-5} e 1.10^{-4} M). Na Figura 25B e na Tabela 6 são apresentados, respectivamente, um gráfico comparativo e os valores de compressibilidade das monocamadas de DOPC na ausência e presença de etefon na pressão de superfície 30 mN/m.

Figura 25 – Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície de DOPC na ausência e presença de etefon em diferentes concentrações



A – Curvas de C_s^{-1} em função da pressão de superfície para as monocamadas de DOPC obtidas das isotermas π -A nas subfases contendo água ultrapura e etefon 1.10^{-6} (linha verde), 1.10^{-5} (linha azul) e 1.10^{-4} M (linha vermelha). B – Gráfico de barras C_s^{-1} obtido das isotermas π -A de DOPC em $\pi = 30$ mN/m na subfase contendo água ultrapura (barra preta) e etefon 1.10^{-6} (barra verde), 1.10^{-5} (barra azul) e 1.10^{-4} M (barra vermelha).

Tabela 6 - Valores de módulo compressional em 30 mN/m para as monocamadas de DOPC na ausência e presença de etefon nas diferentes concentrações

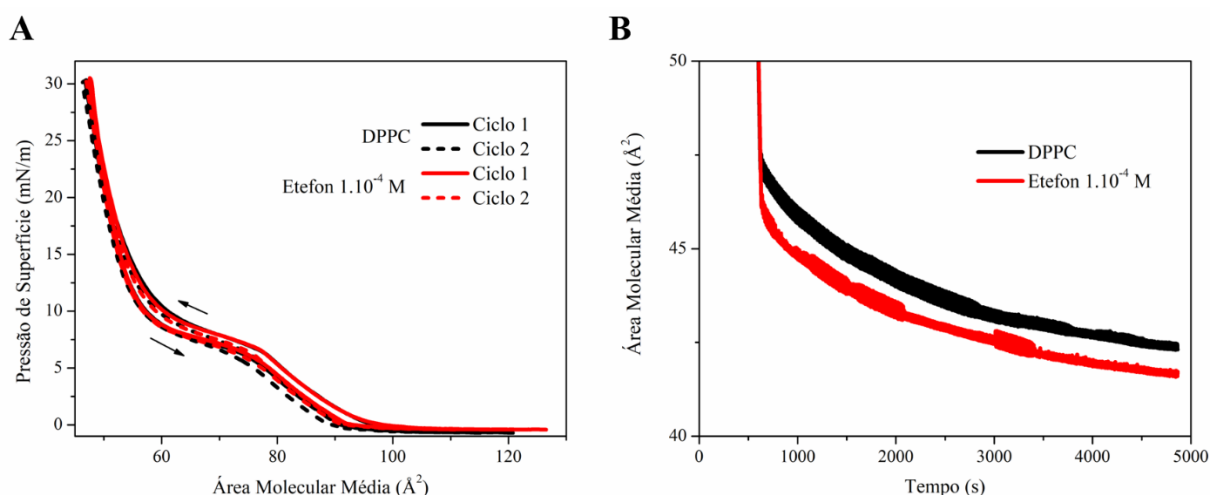
Monocamada	C_s^{-1} (mN/m)	Desvio padrão
DOPC	82,6	0,8
DOPC + Etefon 1.10^{-6} M	89,1	1,0
DOPC + Etefon 1.10^{-5} M	86,5	0,3
DOPC + Etefon 1.10^{-4} M	84,5	0,2

Os resultados observados para o DOPC em subfase aquosa são coerentes com o descrito na literatura (HĄC-WYDRO et al., 2007). Os valores obtidos para 30 mN/m encontram-se dentro da faixa líquido expandida, com $C_s^{-1} < 100$ mN/m (DAVIES; RIDEAL, 1963). O DOPC, assim com o POPC, apresenta menores valores de C_s^{-1} quando comparado ao DPPC por ser mais fluído e não apresentar as transições de fase de forma clara. Na presença de etefon, nas três concentrações de estudo, observa-se que a variação de valores de C_s^{-1} não sugere mudança de fase nas monocamadas, indicando que apesar dos deslocamentos observados nas isotermas π -A, não houve mudanças na fluidez da monocamada.

5.2.3. Estudo da histerese e estabilidade das monocamadas lipídicas

Ciclos de compressão-descompressão da monocamada de DPPC foram estudados na ausência e presença de etefon 1.10^{-4} M na subfase. Este estudo tem como objetivo observar se há formação de agregados estáveis durante o processo de compressão e descompressão. A formação desses agregados é o que caracteriza a presença da histerese. Na Figura 26A são apresentados dois ciclos de compressão-descompressão da monocamada de DPPC na ausência e presença de etefon. Os ciclos foram analisados até $\pi = 30$ mN/m.

Figura 26 – Ciclos de compressão-descompressão e curvas de estabilidade das monocamadas de DPPC na ausência e presença de etefon



A - ciclos de compressão-descompressão obtidos a 23 °C para as monocamadas de DPPC na subfase contendo água ultrapura (linha preta) e etefon 1.10^{-4} M (linha vermelha). B - curvas de estabilidade obtidas a 23 °C para monocamadas de DPPC na subfase contendo água ultrapura e etefon 1.10^{-4} M (linha vermelha).

As isotermas π -A de compressão da monocamada em água ultrapura são semelhantes às obtidas na Figura 17. As isotermas π -A obtidas na descompressão, quando ocorre a abertura das barreiras, são semelhantes às isotermas π -A de compressão e retornam a pressão nula ao final do ciclo. É possível observar uma pequena diminuição de área molecular média na descompressão em relação a compressão, porém não sugere que o filme forme agregados.

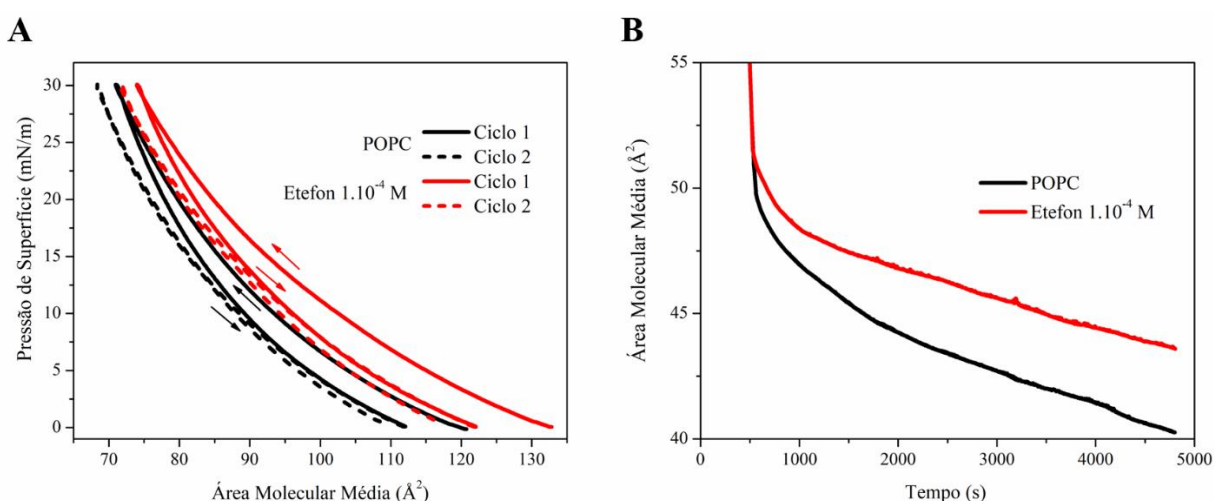
Resultados semelhantes foram obtidos por Xu e Zuo (2018) em um estudo com monocamadas de DPPC, onde também ocorre o deslocamento do ciclo de descompressão para menores áreas moleculares média. A compressão promove uma maior estabilidade para a monocamada que é perturbada pela descompressão. Como a descompressão ocorre sucessivamente a compressão e de forma rápida, as moléculas não conseguem se desvencilhar totalmente, gerando o deslocamento observado (PIRES et. al., 2022).

As isotermas π -A obtidas nos ciclos de compressão-descompressão da monocamada de DPPC na presença de etefon 1.10^{-4} M são semelhantes às obtidas na ausência do composto. Portanto, mesmo com as interações já descritas anteriormente entre o etefon e a monocamada de DPPC, não houve formação de agregados que levariam a monocamada a histerese. As monocamadas também foram utilizadas no estudo de estabilidade. Para isso, a monocamada foi comprimida até $\pi = 30$ mN/m e permaneceu nessa pressão por 4800 segundos na ausência e na presença de etefon 1.10^{-4} M (Figura 26B).

A monocamada de DPPC demonstrou-se estável com o passar do tempo, apresentando uma variação de área molecular de apenas 3 Å. O mesmo resultado foi observado para a estabilidade da monocamada na presença do etefon, que apresentou a mesma variação de área molecular observada para a monocamada na ausência do composto. Desse modo, é possível inferir que o etefon não induziu mudanças na estabilidade da monocamada.

A Figura 27 apresenta dois ciclos de compressão-descompressão e as curvas obtidas para as medidas de estabilidade da monocamada de POPC em subfase contendo água ultrapura e etefon 1.10^{-4} M. Para esse estudo, as monocamadas foram comprimidas até $\pi = 30$ mN/m e, somente para a análise da estabilidade, permaneceram nessa pressão por 4800 segundos.

Figura 27 – Ciclos de compressão-descompressão e curvas de estabilidade das monocamadas de POPC na ausência e presença de etefon



A - ciclos de compressão-descompressão obtidos a 23 °C para as monocamadas de POPC na subfase contendo água ultrapura (linha preta) e etefon 1.10^{-4} M (linha vermelha). B - curvas de estabilidade obtidas a 23 °C para monocamadas de POPC na subfase contendo água ultrapura e etefon 1.10^{-4} M (linha vermelha).

No primeiro ciclo (Figura 27A), as isotermas π -A de compressão obtidas para o fosfolípido POPC na ausência e presença de etefon são semelhantes às obtidas na Figura 20. Nota-se que dois ciclos de compressão-descompressão na ausência e presença de etefon são

semelhantes. No primeiro ciclo há histerese na ausência e presença de etefon na subfase. No segundo ciclo não é possível observar a histerese vista no primeiro e as isothermas π -A deslocam-se para menores áreas na ausência e presença do etefon. Porém, no caso do etefon, seja no primeiro ou no segundo ciclo, as isothermas π -A estão em maiores áreas moleculares em comparação com os ciclos sem etefon, como já foi observado na Figura 20.

Os fosfolipídios insaturados são sensíveis a reações de hidrólise, que é um processo natural sofrido pelo fosfolipídio e ocorre devido à quebra da ligação do grupo carbonila. Ao sofrer essa quebra, o POPC fornece os seguintes produtos: 1-Acil-Lyso-PC, 2-Acil-Lyso-PC, ácidos graxos livres e glicerofosforilcolina. A formação de Lyso-PC é uma das principais razões para a ocorrência de instabilidade química e física observadas para as monocamadas na histerese e nas bicamadas, uma vez que essa molécula possui propriedades detergentes e pode desestabilizar a mono e bicamada de POPC (GRIT et al., 1989).

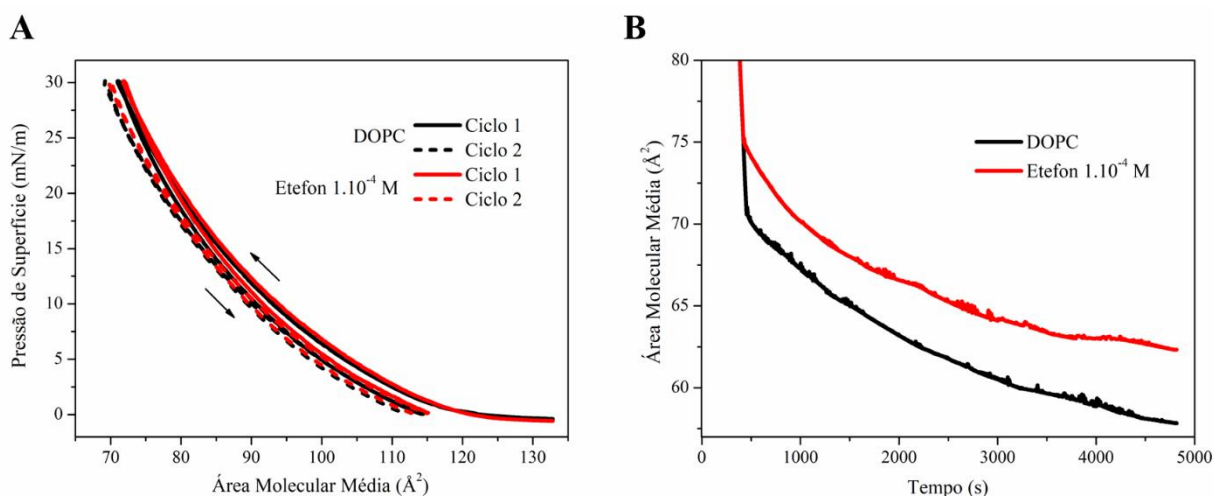
Além das reações de hidrólise, os fosfolipídios insaturados também sofrem um processo de oxidação natural. A oxidação das ligações duplas C=C em lipídios pode ser mediada por uma variedade de espécies reativas presentes na atmosfera, como oxigênio singlete, ozônio ou o radical OH (DIX; AIKENS, 1993; ELIASON; GILMAN; VAIDA, 2004). Após a reação dessas espécies reativas com as insaturações da cadeia, ocorre formação de aldeídos lipídicos truncados (BACELLAR; BATISTA, 2019). A possível ocorrência dos dois processos citados, hidrólise e oxidação, podem ser os responsáveis pela perda de área molecular média observada no segundo ciclo da histerese.

A monocamada de POPC em água ultrapura mostrou-se instável com o transcorrer do tempo (Figura 27B). Esse efeito também pode estar relacionado com as reações de hidrólise e oxidação que esse fosfolipídio pode fazer. Esse fato explica a instabilidade da monocamada de POPC no decorrer dos 4800 segundos do experimento.

A monocamada de POPC na presença de etefon apresentou o mesmo perfil observado para a monocamada em água ultrapura. O deslocamento observado nas isothermas π -A e nos ciclos de compressão-descompressão também foi observado na curva de estabilidade. Isso indica que o etefon, mesmo embebido entre as cabeças dos lipídios na interface ar/água, na pressão de 30 mN/m, não influencia nos processos de hidrólise e oxidação sofridos naturalmente pelo POPC.

A Figura 28 apresenta dois ciclos de compressão-descompressão e as curvas obtidas para as medidas de estabilidade da monocamada de DOPC em subfase contendo água ultrapura e etefon 1.10^{-4} M. Para esse estudo, as monocamadas foram comprimidas até $\pi = 30$ mN/m e, somente para a análise da estabilidade, permaneceram nessa pressão por 4800 segundos.

Figura 28 – Ciclos de compressão-descompressão das monocamadas de DOPC na ausência e presença de etefon



A - ciclos de compressão-descompressão obtidos a 23 °C para as monocamadas de DOPC na subfase contendo água ultrapura (linha preta) e etefon 1.10⁻⁴ M (linha vermelha). B - curvas de estabilidade obtidas a 23 °C para monocamadas de DOPC na subfase contendo água ultrapura e etefon 1.10⁻⁴ M (linha vermelha).

Para o primeiro ciclo (Figura 28A), as isothermas π -A de compressão obtidas para a monocamada de DOPC são semelhantes às apresentadas na Figura 23. As isothermas de descompressão (abertura das barreiras) são semelhantes às isothermas π -A de compressão, retornando a pressão nula ao final do ciclo. No segundo ciclo, o mesmo comportamento observado para o POPC ocorreu para o DOPC, apresentando deslocamento para menor área molecular média.

Na presença de etefon, observa-se que a isoterma π -A (Figura 28A) de compressão apresenta um pequeno deslocamento, quando comparado a isoterma π -A de compressão do DOPC em água ultrapura. A isoterma π -A de descompressão (abertura das barreiras) é semelhante à de compressão. No segundo ciclo, nota-se o mesmo comportamento observado para o DOPC em água ultrapura, as isothermas π -A de compressão e descompressão apresentam deslocamento para menor área molecular média.

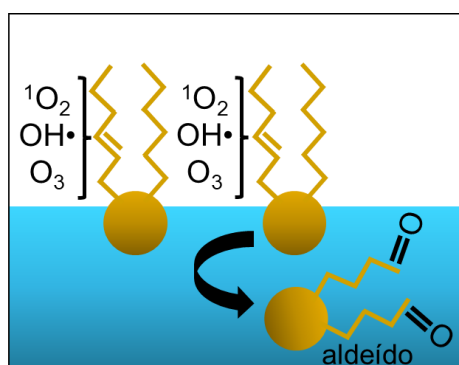
O DOPC é um fosfolípido que possui insaturações em sua cadeia alifática e, conseqüentemente, sofre os processos de oxidação e hidrólise já descritos anteriormente. Tal fato justifica a diminuição da área molecular média que ocorre no segundo ciclo para esse fosfolípido, independentemente da presença de etefon na subfase aquosa.

A curva de estabilidade da monocamada de DOPC em água ultrapura (Figura 28B) apresentou comportamento típico para o fosfolípido. Aqui também observamos a diminuição da área ocupada devido ao processo natural de oxidação e hidrólise do fosfolípido. Na presença de etefon a curva de estabilidade apresenta deslocamento semelhante ao observado na isoterma

π -A, mas não altera o perfil da curva, indicando que embora o etefon esteja presente na interface ar/água, não influencia nos processos naturais sofridos pelo DOPC.

Após a etapa inicial da reação de oxidação, que faz com que o estiramento do vinil CH desapareça, a decomposição posterior resulta na inserção de uma variedade de grupos polares que contêm oxigênio em sua composição. Por sua vez, estes compostos aumentam a solubilidade e restringem o movimento livre das cadeias alifáticas, formando ligações de hidrogênio com o meio circundante, nesse caso água (WONG-EKKABUT et al., 2007). Outro resultado da oxidação é a quebra das cadeias alifáticas, gerando aldeídos ou álcoois de cadeia curta mais solúveis em água (CATALÁ, 2006; PAZIN et al., 2021). Portanto, de forma geral para os fosfolipídios insaturados (POPC e DOPC neste caso), a quebra das cadeias alifáticas, formando produtos mais solúveis em água (Figura 29), pode ser a principal responsável pela diminuição da área observada no segundo ciclo de compressão-descompressão e curva de estabilidade, independentemente da presença de etefon na subfase aquosa.

Figura 29 - Esquema representativo da oxidação de fosfolipídio insaturado e formação de aldeído



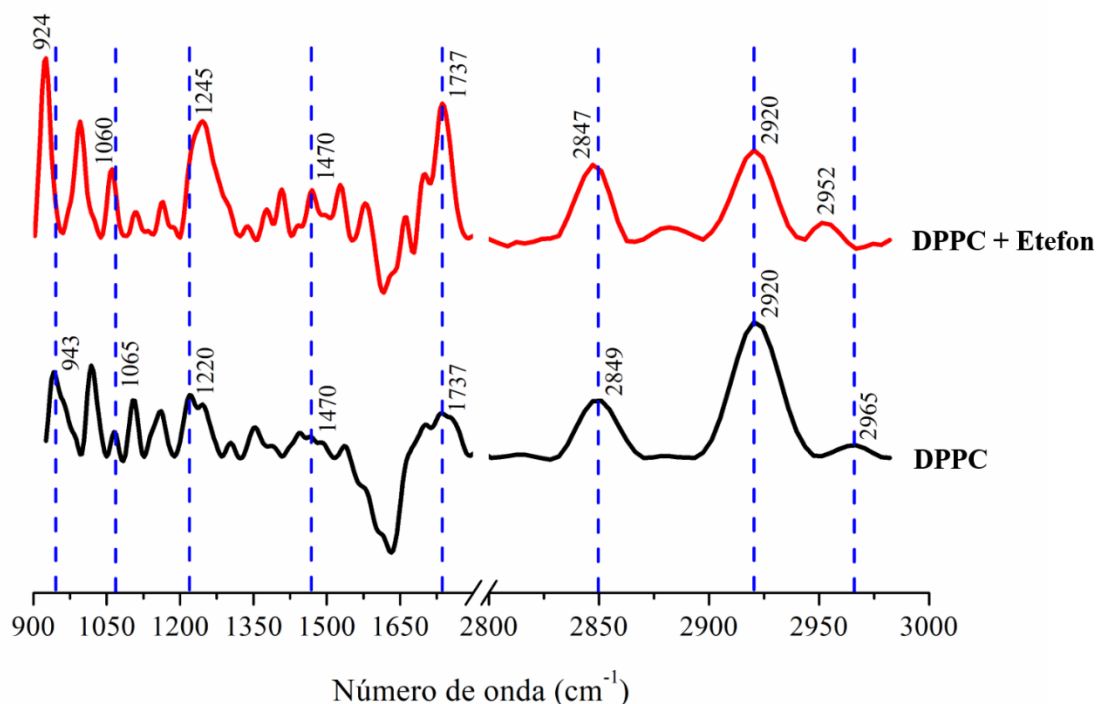
Fonte: Próprio autor

5.2.4. PM-IRRAS

Complementando os estudos das monocamadas e com o objetivo de compreender quais grupos presentes nos lipídios foram alterados na exposição ao etefon, foram obtidos espectros de PM-IRRAS para o DPPC, POPC e DOPC na ausência e na presença de etefon (1.10^{-4} M).

A Figura 30 apresenta os espectros de PM-IRRAS obtidos para as monocamadas de DPPC em água ultrapura e etefon 1.10^{-4} M, à 30 mN/m, no intervalo de 900 a 1800 cm^{-1} (cabeça) e no intervalo de 2800 a 2980 cm^{-1} (cauda), e os valores referentes aos modos vibracionais das bandas presentes no espectro (Tabela 7). O intervalo espectral corresponde às vibrações dos grupos presentes na cabeça polar do fosfolipídio.

Figura 30 – Espectros de PM-IRRAs do fosfolipídio DPPC na ausência e presença de etefon



Espectros de PM-IRRAS obtidos o fosfolipídio DPPC em água ultrapura (linha preta) e na presença de etefon 1.10^{-4} M (linha vermelha) a 30 mN/m.

Tabela 7 – Atribuições das principais bandas de vibração da cabeça do DPPC na ausência e presença de etefon na subfase

Grupo	DPPC (cm ⁻¹)	DPPC + Etefon (cm ⁻¹)
$\nu_{as}(\text{CN}^+\text{N})$	943	924
$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	1065	1060
$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$	1220	1245
$\delta(\text{CH}_2)$	1470	1470
$\nu(\text{C=O})$	1737	1737
$\nu_s(\text{CH}_2)$	2849	2847
$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	2920	2920
$\nu_{as}(\text{CH}_3)$	2965	2952

ν_{as} – estiramento antissimétrico, ν_s – estiramento simétrico, δ – deformação angular, ν – estiramento.

O espectro de PM-IRRAS da monocamada de DPPC na subfase contendo água ultrapura apresenta as bandas características para o fosfolipídio, estando de acordo com a literatura (AOKI et al., 2016; PEREIRA et al., 2018; MORATO et al., 2021). Nota-se a presença do estiramento antissimétrico do grupo colina ($\nu_{as}(\text{CN}^+\text{N})$), os estiramentos simétrico e antissimétrico do grupo fosfato ($\nu_s(\text{PO}_2^-)$ e $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$), a deformação angular do grupo CH_2 ($\delta(\text{CH}_2)$), o estiramento simétrico do grupo carbonila ($\nu(\text{C=O})$), os estiramentos simétrico e

antissimétrico do grupo CH_2 ($\nu_s(\text{CH}_2)$ e $\nu_{as}(\text{CH}_2)$) e o estiramento antissimétrico do grupo CH_3 ($\nu_{as}(\text{CH}_3)$).

Para a região da cabeça do fosfolipídio, na presença de etefon houve deslocamento do estiramento antissimétrico do grupo colina ($\nu_{as}(\text{CN}^+\text{N})$) de 943 para 924 cm^{-1} . Portanto, mesmo não observando mudanças nas isotermas π -A, o deslocamento é consistente com a ocorrência de uma interação atrativa entre o grupo catiônico do DPPC, colina, e o etefon desprotonado. Morato e colaboradores (2021) obtiveram resultados semelhantes ao exporem monocamadas de DPPC ao inseticida organofosforado acefato, indicando que esse pode ser um comportamento comum dos organofosforados a interação com o grupo hidratado colina.

O estiramento simétrico do grupo fosfato ($\nu_s(\text{PO}_2^-)$), na presença do etefon, deslocou de 1065 para 1060 cm^{-1} . Já o estiramento assimétrico do grupo fosfato deslocou de 1220 para 1245 cm^{-1} . Essas mudanças nas bandas de fosfato indicam que a interação entre as moléculas de etefon e DPPC podem ter afetado a ligação de hidrogênio do grupo fosfato com as moléculas de água na vizinhança. Já é reportado na literatura que os grupos fosfato têm se mostrado passíveis de realizar ligações de hidrogênio com moléculas de água (ARRONDO; GONI; MACARULLA, 1984).

O espectro de PM-IRRAS de DPPC na presença de etefon não apresentou alteração nas bandas dos grupos CH_2 (1470 cm^{-1}) e carbonila (1737 cm^{-1}). A ausência de alterações nesses grupos reforça as hipóteses de interação do etefon com a colina e fosfato, presentes na cabeça do fosfolipídio.

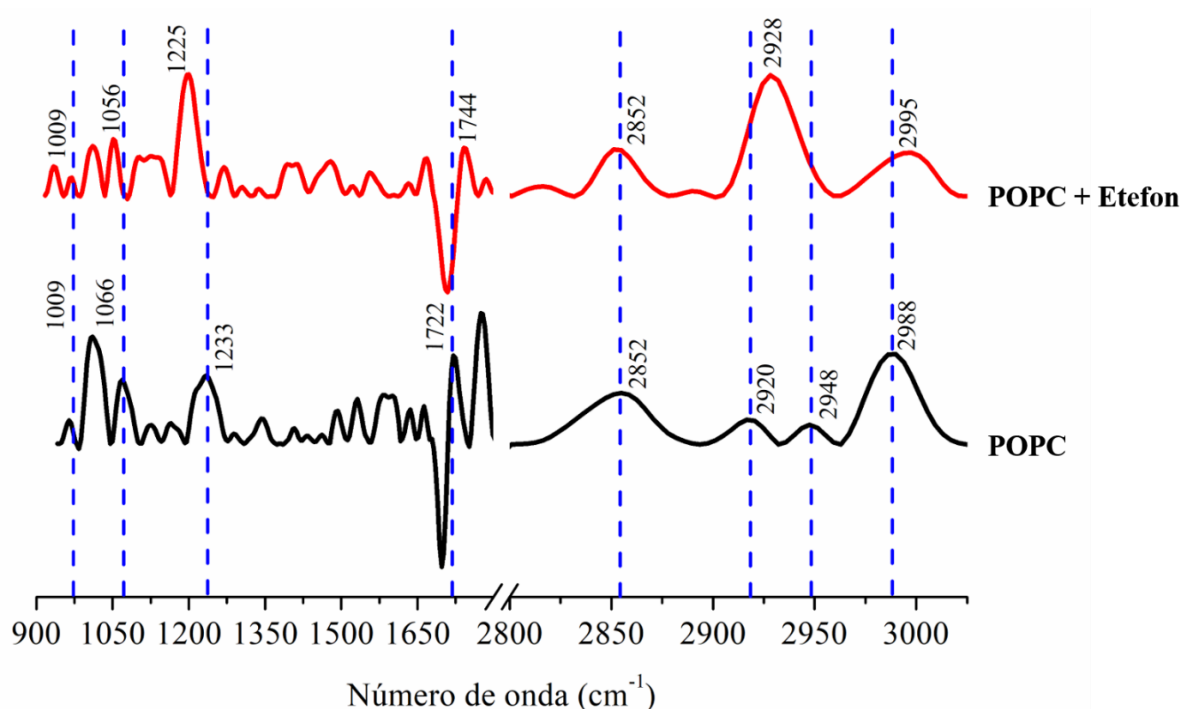
Já para a região da cauda do fosfolipídio, na presença de etefon na subfase, não houve deslocamento significativo da banda do estiramento antissimétrico do grupo CH_2 (2920 cm^{-1}) e nota-se o deslocamento de apenas 2 cm^{-1} da banda do estiramento simétrico do grupo CH_2 (2849 para 2847 cm^{-1}). Embora não se observe deslocamentos na banda do estiramento antissimétrico e para o estiramento simétrico o deslocamento seja muito pequeno, a intensidade relativa entre eles ($\nu_s(\text{CH}_2)/\nu_{as}(\text{CH}_2)$) aumentou de 0,42 para 0,86 na presença de 1.10^{-4} M de etefon na subfase.

Na literatura já é reportado que o aumento da intensidade relativa se deve a uma desestruturação nas cadeias da monocamada (LEVIN et al., 1985). Esta desestruturação da monocamada afeta o grupo CH_3 , levando a um deslocamento de 13 cm^{-1} (2965 para 2952 cm^{-1}) (DICKO, BOURQUE; PÉZOLET, 1998; SILVA et al., 2018). Esses resultados demonstram que, embora, as moléculas de etefon não penetrem na região hidrofóbica do fosfolipídio, as interações com os grupos presentes na cabeça perturbam a organização da monocamada. Essa

perturbação pode estar presente na bicamada e pode ser a responsável pelos efeitos observados nas GUVs.

A Figura 31 apresenta os espectros de PM-IRRAS obtidos para as monocamadas de POPC em água ultrapura e etefon 1.10^{-4} M, à 30 mN/m, no intervalo de 900 a 1800 cm^{-1} (cabeça) e no intervalo de 2800 a 3000 cm^{-1} (cauda), e os valores referentes aos modos vibracionais das bandas presentes no espectro (Tabela 8). O intervalo espectral corresponde às vibrações dos grupos presentes na cabeça polar do fosfolipídio.

Figura 31 - Espectros de PM-IRRAs do fosfolipídio POPC na ausência e presença de etefon



Espectros de PM-IRRAS obtidos o fosfolipídio POPC em água ultrapura (linha preta) e na presença de etefon 1.10^{-4} M (linha vermelha) a 30 mN/m.

Tabela 8 – Atribuições das principais bandas de vibração da cabeça do POPC na ausência e presença de etefon na subfase

Grupo	POPC (cm^{-1})	POPC + Etefon (cm^{-1})
$\nu_{\text{as}}(\text{CN}^+\text{N})$	1009	1009
$\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$	1066	1056
$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$	1233	1255
$\nu(\text{C=O})$	1722	1744
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	2852	2852
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	2920	2928
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$	2948	-
$\nu(\text{HC=CH})$	2988	2995

ν_{as} – estiramento antissimétrico, ν_{s} – estiramento simétrico, δ – deformação angular, ν – estiramento.

Para a região da cabeça do fosfolipídio, na presença de etefon não houve deslocamento do estiramento antissimétrico do grupo colina ($\nu_{as}(CN^+N)$). A banda do estiramento antissimétrico do grupo fosfato ($\nu_{as}(PO_2^-)$) deslocou de 1233 cm^{-1} para 1255 cm^{-1} . Já a banda do estiramento simétrico do grupo fosfato ($\nu_s(PO_2^-)$) deslocou de 1066 cm^{-1} para 1056 cm^{-1} . Na literatura é reportado que o deslocamento da banda do grupo P=O para menores números de onda, é consequência do aumento da hidratação desse grupo (FRINGELI; GÜNTARD, 1981).

A banda relativa ao estiramento do grupo carbonila ($\nu(C=O)$) do POPC está localizada em 1722 cm^{-1} . A posição dessa banda, assim como do grupo fosfato, está relacionada a hidratação da região polar do lipídio, além da polaridade do meio. A localização dessa banda em menores números de onda, quando comparado ao DPPC, confirma uma maior fluidez para a monocamada de POPC (HUO et al., 1999). Após a exposição ao etefon, houve um deslocamento para 1744 cm^{-1} da banda do estiramento do grupo carbonila ($\nu(C=O)$). Esse deslocamento pode estar relacionado as alterações na solvatação do grupo carbonila (SCHMIDT et al., 2015).

Os resultados observados para os deslocamentos das bandas do estiramento antissimétrico do grupo fosfato ($\nu_{as}(PO_2^-)$) e das bandas do estiramento do grupo carbonila ($\nu(C=O)$) estão intrinsecamente ligados a hidratação da região polar do lipídio. Esses resultados sugerem que o POPC pode ter passado pelo processo natural de hidrólise já citado anteriormente, devido aos grupos atingidos.

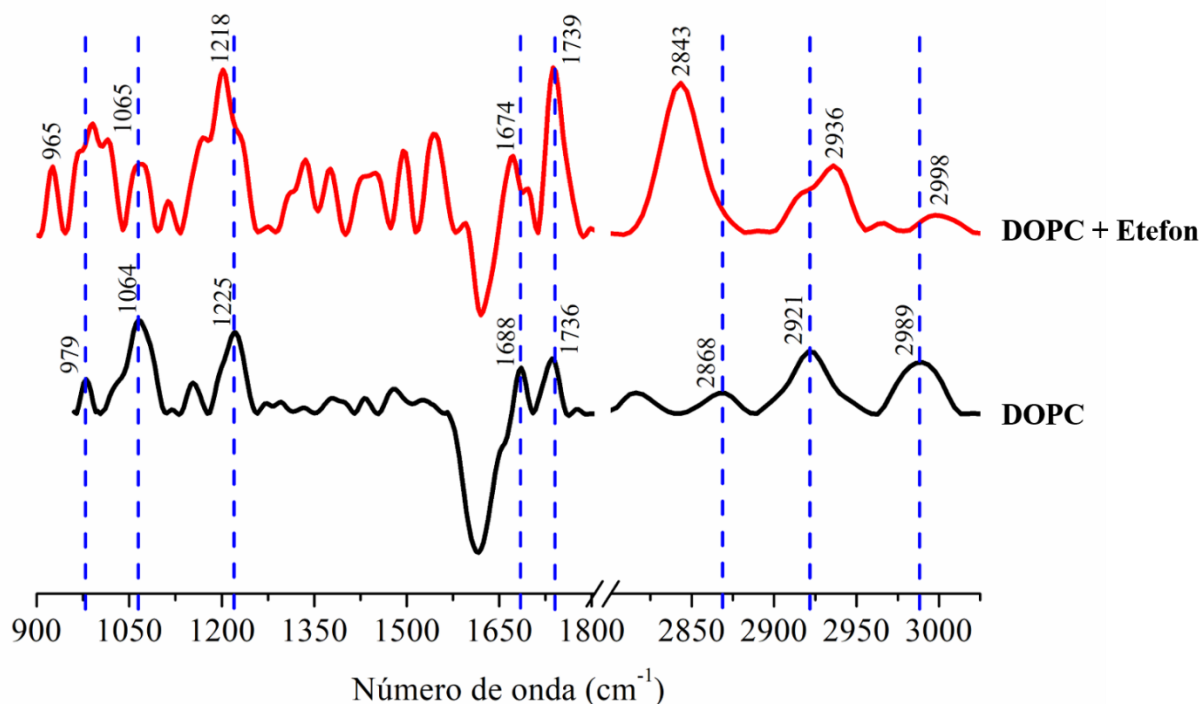
Para a região da cauda do fosfolipídio, na presença de etefon na subfase, não houve deslocamento da banda do estiramento simétrico do grupo CH_2 (2852 cm^{-1}). Para a banda de estiramento antissimétrico do grupo CH_2 ($\nu_{as}(CH_2)$) nota-se um deslocamento de 8 cm^{-1} (2920 para 2928 cm^{-1}). A intensidade relativa entre os estiramentos citados aumentou de 0,48 para 2,19. Além disso a banda referente ao estiramento do grupo CH_3 ($\nu_{as}(CH_3)$) não é vista na presença do etefon e o estiramento $\nu(HC=CH)$ deslocou de 2988 cm^{-1} para 2995 cm^{-1} .

Conforme já discutido para o DPPC, o aumento da intensidade relativa gera uma desestruturação nas cadeias da monocamada que pode ter afetado o grupo CH_3 e levado ao desaparecimento de sua banda na presença do etefon. Esses resultados podem indicar que o etefon não permanece apenas na subfase, mas também interage com a região da cauda do fosfolipídio.

A Figura 32 apresenta os espectros de PM-IRRAS obtidos para as monocamadas de DOPC em água ultrapura e etefon 1.10^{-4} M , à 30 mN/m , no intervalo de 900 a 1800 cm^{-1} (cabeça) e no intervalo de 2800 a 3000 cm^{-1} (cauda), e os valores referentes aos modos

vibracionais das bandas presentes no espectro (Tabela 9). O intervalo espectral corresponde às vibrações dos grupos presentes na cabeça polar do fosfolípido.

Figura 32 - Espectros de PM-IRRAs do fosfolípido DOPC na ausência e presença de etefon



Espectros de PM-IRRAS obtidos o fosfolípido POPC em água ultrapura (linha preta) e na presença de etefon 1.10^{-4} M (linha vermelha) a 30 mN/m.

Tabela 9 – Atribuições das principais bandas de vibração da cabeça do DOPC na ausência e presença de etefon na subfase

Grupo	DOPC (cm^{-1})	DOPC + Etefon (cm^{-1})
$\nu_{\text{as}}(\text{CN}^+\text{N})$	979	965
$\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$	1064	1065
$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$	1225	1218
$\nu(\text{C=O})$	1688	1674
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	2868	2843
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	2921	2936
$\nu(\text{HC=CH})$	2989	2998

ν_{as} – estiramento antissimétrico, ν_{s} – estiramento simétrico, δ – deformação angular, ν - estiramento.

As bandas da região da cabeça do DOPC na presença de etefon foram ligeiramente alteradas. Os estiramentos simétrico $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$ e antissimétrico $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ do grupo fosfato deslocaram de 1064 cm^{-1} e 1225 cm^{-1} para 1065 cm^{-1} e 1218 cm^{-1} , respectivamente. Conforme já discutido para o POPC, o deslocamento da banda do grupo P=O para menores números de

onda infere uma maior hidratação desse grupo. Outro grupo que está ligado a hidratação e também apresentou deslocamento foi o grupo carbonila $\nu(\text{C=O})$ que passou de 1688 cm^{-1} para 1674 cm^{-1} . Esses resultados sugerem que o DOPC também possa ter sofrido processo de hidrólise.

Para a região da cauda, a inserção de etefon na subfase gerou efeitos em todas as bandas observadas. Os estiramentos simétrico $\nu_s(\text{CH}_2)$ e antissimétrico $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ referentes ao grupo CH_2 deslocaram de 2868 cm^{-1} e 2921 cm^{-1} para 2843 cm^{-1} e 2936 cm^{-1} . A banda do estiramento do grupo $\nu(\text{HC=CH})$ também apresentou um deslocamento de 9 cm^{-1} . Esses deslocamentos sugerem que o etefon, assim como para o DPPC e o POPC, esteja causando uma desordem nas cadeias do DOPC. Além disso, o etefon talvez não esteja permanecendo apenas na subfase, mas interagindo com a região da cauda do fosfolipídio também. Esses resultados corroboram com os que foram observado nas isotermas π -A, onde os deslocamentos na presença do etefon foram mantidos até o colapso.

6. CONCLUSÃO

Em geral, pode-se concluir que a exposição oral de ratos machos ao etefon causou toxicidade leve sobre a saúde geral dos animais, evidenciada pelas alterações nos consumos de água e ração. A análise histopatológica do testículo e epidídimo revelou alterações focais e interindividuais nos grupos expostos ao etefon. As alterações observadas corroboram a diminuição da quantidade de espermatozoides na contagem no testículo. Na avaliação espermática notou-se uma redução no número de espermatozoides com motilidade progressiva e um aumento na motilidade não progressiva. Também foi observado um aumento de espermatozoides com morfologia, membrana plasmática e membrana acrossomal comprometidas. Sendo assim, a exposição oral dos ratos machos ao etefon levou a mudanças estruturais e funcionais nos espermatozoides, indicando uma redução na quantidade e qualidade dos mesmos, com possíveis implicações na fertilidade.

As GUVs de DPPC foram as que apresentaram menor interação com o etefon e, conseqüentemente, menor número de efeitos morfológicos foram observados. Já as GUVs de POPC foram as que apresentaram maiores efeitos morfológicos (perda de contraste de fase, formato pera e *buds*), com danos a estrutura da bicamada. Além disso, também observamos o rompimento de vesículas com apenas 5 minutos de exposição ao etefon. O POPC é um fosfolípido sensível a reações de hidrólise e oxidação, que ocasionam a quebra dessa molécula em moléculas menores. Porém, em comparação com o grupo controle e ainda considerando as possíveis reações de hidrólise e oxidação, pode-se afirmar que a exposição ao etefon é responsável pelas alterações morfológicas e rompimento das vesículas de POPC. O DOPC também apresentou os mesmos efeitos morfológicos observados nas GUVs de POPC expostas ao etefon, porém em menor número (9,7%) quando comparado ao POPC (58%).

Para compreender as interações em nível molecular observadas nas bicamadas, foram estudadas monocamadas de DPPC, POPC e DOPC. Os filmes de Langmuir mostraram que o etefon interage com as monocamadas dos três fosfolípidios investigados. O maior efeito nas monocamadas foi observado para o fosfolípido DOPC, pois o etefon se manteve na interface ar/água até o colapso, provocando deslocamentos para maiores áreas nas isotermas π -A. As monocamadas de POPC também foram deslocadas para maiores áreas na presença de etefon na subfase, mas o composto não se manteve até a pressão de colapso, sendo expulso da interface ar/água quando a isoterma π -A alcança pressões acima de 30 mN/m. Já a interação com o fosfolípido DPPC ocorreu de forma eletrostática com os grupos presentes na cabeça polar (colina e fosfato). Porém, a interação não permitiu que o etefon ocupasse uma área na interface ar/água e, por esse motivo, não foram observados deslocamentos das isotermas π -A. No estudo

de estabilidade das monocamadas, conclui-se que o etefon não interfere no processo oxidação e hidrólise que é sofrido naturalmente pelos fosfolipídios POPC e DOPC, nem na estabilidade do DPPC.

A análise das monocamadas por PM-IRRAS confirmou a interação eletrostática do DPPC com o etefon através do deslocamento observado para o grupo colina ($\nu_{as}(CN^+N)$). Apesar de não se observarem muitos efeitos nas bicamadas e deslocamentos nas monocamadas de DPPC, o etefon gera uma desestruturação das cadeias, evidenciado pelo aumento da intensidade relativa entre os estiramentos simétrico e antissimétrico do grupo CH_2 . Para o POPC, a análise de PM-IRRAS fortaleceu a hipótese de que os danos morfológicos nas bicamadas sejam devidos às reações de hidrólise sofridas pelo fosfolipídio na interação com o etefon, pois houve deslocamento das bandas do grupo fosfato e das bandas do grupo carbonila, que são grupos que estão intrinsecamente ligados a hidratação da região polar do lipídio. A região da cauda também sofreu uma desestruturação pela exposição ao etefon. O DOPC também apresentou deslocamentos dos grupos responsáveis pela hidratação da região polar do fosfolipídio e as cadeias também apresentaram uma desestruturação devido a exposição ao etefon em ambos os casos.

Diante disso, pode-se concluir que o etefon pode gerar danos à saúde geral, saúde reprodutiva e a membrana celular. Tais resultados evidenciam a importância de estudos que avaliem a toxicidade geral e reprodutiva de agrotóxicos, principalmente do etefon que apresenta poucos estudos. Estudos que identifiquem os níveis de exposição real no local de trabalho, especialmente de homens que são a maioria dos trabalhadores nas lavouras, também são de extrema importância. Além disso, estudos primários envolvendo apenas as interações moleculares, como foi realizado nesta tese com os sistemas miméticos, também são de fundamental importância para compreender o mecanismo de ação dos agrotóxicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD ELDAIM, M. A. et al. Ameliorative effects of *Saussurea lappa* root aqueous extract against Ethephon-induced reproductive toxicity in male rats. **Environmental toxicology**, 2018.

ANDREEVA, T. D. et al. Effects of Ca^{2+} , Glu and GABA on hBest1 and composite hBest1/POPC surface films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 161, p. 192-199, 2018.

AOKI, P. H. B. et al. Molecular-level modifications induced by photo-oxidation of lipid monolayers interacting with erythrosin. **Langmuir**, v. 32, n. 15, p. 3766-3773, 2016.

ARRONDO, J. L. R.; GONI, F. M.; MACARULLA, J. M. Infrared spectroscopy of phosphatidylcholines in aqueous suspension a study of the phosphate group vibrations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 794, n. 1, p. 165-168, 1984.

AUGER, J. et al. Intra-and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. **Human Reproduction**, v. 15, n. 11, p. 2360-2368, 2000.

AYEE, M. A. A; ROTH, C. W.; AKPA, B. S. Structural perturbation of a dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayer by warfarin and its bolaamphiphilic analogue: A molecular dynamics study. **Journal of colloid and interface science**, v. 468, p. 227-237, 2016.

BACELLAR, I. O. L.; BAPTISTA, M. S. Mechanisms of photosensitized lipid oxidation and membrane permeabilization. **Acs Omega**, v. 4, n. 26, p. 21636-21646, 2019.

BAYER. **Bula Ethrel 720**. Disponível em: < <https://www.agro.bayer.com.br/d/regulador-de-crescimento-bcs-ethrel-720-br>>. Acesso em set. 2023.

BLAUDEZ, D. et al. Polarization-modulated FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air/water interface. **Applied spectroscopy**, v. 47, n. 7, p. 869-874, 1993.

CANTOR, R. S. Lateral pressures in cell membranes: a mechanism for modulation of protein function. **The journal of physical chemistry B**, v. 101, n. 10, p. 1723-1725, 1997.

CATALÁ, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 38, n. 9, p. 1482-1495, 2006.

CHRISTIAN, M. S. **Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology**. In: Hayes, W. Method of toxicology. Philadelphia: Taylor & Francis, p. 1301-1381, 2001.

COLLIER, C. P. Bilayer membrane interactions with nanofabricated scaffolds. **Chemistry and physics of lipids**, v. 192, p. 75-86, 2015.

CREASY, D. M. Pathogenesis of male reproductive toxicity. **Toxicologic pathology**, v. 29, n. 1, p. 64-76, 2001.

DAVIES, J.T.; RIDEAL, E.K. **Interfacial Phenomena**. New York, Academic Press, 1963.

DICKO, A.; BOURQUE, H.; PÉZOLET, M. Study by infrared spectroscopy of the conformation of dipalmitoylphosphatidylglycerol monolayers at the air–water interface and transferred on solid substrates. **Chemistry and physics of lipids**, v. 96, n. 1-2, p. 125-139, 1998.

DIMOVA, R. Giant vesicles and their use in assays for assessing membrane phase state, curvature, mechanics, and electrical properties. **Annual review of biophysics**, v. 48, p. 93-119, 2019.

DOMENICONI, R. F. et al. Immunolocalization of aquaporins 1, 2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog. **Cell and tissue research**, v. 332, p. 329-335, 2008.

EL-TAWIL, M. F. Toxicological effects of short-term feeding with chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl insecticides on adult albino rats. **Middle East J Agric Res**, v. 3, n. 2, p. 208-220, 2014.

FATMA F. et al. Phytotoxicity of pesticides mancozeb and chlorpyrifos: correlation with the antioxidative defence system in *Allium cepa*. *Physiol Mol Biol Plants*, v. 24, n.1, p. 115-123, 2017.

FERNANDES, G. S. A. et al. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 106-112, 2007.

FERRUCCI, D. et al. Desquamation takes center stage at the origin of proliferative inflammatory atrophy, epithelial–mesenchymal transition, and stromal growth in benign prostate hyperplasia. **Cell Biology International**, v. 41, n. 11, p. 1265-1270, 2017.

FILLER, R. Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology. In: Chapin, R.E., Heindel, J.H. (Eds), **Male reproductive toxicology**, p. 334-343, 1993.

FRINGELI, U. P.; GÜNTARD, H. H. Infrared membrane spectroscopy. **Membrane spectroscopy**, p. 270-332, 1981.

GARBETTA, A. et al. Dose-dependent lipid peroxidation induction on ex vivo intestine tracts exposed to chyme samples from fumonisins contaminated corn samples. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 5, p. 1140-1145, 2015.

GARRETT, C. et al. Selectivity of the human sperm-zona pellucida binding process to sperm head morphometry. **Fertility and sterility**, v. 67, n. 2, p. 362-371, 1997.

GERSHFELD, N. L. Physical chemistry of lipid films at fluid interfaces. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 27, n. 1, pp. 349-368, 1976.

GILDEN, R. C.; HUFFLING, K.; SATTLE, B. Pesticides and health risks. **Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing**, v. 39, n. 1, p. 103-110, 2010.

GRIT, M. et al. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. **International journal of pharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 1-6, 1989.

GULAYA, N. M. et al. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. **Archives of andrology**, v. 46, n. 3, p. 169-175, 2001.

HAÇ-WYDRO, K. et al. The study on the interaction between phytosterols and phospholipids in model membranes. **Chemistry and physics of lipids**, v. 150, n. 1, p. 22-34, 2007.

HASSAN, S. et al. Silane based novel crosslinked chitosan/poly (vinyl alcohol) membrane: structure, characteristic and adsorption behaviour. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 26, n. 1, p. 208-218, 2016.

HE, X. et al. Experimental and simulation studies of polyarginines across the membrane of giant unilamellar vesicles. **RSC Advances**, v. 6, n. 36, p. 30454-30459, 2016.

HUO, Q. et al. Polarization-modulated infrared reflection absorption spectroscopic studies of a hydrogen-bonding network at the air– water interface. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 15, p. 2929-2934, 1999.

INGRAM, L. O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. **Journal of bacteriology**, v. 125, n. 2, pp. 670–678, 1976.

JAHANGIRFARD, Ramin et al. Ethephon causes reproductive malfunction in adult male mice: Histological and biochemical evidence. In: **Veterinary Research Forum**. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, 2021. p. 333.

JANMEY, P. A.; KINNUNEN, P. K. J. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. **Trends in cell biology**, v. 16, n. 10, p. 538-546, 2006.

JING, B. et al. Interaction of ionic liquids with a lipid bilayer: a biophysical study of ionic liquid cytotoxicity. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 10, p. 2781-2789, 2016.

KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene**, v. 14, n. 6, p. 629-640, 1997.

KEMPINAS, W. G.; KLINEFELTER, G. R. Interpreting histopathology in the epididymis. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 2, p. e979114, 2014.

KHAN, S. et al. Fipronil induced spermatotoxicity is associated with oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male rats. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 124, p. 8-14, 2015.

KING, A. Technology: The Future of Agriculture. **Nature**, v. 544, n. 1, p. 21-23, 2017.

LEVIN, I. W. et al. Two types of hydrocarbon chain interdigitation in sphingomyelin bilayers. **Biochemistry**, v. 24, n. 22, p. 6282-6286, 1985.

LIMA, A. F.; SILVA, E. G. A.; IWATA, B. F. Agriculturas e agricultura familiar no Brasil: uma revisão da literatura. **Revista Retratos de Assentamentos**, v. 22, n. 1, p. 50-68, 2019.

MARONI, M.; FANETTI, A. C.; METRUCCIO, F. Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture. **La Medicina del lavoro**, v. 97, n. 2, p. 430-437, 2006.

MARSH, D. Lateral pressure in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1286, n. 3, p. 183-223, 1996.

MENKVELD, R. et al. Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro. **Fertility and sterility**, v. 65, n. 3, p. 637-644, 1996.

MORATO, L. F. C. et al. Effects of insecticide acephate on membrane mimetic systems: The role played by electrostatic interactions with lipid polar headgroups. **Journal of Molecular Liquids**, v. 332, p. 115868, 2021.

MOURA, R. M. Humanos versus natureza: a origem das questões fitossanitárias que levaram ao uso dos agrotóxicos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 15, n. 2, p. 23-36, 2018

NAGARAJAN, S. et al. Dynamics of the gel to fluid phase transformation in unilamellar DPPC vesicles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 46, p. 13749-13756, 2012.

NAKAHARA, H.; LEE, S.; SHIBATA, O. Specific interaction restrains structural transitions of an amphiphilic peptide in pulmonary surfactant model systems: An in situ PM-IRRAS investigation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1798, n. 6, p. 1263-1271, 2010.

ORTIZ-COLLAZOS, Stephanie et al. Langmuir films and mechanical properties of polyethyleneglycol fatty acid esters at the air-water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 498, p. 50-57, 2016.

PALOMO, M. J. et al. The influence of sperm concentration, length of the gamete co-culture and the evolution of different sperm parameters on the in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes. **Zygote**, v. 18, n. 4, p. 345, 2010.

PAZIN, W. M. et al. The protective effect of Artepillin C against lipid oxidation on model membranes. **Journal of Molecular Liquids**, v. 324, p. 115089, 2021.

PEREIRA, L. S. A. et al. Evidence of photoinduced lipid hydroperoxidation in Langmuir monolayers containing Eosin Y. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 682-689, 2018.

PEROBELLI, J. E. et al. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. **Reproductive toxicology**, v. 33, n. 3, p. 308-315, 2012.

PIGNATI, W.; OLIVEIRA, N. P.; SILVA, A. M. C. Vigilância aos agrotóxicos: quantificação do uso e previsão de impactos na saúde-trabalho-ambiente para os municípios brasileiros. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, p. 4669-4678, 2014.

PIRES, G. H. C. R. et al. Sakuranetin interacting with cell membranes models: Surface chemistry combined with molecular simulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 216, p. 112-546, 2022.

POPE, E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A Simple Staining Method for Evaluating Acrosomal Status of Cat Spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.22, n.1, p.87-95, 1991.

ROBB, G. W.; AMMAN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 103-107, 1978.

ROMANTSOV, T.; GUAN, Z.; WOOD, J. M. Cardio-lipin and the osmotic stress responses of bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, n. 10, p. 2092–2100, 2009.

ROTEM, R. et al. Ca (2+)-independent induction of acrosome reaction by protein kinase C in human sperm. **Endocrinology**, v. 131, n. 5, p. 2235-2243, 1992.

RUIZ, G. C. M. et al. Biomimetic collagen/phospholipid coatings improve formation of hydroxyapatite nanoparticles on titanium. **Materials Science and Engineering: C**, v. 77, p. 102-110, 2017.

RUIZ, G. C. M. et al. Chemical and morphological effects of the contraceptive hormone 17 α -ethynylestradiol on fluid lipid membranes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 204, p. 111794, 2021.

RUSSELL, L. D. et al. Histological and histopathological evaluation of the testis. **International Journal of Andrology**, v. 16, p.83, 1993.

SAALFELD, G. Q. et al. Low atrazine dosages reduce sperm quality of Calomys laucha mice. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 2924-2931, 2018.

SCHMIDT, T. F. et al. Binding of methylene blue onto Langmuir monolayers representing cell membranes may explain its efficiency as photosensitizer in photodynamic therapy. **Langmuir**, v. 31, n. 14, p. 4205-4212, 2015.

SEED, J. et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. **Reproductive Toxicology**, v. 10, p. 237-244, 1996.

SENNATO, S. et al. Evidence of domain formation in cardiolipin– glycerophospholipid mixed monolayers. A thermodynamic and AFM study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 33, p. 15950-15957, 2005.

SILVA, R. L. C. G. et al. How the interaction of PVP-stabilized Ag nanoparticles with models of cellular membranes at the air-water interface is modulated by the monolayer composition. **Journal of colloid and interface science**, v. 512, p. 792-800, 2018.

STUNGES, G. M. et al. Interaction between 17 α -ethynylestradiol hormone with Langmuir monolayers: the role of charged headgroups. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 627-633, 2017.

substances. [S.l.]: [s.n.], 1995.

SYAFRUDIN, M. et al. Pesticides in drinking water—a review. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 2, p. 468, 2021.

TAVEIRA, B. L. S.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Análise das notificações de intoxicações agudas, por agrotóxicos, em 38 municípios do estado do Paraná. **Saúde em Debate**, v. 42, p. 211-222, 2018.

TEIXEIRA, G. R. et al. The expression of aquaporins 1 and 9 in adult rat epididymis is perturbed by chronic exposure to ethanol. **Tissue and Cell**, v. 44, n. 1, p. 47-53, 2012.

USEPA. **Reregistration eligibility decision ethephon, prevention, pesticides and toxic**

VIEIRA, A. N.; ROCHA, A. S. B.; RIBEIRO, M. G. L. A importância do modelo de monocamada lipídica da membrana plasmática de archaea para o ensino de biologia celular no brasil. **Góndola, Enseñanza y Aprendizaje de las Ciencias**, v. 17, n. 1, p. 74-89, 2022.

VOLLHARDT, D.; FAINERMAN, V. B. Progress in characterization of Langmuir monolayers by consideration of compressibility. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 127, n. 2, p. 83-97, 2006.

WEINBERGER, Andreas et al. Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles. **Biophysical journal**, v. 105, n. 1, p. 154-164, 2013.

WONG, W. Y. et al. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. **Fertility and sterility**, v. 73, n. 3, p. 435-442, 2000.

WONG-EKKABUT, J. et al. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. **Biophysical journal**, v. 93, n. 12, p. 4225-4236, 2007.

XU, L.; ZUO, Y. Y. Reversible phase transitions in the phospholipid monolayer. **Langmuir**, v. 34, n. 29, p. 8694-8700, 2018.

YAYANOS, A. A.; DIETZ, A. S.; VAN BOXTEL, R. Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. **Science**. v. 205, n. 4408, pp. 808–810, 1979.

YU, Y. et al. Vesicle budding induced by a pore-forming peptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 1, p. 195-201, 2010.

ZHU, C. et al. Point-to-Plane Nonhomogeneous Electric-Field-Induced Simultaneous Formation of Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) and Lipid Tubes. **Chemistry—A European Journal**, v. 22, n. 9, p. 2906-2909, 2016.

ANEXO - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO CEUA

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ETEFON SOBRE A SAÚDE GERAL E REPRODUTIVA DE RATOS MACHOS", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 5533 e tendo como participante(s) ANGELICA CAROLINE LIMA (discente), NAIARA MARIA PAVANI (discente), JAQUELINE NASCIMENTO DA SILVA (docente), ANA PAULA ALVES FAVARETO (orientador responsável), foi avaliado e APR. COM RECOMENDAÇÃO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

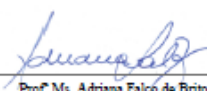
Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APR. COM RECOMENDAÇÃO em reunião realizada em 09/10/2019.

Vigência do projeto: 08/2019 a 05/2020.

ANIMAL VIVO					
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Rato Wistar	44	300 gramas	75 dias	M	Biotério Central

Presidente Prudente, 4 de Novembro de 2019.


 Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
 Coordenador Científico da CPDI


 Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
 Coordenadora da CEUA - UNOESTE