

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Fernanda Moura Costa de Oliveira Campos

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS TÓXICOS DO PIRIMIFÓS-METIL
ASSOCIADO AO BUTÓXIDO DE PIPERONILA**

Rio de Janeiro

2023

Fernanda Moura Costa de Oliveira Campos

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS TÓXICOS DO PIRIMIFÓS-METIL
ASSOCIADO AO BUTÓXIDO DE PIPERONILA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Fausto Klabund Ferraris

Co-orientador: Dr. Esdras Barbosa Garcia

Rio de Janeiro

2023

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Campos, Fernanda Moura Costa de Oliveira.

Avaliação *in vitro* dos efeitos tóxicos do pirimifós-metil associado ao butóxido de piperonila. / Fernanda Moura Costa de Oliveira Campos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2023.

123 f.: il.; fig.; graf.; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2023.

Orientador: Dr. Fausto Klabund Ferraris
Coorientador: Dr. Esdras Barbosa Garcia

1. Agrotóxicos. 2. Pirimifós metil. 3. Butóxido de piperonila, 4. Citotoxicidade. 5. Genotoxicidade 6. Mistura de agrotóxicos. I. Título.

In vitro evaluation of the toxic effects of pirimifos-methyl associated with piperonyl butoxide.

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

“This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001”.

FERNANDA MOURA COSTA DE OLIVEIRA CAMPOS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS TÓXICOS DO PIRIMIFÓS-METIL
ASSOCIADO AO BUTÓXIDO DE PIPERONILA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 28/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cristiane Barata Silva (INCQS/FIOCRUZ)



Dra. Joseane Lima Prado Godinho (University of Oklahoma)

Dra. Tatiana Almeida Pádua (Farmanguinhos/FIOCRUZ)

ORIENTADORES

Dr. Fausto Klabund Ferraris - Orientador (INCQS/FIOCRUZ)

Dr. Esdras Barbosa Garcia - Co-orientador (INCQS/FIOCRUZ)

Dedico este trabalho, com todo o meu amor,
à minha família, que é a minha base.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus maravilhoso pelo dom da vida e pelo cuidado comigo. Por me dar saúde, força e que me ergueu nos momentos difíceis e me fez acreditar que sou capaz, não só por mim mesma, mas por causa Dele, que renova as minhas forças a cada manhã e pela oportunidade de viver esta experiência.

Aos meus pais Carlos Jorge e Sônia, ao meu irmão Felipe, por vocês existirem na minha vida, agradeço pelo carinho, pelo amor, compreensão e investimentos durante toda minha trajetória acadêmica. Muito obrigada por me apoiarem e estarem comigo nos momentos de alegrias, tristezas e dúvidas. Mas olhando para trás, percebo que só fui capaz de chegar até aqui porque tive o privilégio de tê-los ao meu lado, me deram forças para superar todos os obstáculos em meu caminho, de modo que tudo que conquistei eu devo a vocês. Muito obrigada por tudo, amo vocês.

Ao meu esposo Gilson, por todo o amor, incentivo, carinho, dedicação, compreensão e por seu apoio incondicional, em especialmente nesse período de maior ausência, estresse para me dedicar a este trabalho, você faz parte desta conquista.

Ao meu orientador Dr. Fausto Ferraris, um brilhante pesquisador e mesmo sempre muito atarefado, consegue cumprir com perfeição todas as suas obrigações e por ter me recebido no LabFar, por ter aberto as portas e ter contribuído para que eu “despertasse” para a ciência. Obrigada pelas conversas, pela paciência e pela orientação que resultou neste trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Esdras Garcia, uma pessoa carismática, de energia contagiante. Obrigada pelos conselhos e ensinamentos, pelo auxílio nas análises dos resultados deste trabalho, pelas sugestões e correções da escrita da dissertação.

Pelas amigadas do LabFar, pelos momentos de descontração, pelas conversas, pelo apoio. A vocês: Júlia Maria, Nathália, Beatriz e Yasmin; Trabalhar ao lado de vocês tornou meus dias muito mais agradáveis! Obrigada pela amizade!

A Thais, pela amizade e preocupação constante com minha progressão na pesquisa e meu bem-estar pessoal, pelas explicações das rotinas do laboratório e auxílio nos experimentos, pelas conversas, e por ter me recebido tão prontamente; muito obrigada pela amizade.

A Dra. Lúcia Helena, a Dra. Angélica e a Dra. Maria Helena, por cederem gentilmente, as amostras do pirimifós metil e do butóxido de piperonila.

A Dra. Tatiana de Pádua e ao Dr. Thadeu Costa, pelas contribuições em algumas metodologias.

A Ms. Taline Conde e Dra. Ludmila Bergsten, pela contribuição na metodologia do ensaio cometa.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária (PPGVS/INCQS/FIOCRUZ), que possibilitou a implementação deste trabalho.

A CAPES, pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste sonho.

Meu muito obrigada a todos, pois vocês fazem parte deste trabalho.

Viver é acalentar sonhos e esperanças, fazendo da fé a nossa inspiração maior. É buscar nas pequenas coisas, um grande motivo para ser feliz!

(Mário Quintana)

RESUMO

Na atualidade, o uso dos agrotóxicos é cada vez mais intenso e disseminado no Brasil, tanto no ambiente rural como no urbano, com objetivo de combater as pragas. Essas substâncias apresentam algum grau de toxicidade sobre ecossistemas e organismos vivos que vão desde intoxicação aguda a efeitos crônicos. Com base nesta problemática, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do pirimifós-metil (PMF) e o butóxido de piperonila (PBO), tanto na forma isolada como combinada, através de ensaios *in vitro*, em células alvos de diversas origens teciduais (AMJ2-C11, RAW 264-7, H9C2, HepG2 e HEK 293), em diferentes tempos de exposições (24, 48, 72 e 96 horas). A linhagem de macrófagos AMJ2-C1 apresentou sensibilidade à toxicidade do PMF, do PBO e a mistura das duas substâncias, somente nas maiores concentrações (50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), a partir da exposição de 72 horas, sendo observado resultado muito semelhante com a linhagem RAW 264-7. A célula de origem muscular cardíaca H9C2 também apresentou toxicidade às substâncias testes no maior tempo de exposição (96 horas). A linhagem HepG2 ao ser exposta ao PMF e PBO isoladamente não apresentou efeito citotóxico, porém o MIX foi mais citotóxico para a célula na concentração 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nas exposições de 48, 72 e 96 horas. A célula HEK 293 na exposição de 24 horas não apresentou efeito citotóxico em nenhuma das concentrações das substâncias analisadas, no entanto nas exposições de 48 e 72 horas apresentaram efeitos citotóxicos nas maiores concentrações do PMF, PBO e MIX. Já na exposição de 96 horas a célula HEK 293 não teve efeito citotóxico ao ser exposta ao PMF e PBO, mas no MIX houve efeito citotóxico nas maiores concentrações. Este trabalho aponta que nas exposições mais prolongadas e nas maiores concentrações o PMF, PBO e a mistura inibem a viabilidade das células em vários níveis de susceptibilidade nas diferentes células analisadas, sendo que esta sensibilidade depende do tipo celular. No ensaio de genotoxicidade, a célula HepG2 e células de sangue total de camundongos ao serem expostas ao PMF, PBO e MIX não apresentaram efeitos genotóxicos. Com base nos resultados encontrados, conclui-se que dependendo do tipo celular testado, o PMF e PBO apresentam individualmente efeitos tóxicos variados e a associação das duas substâncias em alguns tempos exposições e nas maiores concentrações apresentam efeito sugestivo de sinergismo. Esses resultados apontam a importância de se conhecer melhor os efeitos tóxicos de agrotóxico PMF e sinergista PBO na predição de potenciais riscos à saúde humana.

PALAVRAS-CHAVE: Agrotóxicos; Pirimifós metil, Butóxido de piperonila, Citotoxicidade, Genotoxicidade, Mistura de agrotóxicos.

ABSTRACT

Currently, the use of pesticides is increasingly intense and widespread in Brazil, both in rural and urban environments, with the aim of combating pests. These substances present some degree of toxicity to ecosystems and living organisms ranging from acute intoxication to chronic effects. Based on this problem, the objective of this study was to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of pirimiphos-methyl (PMF) and piperonyl butoxide (PBO), both isolated and combined, through in vitro assays, in target cells of different tissue origins (AMJ2-C11, RAW 264-7, H9C2, HepG2 and HEK 293) at different exposure times (24, 48, 72 and 96 hours). The AMJ2-C1 macrophage strain showed sensitivity to the toxicity of PMF, PBO and the mixture of the two substances, only in the highest concentrations (50 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), from the 72-hour exposure, the result is very similar to the RAW 264-7 strain. The cell of cardiac muscle origin H9C2 also showed toxicity of the substances in the longest exposure time (96 hours). The HepG2 strain, when exposed to PMF and PBO alone, did not show a cytotoxic effect, but MIX was more cytotoxic for the cell at a concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ at exposures of 48, 72 and 96 hours. The HEK 293 cells in the 24-hour exposure did not show cytotoxic effect in any of the concentrations of the analyzed substances, however in the exposures of 48 and 72 hours they showed cytotoxic effects in the highest concentrations of PMF, PBO and MIX. In the 96-hour exposure, the HEK 293 cell had no cytotoxic effect when exposed to PMF and PBO, but in the MIX there was a cytotoxic effect in the highest concentrations. This work points out that in longer exposures and in higher concentrations, PMF, PBO and the mixture inhibit cell viability at various susceptibility levels in the different analyzed cells, and this sensitivity depends on the cell type. In the genotoxicity assay, HepG2 cells and whole blood cells from mice when exposed to PMF, PBO and MIX did not show genotoxic effects. Based on the results, it is concluded that depending on the cell type tested, PMF and PBO individually present varied toxic effects. The association of the two substances in some exposure times and in the highest concentrations presents a suggestive effect of synergism. These results point to the importance of better understanding the toxic effects of PMF pesticides and PBO synergist in predicting potential risks to human health.

KEYWORDS: Pesticides, Pyrimifos methyl, Piperonyl Butoxide, Citotoxicity, Genotoxicity, Mixture of pesticides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Gráfico dos Registros de agrotóxicos no Brasil desde 2000 a 2021.....	23
Quadro 1: Classificação dos sinais e sintomas por intoxicações agudas, subagudas e crônicas dos agrotóxicos.....	25
Quadro 2: Classificação dos agrotóxicos de acordo com GHS.....	27
Quadro 3: Parâmetros toxicológicos da classificação toxicológica de agrotóxicos da Anvisa ajustada pelo Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS).....	28
Figura 2: Representação esquemática da fórmula estrutural do pirimifós-metil.....	29
Figura 3: Representação esquemática da fórmula estrutural do butóxido de Piperonila....	30
Figura 4: Visualização da lâmina corada com corante brometo de etídeo no teste citotoxicidade: células vivas em verde e células mortas de laranjas.....	40
Figura 5: Ensaio cometa: Classificação do dano ao DNA da célula.....	43
Figura 6: Linhagem AMJ2-C11 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 24 horas.....	44
Figura 7: Linhagem AMJ2-C11 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 48 horas.....	45
Figura 8: Linhagem AMJ2-C11 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 72 horas.....	46
Figura 9: Linhagem AMJ2-C11 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 96 horas.....	47
Figura 10: Linhagem RAW 264-7 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 24 horas.....	48
Figura 11: Linhagem RAW 264-7 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 48 horas.....	49
Figura 12: Linhagem RAW 264-7 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 72 horas.....	50
Figura 13: Linhagem RAW 264-7 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 96 horas.....	51

Figura 14: Linhagem H9C2 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 24 horas.....	52
Figura 15: Linhagem H9C2 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 48 horas.....	53
Figura 16: Linhagem H9C2 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 72 horas.....	54
Figura 17: Linhagem H9C2 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 96 horas.....	55
Figura 18: Linhagem HepG2 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 24 horas.....	56
Figura 19: Linhagem HepG2 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 48 horas.....	57
Figura 20: Linhagem HepG2 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 72 horas.....	58
Figura 21: Linhagem HepG2 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 96 horas.....	59
Figura 22: Linhagem HEK 293 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 24 horas.....	60
Figura 23: Linhagem HEK 293 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 48 horas.....	61
Figura 24: Linhagem HEK 293 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 72 horas.....	62
Figura 25: Linhagem HEK 293 foi exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 96 horas.....	63
Figura 26: Parâmetro bioquímico ALT da célula HepG2 controles e tratados.....	65
Figura 27: Parâmetro bioquímico AST da célula HepG2 controles e tratados.....	66
Figura 28: Parâmetro bioquímico ácido úrico da célula HEK 293 controles e tratados	67
Figura 29: Parâmetro bioquímico creatinina da célula HEK 293 controles e tratados.....	68
Figura 30: Parâmetro bioquímico ureia da célula HEK 293 controles e tratados.....	69

Figura 31: Citotoxicidade em células HepG2 expostas ao PMF, PBO e MIX por 24 horas.....	70
Figura 32: Citotoxicidade em células sanguíneas de camundongos Balb-c expostas ao PMF, PBO e MIX por 2 horas.....	71
Figura 33: Efeito do PMF na indução de dano ao DNA nas células HepG2.....	72
Figura 34: Efeito do PBO na indução de dano ao DNA nas células HepG2.....	73
Figura 35: Efeito do MIX na indução de dano ao DNA nas células HepG2.....	74
Figura 36: Efeito do PMF na indução de dano ao DNA <i>in vitro</i> nas células de sangue total de camundongos.....	76
Figura 37: Efeito do PBO na indução de dano ao DNA <i>in vitro</i> nas células de sangue total de camundongos.....	77
Figura 38: Efeito do MIX na indução de dano ao DNA <i>in vitro</i> nas células de sangue total de camundongos.....	78

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Informações químicas e toxicológicas das substâncias analisadas.....	32
Tabela 2: Análise em porcentagem da toxicidade do ensaio MTT, diferentes linhagens celulares foram submetidas ao PMF, PBO (isolados e combinados)	64
Tabela 3: Ensaio de Citotoxicidade em células HepG2 e sangue total de camundongos <i>in vitro</i>	71
Tabela 4: Ensaio de genotoxicidade do PMF em célula HepG2 <i>in vitro</i>	73
Tabela 5: Ensaio de genotoxicidade do PBO em célula HepG2 <i>in vitro</i>	74
Tabela 6: Ensaio de genotoxicidade do MIX (PMF + PBO) em célula HepG2 <i>in vitro</i>	75
Tabela 7: Ensaio de genotoxicidade do PMF em sangue total de camundongos <i>in vitro</i>	76
Tabela 8: Ensaio de genotoxicidade do PBO em sangue total de camundongos <i>in vitro</i>	77
Tabela 9: Ensaio de genotoxicidade do MIX em sangue total de camundongos <i>in vitro</i>	78

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AChE- Acetilcolinesterase

ACh- Acetilcolina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ALT- Alanina Aminotransferase

AST- Aspartato Aminotransferase

ATP - Adenosina trifosfato intracelular

CC- Controle celular

CO₂- Gás carbônico

CS-controle solvente

COX2- Ciclooxigenase-2

DDT- Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DRfA - Dose de Referência Aguda

DL - Dose Letal

DMEM- Meio *Dulbecco* MEM

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EDTA - *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (Ácido etilenodiamino Tetra-Acético)

EPI- Equipamento de Proteção Individual

FDA - diacetato de fluoresceína

FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz

GHS-*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* – (Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos)

H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio

IAs – Ingredientes ativos

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

IDA- Ingestão Diária Aceitável

INCQS- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

KCl- Cloreto de Potássio

LH- Linfoma de hodgkin

LNH- Linfoma não hodgkin

LMR - Limite Máximo de Resíduo

mA- Miliampere

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg/kg - Miligramas por quilo
mM - Milimolar
MMS - Metanossulfonato de metila
MTT-Brometo de Tiazolil Azul de Tetrazolio
MIX- PMF+PBO
NaCl- Cloreto de Sódio
NaOH- Hidróxido de Sódio
NOTIVISA-Sistema de Notificações em Vigilância Sanitária
OMS – Organização Mundial de Saúde
OP - Organofosforado
OH- Hidroxila
PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
BPF- Baixo ponto de fusão
PBO - Butóxido de Piperonila
PBS - *Phosphat-Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino)
pH - Potencial Hidrogeniônico
PFN- Ponto de fusão normal
PMF - Pirimifós-Metil
RNA- Ácido Ribonucleico
ROS-Espécies reativas de oxigênio
SBF- Soro fetal bovino
Tris-HCl –Tris -Hidroximetil-Aminometano
UA-Unidades arbitrárias
UAT-Unidades arbitrárias totais
V-Voltagem

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	20
1.1- Perfil histórico do uso dos agrotóxicos.....	20
1.2- Agrotóxicos e riscos para a saúde humana.....	23
1.3- Classificações toxicológicas e funcionais dos agrotóxicos.....	26
1.3.1- Pirimifós metil.....	29
1.3.2- Butóxido de piperonila.....	30
1.3.3- Exposições à mistura de agrotóxicos.....	31
1.4- Justificativa.....	33
2-OBJETIVO GERAL.....	34
2.1-Objetivos específicos.....	34
3- METODOLOGIA.....	35
3.1-Linhagens celulares.....	35
3.2- Cultura de células.....	35
3.3-Substâncias químicas utilizadas no estudo.....	35
3.4- Ensaio de Citotoxicidade (viabilidade celular) <i>in vitro</i>-MTT.....	36
3.5- Análise dos parâmetros bioquímicos.....	38
3.6- Ensaio de Citotoxicidade e Genotoxicidade - Ensaio cometa.....	39
3.6.1- Preparo das células HepG2 – Ensaio Cometa.....	41
3.6.2- Preparo das células sanguíneas dos camundongos Balb/c– Ensaio Cometa.....	41
3.6.3- Avaliação do dano ao DNA da célula-Ensaio Cometa.....	42
3.7- Análise estatística.....	43
4- RESULTADOS.....	44
4.1- Avaliações de Citotoxicidade- viabilidade.....	44
4.1.1- Avaliação citotóxica em linhagem macrófago alveolar pulmão de camundongo AMJ2-C11.....	44
4.1.2- Avaliação citotóxica em linhagem de macrófago murino RAW 264-7.....	48
4.1.3- Avaliação citotóxica em linhagem cardíaca H9C2.....	52
4.1.4-Avaliação citotóxica em linhagem hepatocarcinoma HepG2.....	56
4.1.5- Avaliação citotóxica em linhagem renal HEK 293.....	60
4.2- Análises dos parâmetros bioquímicos.....	65
4.3- Avaliações da Citotoxicidade e Genotoxicidade- Ensaio cometa.....	70
4.3.1- Análise da Citotoxicidade nas células HepG2 e células de sangue total de camundongos	

Ensaio cometa.....	70
4.3.2- Análise do ensaio de Genotoxicidade nas células HepG2- Ensaio Cometa.....	72
4.3.3- Análise do ensaio de Genotoxicidade <i>in vitro</i> em sangue total de camundongos-Ensaio Cometa.....	75
5-DISCUSSÃO.....	79
6-CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIAS.....	98

1- INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos também conhecidos como: defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, biocidas ou agroquímicos, são produtos de origem orgânica ou inorgânica, utilizados para prevenção, controle e eliminação de possíveis pragas, empregados em produções agrícolas, em locais de armazenamentos, em indústrias, pecuária, veterinária, ou campanhas sanitárias (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

Os agrotóxicos dependendo de sua espécie-alvo são divididos em: inseticida, bactericida, herbicida, fungicida e nematicida, mas podendo também ser classificados tendo como base a sua estrutura molecular como: carbamato, organoclorado, organofosforado e piretróide (SHARMA et al.,2019).

Os agrotóxicos são formados pelo componente químico ativo, denominado ingrediente ativo (IA), que atua no combate das pragas e por outros ingredientes inertes, definidos como todo material que é adicionado para a preparação do produto final. Estes componentes inertes podem incluir carreadores, agentes antipoeiras, atraentes, encapsuladores, solventes, adjuvantes, emulsificantes ou adesivos, que tem a função de aumentar a eficiência dos agrotóxicos, potencializando a ação de pulverização, solubilidade, espalhamento, estabilidade dos compostos de sua formulação e a segurança no manejo (SANTOS, 2002).

1.1- Perfil histórico do uso dos agrotóxicos

A humanidade por séculos alimentou-se de produtos fornecidos pela natureza, livre de componentes químicos. Com o passar do tempo, houve a necessidade de aprimorar as técnicas da produção agrícola, para acompanhar o crescimento populacional e a demanda por mais alimentos (BRASIL, 2015). Então o homem passou a buscar meio para aumentar a produtividade agrícola e o combate às pragas que atacam as plantações através da utilização de substâncias tóxicas (ANDREOLI et al., 2007).

No início do século XX, a agricultura passou a ser uma atividade comercial no Brasil, com objetivo de alimentar a população que expandia e que buscava por mais oferta de alimentos. Com isto, ocorreu um intenso e continuo processo de mudanças tecnológicas e organizacionais do mundo da produção, trazendo grandes transformações nos processos e nas relações de trabalho. Além disso, através da inserção de componentes químicos nas produções agrícolas de alimentos, observou-se que estes alimentos estavam sendo também contaminados por substâncias que aparentemente eram nocivas apenas aos insetos (SILVA et al., 2005). Ao

longo do tempo, percebeu-se que estes agrotóxicos que eram consumidos nos alimentos, também causavam intoxicação ao homem e geravam vários tipos de doenças (ANDRADES; GANIMI, 2007; BRASIL, 2015).

No período da Primeira Guerra Mundial iniciou-se a produção de substâncias químicas tóxicas, para serem empregadas como armas bélicas. Entre fins de 1930 e no decorrer da década de 1940, foi observado que estas armas químicas eram letais contra as pragas que atacavam as plantações agrícolas. A busca por substâncias químicas tóxicas apropriadas para fins militares levou o desenvolvimento de diversos produtos com propriedades biocidas, que passaram a ser utilizados no combate às pragas das lavouras na época (ANDRADES; GANIMI, 2007; BRASIL, 2015).

Dados históricos mostram que em 1939, o químico suíço *Paul Hermann Muller*, constatou que o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), tinha propriedades inseticidas, e passou a ser utilizado no combate aos mosquitos vetores da malária, sendo utilizado durante e após a Segunda Guerra Mundial (ANDRADES; GANIMI, 2007; BRASIL, 2015). As primeiras amostras do agrotóxico DDT, considerado “o milagroso pó branco”, chegaram ao Brasil, em 1943, passou a ser utilizado para prevenir e evitar a irradiação de doenças como: malária, febre amarela, doença do sono, tifo, oncocercose e muitas outras doenças transmitidas por vetores (SPADOTTO, 2006).

Em 1950, o governo adotou pacotes tecnológicos agrícolas com objetivo de aumentar a produtividade agrícola, com a incorporação de inovações tecnológicas na produção, como sementes geneticamente modificadas, maquinários agrícolas e produtos de origem química, como fertilizantes e agrotóxicos. Este período foi chamado de “Revolução Verde” (BALSAN, 2006; PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

Na década de 1960, houve a decisão política de preservar a estrutura das grandes propriedades, aderindo novos pacotes tecnológicos, com a utilização de agrotóxicos, aquisição de maquinários mais modernos e a implementação do Sistema Nacional de Crédito Rural, que vinculava a obtenção de crédito agrícola para compra de insumos químicos pelos agricultores. Tais medidas impulsionaram o agronegócio, fazendo o Brasil ser reconhecido como um importante mercado (BRASIL, 1995; BALSAN, 2006; PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003; LONDRES, 2011). No final da mesma década, a comercialização de agrotóxicos ocorreu em grande escala, com várias indústrias se instalando no território nacional, na metade da década de 1970, principalmente na região Sul-Sudeste do Brasil (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

Em 1975, foi estabelecido o Programa Nacional de Defensivos Agrícolas, no âmbito do II Plano Nacional de Desenvolvimento, que disponibilizava recursos financeiros para a implementação de empresas nacionais (SILVA et al., 2005; PELAEZ; TERRA; SILVA, 2010).

A lei 7.802, foi instituída em 11 de julho de 1989, que regulamentou a utilização dos agrotóxicos (SILVA et al., 2005; PELAEZ; TERRA; SILVA, 2010).

“O processo regulatório de produtos agrotóxicos é um ato complexo que envolve o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Ministério do Meio Ambiente, na figura do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e o Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Cada órgão atua analisando o pleito de registro em sua área de atuação, cabendo ao MAPA, como órgão responsável pela emissão do certificado de registro”.

Várias políticas de incentivo a utilização de agrotóxicos, através da obtenção de pacotes tecnológicos, isenção de impostos e facilitação na importação destes produtos, ocorreram entre os anos de 2001 a 2007. Com o passar dos anos, novos incentivos, como a troca de insumos pela produção, financiada pelas próprias indústrias de agroquímicos, favoreceu ainda mais o crescimento deste mercado (LONDRES, 2011).

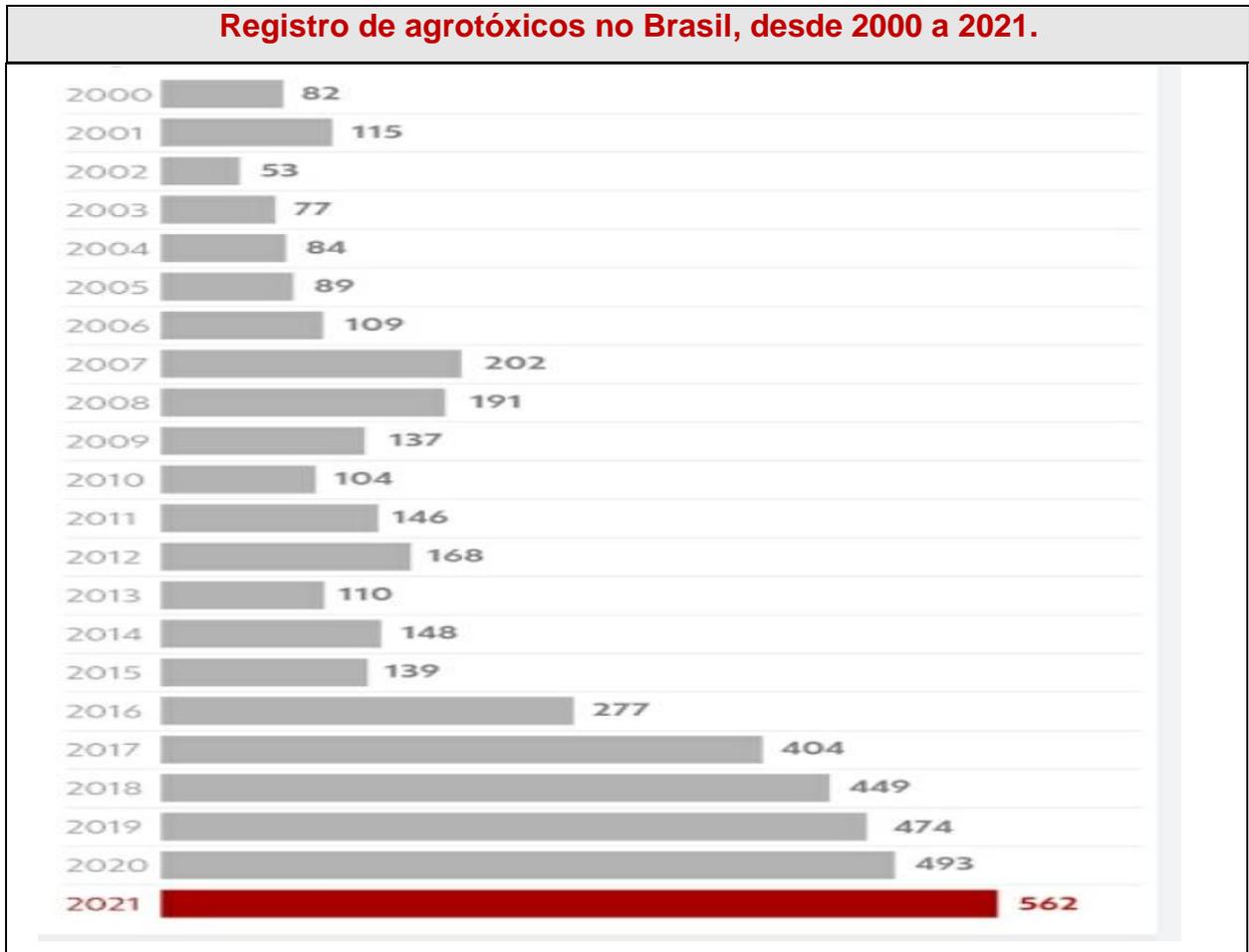
Em 2008, Brasil recebeu o título de “maior consumidor de agrotóxicos do mundo”, de acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário (AGROFIT), que é uma plataforma de consulta pública composta por um banco de dados de agrotóxicos registrados pelo MAPA, e com informações fornecidas pela ANVISA e pelo IBAMA (UFMG, 2021).

O uso de agrotóxicos no Brasil é assunto de grande importância nacional e relevância para mobilização socioeconômica e política, por estar associado ao agronegócio, que é responsável por expressiva exportação do país, com o seu impulso positivo no Produto Interno Bruto, ao mesmo tempo, é questão de saúde pública, considerando os impactos negativos ambientais e sociais (SOUZA; PEIXOTO; TOLEDO, 1995). Segundo o IBAMA em 2019, a agricultura brasileira utilizou 620 mil toneladas de agrotóxicos (IBAMA, 2021).

O Brasil através do MAPA liberou mais de 4.000 registros de agrotóxicos, componentes e afins no país como mostra a Figura 1. O poder Executivo iniciou a contagem, no ano 2000 foram liberados 82 agrotóxicos. Em 2021, o Brasil aprovou o registro de 562 agrotóxicos, o maior número já confirmado, pelo Ministério da Agricultura, desde 2000. Sendo a maioria dos produtos classificados como genéricos, (94,1%) isto é, constituídos com

ingredientes já existentes no mercado. Desses 562 agrotóxicos, 33 são inéditos (5,9%) de origem química ou biológica (SALATI, 2022).

Figura 1: Gráfico dos Registros de agrotóxicos no Brasil desde 2000 a 2021.



Fonte adaptado: Ministério da Saúde, 2022.

1.2- Agrotóxicos e riscos para a saúde humana

Os agrotóxicos são produtos que vêm sendo cada vez mais sendo empregados na agricultura, como consequência causando riscos para a saúde dos seres humanos e ecossistemas, pois depende do tempo de exposição durante sua aplicação, à toxicidade do produto e do grau de contaminação. Os agrotóxicos representam um forte risco à saúde física ou mental dos trabalhadores rurais, sendo esses os mais afetados, já que estão expostos diretamente a estes produtos ao longo de suas jornadas de trabalho (MAIA et al., 2018).

A absorção dos defensivos agrícolas pode ocorrer através da pele, mucosas ou vias aéreas (MAIA et al., 2018). A exposição pode ocorrer por várias fontes, como: água, ar, solo,

alimentos contaminados e também pelo contato direto com o produto durante o desenvolvimento das atividades funcionais no meio rural (PALMA, 2011).

Os indivíduos com maior risco de intoxicação por agrotóxicos são aqueles que estão expostos diretamente a estes produtos ao longo de suas jornadas de trabalho no campo, através do preparo, aplicação ou em qualquer outra fase de manuseio. Além disso, há o contato indireto da exposição aos agrotóxicos através das capinas, roçadas, colheitas e inalação do ar contaminado por produtos agroquímicos. Outros grupos de risco incluem: moradores em áreas ao entorno das lavouras, profissionais que trabalham no controle de vetores de doenças, profissionais de empresas dedetizadoras e indústrias fabricantes de agrotóxicos, assim como pessoas que trabalham com transporte e comércio desses produtos. É importante inserir também os consumidores dos alimentos contaminados por resíduos de agrotóxicos provenientes das lavouras (LONDRES, 2011).

Os efeitos adversos causados por intoxicação pelos agrotóxicos dependem: do tempo de exposição, a toxicidade e a concentração das substâncias, das vias de absorções do corpo, condições ambientais e a forma da intoxicação, sendo relacionadas às mais diversas doenças que, devido à inespecificidade dos sintomas, muitas vezes não são associados aos agrotóxicos (PEREIRA, 2019).

Os sintomas de intoxicação podem ser divididos a partir do início do seu surgimento, classificados em três tipos: intoxicação aguda, intoxicação subaguda e intoxicação crônica, conforme o quadro 1 (BRITO; GOMIDE; CÂMARA, 2009).

Quadro 1: Classificações dos sinais e sintomas por intoxicações agudas, subagudas e crônicas dos agrotóxicos:

Intoxicação	Sinais e sintomas
Aguda	Dores de cabeça, náuseas, vômitos, dificuldades respiratórias, fraqueza, salivação, cólicas abdominais, tremores, fadiga, miose, fraqueza muscular mínima, cólicas abdominais sem diarreia e entre outros.
Subaguda	Salivação, lacrimejamento, miose, broncorreia, broncoespasmo, bradicardia, vômitos, sudorese, cólicas abdominais, incontinência urinária e fecal, tremores, fraqueza, confusão, letargia, ansiedade.
Crônica	Agravamento do quadro moderado; insuficiência respiratória, pupilas puntiformes, arritmias, paralisias, coma, convulsões, anemia, dermatites, alterações hormonais, problemas imunológicos, disfunções reprodutivas (infertilidade, malformações congênicas e abortos), doenças do fígado e dos rins, doenças respiratórias, efeitos no desenvolvimento infantil, cânceres entre efeitos neurotóxicos retardados, alterações cromossômicas e dermatites de contato, lesões hepáticas, arritmias cardíacas, lesões renais e neuropatias periféricas, outros.

Fonte: Brasil, 2015.

Os danos causados por agrotóxicos, muitas vezes são irreversíveis, incluindo paralisias e alguns estudos relatam que determinados grupos de agrotóxicos têm probabilidade de gerar efeitos carcinogênicos (LONDRES, 2011; BRASIL, 2015; BRASIL, 2018).

O Brasil está entre um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos, dado avaliado pelo volume comercializado no país. Com isto vários trabalhadores rurais são expostos e acabam sendo intoxicados por esses produtos (FARIA et al., 2007; UFMG, 2021).

Nesse sentido, o Brasil criou sistemas de informações que são responsáveis pelos registros dos casos de intoxicação por agrotóxicos, com o objetivo de controlar os casos de intoxicações. Em 1980, estabeleceu o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, vinculado ao Ministério da Saúde, responsável por reunir, analisar e divulgar os números de casos de intoxicação por envenenamentos registrados pelo Centro de Informação e Assistência Toxicológica (LONDRES, 2011; DIAS et al., 2018).

Em maio de 1991, foi criada a Coordenação dos Centros de Assistência Toxicológica na Divisão de Avaliação de Riscos, do Sistema Nacional Vigilância Sanitária, que é

responsável pela coordenação da Rede de Centros e pela celebração de convênios para repasse de verbas (LONDRES, 2011; DIAS et al., 2018).

Em 1999, a ANVISA foi fundada com a finalidade de fiscalizar o consumo de produtos submetidos aos agrotóxicos. Em 2005, foi criada pela ANVISA a Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica, com objetivo de receber tanto as notificações de eventos adversos à saúde, como as queixas técnicas relacionadas aos diferentes produtos sob vigilância sanitária, inclusive os agrotóxicos. No caso dos agrotóxicos, observou-se um crescente aumento do número de notificações, possivelmente em decorrência da grande comercialização dessas substâncias e na melhoria da atuação pela vigilância e assistência à saúde para identificação, diagnóstico e notificação dos casos (LONDRES, 2011; DIAS et al., 2018).

1.3- Classificações toxicológicas e funcionais dos agrotóxicos

Em 2001, a ANVISA implantou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) com o objetivo de avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos em alimentos, em ação conjunta com o MAPA, que é responsável pelo controle, fiscalização, inspeção da importação e exportação dos resíduos de agrotóxicos entre outros. As análises, são estabelecidas por diferentes parâmetros, dentre eles, a Dose de Referência Aguda (DRfA), a Ingestão Diária Aceitável (IDA), à quantidade máxima de agrotóxico que pode ser consumido diariamente, ao longo de toda vida, sem oferecer risco à saúde, de acordo com os conhecimentos científicos atuais e o Limite Máximo de Resíduos (expressa em mg/kg de peso corporal, que é a quantidade máxima legalmente aceita de um agrotóxico em um determinado alimento) (BELTRANE; JUNIOR, 2005; GOUVÊA et al., 2015; BRASIL, 2019).

A análise de risco é a associação entre avaliações dos perigos (determinam os efeitos adversos dos agrotóxicos), de dose-resposta (baseada nos valores de referência abaixo dos quais não há efeitos adversos) e de exposição (analisado na quantidade a que o indivíduo é exposto) para definir a hipótese de ocorrência dos efeitos adversos de um resíduo de agrotóxico a um indivíduo ou população, em condição de exposição (BRASIL, 2017).

O Brasil passou a adotar em julho de 2019, o novo marco regulatório no setor dos agrotóxicos, que altera os critérios de avaliação, classificação toxicológica dos produtos e a forma como o consumidor é informado, por meio das embalagens, a respeito do nível de periculosidade de cada um deles. Os parâmetros de classificação toxicológica dos pesticidas com base nos padrões do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de

Produtos Químicos (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – GHS*), proposta pela ONU (Organização das Nações Unidas), este novo sistema está sendo usado para definir e classificar os riscos e perigos dos produtos químicos, bem como estabelecer elementos de comunicação como: símbolos, ícones e alertas, nos rótulos e embalagens de forma padronizada, passando de quatro para cinco as categorias de classificações toxicológicas, além de incluir uma categoria ‘não classificada’ apropriada para alguns produtos de origem biológica. A reclassificação foi necessária, pois o Brasil passou a ter regras harmonizadas com outros países da União Europeia e da Ásia, entre outros, com objetivo de facilitar a comercialização de produtos nacionais no exterior. O IBAMA classifica os agrotóxicos quanto à periculosidade ambiental, a ANVISA classifica os produtos em relação à toxicidade à saúde (BRASIL, 2021).

Quadro 2: Classificação dos agrotóxicos de acordo com GHS:

	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.

De acordo com a legislação, os rótulos das embalagens devem ser identificados através de cores, a que classe de toxicidade que o produto pertence. A periculosidade ambiental dos produtos também é classificada em cinco categorias e não classificadas, sendo

a categoria I a mais perigosa e a categoria V com menor risco, em comparação com as outras categorias (BRASIL, 2019).

Quadro 3: Parâmetros toxicológicos da classificação toxicológica de agrotóxicos da Anvisa ajustada pelo Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS).

Categoria		Cat 1	Cat 2	Cat 3	Cat 4	Cat 5	Não classificado
Nome da categoria		Extremamente Tóxico	Altamente Tóxico	Moderadamente tóxico	Pouco tóxico	Improvável de Causar Dano Agudo	Não classificado
Via de exposição Oral (mg/kg p.c.)		≤ 5	>5 - 50	>50 - 300	>300 - 2000	>2000 - 5000	> 5000
Via de exposição Cutânea (mg/kg p.c.)		≤ 50	>50 - 200	>200 - 1000	>1000 - 2000	>2000 - 5000	> 5000
Via de exposição Inalatória	Gases (ppm/V)	≤ 100	>100 - 500	>500 - 2500	>2500 - 20000	>20000	
	Vapores (mg/L)	≤ 0,5	> 0,5 - ≤ 2,0	>2,0 - ≤ 10	> 10 ≤ 20	> 20	
	Produtos sólidos e líquidos (mg/L)	≤ 0,05	>0,05 - 0,5	>0,5 - 1,0	>1,0 - 5,0	> 5,0	

Fonte: ANVISA, 2019.

A classificação toxicológica dos agrotóxicos é realizada através de dados experimentais *in vitro* e *in vivo*. Esta avaliação é multidisciplinar para fins da segurança do uso, é realizada de acordo com o resultado dos testes realizados em laboratório para obtenção da dose letal 50 (DL50, quantidade necessária de determinada substância para matar 50% dos organismos testados em condições experimentais) (ABRASCO, 2019).

Com objetivo de diminuir a possibilidade de ocorrer algum tipo de acidente durante o manuseio do agrotóxico, independente da classe a que pertence alguns cuidados devem ser tomados como: o manuseio cuidadoso, a utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs: respirador, viseira, touca árabe, macacão apropriado, avental e luvas) e seguindo sempre as recomendações dos fabricantes (BRASIL, 2002).

No Brasil, pesquisas vêm sendo feitas para o controle da presença de resíduos agrotóxicos nos alimentos, com o intuito de minimizar a quantidade e os riscos causados pelo

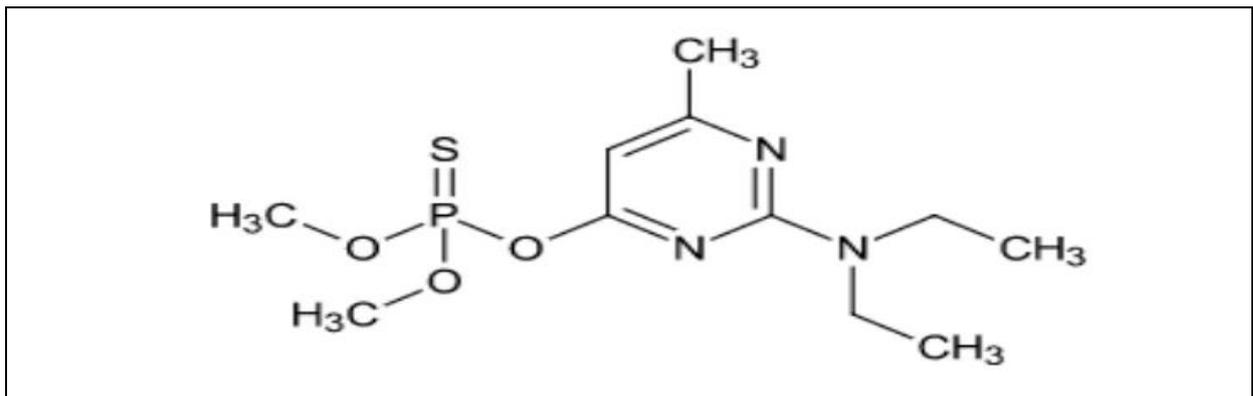
uso destas substâncias nos produtos alimentícios. Essa é uma problemática que envolve o consumo interno e externo desses alimentos. A afirmação dos limites e a permissão do uso desses produtos tóxicos para garantir o sucesso da produção agrícola, mas não pode descuidar da faixa etária da população consumidora e os riscos associados à toxicidade de cada produto (BRASIL, 2015).

Neste contexto então ser inserir o alvo do presente estudo, buscar conhece os efeitos tóxicos do organofosforado pirimifós metil associado ao sinergista butóxido de piperonila. Pois na lavoura essas substâncias são utilizadas em associação, com objetivo de potencializar a ação do efeito tóxico do agrotóxico.

1.3.1- Pirimifós-Metil

O pirimifós-metil (PMF) O-2-dietilamino-6-metilprimidin-4-il-O-O-dimetil fosforotioato, pertence a classe dos inseticidas do grupo 1B (inibidores da acetilcolinesterase – Organofosforados), derivado heterocíclico do ácido fosfórico, que apresenta fórmula molecular $C_{11}H_{20}N_3O_3PS$, como mostra a figura 2. Com classificação toxicológica: III (Medianamente Tóxico) e potencial de Periculosidade II (Muito Perigoso ao Meio Ambiente), este agrotóxico é registrado pela ANVISA – Ministério da Saúde. Tem ação inseticida e acaricida (GOUVÊA et al., 2015; WHO, 2016; ANVISA, 2022).

Figura 2: Representação esquemática da fórmula estrutural de pirimifós-metil.



Fonte adaptado: PUBCHEM, 2021.

O PMF é um OP (organofosforado) inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Com a inibição da AChE, ocorre a permanência da acetilcolina nas fendas sinápticas, intensificando a transmissão do impulso nervoso e impedindo a despolarização das células, resultando na paralisia da musculatura lisa

e esquelética do inseto e ação letal através da insuficiência respiratória levando a morte (ALABI et al., 2014; GOUVÊA et al., 2015).

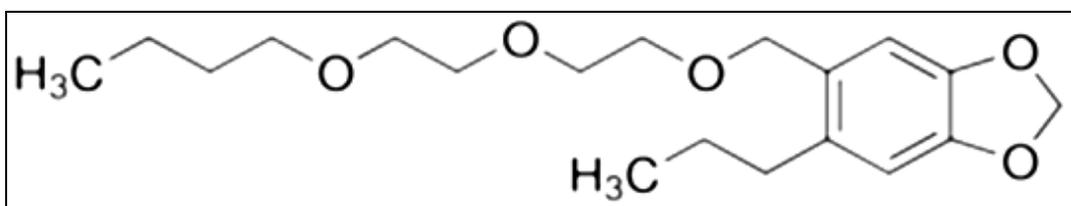
O PMF foi registrado como agrotóxico, nos Estados Unidos da América desde 1986, (KIM et al., 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) é registrado pela ANVISA e não existem evidências de atividade carcinogênica, mutagênica ou teratogênica nos estudos realizados (GOUVÊA et al., 2015; WHO, 2016).

Esta substância tem como função principal atuar no controle e impedir a proliferação de pragas e no combate a possíveis doenças em plantações de sementes, grãos e produtos armazenados: como arroz, milho, trigo, casas de animais, domésticos e instalações industriais (ALABI et al., 2014; GOUVÊA, et al., 2015).

1.3.2- Butóxido de piperonila

O butóxido de piperonila (PBO) 5- [2- (2-butoxi) etoximetil] -6-propil-1,3-benzodioxol, na figura 3 a apresentação da fórmula molecular $C_{19}H_{30}O_5$, atua como sinergista, potencializando a ação de outros inseticidas. O PBO não é registrado na ANVISA, como agrotóxico, mas pode ser utilizado como aditivo, de acordo com a RDC n° 34 de 16 de agosto de 2010. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos classifica o PBO na categoria dos sinergistas. O PBO não apresenta potencial de atividade genotóxica, efeito mutagênico, teratogenicidade ou neurotóxico nos estudos conduzidos em testes *in vivo* e *in vitro*. Mas em estudo *in vivo*, foram observados efeitos carcinogênicos, sobre o fígado e a tireoide, em doses elevadas (GOUVÊA et al., 2015; VARDAS et al, 2016).

Figura 3: Representação esquemática da fórmula estrutural de butóxido de piperonila.



Fonte adaptado: PUBCHEM, 2021.

Alguns autores como: Samson (1990), Daglish (1995) e Lorini & Galley (2000), relatam que o PBO tem como mecanismo de ação a inibição da atividade enzimática

microssomal de insetos (complexos na resistência de insetos). Desta forma potencializa a ação dos IAs como piretróides e inseticidas organofosforados (reforçando e aprimorando sua ação inseticida), prevenindo os mecanismos de defesa natural dos insetos, através da ação inibidora sobre o complexo enzimático do citocromo P450, atuando na inibição de oxidases e esterases, como por exemplo, a acetilcolinesterase, responsável pela resistência a fosforado e carbamato (SAMSON et al.,1990; DAGLISH et al.,1995; LORINI; GALLEY 2000; SCOTT; WEN, 2001; BERNARDI; OMOTO, 2014).

A ação do sinergista tem como efeito diminuir a dose de inseticida necessária para combater os insetos, pois atua aumentando sua eficácia para combater os insetos mais resistentes aos inseticidas. Quando os sinergistas são adicionados aos inseticidas organofosforados, pode-se minimizar a contaminação ambiental por resíduos de inseticidas, pois são necessárias menores doses para causar a morte dos insetos (BECKEL; LORINI; LAZZARI, 2006). O uso do sinergista mostra-se uma ferramenta importante no estudo da resistência das pragas aos inseticidas, porque admite que sua aplicação inferir no mecanismo da resistência envolvido com a espécie e substância em estudo. Outros estudos podem ser indispensáveis para identificar os demais mecanismos de resistência envolvidos, pois não apenas o metabolismo por enzimas (ALABI et al., 2014; GOUVÊA et al., 2015).

1.3.3- Exposições à mistura de agrotóxicos

Os seres vivos são expostos a uma grande variedade de substâncias químicas que são encontradas no meio ambiente. Dentre essas substâncias, estão incluídos os agrotóxicos. Apesar da grande preocupação acerca da exposição que ocorre mais comumente, através de pequenas concentrações dos seres humanos aos agrotóxicos, existem poucos estudos que analisam o modo pelo qual as misturas de agrotóxicos podem afetar a saúde da população (DAS; SHAIK; JAMIL, 2007).

Certos agrotóxicos são capazes de interagir quimicamente quando combinados, sendo que, o metabolismo de um, acaba intervindo no metabolismo do outro (BELDEN; LYDY, 2000). Tais interações entre estes compostos químicos podem levar a diversos efeitos colaterais aos seres vivos. A interação entre os agrotóxicos pode ser de forma: ação aditiva, sinergismo, potencializador e antagonismo. Essas interações podem ocorrer durante a absorção, a distribuição, o metabolismo, ou em sítio de ação tóxica e excreção do agrotóxico (HODGSON, 1999).

O efeito aditivo é um mecanismo de ação independente, onde não há a interação da ação de uma substância tóxica sobre a outra, o que pode camuflar a ação dessa mistura. O efeito aditivo ocorre quando a toxicidade total, resultante da combinação de dois ou mais agrotóxicos, é igual à soma dos efeitos de toxicidade induzida por cada substância individualmente. O efeito sinérgico ocorre quando a toxicidade total é resultado da combinação de dois ou mais agrotóxicos, sendo maior do que a soma dos efeitos de toxicidade induzida por cada substância individualmente. O efeito potencializador é o efeito tóxico de uma substância é intensificado pela presença de um ou mais substâncias que são apenas ligeiramente ativos. O efeito antagônico ocorre quando a substância total é menor do que a toxicidade induzida por cada substância individualmente (CONTE et al., 2022; HERNANDEZ et al., 2013).

A tabela 1 apresenta informações químicas e toxicológicas das substâncias do presente estudo.

Tabela 1: Informações químicas e toxicológicas das substâncias analisadas:

Agrotóxicos	Grupo Químico	Classe	Classificação toxicológica*	IDA (mg/kg⁻¹ dia⁻¹)	ARfD (mg kg⁻¹ dia⁻¹)
Pirimifós metil	Organofosforado	Inseticida e acaricida	Classe III	0,004	0,15
Butóxido de Piperonila	Metilendioxibenzeno	Sinergista	NE	0,2	NE

* Até 2019; IDA – Ingestão Diária Aceitável; ARfD – Dose de Referência Aguda; NE – Não Estabelecida Fonte: Adaptado de ANVISA, 2019.

1.4- Justificativa

Os efeitos tóxicos do PMF já são amplamente demonstrados na literatura Brealey et al., 1980, Ngoula, et al., 2007, Rumbos et al., 2013, Olsvik et al., 2017, contudo a segurança deste pesticida ainda é pouco explorada quando associado ao PBO, mostrando que não há dados da análise toxicidade *in vitro* do PMF, PBO individualmente e em mistura. Mesmo conhecendo-se os limites de segurança destas substâncias isoladas, pouco se sabe na literatura dos efeitos tóxicos quando estas substâncias estão combinadas (GUEDES et al., 1995, SYME et al., 2022)

A relevância deste estudo para a vigilância sanitária está no risco do uso dessas substâncias para a saúde humana não ser imediato, mas os danos causados pelo consumo em longo prazo precisam ser levados em consideração. Para a vigilância sanitária é indispensável entender os riscos que os agrotóxicos podem trazer para os consumidores e para diversas categorias profissionais, como por exemplo, os trabalhadores rurais. Desta forma, avaliar a toxicidade da associação do PMF com o PBO é importante, uma vez que tal avaliação fornecerá resultados dentro de condições de exposição mais próximas da realidade.

Assim, visando à segurança dos consumidores e dos trabalhadores rurais, é importante avaliar os potenciais citotóxicos e genotóxicos das substâncias. Dentre os testes disponíveis para avaliação da genotoxicidade através do ensaio cometa em condições alcalinas, avalia o efeito geral do dano ao DNA da célula, e fornece informações importantes quando realizado em conjunto com outros ensaios. Alguns estudos indicam que o PBO pode causar efeito carcinogênico, o que leva a uma preocupação quanto ao risco de indução de câncer em longo prazo (GOUVÊA et al., 2015; VARDAVAS et al., 2016).

2 - OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos tóxicos do pirimifós-metil quando associado ao butóxido de piperonila em diferentes linhagens celulares de origens teciduais diversas através de estudos *in vitro*.

2.1- Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do pirimifós-metil, butóxido de piperonila tanto isolados como combinados;
- Detectar a presença de marcadores bioquímicos em células alvos que possam evidenciar a toxicidade do pirimifós-metil, o butóxido de piperonila, tanto isolados como combinados, em determinados órgãos;
- Investigar a genotoxicidade do pirimifós-metil, butóxido de piperonila tanto isolados como combinados.

3- METODOLOGIA

3.1- Linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas nos ensaios, com sua respectiva origem tecidual: a linhagem celular HEK 293, são células renais embrionárias de origem humana. A linhagem celular HepG2 linhagem de origem de hepatocarcinoma humano. A linhagem celular H9C2 é um subclone da linha celular clonal original derivada do tecido cardíaco embrionário de ratos. A linhagem celular AMJ2-C11 linhagem celular de macrófagos alveolares de tecido pulmonar origem de camundongos e a célula RAW 264-7 linhagem de macrófagos murino. Essas células foram selecionadas para analisar dos efeitos tóxicos PMF e PBO (isolados ou combinados), pode haver uma toxicidade sistêmica ou não, então foi necessário analisar diferentes linhagens para predizer ser ocorrer o efeito citotóxico em algum órgão específico ou ser ocorrer em múltiplos órgãos.

3.2- Culturas de células

Cada linhagem celular foi cultivada em garrafas de poliestireno com as metragens de 25 cm², 75 cm² e 162 cm² com Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM); suplementada com 10% de soro fetal bovino-SBF (Sigma-Aldrich- F9665); com solução antibiótica penicilina-estreptomicina, solução antifúngica anfotericina B; as células foram cultivadas em estufa (THERMO FISHER SCIENTIFIC e modelo 3425) a 37°C, contendo 95% de ar umidificado e 5% de CO₂. Antes da realização de todos os experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de Azul de *Trypan* e a contagem realizada em câmara de Neubauer da marca KASVI, visualizadas em microscópio óptico invertido.

3.3- Substâncias químicas utilizadas no estudo

As substâncias de referências do agrotóxico pirimifós-metil na concentração 416,59 µg mL⁻¹, (2196-I, Dr.Ehrenstofer) e o sinergista butóxido de piperonila na concentração 393,60 µg mL⁻¹, (2524-E, AccuStandard), foram adquiridos como padrão analítico de pureza grau (≤100%) como Pestanal[®] (uma marca registrada da Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Alemanha). Essas substâncias foram gentilmente cedidas pela Dra. Lucia Helena

Pinto Bastos, do Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos, do Departamento de Química do INCQS/FIOCRUZ.

O solvente metanol foi evaporado até *secura* das amostras padrões do PMF e PBO, para avaliar de forma isolada e em mistura. A quantidade de solvente químico foi reduzida uma vez que o mesmo por si só pode ser tóxico para as células.

As concentrações avaliadas para cada pesticida foram originadas de valores de referência toxicológica obtidos por cálculos regulatórios como aqueles encontrados na vida cotidiana. Correspondia ao limite de exposição ocupacional/ nível aceitável de exposição do operador, ingestão diária aceitável e nível de exposição residencial. O cálculo para o estudo *in vitro* foi realizado com base no peso corporal de um humano 70 kg, simulando a submersão das células na cultura no meio de cultura contendo a concentração exata de pesticidas.

Para a realização dos ensaios deste trabalho, as amostras foram homogeneizadas e foram feitas diversas diluições de acordo com as foram diluídas nas concentrações 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em meio de cultura adequado para cada linhagem celular, para a realização dos ensaios *in vitro* dos ensaios MTT, bioquímica e o cometa.

3.4- Ensaio de Citotoxicidade (viabilidade celular) *in vitro* - Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

O ensaio MTT, foi baseado no protocolo descrito por Mosmann (1983), com adaptações. Este ensaio mensura a atividade celular *in vitro* através da redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio, que é um reagente de coloração amarelada. As células são metabolicamente ativas por atuação das enzimas desidrogenases mitocondriais, como a succinato desidrogenase, atuam no anel nitrogenado central de sais tetrazólicos resultando na mudança de cor para roxo (formação de cristais formazan). Esta conversão ocorre em células viáveis. Os principais usos do ensaio de MTT são para avaliar a citotoxicidade, a viabilidade celular, ativação celular, proliferação celular e metabolismo mitocondrial (DE OLIVEIRA et al., 2013; WANG; HENNING; HEBER, 2010, MAGALHÃES; THÁ; LEME, 2018).

A viabilidade celular é diretamente proporcional à atividade mitocondrial que é quantificada pela diminuição do MTT a formazan, pela atividade das enzimas desidrogenases. A quantificação da proliferação celular acontece de forma indireta, porque a mesma é estimada pelo maior número de mitocôndrias, resultado do aumento do número de células (MAGALHÃES; THÁ; LEME, 2018).

O ensaio MTT foi utilizado para avaliar o efeito citotóxico do PMF, PBO e a mistura das duas substâncias, na linhagem celular não aderente (AMJ2-C11) e as células aderentes (H9C2, HepG2, HEK 293 e RAW 264-7) em exposição de 24,48,72 e 96 horas.

Para o preparo das células aderentes, o meio de cultura da garrafa foi descartado e a mesma foi lavada por duas vezes com solução tampão fosfato salino (Phosphate Saline Buffer - PBS) (137 mM NaCl; 10 mM PO₄³⁻; 2,7 mM KCl) com pH 7,45 e em seguida, adicionou-se 2 mL de tripsina a 0,05% (10 mL de tripsina-EDTA 0.5% em 90 mL de PBS), para o processo de tripsinização. A garrafa foi então mantida por 2 min na estufa 5% de CO₂ a 37°C, em seguida foi agitada manualmente para garantir o “descolamento” das células da superfície onde estavam aderidas. Então, adicionou-se 2 mL do meio DMEM com 10% de SFB e com o auxílio de uma pipeta, homogeneizou-se cuidadosamente o conteúdo da garrafa para desfazer os grumos formados.

Após este procedimento o conteúdo da garrafa foi adicionado num tubo de 15 mL contendo 4 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB, que foi centrifugado por 7 min a 1500 RPM em centrífuga da marca HOFFMANNLA. Após a centrifugação o sobrenadante foi removido do tubo. Em seguida o pellet de célula contido no interior do tubo foi ressuspensão em 1 mL de meio de cultura para realizar a contagem na câmara de Neubauer.

As células aderentes foram adicionadas numa placa de 96 poços, com a concentração de $0,5 \times 10^4$ de célula por poço (100 µL/poço), incubadas na estufa com 5% de CO₂ a 37°C, por 24 horas para aderência das células. Após este período de aderência, foram adicionados aos poços 100 µL do PMF, PBO e MIX (PMF e PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 µg mL⁻¹, a placa foi mantida em estufa em diferentes tempos de exposições de 24, 48, 72 e 96 horas totais.

A célula não aderente foi adicionada a placa de 96 poços, com a concentração de 1×10^4 de células por poço (100µL/poço). Logo em seguida foram adicionados aos poços 100 µL os tratamentos, nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 µg mL⁻¹, A placa foi mantida em estufa com 5% de CO₂ a 37°C em diferentes tempos de exposições de 24, 48, 72 e 96 horas totais.

Durante os tempos de exposições das células aos tratamentos, 4 horas antes de finalizar cada tempo de exposição, as placas foram retiradas da estufa, levadas novamente para a cabine de fluxo laminar com as luzes apagadas. Foram adicionados 22 µL do reagente MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide – Invitrogen: M6494) em todos os poços na placa. A placa foi envolvida com papel alumínio para proteger da fotossensibilidade do MTT

mantida na estufa de CO₂ por mais 4 horas a 37°C para completar os diferentes tempos de exposições.

Após completar os tempos de exposições, a placa foi retirada da estufa e centrifugada numa centrífuga específica para placas da marca HT e modelo CN 5400 a 15.000 G por 5 min.

Após o término da centrifugação, todos os sobrenadantes foram removidos e adicionou-se 150 µL do reagente DMSO aos poços para dissolução do precipitado. Em seguida a placa foi deixada em repouso por 5 minutos, antes da leitura.

A leitura da placa de 96 poços foi realizada no espectrofotômetro da marca VERSA MAX modelo CA94089 em comprimento de onda de 550 nm com a programação de 10 segundos de agitação utilizando o programa SOFT MAX PRO 5.3. Por fim, após a leitura da placa calculou-se a média dos valores da absorbância para os controles e as amostras.

Em seguida, construiu-se uma curva padrão plotando a média de absorbância obtida para cada padrão de referência com as concentrações em µg mL⁻¹ no gráfico, determinando a viabilidade das células, a densidade óptica obtida no grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis. Portanto, quanto maior a densidade óptica obtida no ensaio, maior será o número de células viáveis (ERUKAINURE et al., 2018; MAGALHÃES; THÁ; LEME, 2018).

3.5- Análises dos parâmetros bioquímicos

As análises dos biomarcadores de estresse celular foram avaliadas através da análise bioquímica com diversos marcadores. Foi realizada em parceria com o Laboratório de Farmacologia Aplicada de Farmanguinhos.

As células foram semeadas na concentração 1x10⁵ em 100 µL/poço, numa placa de 96 poços e foram incubadas 5% CO₂ a 37°C, por 24 horas para aderência. Após este tempo foram adicionados os tratamentos aos poços nas concentrações 0,5, 1 e 5 µg mL⁻¹ do PMF, PBO e o MIX (PMF+PBO) em 100 µL/poço. A placa retornou a estufa por mais 48 horas de exposição aos agrotóxicos. Após o tempo de exposição os sobrenadantes das células foram coletados e congelados em freezer -70°C para posterior análise.

Nas células HepG2, os sobrenadantes da cultura celular foram coletados para determinação das atividades enzimáticas: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), utilizando o kit de diagnóstico comercial Bioclin, conforme recomendações do fabricante.

Na célula HEK 293, foram investigados os seguintes marcadores renais: ácido úrico, creatinina e ureia, utilizando o kit de diagnóstico comercial Bioclin, conforme recomendações do fabricante.

As atividades enzimáticas AST, ALT, na célula HepG2 foram lidas por um leitor de microplaca a SpectraMax®M5/ Molecular Devices a 505 nm e com valores processados pelo programa SOFT MAX PRO 5.3 e a atividade enzimática do ácido úrico foi lida no comprimento de onda de 1 a 505 nm, enquanto a creatinina foi lida em 2 a 510 nm e da ureia foi lida a 600nm.

3.6- Ensaio de Citotoxicidade e Genotoxicidade – Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado em parceria com o laboratório de Citotoxicidade e Genotoxicidade, de acordo com a metodologia descrita Hartmann; Speit, 1997, com adaptações.

O ensaio do cometa é uma técnica rápida e sensível para detecção de lesões primárias ao DNA da célula, mas não detecta modificações, mas sim o dano ao DNA que podem ou não resultar em modificações, após serem processadas pelas enzimas de reparo (GONTIJO; TICE, 2003). É uma técnica que permite detectar o dano no DNA reparados (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003) ou lesão gênica (PFUHLER et al., 2011). A visualização ao microscópio de fluorescência mostra a imagem similar a um cometa, com uma cabeça caracterizada e cauda proeminente, a cabeça é composta por DNA intacto e a cauda são fragmentos de DNA que foram transportados para fora do núcleo da célula (KASUBA et al., 2012; TICE; ANDREWS; SINGH, 1990).

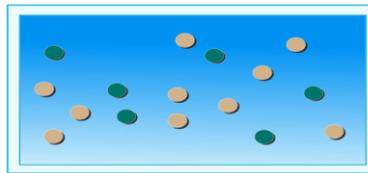
Para a realização do ensaio cometa, o PMF, PBO e MIX foram diluídos nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em meio DMEM para as células HepG2 e para células de sangue total de camundongos Balb-c, as amostras foram diluídas em PBS. O ensaio cometa é dividido em duas etapas: a primeira etapa consiste, obrigatoriamente, na avaliação de viabilidade celular (Citotoxicidade) e a segunda na avaliação de dano ao DNA (Genotoxicidade), sendo que a última etapa só pode ser realizada caso a perda de viabilidade celular, seja $\leq 20\%$ quando comparado ao grupo controle celular (INCQS, 2018; TICE et al., 2000), para isso foram analisadas 200 células por grupo experimental.

A viabilidade celular (citotoxicidade) foi determinada adicionando-se o volume de 25 μL de células tratadas e 25 μL do corante brometo de etídio. As amostras (50 μL) foram colocadas em lâminas de microscopia cobertas com lamínulas e observadas ao microscópio de

fluorescência. As células foram observadas e classificadas no ensaio de citotoxicidade: As células viáveis apresentam fluorescência na coloração verde, as células perdendo a viabilidade contêm grânulos citoplasmáticos verdes e núcleo laranja e as células mortas fluorescência na coloração laranja, como ilustrado na figura 4 (HENDERSON et al., 1998). O resultado final foi expresso em percentual de células mortas, onde também estão incluídas as células que estavam perdendo a viabilidade (TICE, 2003).

Figura 4: Visualização da lâmina corada com corante brometo de etídeo.

No ensaio citotoxicidade: células vivas em verde e células mortas em laranja.



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

Após a realização da avaliação da citotoxicidade das células HepG2 e células sanguíneas de camundongos, iniciou-se a etapa de genotoxicidade do ensaio cometa. Nesta etapa do ensaio, as lâminas foram preparadas por cultura, totalizando 4 lâminas por substância teste. As lâminas foram sempre protegidas da luz, para evitar novas quebras no DNA da célula. Sobre a lâmina pré-coberta com agarose em ponto de fusão normal (PFN) a 1,5%, foram adicionadas alíquotas de 10 μ L da suspensão celular que foram homogeneizadas em 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (agarose BPF 0,5%) em PBS a 37°C, colocadas em lâminas para microscopia previamente revestidas com agarose de ponto de fusão normal 1,5% (Sigma-Aldrich) em PBS, cobertas com lamínula e mantidas em geladeira (4 a 7°C) por cerca de 5 min para solidificar a agarose BPF. Após a solidificação da agarose BPF, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram mergulhadas em solução de lise (sarcosinato de lauroilo sódico 1%, NaCl 2,5M, EDTA dissódico 100mM, Tris 10mM, pH 10, Triton X-100 1%) e mantidas em geladeira, em overnight. Após a lise, as lâminas foram colocadas na cuba horizontal de eletroforese e foram mantidas em tampão alcalino (EDTA dissódico 1 mM, NaOH 300 mM) por 20 min, para a desnaturação do DNA. Em seguida, a eletroforese foi realizada a 25 V (0,86 V/cm) e 300 mA, por 20 min. Posteriormente, foram submetidas à neutralização com solução de tampão Tris 0,4 M (pH 7,5), a fixação com etanol absoluto e após secagem a leitura das lâminas foi realizada a coloração com brometo de etídeo (20 μ g

mL⁻¹) para análise microscópica em fluorescência (POP 65.3330.011; HARTMANN; SPEIT, 1997, ŽELJEŽIĆ et al, 2016).

Para estabelecer os níveis de dano primário ao DNA, o ensaio cometa foi realizado com a célula aderente HepG2 e as células de sangue total de camundongos.

3.6.1- Preparo da célula HepG2 – Ensaio Cometa

As células HepG2 foram adicionadas numa placa de 96 poços com a concentração de $1,5 \times 10^6$ de célula em 100 µL/poço, mantida em estufa de CO₂ a 37°C. Após 24 horas de aderência das células, os sobrenadantes dos poços foram removidos e adicionados os tratamentos aos poços PMF, PBO e MIX nas concentrações 100, 50, 10, 1 µg mL⁻¹ em meio DMEM com 10% soro fetal bovino. O controle de solvente utilizado foi metanol evaporado a partir dos tubos utilizados no protocolo de secagem do metanol e diluído em meio DMEM. O controle positivo selecionado para o ensaio com as células HepG2 foi o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 100 µM (ŽELJEŽIĆ et al., 2016). O tempo de exposição das células HepG2 foi de 24 horas em CO₂ a 37°C.

No terceiro dia, os sobrenadantes foram descartados dos poços, e lavou-se a placa de cultura uma vez com 150 µL de PBS e em seguida, adicionou-se 15 µL de tripsina, para o processo de tripsinização, agitada levemente para garantir o “descolamento” das células da superfície onde estavam aderidas. Então, adicionou-se 30 µL de meio DMEM com 10% soro fetal bovino e, com o auxílio de uma pipeta, homogeneizou-se cuidadosamente o conteúdo da placa para desfazer os grumos formados.

As células foram adicionadas nas lâminas para avaliação da Citotoxicidade e da Genotoxicidade, conforme o item 3.6 deste trabalho.

3.6.2- Preparo da célula sanguínea dos camundongos Balb/c – Ensaio Cometa

A coleta da amostra de sangue total dos camundongos Balb/c, adultos saudáveis do sexo masculino, com 8 semanas de vida. Inicialmente, os animais foram anestesiados com solução de Cetamina e Xilazina em água de injeção intraperitoneal, 200 µg mL⁻¹ por animal. Após higienização prévia com álcool a 70%, o abdômen do roedor foi aberto por uma incisão mediana com o auxílio de instrumentos cirúrgicos. As vísceras abdominais foram afastadas para a direita do animal, a aorta descendente foi exposta deslocando-se a gordura intraperitoneal e em seguida foi puncionada com a seringa dotada da agulha 25X8mm

contendo 80 µL/mL de heparina a 5000 UI/mL para a remoção do sangue num tubo de coleta apropriado isento de anticoagulantes (FURG, 2022).

Os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade foram realizados conforme o item 3.6 deste trabalho. As amostras foram diluídas nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 µg mL⁻¹ em PBS para sangue total de camundongo Balb-c, o controle celular e o controle solvente.

Os ensaios em sangue total de camundongos foram realizados utilizando o volume final de 50 µL por concentração (duplicata) em eppendorfs, sendo 37,5 µL de sangue e 12,5 µL de amostra PMF ou PBO. No caso do MIX o volume de sangue foi de 25 µL e de amostra 25 µL (12,5 µL de PMF e 12,5 µL de PBO). Nos ensaios com MIX foram incluídos os controles de solvente 50% e MMS 50%, ou seja, controles com metade do volume de sangue (25 µL) a fim de reproduzir as mesmas condições experimentais que as amostras do MIX. O tempo de exposição da célula aos agrotóxicos foi de 2 horas, a 37°C 5% de CO₂ e ao abrigo da luz.

3.6.3- Avaliação do dano ao DNA da célula-Ensaio Cometa

A extensão de migração do DNA das HepG2 e das células sanguíneas foram avaliadas através do tamanho da cauda dos cometas em 4 classes (0 a 3), sendo 0- ausência de cauda, 1- cauda curta, 2- cauda longa e 3- totalmente danificado ou com a cabeça do cometa muito pequena. O total de cometas obtidos em cada classe de dano foi convertido em unidades arbitrárias (UA) através do cálculo:

$$UA = [(M0 \times 0) + (M1 \times 1) + (M2 \times 2) + (M3 \times 3)], \text{ sendo:}$$

M0 = número de células com classe de dano 0;

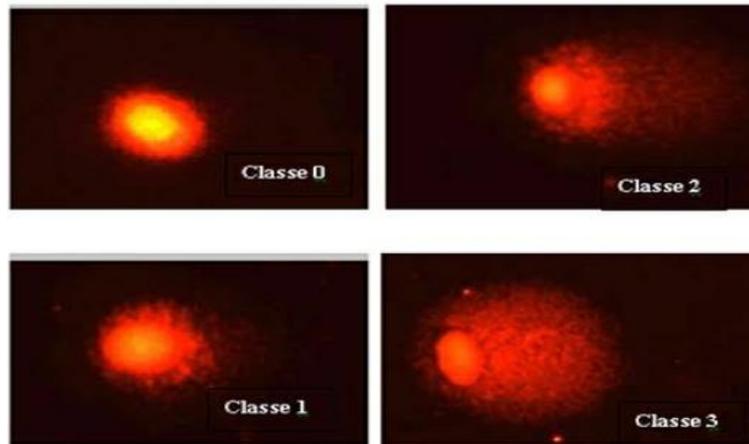
M1 = número de células com classe de dano 1;

M2 = número de células com classe de dano 2;

M3 = número de células com classe de dano 3.

Os resultados apresentados são provenientes da combinação de dois ensaios realizados independentes através da comparação dos valores médios de unidades arbitrárias totais (UAT) obtidos de 4 lâminas de cada concentração por ensaio em relação aos valores médios de UAT dos respectivos controles de solvente. A partir da comparação entre os grupos foi realizada a análise estatística (Teste t de *Student*) e considerado o dano ao DNA significativo quando $p < 0,05$ e ou quando $p < 0,001$ (INCQS, 2018).

Figura 5: Ensaio cometa: Classificação do dano ao DNA da célula.



Ensaio cometa- células classificadas: classe 0—sem danos; classe 1—pouco dano; classe 2—dano médio; e classe 3—grande dano, com a maior parte do DNA na cauda do cometa.
Fonte: Imagem adaptada de TROMPOWSKY, 2016.

3.7- Análises estatísticas

Todas as distribuições dos dados foram avaliadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnof. Para essa avaliação, um valor de p maior que 0,1 indica que os dados se distribuem normalmente. Para dados com distribuição normal, calculados as médias e erro padrão da média. Para dados com distribuição livre, foram realizadas análises estatísticas apropriadas para cada tipo de dado. Neste caso foram adotados testes não paramétricos. Para todos os testes, valores de p menores que 0,05 foram considerados como tendo significância estatística.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa *Graph Pad Prism 5* em sistema operacional Windows10.

4- RESULTADOS

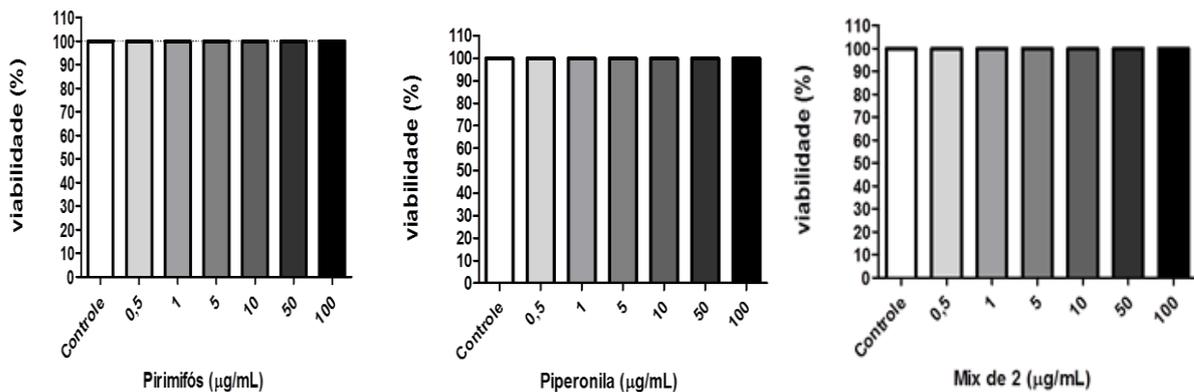
4.1- Avaliações de citotoxicidade- viabilidade

Neste estudo, o ensaio MTT foi usado para determinar a citotoxicidade do agrotóxico PMF, o sinergista PBO e a mistura dos IAs, em diferentes concentrações 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando diversas linhagens celulares (AMJ2-C11, HEK 293, HepG2, H9C2 e RAW 264-7), em diferentes tempos de exposições: 24, 48, 72 e 96 horas. Foi aplicada esta análise com o intuito de determinar a capacidade dos produtos químicos na questão de induzirem o efeito citotóxico que gerasse danos à integridade celular.

4.1.1- Avaliação citotóxica em linhagem macrófago alveolar do pulmão de camundongos AMJ2-C11

A célula AMJ2-C11 ao ser exposta por 24 horas ao PMF, PBO e a mistura das duas substâncias, não apresentou efeito citotóxico, como pode ser observado na figura 6.

Figura 6: Linhagem AMJ2-C11 exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 24 horas.



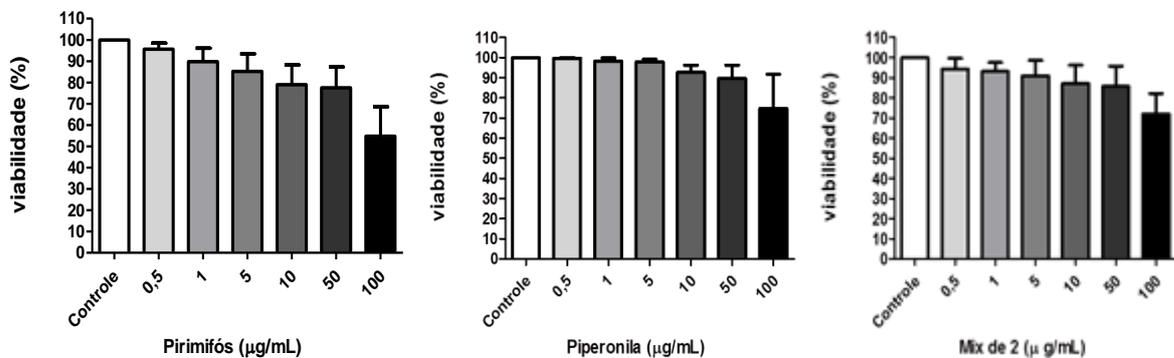
Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular AMJ2-C11, em ensaio de MTT, exposição de 24 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Quando avaliado o tempo de exposição de 48 horas, foi observado que o PMF se demonstrou bastante tóxico para a célula AMJ2-C11, na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, onde inviabilizou 45% das células. As demais concentrações desta exposição não apresentaram efeito tóxico significativo (Figura 7).

O sinergista PBO não apresentou efeito citotóxico significativo em nenhuma das concentrações analisadas, mantendo a viabilidade das células dentro da faixa entre 75 a 100% (Figura 7).

Quando avaliada a interação entre os dois produtos em mistura (PMF e PBO) no período de exposição de 48 horas, a célula de macrófago não apresentou efeito citotóxico significativo em nenhuma das concentrações analisadas, mantendo a viabilidade das células dentro da faixa entre 72 a 94 % (Figura 7).

Figura 7: Linhagem AMJ2-C11 exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 48 horas.



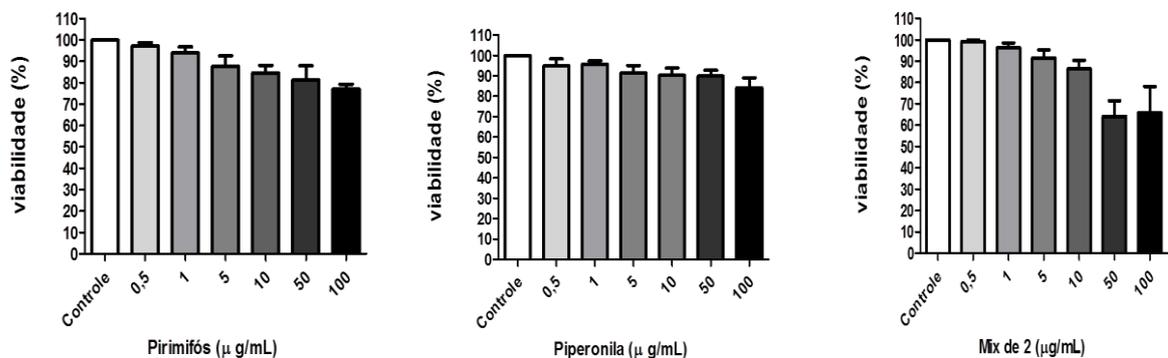
Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular AMJ2-C11, em ensaio de MTT, exposição de 48 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Quando a célula AMJ2-C11 foi exposta ao PMF por 72 horas não foi observado nenhum efeito citotóxico significativo em nenhuma das concentrações analisadas, mantendo a viabilidade das células dentro de uma faixa entre 77 a 97 % (Figura 8).

Na exposição de 72 horas da célula AMJ2-C11 ao sinergista PBO, não foi observado nenhum efeito citotóxico significativo, mantendo entre 84 a 95% a viabilidade celular (Figura 8).

A linhagem AMJ2-C11 também foi exposta ao MIX, por 72 horas. Foi observado uma toxicidade relevante para a célula de macrófago exposta ao MIX de agrotóxicos na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (34% de efeito citotóxico) e a concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, induzindo 36% de morte celular. As concentrações menores do MIX não apresentaram efeito citotóxico significativo (Figura 8).

Figura 8: Linhagem AMJ2-C11 exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 72 horas.



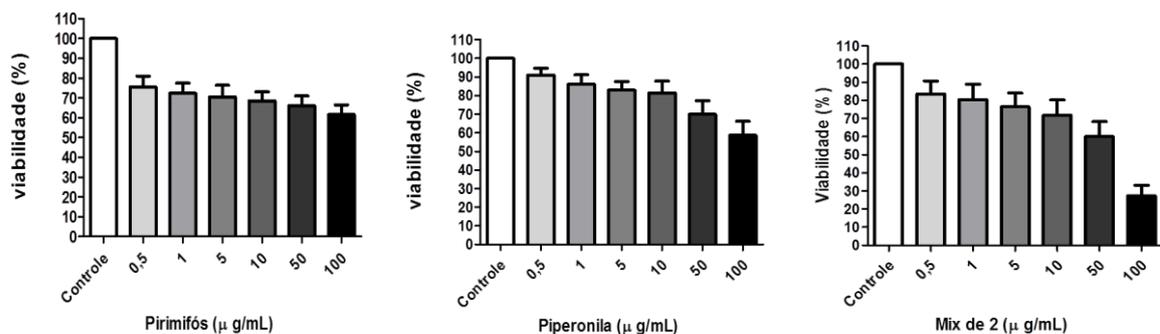
Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular AMJ2-C11, em ensaio de MTT, exposição de 72 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Na figura 9, observa-se a análise da viabilidade da célula AMJ2-C11 exposta por 96 horas ao PMF, PBO e a mistura das duas substâncias. O PMF apresentou efeito citotóxico a partir da concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, (32% de morte celular), a concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (34% de efeito citotóxico) e a concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (39% de morte celular). A partir da concentração $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores, apresentou viabilidade celular na faixa de 70 a 75 %. Com base nesses achados, a exposição da linhagem AMJ2-C11 frente ao PMF por um tempo de 96 horas foi o que mais apresentou atividade tóxica.

Quando a célula de macrófago foi exposta por 96 horas ao PBO na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ induziu 41% de morte celular, mas a partir da concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores, não foi observado efeito citotóxico (Figura 9).

A linhagem AMJ2-C11 também foi exposta ao MIX por 96 horas. Observa-se um aumento significativo pela concentração dependente da toxicidade das substâncias testadas. A linhagem AMJ2-C11 apresentou morte celular de 40% e 73%, respectivamente nas concentrações de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir da concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores, a viabilidade das células manteve-se dentro da faixa de 72 a 83% (Figura 9).

Figura 9: Linhagem AMJ2-C11 exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 96 horas.



Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular AMJ2-C11, em ensaio de MTT, exposição de 96 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

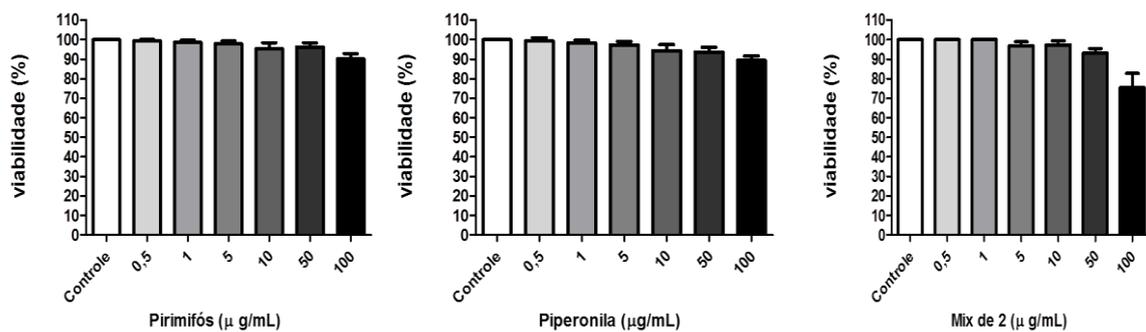
4.1.2- Avaliação citotóxica em linhagem macrófago murino RAW 264-7

A célula de macrófago RAW 264-7 quando exposta por 24 horas ao PMF não apresentou efeito citotóxico significativo, mantendo a viabilidade celular na faixa entre 90 a 99% (Figura 10).

De forma semelhante, o PBO não apresentou efeito citotóxico significativo, onde o percentual de células viáveis ficou em torno de 89 a 99% (Figura 10).

A célula RAW 264-7 também foi exposta por 24 horas ao MIX, observa-se que nenhuma das concentrações testadas afetaram de forma significativa a viabilidade celular, o percentual de células viáveis de 75 a 100% (Figura 10).

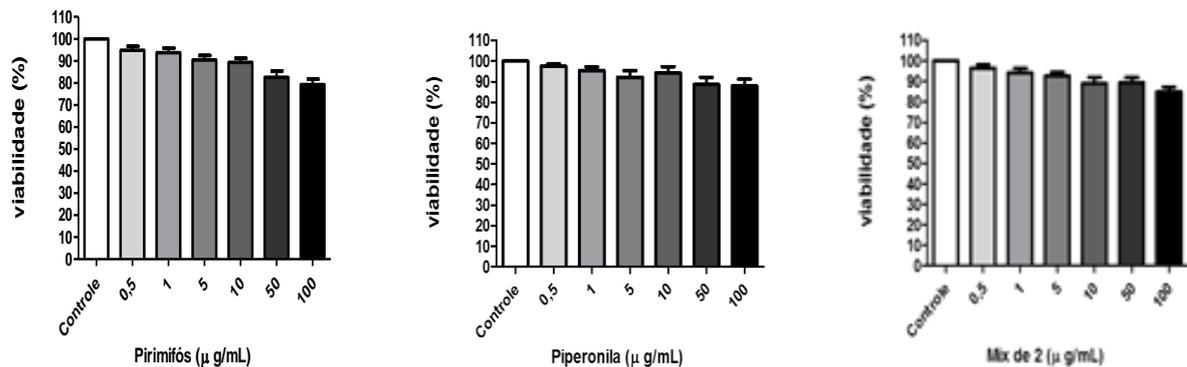
Figura 10: Linhagem RAW 264-7 exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 24 horas.



Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular RAW 264-7, em ensaio de MTT, exposição de 24 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Na Figura 11, observa-se a análise da viabilidade celular da Linhagem RAW 264-7 exposta por 48 horas ao PMF, PBO e a misturas das duas substâncias, não apresentaram efeito citotóxico significativo em nenhuma das concentrações analisadas das substâncias-testes.

Figura 11: Linhagem RAW 264-7 exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 48 horas.



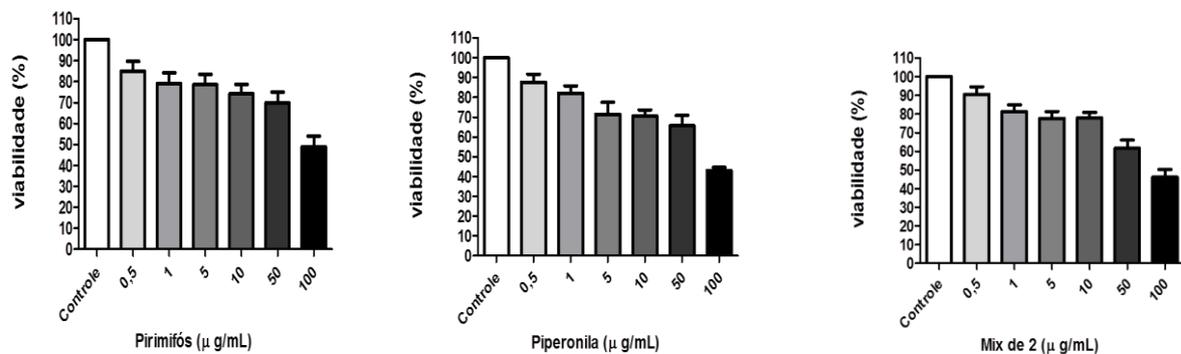
Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular RAW 264-7, em ensaio de MTT, exposição de 48 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Quando a célula RAW 264-7 foi exposta ao PMF por 72 horas. O PMF apresentou efeito citotóxico significativo apenas na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ induzindo 51% de morte celular. Mas a partir da concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores, apresentaram percentual celular na faixa entre 70 a 85 % de células viáveis (Figura 12).

Na exposição de 72 horas da célula RAW 264-7 ao sinergista PBO apresentou efeito citotóxico a partir das concentrações de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, induzindo 35% e 57% de morte celular, respectivamente. Mas a partir da concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores, apresentou viabilidade celular na faixa de 70 a 88 % (Figura 12).

Quando a célula RAW 264-7 foi exposta ao MIX por 72 horas. Foi observada uma toxicidade relevante para a célula de macrófago exposta ao MIX de agrotóxicos na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (46% de efeito citotóxico) e a concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (38% de morte celular). As concentrações menores do MIX não apresentaram efeito citotóxico significativo (Figura 12).

Figura 12: Linhagem RAW 264-7 exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 72 horas.



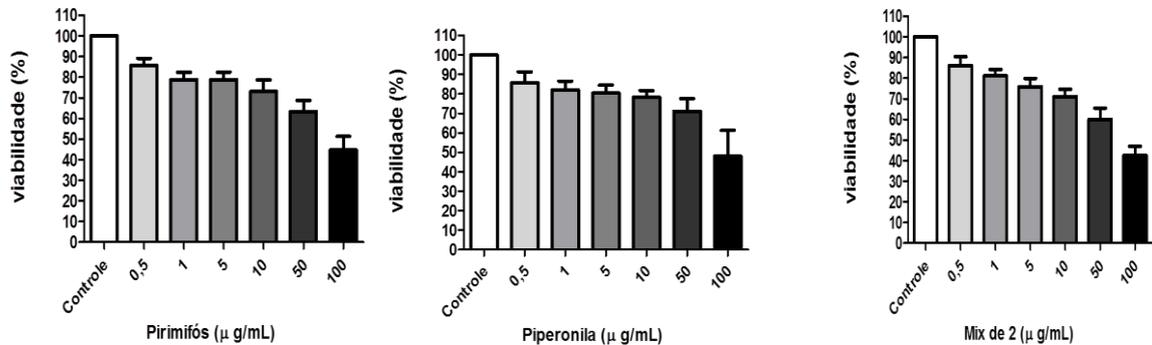
Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular RAW 264-7, em ensaio de MTT, exposição de 72 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Na figura 13, observa-se a análise da viabilidade da célula RAW 264-7 exposta por 96 horas ao PMF, PBO e o MIX. O PMF na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (55% de efeito citotóxico) e a concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (37% de efeito citotóxico). A partir da concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores manteve-se na faixa a viabilidade celular entre 73 a 86%.

Na exposição por 96 horas da célula RAW 264-7 ao sinérgista PBO na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ induziu 52% de morte celular, mas a partir da concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores, não foram observados efeitos citotóxicos significativos (Figura 13).

Quando avaliada a interação entre os dois produtos em mistura (PMF+PBO) por 96 horas nas células RAW 264-7, apresentou morte celular de 40% e 58%, respectivamente nas concentrações de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir da concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e concentrações inferiores, a viabilidade das células manteve-se dentro da faixa de 71 a 86% (Figura 13).

Figura 13: Linhagem RAW 264-7 exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 96 horas.



Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular RAW 264-7, em ensaio de MTT, exposição de 96 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

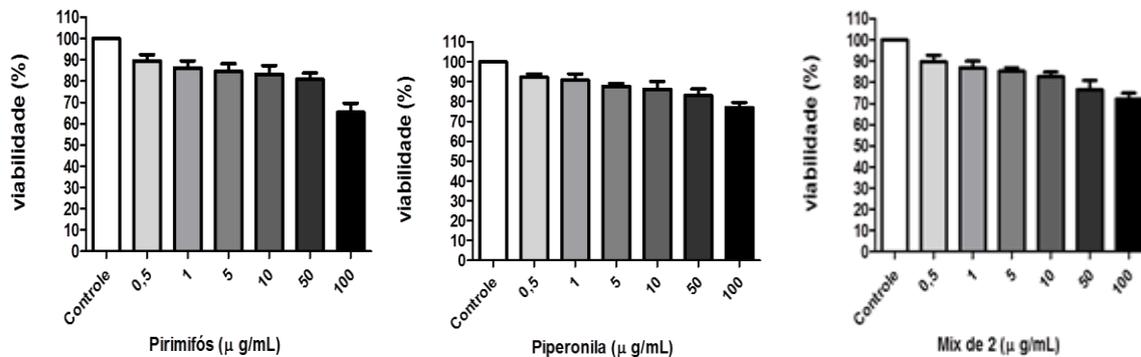
4.1.3- Avaliação citotóxica em linhagem cardíaca H9C2

Quando a célula H9C2 foi exposta ao PMF por 24 horas, não foi observado nenhum efeito citotóxico significativo em nenhuma das concentrações analisadas, mantendo a viabilidade das células dentro de uma faixa entre 71 a 89% (Figura 14).

De forma semelhante, o PBO não apresentou efeito citotóxico significativo, onde o percentual de células viáveis ficou em torno de 77 a 92% da linhagem H9C2 (Figura 14).

Quando avaliada a interação entre os dois produtos (PMF e PBO) no período de exposição de 24 horas, nas células H9C2, foi observado que a mistura dessas substâncias não apresentou efeito citotóxico significativo em nenhuma das concentrações analisadas, mantendo a viabilidade das células dentro da faixa entre 72 a 90% de viabilidade celular (Figura 14).

Figura 14: Linhagem H9C2 exposta ao PMF, ao PBO e associação das duas substâncias, em tempo exposição de 24 horas.



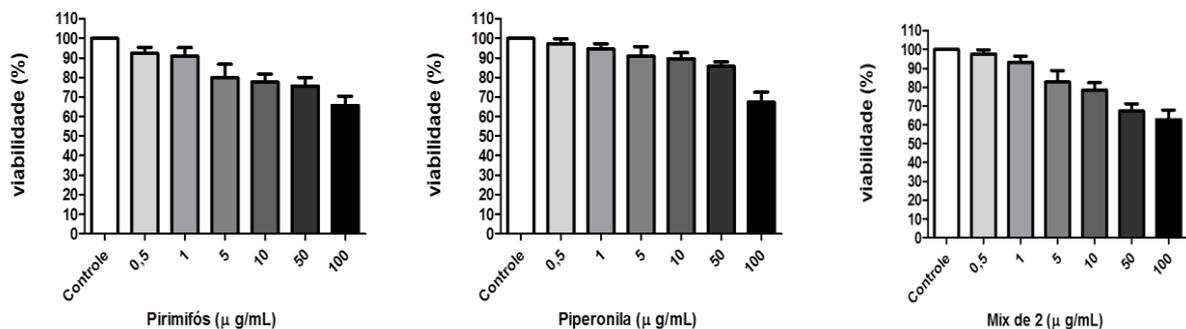
Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 µg mL⁻¹ em linhagem celular H9C2, em ensaio de MTT, exposição de 24 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Quando avaliado o tempo de exposição de 48 horas, foi observado que o PMF na célula H9C2 na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, inviabilizou 34% das células e as demais concentrações desta exposição não apresentaram efeito tóxico significativo (Figura 15).

O sinergista PBO gerou uma toxicidade em torno de 33% na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, mas a partir da concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores observa-se que a viabilidade celular foi superior a 85 % (Figura 15).

A linhagem H9C2 também foi exposta ao MIX, por 48 horas. Foi observado na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (37% de efeito citotóxico) e a concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, (33% de morte celular). As concentrações menores do MIX não apresentaram efeito citotóxico significativo (Figura 15).

Figura 15: Linhagem H9C2 exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 48 horas.



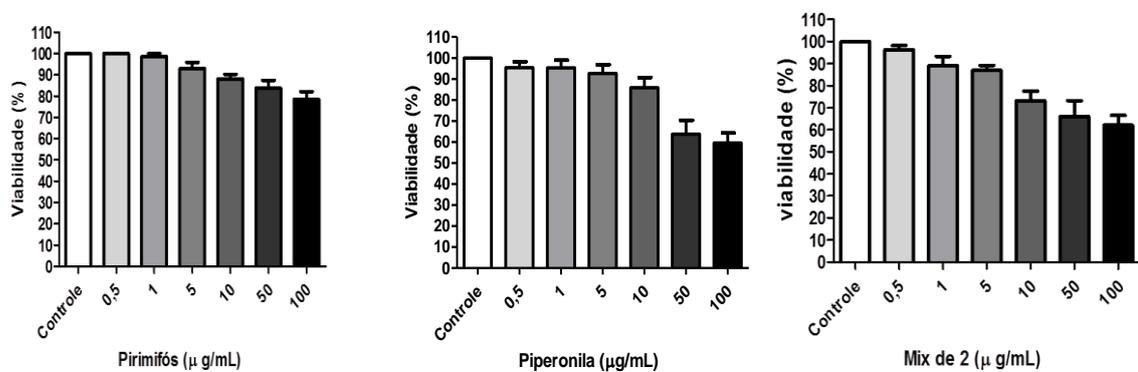
Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular H9C2, em ensaio de MTT, exposição de 48 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

As células de H9C2 quando expostas por 72 horas ao PMF não apresentaram efeito citotóxico significativo, mantendo a viabilidade celular na faixa entre 78 a 100% de viabilidade celular (Figura 16).

Quando a célula cardíaca foi exposta por 72 horas ao sinergista PBO, observa-se que na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ induziu 41% de morte celular e na concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 36% de efeito citotóxico. A partir da concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores, não foram observados efeito citotóxico significativo, a viabilidade das células manteve-se dentro da faixa de 86 a 95% (Figura 16).

Quando a célula cardíaca foi exposta por 72 horas ao MIX, observa-se que a célula apresentou morte celular de 34% e 38%, respectivamente nas concentrações de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir da concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores, a viabilidade das células manteve-se dentro da faixa de 73 a 96% (Figura 16).

Figura 16: Linhagem H9C2 exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias, em tempo de exposição de 72 horas.



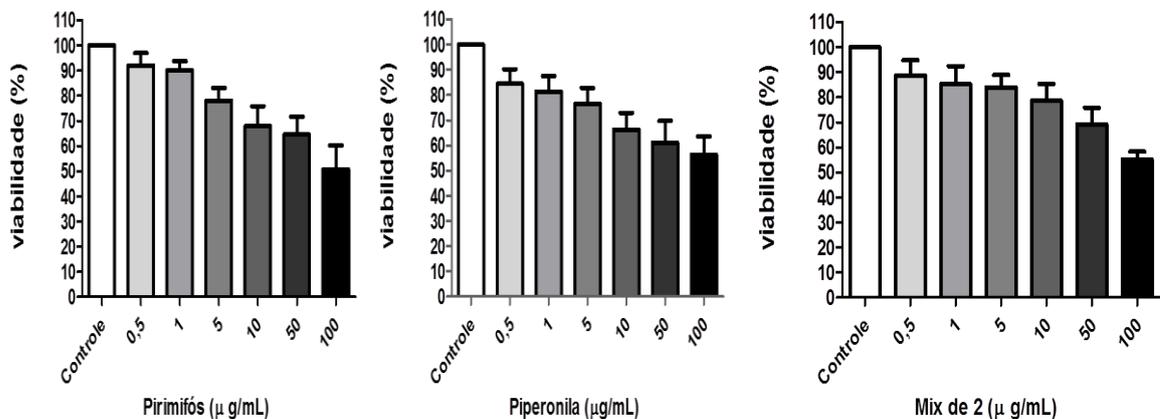
Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular H9C2, em ensaio de MTT, exposição de 72 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Quando avaliado o tempo de exposição de 96 horas, foi observado que o PMF se mostrou altamente tóxico para a célula H9C2, na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (49% de morte celular), a concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (36% de efeito citotóxico) e a concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (32% de efeito citotóxico). As demais concentrações desta exposição não apresentaram efeito tóxico significativo (Figura 17).

Quando a célula cardíaca foi exposta por 96 horas ao sinergista PBO gerou uma toxicidade em torno de 44% na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, a concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (39% de efeito citotóxico) e a concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (34% de efeito citotóxico). A partir da concentração $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ observa-se que a viabilidade celular foi superior a 76% (Figura 17).

A linhagem H9C2 foi exposta por 96 horas ao MIX. Que na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (45% de efeito citotóxico) e a concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, induzindo 31% de morte celular. As concentrações menores do MIX não apresentaram efeito citotóxico significativo (Figura 17).

Figura 17: Linhagem H9C2 exposta ao PMF, PBO e mistura das duas substâncias em tempo de exposição de 96 horas.

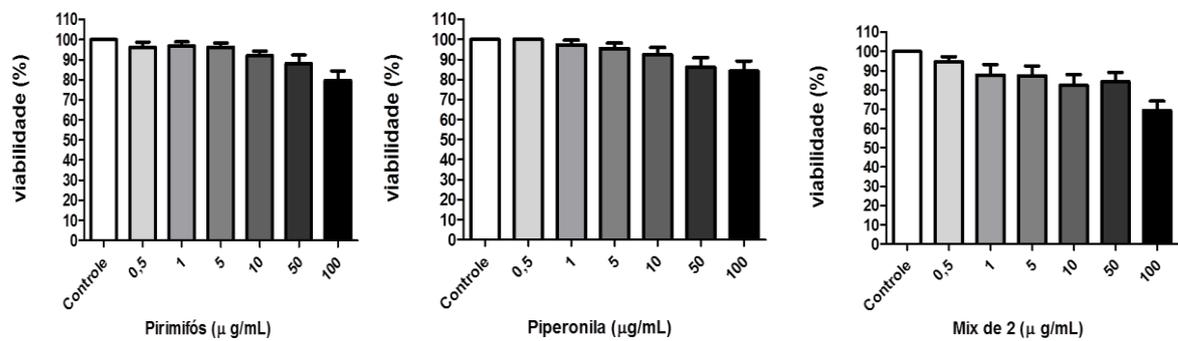


Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular H9C2, em ensaio de MTT, exposição de 96 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

4.1.4- Avaliação citotóxica em linhagem hepatocarcinoma humano HepG2

Na Figura 18, observa-se que a viabilidade celular da Linhagem HepG2 exposta por 24 horas ao PMF, PBO e a mistura das duas substâncias, em todas as concentrações testadas, nenhuma delas apresentou atividade citotóxica de forma significativa.

Figura 18: Linhagem HepG2 exposta ao PMF, ao PBO e associação das duas substâncias, em tempo exposição de 24 horas.



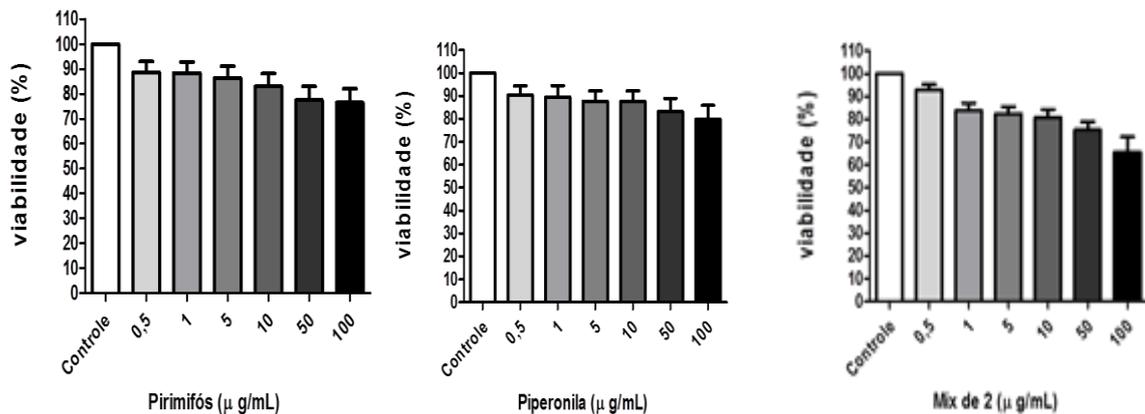
Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular HepG2, em ensaio de MTT, exposição de 24 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Na figura 19, observa-se a viabilidade da célula HepG2 exposta por 48 horas ao PMF não apresentou efeito citotóxico significativo, o percentual de 76 a 89% de células viáveis (Figura 19).

Quando a célula hepática foi exposta por 48 horas ao PBO não apresentou efeito citotóxico significativo, mantendo-se entre 80 a 90% de células viáveis (Figura 19).

Quando avaliada a interação entre os dois produtos (PMF+PBO) no período de exposição de 48 horas, na célula HepG2 foi observado que o MIX na concentração 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 35% de efeito citotóxico, mas a partir da concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores, mantendo-se entre 75 a 93% de viabilidade celular (Figura 18).

Figura 19: Linhagem HepG2 exposta ao PMF, ao PBO e associação das duas substâncias, em tempo exposição de 48 horas.



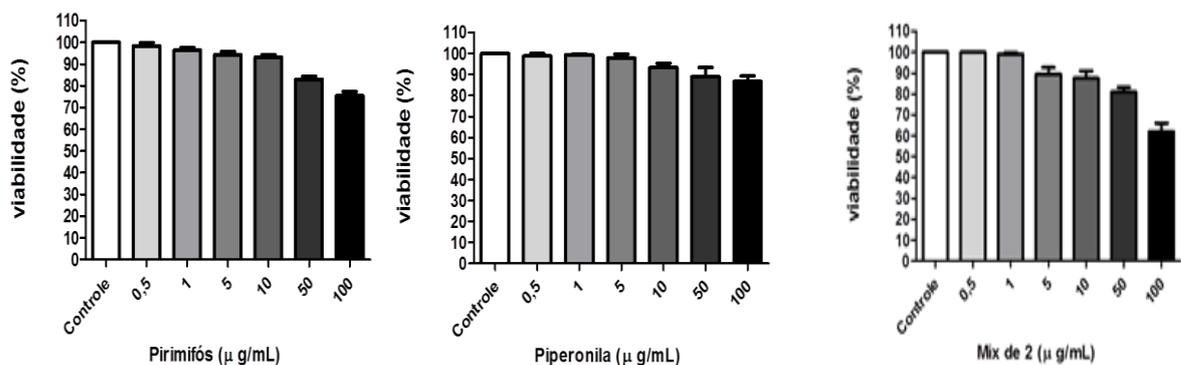
Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular HepG2, em ensaio de MTT, exposição de 48 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Quando a célula HepG2 foi exposta por 72 horas ao PMF não apresentou efeito citotóxico significativo, o percentual de 75 a 98% de células viáveis (Figura 20).

Quando a célula HepG2 foi exposta por 72 horas ao sinergista PBO não apresentou efeito citotóxico significativo, mantendo-se entre 80 a 96% de viabilidade celular (Figura 20).

Na exposição de 72 horas da célula HepG2 ao MIX, observa-se que a concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (35% de efeito citotóxico) e as menores concentrações do MIX não apresentaram efeito citotóxico significativo, mantendo-se entre 84 a 99% de viabilidade celular (Figura 20).

Figura 20: Linhagem HepG2 exposta ao PMF, ao PBO e associação das duas substâncias, em tempo exposição de 72 horas.



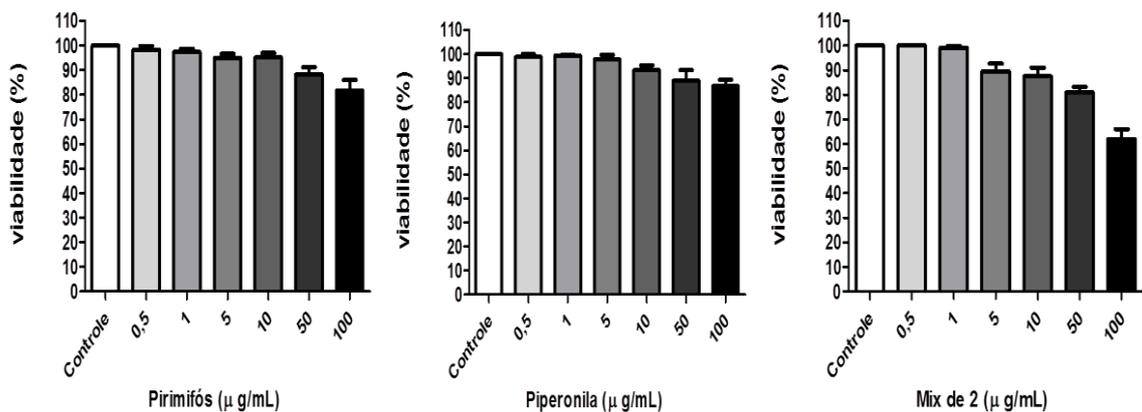
Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular HepG2, em ensaio de MTT, exposição de 72 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Quando a célula HepG2 foi exposta ao PMF por 96 horas, não foi observado efeito citotóxico significativo em nenhuma das concentrações analisadas, mantendo a viabilidade da célula dentro de uma faixa entre 82 a 98% (Figura 21).

Na exposição de 96 horas da célula HepG2 ao sinergista PBO, não foi observado nenhum efeito citotóxico significativo, mantendo-se entre 87 a 99% a viabilidade celular (Figura 21).

Quando a célula foi exposta por 96 horas ao MIX causou 38% de morte celular na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, mas a partir da concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores, mantendo-se entre 81 a 100% de células viáveis (Figura 21).

Figura 21: Linhagem HepG2 exposta ao PMF, ao PBO e associação das duas substâncias, em tempo exposição de 96 horas.



Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular HepG2, em ensaio de MTT, exposição de 96 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

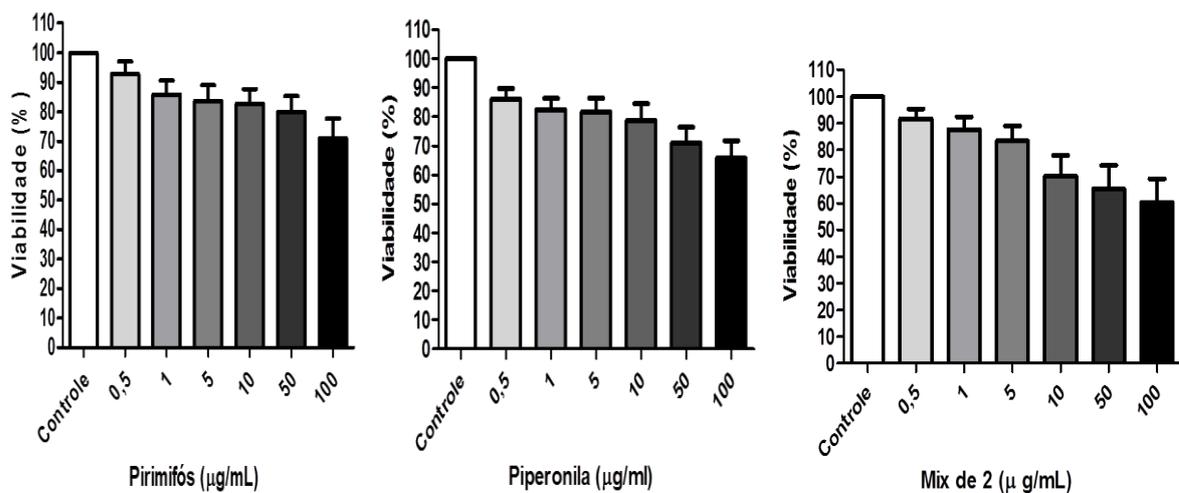
4.1.5- Avaliação citotóxica em linhagem renal HEK 293

Quando a célula HEK 293 foi exposta ao PMF por 24 horas, não foi observado nenhum efeito citotóxico significativo em nenhuma das concentrações analisadas, mantendo a viabilidade das células dentro de uma faixa entre 71 a 98% (Figura 22).

Na exposição de 24 horas da célula HEK 293 ao sinergista PBO, não foi observado nenhum efeito citotóxico significativo, mantendo-se entre 70 a 92% de viabilidade celular (Figura 22).

Quando a célula foi exposta por 24 horas ao MIX causou 34% de morte celular na concentração 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partir da concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores, mantendo entre 79 a 96% de células viáveis (Figura 22).

Figura 22: Linhagem HEK 293 exposta ao PMF, PBO e associação das duas substâncias, em tempo exposição de 24 horas.



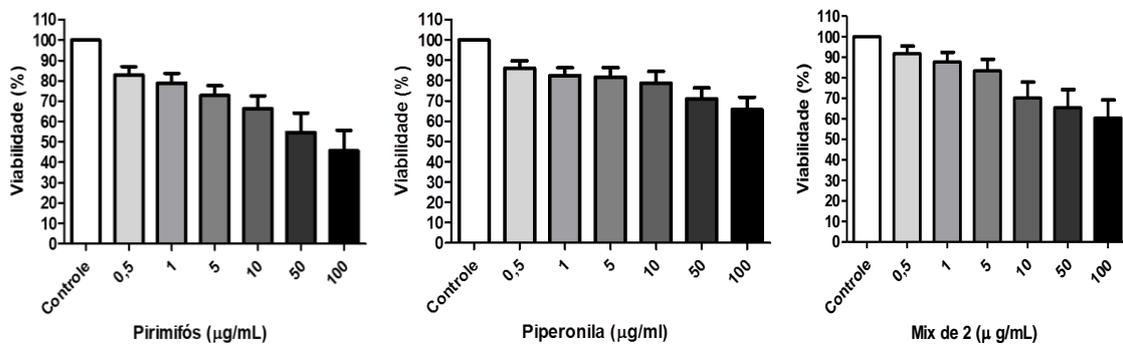
Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular HEK 293, em ensaio de MTT, exposição de 24 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Quando avaliado o tempo de exposição de 48 horas, foi observado que o PMF se mostrou altamente tóxico para a célula HEK 293, na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, inviabilizou 54% das células, na concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (45% de efeito citotóxico) e a concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (34% de efeito citotóxico). As demais concentrações desta exposição não apresentaram efeito tóxico significativo (Figura 23).

Na exposição de 48 horas da célula HEK 293 ao sinergista PBO, na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ 34% de morte celular. A partir da concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores, o percentual celular entre 71 a 86% de células viáveis (Figura 23).

A linhagem HEK 293 foi exposta por 48 horas ao MIX. Foi observado que na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (40% de morte celular) e na concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (35% de células mortas). A partir da concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores mantendo-se entre 70 a 91% de viabilidade celular (Figura 23).

Figura 23: Linhagem HEK 293 exposta ao PMF, ao PBO e associação das duas substâncias, em tempo exposição de 48 horas.



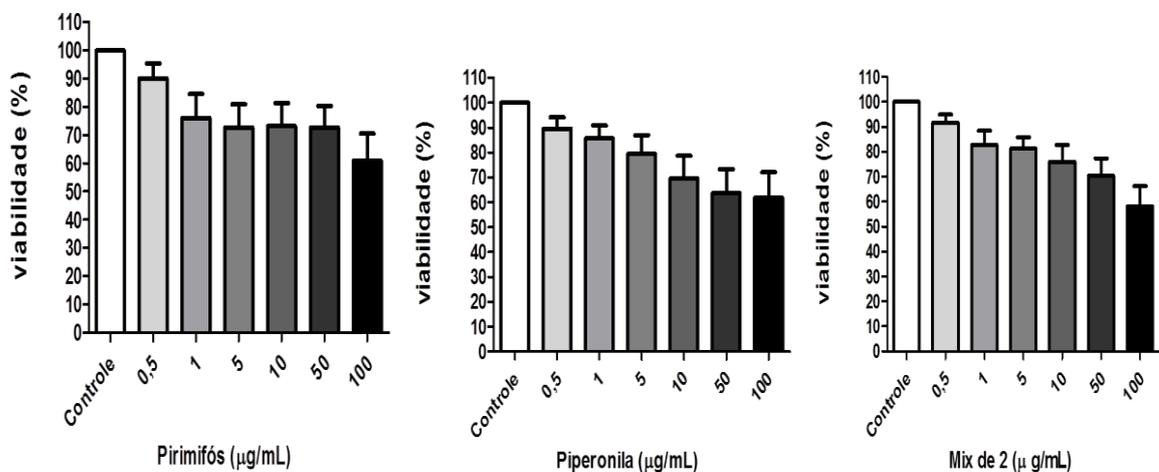
Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular HEK 293, em ensaio de MTT, exposição de 48 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Quando a célula HEK 293 foi exposta por 72 horas ao PMF, observa-se que na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ causou 39% de morte celular, mas a partir da concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores mantendo-se na faixa entre 73 a 90% de viabilidade celular (Figura 24).

A linhagem HEK 293 também foi exposta ao PBO foi altamente tóxico para célula induziu 38% de efeito citotóxico na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, a concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (37% de efeito citotóxico) e a concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (31% de efeito citotóxico). A partir da concentração $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores se manteve na faixa entre 79 a 89% de viabilidade celular (Figura 24).

Na exposição de 72 horas da célula HEK 293 ao MIX na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ causando 42% de morte celular, mas a partir da concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inferiores, percentual celular na faixa entre 70 a 91% de células viáveis (Figura 24).

Figura 24: Linhagem HEK 293 exposta ao PMF, ao PBO e associação das duas substâncias, em tempo exposição de 72 horas.



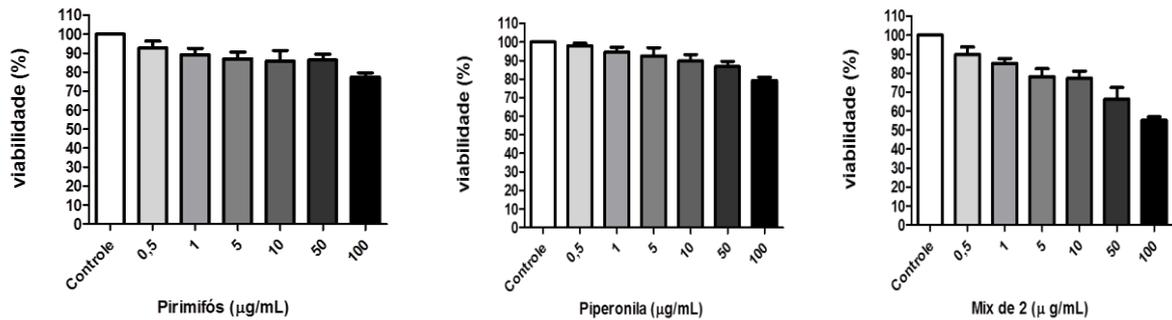
Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular HEK 293, em ensaio de MTT, exposição de 72 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Quando avaliado o tempo de exposição de 96 horas na célula HEK 293, foi observado que o PMF não apresentou efeito citotóxico significativo, mantendo-se entre 77 a 93% de viabilidade celular (Figura 25).

Quando a célula HEK 293 foi exposta ao PBO por 96 horas, não foi observado nenhum efeito citotóxico significativo em nenhuma das concentrações analisadas, mantendo a viabilidade das células dentro de uma faixa entre 79 a 98% (Figura 25).

A linhagem HEK 293 também foi exposta por 96 horas ao MIX, que foi altamente tóxico para célula na concentração 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (45% de efeito citotóxico), a concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (34% de efeito citotóxico). A partir da concentração 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não apresentou efeito citotóxico significativo, mantendo-se entre 77 a 90% de viabilidade celular (Figura 25).

Figura 25: Linhagem HEK 293 foi exposta ao PMF, ao PBO e associação das duas substâncias, em tempo exposição de 96 horas.



Legenda: Efeito citotóxico do PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações de 0,5; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagem celular HEK293, em ensaio de MTT, exposição de 96 horas. Os valores representam a soma de 2 ensaios independentes em quadruplicada. Os valores apresentados estão expressos em porcentagem da viabilidade das células.

Neste primeiro bloco de resultados, é possível concluir que as células de macrófagos, cardíaca, hepática e renal, são as mais sensíveis às substâncias testes nas maiores concentrações e a partir da exposição de 48 horas e observa-se que em alguns casos que associação das 2 substâncias gerou um efeito maior de toxicidade.

Tabela 2: Análise em porcentagem da toxicidade do ensaio MTT em diferentes linhagens celulares foram submetidas ao PMF, PBO (isolados e combinados):

CÉLULA	SUBSTÂNCIA TESTE	EXPOSIÇÃO	TOXICIDADE
AMJ2-C11	PMF 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	48 horas	45%
AMJ2-C11	MIX 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	72 horas	35 % e 36%
AMJ2-C11	PMF 100, 50 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PBO 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MIX 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	96 horas	39%, 34% e 32% 41% 73% e 40%
RAW 264-7	PMF 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PBO 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MIX100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	72 horas	51% 57% e 35% 46% e 38%
RAW 264-7	PMF 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PBO 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MIX 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	96 horas	55% e 37% 52% 58% e 40%
H9C2	PMF 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PBO 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MIX 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	48 horas	34% 33% 37%, 33%
H9C2	PBO 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MIX 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	72 horas	41% e 36% 38% e 34%
H9C2	PMF 100, 50 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PBO 100, 50 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MIX 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	96 horas	49%, 36%, 32% 44%, 39%, 34% 45%, 31%
HepG2	MIX 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	48, 72 e 96 horas	35%, 35%, 38%
HEK 293	MIX 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	24 horas	34%
HEK 293	PMF 100, 50 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PBO 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MIX 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	48 horas	54%, 45%, 34% 34% 40%, 35%
HEK 293	PMF 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PBO 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MIX 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	72 horas	39% 38%, 37% 42%
HEK 293	MIX 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	96 horas	45%, 34%

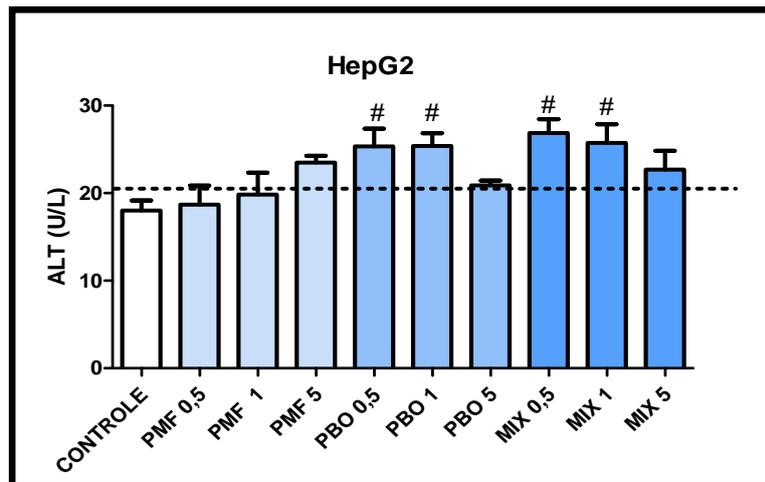
Legenda: Ensaio de viabilidade celular utilizando MTT. As células AMJ2-C11, RAW 264-7, H9C2 HepG2 e HEK 293 foram expostas por 24, 48, 72 e 96 horas, submetidas ao PMF, PBO e MIX (PMF+PBO), nas concentrações 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Determinação do percentual de células não viáveis.

4.2- Análises dos parâmetros bioquímicos

Com a finalidade de avaliar se a exposição nas concentrações não tóxicas (com viabilidade celular igual ou superior a 70%) de PMF, PBO e MIX poderiam interferir no metabolismo celular, foi realizado um estudo de painel bioquímico com as linhagens celulares HepG2 e HEK 293, ambas expostas aos PMF, PBO e MIX, nas concentrações 0,5; 1 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 48 horas de exposição.

Os dados apresentados na Figura 26 demonstraram que a célula HepG2 apresentou diferenças estatísticas significativas ao serem expostas às substâncias químicas do estudo resultando no aumento significativo da enzima ALT nas concentrações 0,5 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do sinergista PBO e ao MIX em comparação com o controle.

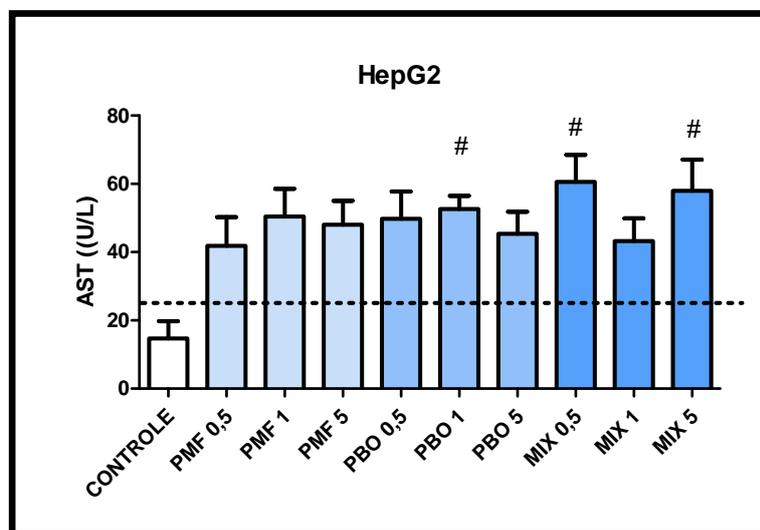
Figura 26- Parâmetro bioquímico ALT na célula HepG2 controles e tratados



Legenda: Análise bioquímica do marcador ALT na célula HepG2 exposta ao controle, PMF, PBO e MIX (PMF+PBO), nas concentrações 0,5; 1 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 48 horas de exposição. Dados são mostrados com média \pm EPM do parâmetro avaliado. N mínimo = 4. A avaliação estatística foi realizada utilizando o teste *ONE WAY* ANOVA seguida do pós-teste *Dunnnett's*. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos (#). A linha pontilhada representa os valores de referência do parâmetro em questão.

Os dados apresentados na Figura 27 demonstraram que a célula HepG2 apresentou diferenças estatísticas significativas quando expostas ao PBO e ao MIX. O PBO na concentração $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ resultou no aumento significativo da enzima AST. No MIX as concentrações 0,5 e $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentaram aumento significativo do marcador AST, porém na concentração $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ estatisticamente não foi observado alteração significativa para a célula.

Figura 27- Parâmetro bioquímico AST na célula HepG2 controles e tratados



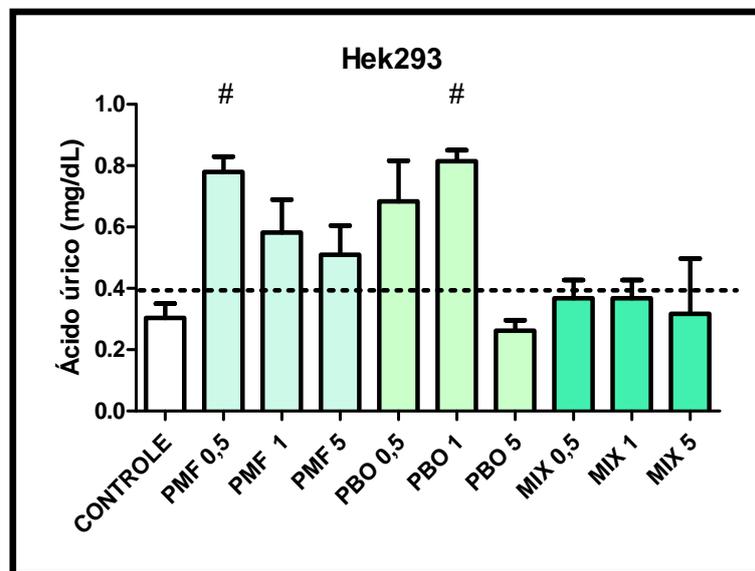
Legenda: Análise bioquímica do marcador AST na célula HepG2 exposta ao controle, PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações 0,5; 1 e $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante 48 horas de exposição. Dados são mostrados com média \pm EPM do parâmetro avaliado. N mínimo = 4. A avaliação estatística foi realizada utilizando o teste *ONE WAY ANOVA* seguida do pós-teste *Dunnett's*. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos (#). A linha pontilhada representa os valores de referência do parâmetro em questão.

Essas análises das enzimas AST e ALT indicam que a célula HepG2 ao ser exposta ao PBO e a mistura das duas substâncias, nas concentrações citadas, podem modular o metabolismo da função hepática na linhagem HepG2.

A partir dos dados obtidos com as células de origem hepática, foi realizado o estudo com as células de origem renal, HEK 293.

Na Figura 28 pode ser observado o efeito da exposição durante 48 horas das células da linhagem HEK 293 e os efeitos gerados nos níveis de ácido úrico. O PMF na menor concentração ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou aumento significativo do ácido úrico, porém nas maiores concentrações não foram observados efeitos. O PBO demonstrou uma variação na concentração intermediária ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentando aumento significativo nos níveis de ácido úrico presente no sobrenadante celular. Por outro lado, o MIX das 2 substâncias testadas, nas 3 diferentes concentrações não induziu nenhuma alteração significativa quando comparado ao grupo controle.

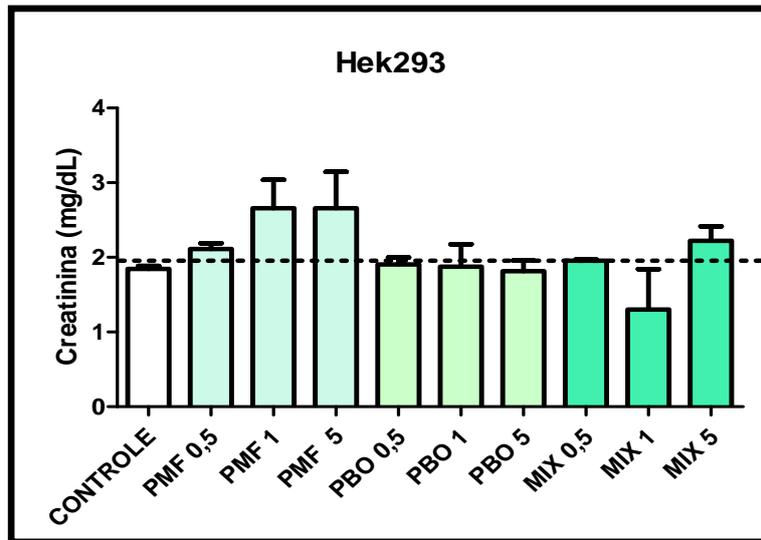
Figura 28- Parâmetro bioquímico ácido úrico da célula HEK 293 controles e tratados



Legenda: Análise bioquímica do marcador ácido úrico na célula HEK 293 exposta ao controle, PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações 0,5; 1 e $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante 48 horas de exposição. Dados são mostrados com média \pm EPM do parâmetro avaliado. N mínimo = 4. A avaliação estatística foi realizada utilizando o teste *ONE WAY ANOVA* seguida do pós-teste *Dunnett's*. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos (#). A linha pontilhada representa os valores de referência do parâmetro em questão.

O marcador creatinina na célula HEK 293, não apresentou nenhuma alteração estatisticamente significativa nas concentrações das substâncias analisadas, tanto na forma isolada como em mistura.

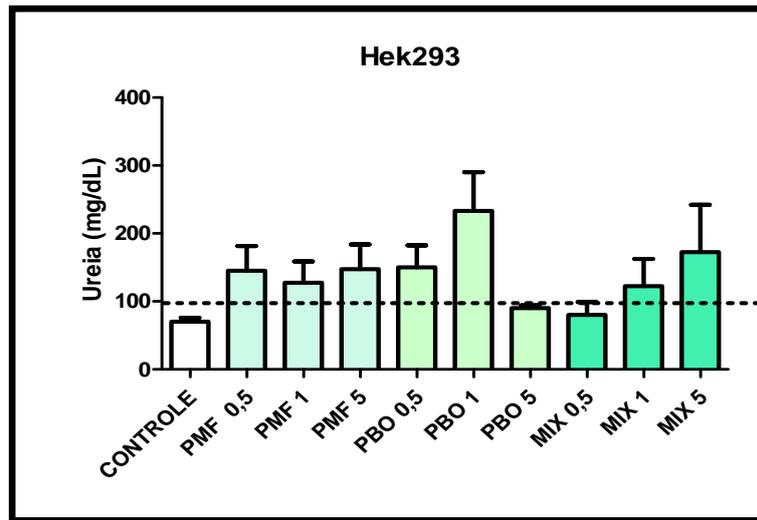
Figura 29- Parâmetro bioquímico creatinina da célula HEK 293 controles e tratados



Legenda: Análise bioquímica do marcador creatinina na célula HEK 293 exposta ao controle, PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações 0,5; 1 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 48 horas de exposição. Dados são mostrados com média \pm EPM do parâmetro avaliado. N mínimo = 4. A avaliação estatística foi realizada utilizando o teste *ONE WAY ANOVA* seguida do pós-teste *Dunnnett's*. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos (#). A linha pontilhada representa os valores de referência do parâmetro em questão.

Na avaliação da ureia na célula HEK 293, não apresentou nenhum resultado estatisticamente significativo nas concentrações das substâncias analisadas, tanto na forma isolada como em mistura.

Figura 30- Parâmetro bioquímico ureia da célula HEK 293 controles e tratados



Legenda: Análise bioquímica do marcador ureia na célula HEK 293 exposta ao controle, PMF, PBO e MIX (PMF+ PBO), nas concentrações 0,5; 1 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 48 horas de exposição. Dados são mostrados com média \pm EPM do parâmetro avaliado. N mínimo = 4. A avaliação estatística foi realizada utilizando o teste *ONE WAY ANOVA* seguida do pós-teste *Dunnett's*. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos (#). A linha pontilhada representa os valores de referência do parâmetro em questão.

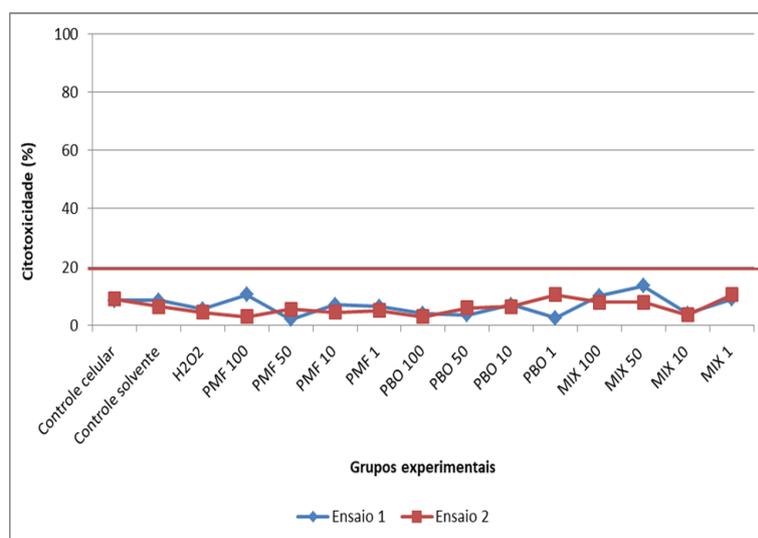
4.3- Avaliações de Citotoxicidade e Genotoxicidade- Ensaio cometa

O ensaio do cometa é considerado um método mais sensível em comparação com outros testes citogenéticos. Pois avalia alterações morfológicas cromossômicas, e danos no DNA induzidos por agentes considerados genotóxicos. No presente estudo, no teste de citotoxicidade e de genotoxicidade foram avaliados nas células HepG2 e no sangue total de camundongos.

4.3.1- Análise da Citotoxicidade nas células HepG2 e células de sangue total de camundongos- Ensaio cometa

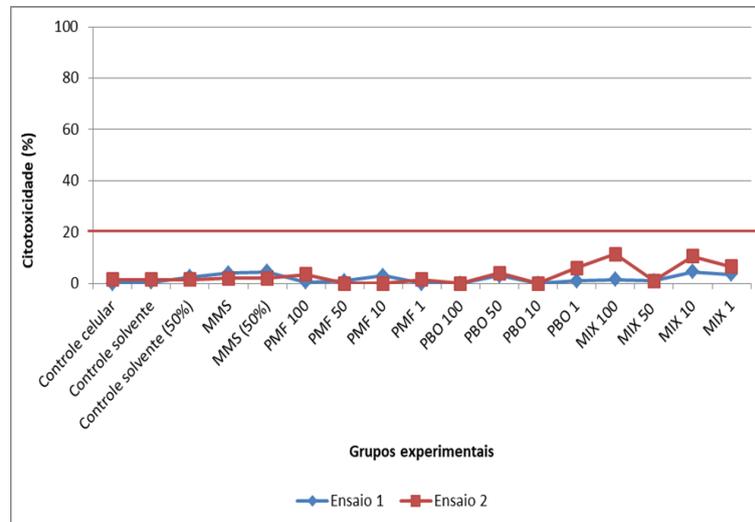
Na Tabela 3 estão apresentados os resultados de citotoxicidade das amostras PMF, PBO, MIX e controles nas células HepG2 e em sangue total de camundongos. Após a combinação de 2 ensaios independentes para avaliação de citotoxicidade foi constatado que o PMF, PBO e o MIX não são citotóxicos e a perda de viabilidade foi inferior a 20% em todos os grupos experimentais avaliados tanto no ensaio com as células HepG2 (Figura 31) quanto com sangue total de camundongos (Figura 32). A citotoxicidade máxima encontrada nos ensaios foi de 13,5% no MIX na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da célula HepG2.

Figura 31: Citotoxicidade em células HepG2 expostas ao PMF, PBO e MIX por 24 horas.



Legenda: A linha destacada em vermelho representa o limite aceitável de mortalidade das células para a execução dos ensaios de genotoxicidade (20%). Análise de 200 células por grupo experimental.

Figura 32: Citotoxicidade em células sanguíneas de camundongos Balb-c expostas ao PMF, PBO e MIX por 2 horas.



Legenda: A linha destacada em vermelho representa o limite aceitável de mortalidade das células para a execução dos ensaios de genotoxicidade (20%). Análise de 200 células por grupo experimental.

Tabela 3: Ensaio de Citotoxicidade em células HepG2 e sangue total de camundongos *in vitro*

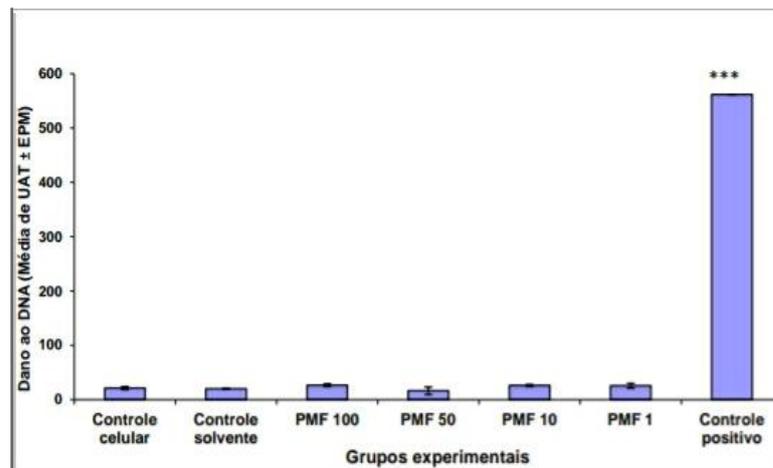
Grupos experimentais	Média de Citotoxicidade (%)			
	HepG2		Sangue total	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
Controle celular	8,5	9	0	1,5
Controle solvente	8,5	6,5	0,5	1,5
Controle solvente (50%)	-	-	2,5	1,5
H ₂ O ₂	5,5	4,5	-	-
MMS	-	-	4	2
MMS (50%)	-	-	4,5	2
PMF 100	10,5	3	0,5	3,5
PMF 50	2	5,5	1	0
PMF 10	7	4,5	3	0
PMF 1	6,5	5	0	1,5
PBO 100	4	3	0	0
PBO 50	3,5	6	3	4
PBO 10	7	6,5	0	0
PBO 1	2,5	10,5	1	6
MIX 100	10	8	1,5	11,5
MIX 50	13,5	8	1	1
MIX 10	4	3,5	4,5	10,5
MIX 1	9	10,5	3,5	6,5

Legenda: Ensaio de viabilidade celular utilizando diacetato de fluoresceína ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$) e brometo de etídio ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$). As células HepG2 foram expostas por 24 horas e no sangue total de camundongos a exposição foi de 2 horas, submetidas ao PMF, PBO e MIX (PMF+PBO), nas concentrações 100,50, 10, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foi realizada a análise microscópica de duzentas células por tratamento e para a determinação do percentual de células não viáveis. Resultados de 2 ensaios independentemente realizados.

4.3.2- Análise do ensaio de Genotoxicidade nas células HepG2- Ensaio cometa

Verificou-se que o PMF (Figura 33), PBO (Figura 34) e MIX (Figura 35) não induziram dano significativo ao DNA ($p > 0,05$) nas concentrações testadas quando comparadas ao controle solvente metanol (controle negativo). O controle positivo H_2O_2 100 μM induziu efeito genotóxico altamente significativo ($p < 0,001$). Nas Tabelas 4, 5 e 6 estão apresentados os resultados de dois ensaios independentes de genotoxicidade da célula HepG2, bem como a análise estatística.

Figura 33: Efeito do PMF na indução de dano ao DNA nas células HepG2.



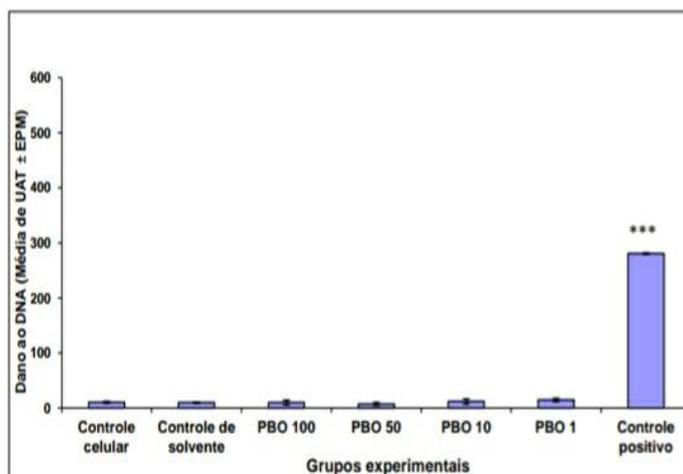
Legenda – Resultado do ensaio (Combinação de dois ensaios independentes). [1], [2] em célula HepG2 *in vitro* – Resultado dos ensaios U.A.T. – Unidades Arbitrárias Totais; CC-Controle celular; CS - Controle de solvente; Controle positivo H_2O_2 (100 μM); PMF – Pirimifós nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por exposição de 24 horas. Nota: Controle positivo H_2O_2 (100 μM); *** Resultado estatístico significativo ($p < 0,001$).

Tabela 4: Ensaio de genotoxicidade *in vitro* do PMF em célula HepG2 *in vitro*

PMF	U.A.T	Média	Desvio Padrão	Erro padrão	Variância	Teste F (p)	Teste t (p)
[1] CC	24	21,00	4,2426	3	18	-	-
[2] CC	18	-	-	-	-	-	-
[1] CS	21	20,00	1,4142	1	2	-	-
[2] CS	19	-	-	-	-	-	-
[1] H ₂ O ₂	559	561,50	3,5355	2,5	12,5	0,8846	0,00026***
[2] H ₂ O ₂	564	-	-	-	-	-	-
[1]PMF 100	29	26,50	3,5355	2,5	12,5	0,4845	0,068580
[2]PMF 100	24	-	-	-	-	-	-
[1] PMF 50	9	16,00	9,8995	7	98	0,1807	0,314305
[2] PMF 50	23	-	-	-	-	-	-
[1] PMF 10	28	26,00	2,8284	2	8	0,5903	0,057674
[2] PMF 10	24	-	-	-	-	-	-
[1] PMF 1	30	25,50	6,3640	4,5	40,5	0,2784	0,177584
[2] PMF 1	21	-	-	-	-	-	-

Legenda – Resultado do ensaio (combinação de dois ensaios independentes). [1], [2] em célula HepG2 *in vitro* – Resultado dos ensaios U.A.T. – Unidades Arbitrárias Totais; CC-Controlle celular; CS - Controle de solvente; Controle positivo H₂O₂ (100 µM); PMF – Pirimifós nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 µg mL⁻¹ por exposição de 24 horas. Nota: (***) indicam que o dano ao DNA foi significativo (p< 0,001).

Figura 34: Efeito do PBO na indução de dano ao DNA nas células HepG2.



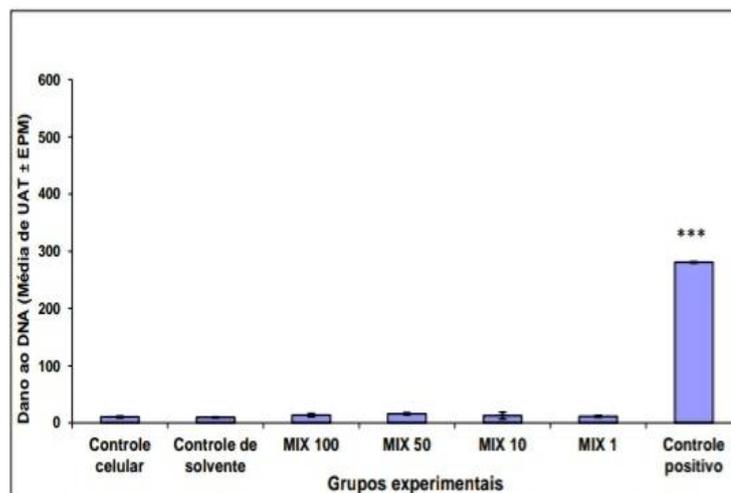
Legenda – Resultado do ensaio (combinação de dois ensaios independentes). [1], [2] em célula HepG2 *in vitro* – Resultado dos ensaios U.A.T. – Unidades Arbitrárias Totais; CC-Controlle celular; CS - Controle de solvente; Controle positivo H₂O₂ (100 µM); Controle positivo H₂O₂ (100 µM); PBO - Butóxido de piperonila; nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 µg mL⁻¹ por exposição de 24 horas. Nota: Controle positivo H₂O₂ (100 µM); *** Resultado estatístico significativo (p< 0,001).

Tabela 5: Ensaio de genotoxicidade *in vitro* do PBO em célula HepG2 *in vitro*

PBO	U.A.T	Média	Desvio Padrão	Erro padrão	Variância	Teste F (p)	Teste t (p)
[1] CC	12	10,50	2,1213	1,5	4,5	-	-
[2] CC	9	-	-	-	-	-	-
[1] CS	10,5	10,00	0,7071	0,5	0,5	-	-
[2] CS	9,5	-	-	-	-	-	-
[1] H ₂ O ₂	279,5	280,75	1,7678	1,25	3,125	0,8846	0,00026***
[2] H ₂ O ₂	282	-	-	-	-	-	-
[1]PBO 100	14,5	10,00	6,3640	4,5	40,5	0,1409	0,500000
[2]PBO 100	5,5	-	-	-	-	-	-
[1]PBO 50	10	7,25	3,8891	2,75	15,125	0,2290	0,214454
[2]PBO 50	4,5	-	-	-	-	-	-
[1]PBO 10	6,5	11,75	6,7175	4,75	45,125	0,1335	0,374599
[2]PBO 10	7	-	-	-	-	-	-
[1]PBO 1	7,5	4,75	3,8891	2,75	15,125	0,2290	0,115671
[2]PBO 1	2	-	-	-	-	-	-

Legenda: Resultado do ensaio (combinação de dois ensaios independentes). [1], [2] em célula HepG2 – Resultado dos ensaios U.A.T. – Unidades Arbitrárias Totais; CC - Controle celular; CS - Controle de solvente; Controle positivo H₂O₂ (100 µM); PBO - Butóxido de piperonila; nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 µg mL⁻¹ por exposição de 24 horas. Nota: (***) indicam que o dano ao DNA foi significativo (p < 0,001).

Figura 35: Efeito do MIX na indução de dano ao DNA nas células HepG2.



Legenda: Resultado do ensaio (Combinação de dois ensaios independentes) [1], [2] em célula HepG2 – Resultado dos ensaios U.A.T. – Unidades Arbitrárias Totais; CC - Controle celular; CS - Controle de solvente; Controle positivo H₂O₂ (100 µM); MIX- mistura de pirimifós + butóxido de piperonila; nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 µg mL⁻¹ por exposição de 24 horas. Nota: Controle positivo H₂O₂ (100 µM); *** Dano ao DNA significativo (p < 0,001).

Tabela 6: Ensaio de genotoxicidade *in vitro* do MIX (PMF + PBO) em célula HepG2

MIX	U.A.T	Média	Desvio Padrão	Erro padrão	Variância	Teste F (p)	Teste t (p)
[1] CC	24	21,00	4,2426	3	18	-	-
[2] CC	18	-	-	-	-	-	-
[1] CS	21	20,00	1,4142	1	2	-	-
[2] CS	19	-	-	-	-	-	-
[1] H ₂ O ₂	559	561,50	3,5355	2,5	12,5	0,8846	0,000026***
[2] H ₂ O ₂	564	-	-	-	-	-	-
[1]MIX 100	43	32,00	15,5563	11	242	0,1154	0,195396
[2]MIX 100	21	-	-	-	-	-	-
[1] MIX 50	29	26,00	4,2426	3	18	0,4097	0,099108
[2] MIX 50	23	-	-	-	-	-	-
[1] MIX 10	37	25,50	16,2635	11,5	264,5	0,1104	0,340362
[2] MIX 10	14	-	-	-	-	-	-
[1] MIX 1	20	23,00	4,2426	3	18	0,4097	0,221457
[2] MIX 1	26	-	-	-	-	-	-

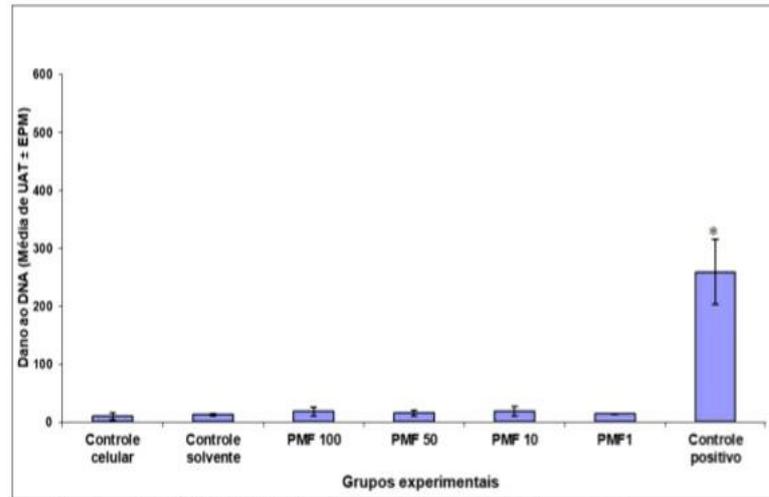
Legenda: Resultado do ensaio (Combinação de dois ensaios independentes). [1], [2] em célula HepG2 *in vitro* – Resultado dos ensaios U.A.T. – Unidades Arbitrárias Totais; CC -Controle celular; CS - Controle de solvente; Controle positivo H₂O₂ (100 µM); MIX- mistura de pirimifós + butóxido de piperonila; nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 µg mL⁻¹ por exposição de 24 horas.

Nota: (***) indicam que o dano ao DNA foi significativo (p< 0,001).

4.3.3- Análise do ensaio de Genotoxicidade *in vitro* em sangue total de camundongos

Assim como nas células HepG2 não foram observados resultados estatisticamente significativos de dano ao DNA após a exposição as amostras de PMF (Figura 36), PBO (Figura 37) e ao MIX (Figura 38). Nas Tabelas 7, 8 e 9 estão discriminados os resultados de dois ensaios independentes de genotoxicidade em sangue total de camundongos e a análise estatística.

Figura 36: Efeito do PMF na indução de dano ao DNA *in vitro* nas células de sangue total de camundongos.



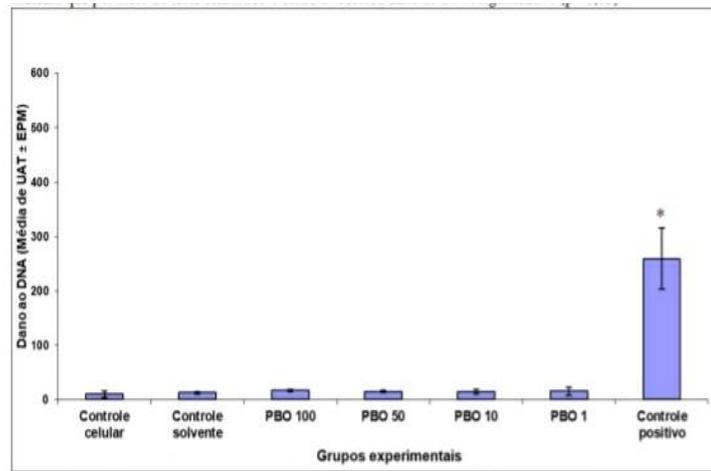
Legenda – Resultado do ensaio (Combinação de dois ensaios independentes). [1], [2] em sangue total de camundongos *in vitro* – Resultado dos ensaios U.A.T. – Unidades Arbitrárias Totais; CC-Controle celular; CS - Controle de solvente; Controle positivo MMS (160 μM); PMF – Pirimifós nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por exposição de 2 horas. Nota: Controle positivo MMS (160 μM); * Resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Tabela 7: Ensaio de genotoxicidade *in vitro* do PMF em sangue total de camundongos *in vitro*

PMF	U.A.T	Média	Desvio Padrão	Erro padrão	Variância	Teste F (p)	Teste t (p)
[1] CC	16	10,00	8,4853	6	72	-	-
[2] CC	4	-	-	-	-	-	-
[1] CS	15	12,50	3,5355	2,5	12,5	-	-
[2] CS	10	-	-	-	-	-	-
[1] MMS	203	259,00	79,1960	56	6272	0,1359	0,023771*
[2] MMS	315	-	-	-	-	-	-
[1]PMF 100	11	18,50	10,6066	7,5	112,5	0,4097	0,263567
[2]PMF 100	26	-	-	-	-	-	-
[1] PMF 50	11	15,50	6,3640	4,5	40,5	0,6457	0,309500
[2] PMF 50	20	-	-	-	-	-	-
[1] PMF 10	11	19,00	11,3137	8	128	0,3856	0,259589
[2] PMF 10	27	-	-	-	-	-	-
[1] PMF 1	15	14,00	1,4142	1	2	0,4845	0,316746
[2] PMF 1	13	-	-	-	-	-	-

Legenda: Resultado do ensaio (Combinação de dois ensaios independentes). [1], [2] em sangue total de camundongos – Resultado dos ensaios U.A.T. – Unidades Arbitrárias Totais; CC -Controle celular; CS - Controle de solvente; Controle positivo MMS (160 μM); PMF - Pirimifós; nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por exposição de 2 horas. Nota: (*) indicam que por meio do teste estatístico T *student* ocorreu dano ao DNA significativo ($p < 0,05$).

Figura 37: Efeito do PBO na indução de dano ao DNA *in vitro* nas células de sangue total de camundongos.



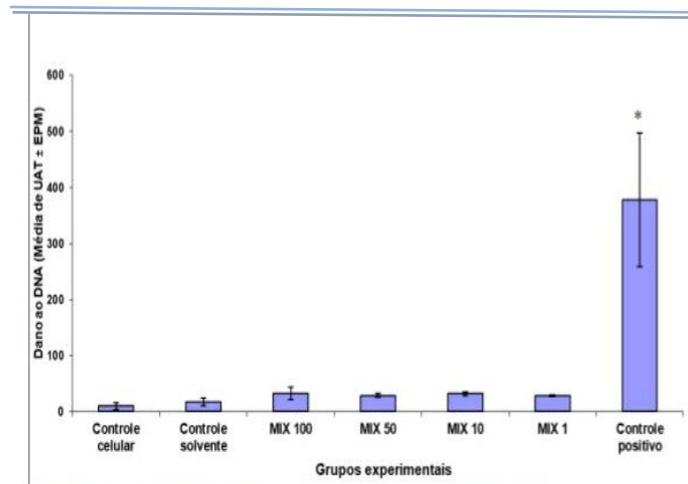
Legenda – Resultado do ensaio (Combinação de dois ensaios independentes). [1], [2] em sangue total de camundongos *in vitro* – Resultado dos ensaios U.A.T. – Unidades Arbitrárias Totais; CC-Controle celular; CS - Controle de solvente; Controle positivo MMS (160 μM); PBO – Butóxido de piperonila nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por exposição de 2 horas. Nota: Controle positivo MMS (160 μM); * Resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Tabela 8: Ensaio de genotoxicidade *in vitro* do PBO em sangue total camundongos *in vitro*

	U.A.T	Média	Desvio Padrão	Erro padrão	Variância	Teste F (p)	Teste t (p)
[1] CC	16	10,00	8,4853	6	72	-	-
[2] CC	4	-	-	-	-	-	-
[1] CS	15	12,50	3,5355	2,5	12,5	-	-
[2] CS	10	-	-	-	-	-	-
[1] MMS	203	259,00	79,1960	56	6272	0,1359	0,023771*
[2] MMS	315	-	-	-	-	-	-
[1] PBO 100	19	17,00	2,8284	2	8	0,8591	0,147533
[2] PBO 100	15	-	-	-	-	-	-
[1] PBO 50	17	15,00	2,8284	2	8	0,8591	0,258316
[2] PBO 50	13	-	-	-	-	-	-
[1] PBO 10	11	15,00	5,6569	4	32	0,7112	0,324534
[2] PBO 10	19	-	-	-	-	-	-
[1] PBO 1	8	15,50	10,6066	7,5	112,5	0,4097	0,370420
[2] PBO 1	23	-	-	-	-	-	-

Legenda: Resultado do ensaio (Combinação de dois ensaios independentes). [1], [2] em sangue total de camundongos – Resultado dos ensaios U.A.T. – Unidades Arbitrárias Totais; CC - Controle celular; CS - Controle de solvente; Controle positivo MMS (160 μM); PBO - Butóxido de piperonila; nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por exposição de 2 horas. Nota: (*) indicam que por meio do teste estatístico T *student* ocorreu dano ao DNA significativo ($p < 0,05$).

Figura 38: Efeito do MIX na indução de dano ao DNA *in vitro* nas células de sangue total de camundongos.



Legenda – Resultado do ensaio (Combinação de dois ensaios independentes). [1], [2] em sangue total de camundongos *in vitro* – Resultado dos ensaios U.A.T. – Unidades Arbitrárias Totais; CC-Controle celular; CS - Controle de solvente; Controle positivo MMS (160 μ M); MIX (mistura de pirimifós + butóxido de piperonila), nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 μ g mL⁻¹ por exposição de 2 horas. Nota: Controle positivo MMS (160 μ M); * Resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Nota: Controle positivo MMS (160 μ M); * Resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Tabela 9: Ensaio de genotoxicidade *in vitro* do MIX em sangue total de camundongos *in vitro*

MIX	U.AT	Média	Desvio Padrão	Erro padrão	Variância	Teste F (p)	Teste t (p)
[1] CC	16	10,00	8,4853	6	72	-	-
[2] CC	4	-	-	-	-	-	-
[1] CS	24	17,50	9,1924	6,5	84,5	-	-
[2] CS	11	-	-	-	-	-	-
[1] MMS	258	377,50	168,9985	119,5	28560,5	0,0639	0,045831*
[2] MMS	497	-	-	-	-	-	-
[1] MIX 100	21	32,50	16,2635	11,5	264,5	0,6550	0,186956
[2] MIX 100	44	-	-	-	-	-	-
[1] MIX 50	25	29,00	5,6569	4	32	0,7024	0,135425
[2] MIX 50	33	-	-	-	-	-	-
[1] MIX 10	29	32,00	4,2426	3	18	0,5506	0,090042
[2] MIX 10	35	-	-	-	-	-	-
[1] MIX 1	30	28,50	2,1213	1,5	4,5	0,2888	0,120464
[2] MIX 1	27	-	-	-	-	-	-

Legenda: Resultado do ensaio (Combinação de dois ensaios independentes). [1], [2] em sangue total de camundongos *in vitro* – Resultado dos ensaios U.A.T. – Unidades Arbitrárias Totais; CC - Controle celular; CS - Controle de solvente; Controle positivo MMS (160 μ M); MIX- mistura de pirimifós + butóxido de piperonila; nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 μ g mL⁻¹ por exposição de 24 horas. Nota: (*) indicam que por meio do teste estatístico T *student* ocorreu dano ao DNA significativo ($p < 0,05$).

5- DISCUSSÃO

A utilização de agrotóxicos na agricultura no Brasil e no mundo tem aumentando muito, a cada ano que se passa. Lucas et al., 2001, Mills; Zahm, 2001, Catano et al., 2008, Bonner et al., 2010, Mackenzie-Ross et al., 2010, constataram nos seus estudos que os agrotóxicos tem provocado a contaminação ambiental, do solo, das águas, dos animais, especialmente aos seres humanos podendo representar risco de saúde evidenciados pelos efeitos carcinogênicos por alguns agrotóxicos e um aumento no risco de desenvolver doenças malignas em trabalhadores expostos, gerando consequências tóxicas que se manifestam de diferentes maneiras, como: bioacumulação, bioampliação, toxicidade crônica, resposta imune aguda, reação alérgica, efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos (ECOBICHON, 2016).

O impacto ambiental dos agrotóxicos costuma ser maior do que o desejado por quem os utilizam, pois mais de 98% dos inseticidas são pulverizados e 95% dos herbicidas atinge um destino diferente de suas espécies-alvo, incluindo espécies não alvos como: ar, água e alimentos (DAMALAS, 1996). Assim, o biomonitoramento genotóxico das populações expostas a agentes químicos mutagênicos é um importante sistema de alerta precoce para doenças genéticas ou cânceres. Os trabalhadores rurais são os profissionais que exibem menor risco de mortalidade desenvolvem doenças cardiovasculares, porém apresentam maior incidência de desenvolver neoplasias combinadas do que a população geral, eles estão constantemente em contato com variados tipos de substâncias químicas potencialmente carcinogênicas, apresentando, com isso, uma mortalidade maior para algumas neoplasias específicas como: próstata, mieloma múltiplo, câncer de lábio, (DAVIS et al.; 1992; SCHREINEMACHERS et al.; 1999), câncer de pulmão (BEANE FREEMAN et al., 2005), câncer de bexiga e cólon (KOUTROS et al., 2009), câncer gástrico (MILLS; YANG, 2007), câncer pancreático (ANDREOTTI et al., 2009), linfoma de Hodgkin (ORSI et al., 2009), linfoma não-Hodgkin (ORSI et al., 2009, BERTRAND et al., 2010), leucemia (BONNER et al., 2010), linfoma múltiplo (BARIS et al., 2004), sarcoma da vesícula biliar (SHUKLA et al., 2001), distúrbios reprodutivos (ARBUCKLE et al., 2001), doença de Parkinson (JENNER, 2001) e doença de Alzheimer (GAUTHIER et al., 2001).

A avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade dos agrotóxicos é difícil, pois a exposição normalmente não ocorre apenas a um único agrotóxico e sim com múltiplos agrotóxicos, o que pode resultar numa interação de efeitos como: aditivos, sinérgicos, potenciação, antagonismo funcional, químico.

A utilização das culturas de células torna-se cada vez mais uma prática comum nos laboratórios de controle de qualidade, para avaliar o potencial de toxicidade de substâncias. Os ensaios *in vitro* vêm substituindo os ensaios *in vivo*, principalmente pelo seu menor custo, boa reprodutibilidade, facilidade de realização e demanda sustentável do mercado consumidor (BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO, 2022).

A exposição *in vitro* faz uma triagem preditiva do potencial citotóxico e genotóxico dos agrotóxicos neste estudo, para futuros ensaios *in vivo*, analisando os danos causados às células pelos agrotóxicos que dependem da biodisponibilidade, metabolismo e taxa de renovação das células. As concentrações menores e intermediárias dos agrotóxicos podem danificar certas funções das células e as maiores concentrações, causam citotoxicidade e morte celular. O tempo de exposição curto ou longo e a determinação do alvo celular podem prover dados para avaliar a toxicidade, através de biomarcadores que são importantes para entender o seu mecanismo de ação. Os agrotóxicos podem afetar a membrana plasmática, estrutura, função, síntese de DNA, o nível de enzimas peroxissomais e índices bioquímicos (CAMATINI et al., 1996).

No presente estudo, utilizou-se o ensaio do MTT, para avaliar o potencial de citotoxicidade das substâncias de diferentes ascendências ou modificações metabólicas nas diversas linhagens celulares de origens animal e humano, podendo resultar ou não em morte.

Neste contexto se insere, as substâncias analisadas no presente estudo tais como o PMF que pertence à classe dos organofosforados, que possui como mecanismo de ação a inibição da AChE, o que gera neurotoxicidade atingindo órgãos alvos sistêmicos, o que impede a degradação da acetilcolina e ocasiona estímulos constantes a nível de receptores nicotínicos e muscarínicos (ALTENHOFEN et al., 2017; BERNE; LEVY, 2018).

O PMF é tóxico para os seres vivos e meio ambientes. A exposição por inalação resulta em náusea, tontura, disfunção muscular, insuficiência respiratória e edema pulmonar. Além disso, têm sido associados a distúrbios autoimunes, podem afetar muitos sistemas e órgãos, incluindo os sistemas nervosos. O PMF é neuroativo e atua como agentes neurotóxicos, gerando polineuropatia tardia induzida e o distúrbio neuropsiquiátrico crônico. Acredita-se que desempenhem um papel crítico em afetar a função cerebral de desenvolvimento, memória, proliferação neural, gerando efeitos neurológicos (doenças de Alzheimer e Parkinson, ansiedade, acidente vascular cerebral isquêmico), hematopoiético, doenças cardiovasculares (insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio) e reprodutivos (HANDY et al., 2002 ; NEISHABOURI et al., 2004 ; GOKALP et al., 2005, JOKANOVIC, 2018).

Já o PBO é utilizado como sinergista com inseticidas organofosforados e piretróides para controlar pragas em locais de armazenamentos de grãos. O PBO inibe a enzima oxidases multifuncional que é responsável pela defesa natural dos insetos e causa a quebra oxidativa dos pesticidas. Com a inibição das enzimas oxidases multifuncionais, o PBO aumenta a toxicidade dos pesticidas e sendo necessárias doses menores para combater as pragas (HERNANDEZ et al., 2013). O PBO produz *in vivo* a inibição dos seguintes sistemas enzimáticos: transaminase glutâmico-oxalacética; transaminase glutâmico- pirúvica, lactato desidrogenase e sistema oxigenase, diminuição na filtração glomerular, hipotermia, depleção dos níveis hepáticos da glutathione (KLAASSEN, 2008; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2019).

A exposição ao PBO pode causar a morte, dependendo da concentração e da exposição. O PBO possui características alergênicas e são absorvidos através das vias dérmica e pulmonar. Ocasionalmente sobre os pulmões aumentando a secreção nasal, asma e pneumonite. Os sintomas por intoxicações crônicas com altas doses podem afetar o sistema nervoso central, provocando coma, convulsões ou depressão respiratória, além de afetar o sangue, rins, pulmões, fígado, pele, sistema reprodutor masculino e sistema nervoso central. A intoxicação aguda causada por PBO pode causar os seguintes sintomas: formigamento nas pálpebras e nos lábios, irritação das conjuntivas e mucosas, espirros, coceira intensa, mancha de pele, secreção e obstrução, reação aguda de hipersensibilidade, excitação e convulsões na fase mais avançada e grave da intoxicação aguda (SCHVARTSMAN, 1988; BRASIL, 1996).

O PBO e seu metabolismo podem estar ligados a vários impactos graves à saúde, dependendo da espécie, dose e período de exposição. No trabalho de Oki e colaboradores (2019), analisou através da bioinformática, que o PBO pode causar efeitos adversos sobre as células hepáticas (HepG2): cirrose hepática, insuficiência hepática, carcinomas, fígado gorduroso, tumores hepáticos, câncer, além de ser classificado como carcinógeno não genotóxico após investigação *in vitro* e *in vivo*.

De fato, como é quase impossível testar todas as combinações possíveis de produtos químicos, a toxicologia de mistura visa desenvolver métodos que possam prever efeitos combinados a partir de dados disponíveis em produtos químicos individuais (KORTENKAMP, 2009; ERMLER et al., 2014). E na literatura existe uma escassez de trabalhos que analisam a toxicidade *in vitro* do PMF e do PBO, individualmente e em combinação. Diante disto, foi proposto um estudo *in vitro* para avaliar os efeitos preditivos citotóxicos e genotóxicos do PMF e do PBO, bem como os efeitos dessas substâncias de forma individual e combinada.

Nos resultados do presente estudo de viabilidade celular da linhagem de macrófagos AMJ2-C11, foi possível observar na figura 6, que estas substâncias não se mostraram tóxicas para estas células, tanto de forma isolada quanto combinada em exposição curta de 24 horas. Não foram tóxicos em nenhuma das concentrações analisadas. Vale ressaltar que isto não significa que estas substâncias sejam seguras. Corroborando com o trabalho de Parny e colaboradores (2014), que avaliou a viabilidade celular com Alamar Blue (resazurina) demonstrou a ausência de toxicidade em macrófagos humanos quando exposto a outro organofosforado (clorpirifós) nas concentrações 0,01, 0,1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ em 24 horas de exposição.

Quando a célula AMJ2-C11, foi submetida à exposição mais prolongada de 48 horas, como mostra a figura 7. Observou-se que o PMF na maior concentração ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) teve maior efeito citotóxico, porém o PBO e a mistura dos IAs não apresentaram toxicidade significativa. Isto mostra que o PMF se apresentou mais seguro na exposição de 24 horas, no entanto quando aumentou o tempo de exposição apresentou efeito tóxico.

O agrotóxico PMF e o sinergista PBO, na figura 8, quando isolados não foram tóxicos para célula AMJ2-C11 no período de 72 horas, contudo quando combinados as substâncias nas maiores concentrações (100 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) reduziram de forma significativa a viabilidade desta célula.

Na exposição de 96 horas a linhagem de macrófago AMJ2-C11 (figura 9), demonstrou que o pesticida PMF nas concentrações (10 , 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) reduziram significativamente a viabilidade da célula de macrófago. Porém o sinergista PBO na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ mostrou-se mais tóxico para célula, vale ressaltar que o só foi tóxico num tempo maior de exposição, uma vez que não alterou significativamente a viabilidade celular nos períodos de 24, 48 e 72 horas. E por fim, observou-se que quando essas substâncias foram combinadas continuavam mostrando-se tóxicas apenas nas duas maiores concentrações (50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Notou-se que o PMF e o sinergista PBO na maior concentração foram mais tóxicos para a célula de macrófago, possivelmente sugestivo de efeito sinérgico ao associar as duas substâncias.

Quando avaliado outra linhagem de macrófago RAW 267-4. De forma geral, ela apresentou uma sensibilidade muito semelhante à linhagem AMJ2-C11, onde o efeito tóxico do PMF, do PBO e da associação entre as duas substâncias ocorreu apenas nos maiores tempos de exposição (72 e 96 horas).

Os defensivos agrícolas promovem a disfunção das células imunes, gerando imunossupressão, causando doenças infecciosas ou imune estimulação levando a doenças

autoimunes, reações inflamatórias e alérgicas (YASUNAGA et al., 2015; OGASAWARA et al., 2017). Vários estudos demonstraram que organofosforados e carbamatos causam alergias, doenças autoimunes, asma e infecções respiratórias bloqueando as atividades citotóxicas de células como Natural Killer e linfócitos T citotóxicos (LI, 2007; FUKUYAMA et al., 2009; CORSINI et al., 2013; JORSARAEI et al., 2014). Além disso, os agrícolas também comprometem o estado funcional dos macrófagos (CORSINI et al., 2013; WEIS et al., 2019).

Helali e colaboradores (2016), avaliaram *in vitro* o inseticida clorpirifós em macrófagos murinos em concentrações de 0,01 e 10 $\mu\text{mol/L}$ evidenciando a redução da atividade da enzima lisossômica dos macrófagos e a produção induzida por LPS de citocinas inflamatórias interleucina (IL-)1 β e TNF- α .

Outro estudo realizado por Proskocil e colaboradores (2019), analisaram o inseticida organofosforado clorpirifós evidenciando a indução da expressão e secreção de mRNA de TNF- α em altas doses (30 e 100 $\mu\text{mol/L}$) em linhagem de macrófagos.

Ogasawara e colaboradores (2017), avaliaram os efeitos do inseticida OP diazinon, nas concentrações (0; 50;100; 200; 300; 400; 500; 600 μM), exposta por 24 horas na célula RAW 264-7. A análise foi feita ao final da incubação, submetida ao ensaio WST-1. No estudo mostrou que o diazinon foi tóxico para a célula. O diazinon levou a geração a produção de proteínas de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, expressões de ciclooxigenase (Cox-2), óxido nítrico sintase induzível e moléculas de superfície celular, incluindo CD40, CD86 e MHC Classe II, aumentando significativamente a expressão de mRNA e produção de proteínas de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 em células. No entanto, a atividade fagocítica foi reduzida em células RAW 264.7.

A cardiotoxicidade está associada com vários agrotóxicos, como organofosforados, carbamatos, organotiofosfatos, piretróides, organoclorados que têm sido demonstrados em muitos relatos de casos. Em estudos *in vivo* e epidemiológicos relataram as consequências cardiovasculares por intoxicação aguda por OP. A lesão de isquemia/reperfusão miocárdica contribui para a exacerbação da doença cardíaca, causando arritmias cardíacas, taquicardia, infarto do miocárdio e até morte súbita que incluem arritmias ventriculares e taquicardia com risco de vida (ZAFIROPOULOS et al., 2014; GEORGIADIS et al., 2018; ANAKWUE, 2019). Sendo assim é importante estudar os efeitos tóxicos do PMF, PBO e a mistura sobre as células cardíacas.

As células H9C2 são frequentemente usadas como modelo *in vitro* para analisar os mecanismos celulares e as vias de sinalização envolvidas na cardiotoxicidade causadas por drogas. Essas células conservam muitos marcadores moleculares de cardiomiócitos e

apresentam características morfológicas de cardiomiócitos primários aos padrões do metabolismo energético, como: função, metabolismo, bioenergética e morfologia das mitocôndrias (KUZNETSOV et al., 2015).

Na célula cardíaca H9C2, numa curta exposição de 24 horas, (figura 14) os pesticidas isolados ou combinados não se mostraram citotóxicos para a célula.

Numa exposição pouco mais prolongada de 48 horas da célula H9C2 ao PMF, PBO e o MIX (figura 15), foi demonstrado que o pesticida PMF na maior concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ reduziu significativamente a viabilidade da célula. Porém o sinergista PBO, na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ mostrou-se ligeiramente mais tóxico a célula. No entanto, quando o PMF foi associado ao PBO resultou no efeito citotóxico a partir da concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Quando a célula cardíaca foi exposta ao período maior de exposição de 72 horas (figura 16), o PMF não apresentou efeito citotóxico em nenhuma das concentrações analisadas, resultado diferente ao observado na exposição de 48 horas. Já o PBO parece ser mais tóxico na exposição de 48 horas, porque a partir da concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ demonstrou ser mais tóxico, reduzindo a viabilidade celular.

Na exposição de 96 horas das células H9C2 às substâncias analisadas, como demonstra a figura 17, o pesticida PMF nas maiores concentrações (100 , 50 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) reduziu significativamente a viabilidade da célula cardíaca. O sinergista PBO, também nas mesmas concentrações reduziu significativamente a viabilidade celular. E por fim, evidenciou-se que quando essas substâncias foram combinadas continuavam mostrando-se tóxicas apenas nas duas maiores concentrações.

Segundo Atale e colaboradores (2014) a viabilidade celular da linhagem celular H9C2 com o ensaio MTT, na exposição de 48 horas ao pesticida organofosforado malation, nas concentrações de 5 , 10 , 15 , 20 , 25 , 30 , 35 e $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, desencadeou diminuição de 25% no tamanho da célula. Além disso, a concentração $20 \mu\text{g/mL}$ foi determinada como DL50 do estudo e a partir dessa dose foi observada a mediação do estresse na linhagem celular H9C2.

Felemban e colaboradores (2015) analisaram a viabilidade celular da linhagem celular H9C2 através do ensaio MTT, as células foram expostas por 24 e 48 horas ao clorpirifós ($12,5$; 25 ; 50 ; 100 ; $200 \mu\text{M}$). E constatou que o Clorpirifós nas concentrações $200 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$ foram citotóxicos para a célula H9C2.

A célula HepG2, linhagem celular derivada de hepatocarcinoma humano e tem sido comumente utilizada como ferramenta na avaliação de metabolismo de xenobióticos e toxicidade hepática. Este modelo experimental está entre os sistemas *in vitro* mais sofisticados que auxiliam no estudo da citotoxicidade induzida por xenobióticos, permitindo uma

compreensão sobre o transporte, metabolismo e eliminação dessas substâncias pelo fígado e na interação e indução de hepatotoxicidade (HOUCK et al., 2009; JUDSON et al., 2010). Devido à função essencial que o fígado desempenha no organismo, principalmente a absorção e biotransformação/desintoxicação de substâncias, torna-se um importante alvo para os efeitos nocivos dos xenobióticos, pelos quais podem provocar perturbação da sua homeostasia e danos até mesmo irreversíveis (JAESCHKE et al., 2002).

Quando as células de hepatócito foram expostas por 24 horas (figura 18) ao PMF, PBO e a mistura não apresentaram alterações significativas na viabilidade celular, sendo consideradas não citotóxicas.

A célula de origem hepática foi exposta aos períodos mais longos, no presente estudo, como ilustram as figuras 19, 20 e 21, o agrotóxico PMF e o sinergista PBO apresentaram efeitos semelhantes tanto individualmente como combinados nos períodos de 48, 72 e 96 horas. Os resultados da análise da HepG2, com as substâncias PMF e PBO não demonstraram alterações significativas em nenhuma das concentrações das substâncias isoladas. Porém quando as substâncias foram combinadas, observou-se que apenas na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ reduziu a viabilidade celular, sendo sugestivo de efeito sinérgico. Diferente ao observado na exposição de 24 horas, onde os inseticidas isolados ou combinados não se mostraram citotóxicos para células.

De acordo com Song et al. (2012), as HepG2 são utilizadas com sucesso para prever o metabolismo, a citotoxicidade e a genotoxicidade de substâncias químicas. Naji-Ali et al. (1994) indicam o uso das células HepG2 em ensaios para detecção de citotoxicidade e genotoxicidade de compostos conhecidos e de misturas complexas de poluentes e ainda sugerem que este sistema teste seja utilizado como uma ferramenta sensível para triagem de poluentes ambientais.

Camatini e colaboradores (1996) avaliaram a viabilidade através do corante azul de trypan nas células de hepatócitos de ratos, com o PMF $4.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Benomil $8.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (isoladamente) ou em combinação com Benomil ($25 \mu\text{g mL}^{-1} + 4.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $50 \mu\text{g mL}^{-1} + 8.3 \mu\text{g mL}^{-1}$), respectivamente, exposições por 2 horas, 30 e 15 min, e observaram que não houve efeito citotóxico e reforçou a depleção de glutatona. Corroborando com os resultados do presente estudo, que em nenhuma das concentrações e tempos analisados não tiveram efeito citotóxico.

Moore e colaboradores 2010, avaliaram a célula HepG2 exposta ao pesticida organofosforado malatião nas concentrações 0, 6, 12, 18 e 24 mM por 48 horas e a análise foi realizada com o ensaio MTT. Os resultados do estudo indicaram que o malatião na baixa

concentração (6 mM) resultou no efeito mitogênico no crescimento de células HepG2. Esse aumento significativo na viabilidade celular em comparação com o controle indica que o malatião induz a proliferação celular em níveis baixos de exposição. Porém, quando as células foram expostas as concentrações 12 e 24 mM de malatião e superiores, as percentagens de viabilidade celular diminuíram significativamente de uma forma dependente da concentração. Este trabalho diverge dos resultados do presente.

Corroborando com o estudo realizado por Hreljac e colaboradores (2008), investigaram os compostos organofosforados paration metil (PT), paraoxon metil (PO) e dimefox (DF) 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ analisaram a proliferação celular nas células HepG2, em diferentes tempos de exposições por 24, 48, 72 e 96 horas, através do MTT. Observaram o paration metil não afetou significativamente a proliferação da célula HepG2. O paraoxon metil causou redução da proliferação celular na concentração 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto nas concentrações mais baixas não tiveram nenhum efeito. O dimefox induziu aumento da proliferação celular em todas as concentrações, após 96 horas de exposição, visto que o número de células viáveis foi significativamente maior do que o controle em todas as concentrações, exceto a mais alta (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

A pesquisa realizada por Zhang e colaboradores (2021) avaliou através do ensaio MTT a viabilidade da célula HepG2 com as concentrações 10, 20, 40, 80, 160, 320 e 640 $\mu\text{mol/L}$) Tricloropiridinol; 3, 5, 6-tricloro-2-piridinol são os principais metabólitos do pesticida organofosforado clorpirifós durante 24 horas de exposição. Relatou que a viabilidade celular (10, 40, 160, 640 $\mu\text{mol/L}$) foi significativamente inibida de maneira dependente da concentração.

O trabalho Edwards e colaboradores 2013, investigaram a viabilidade da célula HepG2, através do ensaio de MTT, exposição por 48 horas, onde observaram que o metil paration e o paration (OPs) reduzem gradualmente a viabilidade das células de maneira dose-dependente, apresentando valores de LD_{50} de 26,20 mM e 23,58 mM, respectivamente, diferente do resultado do PMF na exposição de 48 horas, que não apresentou efeito citotóxico no presente estudo.

Yun e colaboradores (2017), realizaram um estudo que avaliou a citotoxicidade em diversas linhagens celulares, que incluem a célula HepG2 e HEK 293, com ensaio de MTT. As células foram incubadas por 24 horas, após o meio ser removido e substituído por meio fresco contendo 0,1% de DMSO para controle, as concentrações dos inseticidas analisados piretróides incluindo permetrina, β -cipermetrina foram 1,25; 2,5; 5; 10; 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após à exposição a concentração 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de piretróides, a permetrina promoveu o crescimento

celular na célula HEK 293, assim como a β -cipermetrina. Estas células possuíam maior viabilidade do que o controle, porém, à medida que as concentrações utilizadas foram aumentadas, os piretróides mostraram uma tendência aumentada para inibir a viabilidade celular. Na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ do piretróide, permetrina reduziu a viabilidade da célula humana HepG2. Esta célula possuía a viabilidade inferior a 70% do controle. Mas a permetrina também inibiu a viabilidade de células HepG2 de maneira dose-dependente.

Os rins, importante órgão para a excreção de substâncias, pois participa do processo de biotransformação, desintoxicação e a escolha da linhagem celular HEK 293, é uma ótima ferramenta que apresenta sensibilidade para avaliar o potencial citotóxico em células renais que induzem nefrotoxicidade (PFALLER; GSTRAUNTHALER, 1998; PRICE et al. 2004).

Neste contexto, a avaliação da citotoxicidade para linhagem renal HEK 293, submetida à PMF e PBO, como mostrado na figura 22, evidenciou que as substâncias isoladas não se mostraram tóxicas para esta célula, em nenhuma das concentrações. Porém quando foram combinadas as substâncias tornaram-se mais tóxicas para a célula na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ em exposição curta de 24 horas.

Quando a célula HEK 293 foi exposta por 48 horas (figura 23), o PMF foi mais tóxico para a célula renal, pois apresentou toxicidade a partir da concentração menor ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto o sinergista PBO apresentou efeito citotóxico significativo apenas na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ao ser realizada a análise da associação entre PMF e PBO foi observado efeito citotóxico nas maiores concentrações 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Na figura 24, a célula HEK 293 foi exposta por 72 horas ao agrotóxico PMF, PBO e mistura, foi demonstrado que o PMF causou 39% de efeito citotóxico à célula HEK 293. No entanto, o sinergista PBO nesta exposição foi mais tóxico para a célula, pois tiveram 37% de morte celular nas concentrações 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Mas o MIX na maior concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou 42% de morte celular, sendo sugestivo de efeito sinérgico.

Ao expor a célula HEK 293 por 96 horas, como mostra a figura 25, ao PMF e o PBO individualmente, não apresentaram efeito citotóxico em nenhuma das concentrações analisadas. Porém no MIX apresentou efeito citotóxico nas maiores concentrações 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Estudo de Li e colaboradores (2015) avaliaram a célula HEK 293 que foi tratada com 130, 170, 210, 250, 290, 330 e $370 \mu\text{M}$ do inseticida organofosforado clorpirifós por 24 horas de exposição. A viabilidade celular foi determinada pela exclusão do corante azul de tryan. A exposição ao clorpirifós causou uma redução da viabilidade das células HEK 293. O

clorpirifós reduziu a viabilidade das células HEK 293, cima de 80%. Este resultado indica que o clorpirifós apresentou efeitos citotóxicos mais fortes em células HEK 293.

Outro estudo realizado por Emon e colaboradores (2018) avaliou a viabilidade da célula HEK 293 exposta por 24 horas ao clorpirifós (0, 10, 30, 60 e 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A viabilidade celular foi determinada através do ensaio CCK-8. A viabilidade celular foi reduzida de maneira dose-dependente.

No estudo é possível observar efeito sugestivo de sinergismo, quando o PMF e PBO foram combinados, especificamente na concentração 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, independente do desenho experimental da mistura (da célula adicionada e do tempo de exposição de curta ou longa duração). Isso pode ser devido a uma interação mecanicista entre as duas substâncias. De fato, os rótulos dos produtos, devido ao segredo comercial, muitas vezes necessitam de divulgação completa da presença de muitos ingredientes inertes. No entanto, a literatura tem evidenciado que não é frequente que esses produtos exibam aspectos de toxicidade diferentes quando confrontados aos agrotóxicos puros, o que tem sido associado à presença de outros elementos nas formulações (NAGY et al.,2020). Porém, o efeito sinérgico gerado através da interação mecanicista das substâncias individuais avaliados são raros e indicam que os efeitos combinados são maiores do que o esperado das substâncias individualmente.

A avaliação do risco cumulativo foi definida como a análise, caracterização e possível quantificação dos riscos para a saúde ou o meio ambiente por diferentes tempos de exposições das substâncias testes isoladas e combinadas. As substâncias combinadas tendem a aumentar os níveis de estresse oxidativo, pois comprometem pela capacidade mitocondrial de produzir energia, no corpo humano (HERNÁNDEZ et al, 2013; GONÇALVES et al, 2020). Apesar de muitos trabalhos na literatura descreverem os efeitos tóxicos de diferentes agrotóxicos, mas há poucas informações na literatura que relatam sobre o efeito gerado pela interação de múltiplas substâncias. Vale ressaltar que existir uma carência de trabalhos que avaliar a toxicidade *in vitro* do PMF e PBO isolados ou combinados.

As linhagens celulares HepG2 e HEK 293 por representarem órgãos-alvo (hepático e urinário), que estão envolvidos do processo da biotransformação e a eliminação de xenobiótico, caracterizado por serem mais sensíveis, em comparação com as outras células analisadas e avaliação dos danos causados por substâncias tóxicas, em exposição subcrônica de 48 horas, as concentrações finais (0,5,1 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), não apresentaram efeito citotóxico foram determinados pelos resultados do ensaio de citotoxicidade para analisar os parâmetros bioquímicos.

No presente estudo foram avaliados *in vitro* os níveis séricos ALT e o AST nas células HepG2 e ureia, ácido úrico, creatinina nas células HEK 293. Os resultados da análise bioquímica, são preditos do que possam ocorrer *in vivo*, estão apoiados por estudos anteriores em que resultados *in vivo* foram observados à exposição a agrotóxicos OPs (AL-SARAR et al., 2009; BHALLI et al., 2006; GOKCIMEN et al., 2007; PATIL et al., 2003).

Na análise da bioquímica da célula HepG2, os dados estão apresentados na Figura 26 do presente estudo, onde observou-se que o sinergista PBO e o MIX, resultaram no aumento significativo da enzima ALT nas concentrações 0,5 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em comparação com o controle. Também foi analisado na célula HepG2, (Figura 27) a enzima AST, onde o sinergista PBO na concentração 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou aumento significativo. No MIX nas concentrações 0,5 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentaram aumento significativo da enzima AST, porém na concentração 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ estatisticamente não apresentou alteração significativa. Essas análises das enzimas AST E ALT indicam que a célula HepG2 ao ser exposta o PBO e a mistura das duas substâncias, nestas concentrações citadas podem modular o metabolismo da célula de origem hepática.

A linhagem HepG2, que representa o fígado foi selecionada por ser bem caracterizada e validada como modelo útil, para testar a citotoxicidade de substâncias tóxicas, satisfazendo ao que é observado em tecido ou células primárias (KRIJT et al, 2013). O aumento da AST está relacionado principalmente ao dano mitocondrial das células hepáticas, pois 80% dessa enzima é encontrada na organela, e resulta em perda de energia celular e metabolismo anaeróbico. Da mesma forma, a ALT é uma enzima citosólica que é encontrada no meio de cultura quando a célula morre por necrose ou apoptose. A perda de energia celular pode estar associada ao aumento dos níveis de transaminases extracelulares observados (LIEBEL et al., 2015).

As aminotransferases, incluindo as enzimas ALT e a AST, são empregadas com frequência na avaliação do fígado para monitorar e detectar o progresso da lesão hepatocelular (COLANTONIO et al., 2012; ARAGON; YOUNOSSI, 2010). No fígado, a enzima ALT é encontrada apenas no citoplasma celular, enquanto que a enzima AST é localizada no citosol (20% da atividade total) e nas mitocôndrias (80% da atividade total) (PERRILLO et al., 2002). Os valores da AST podem apresentar níveis superiores ALT, se há lesão permanente, os níveis da enzima ALT tornam-se superiores aos da enzima AST, pois o tempo de meia-vida plasmática da AST é maior (PACIFICO et al., 2013; KIM et al., 2008). A magnitude das alterações de aminotransferases pode ser classificada como: leve, moderada e elevada (GREEN; FLAMM, 2002; PRATT; KAPLAN, 2000; GOPAL; ROSEN, 2000). A enzima

ALT é um excelente marcador biológico para a detecção precoce da lesão hepática. Mas os valores elevados desta enzima demandam uma avaliação clínica associada a outros parâmetros bioquímicos, para a obtenção de um diagnóstico mais preciso (PACIFICO et al., 2013; GOBEL et al., 2011; KIM et al., 2008).

As lesões no fígado, *in vivo* podem alterar os níveis séricos das concentrações de enzimas hepáticas, principalmente as transaminases. Essas enzimas são responsáveis em catalisar a mudança do grupo α -amino para o grupo α -ceto do ácido cetoglutarato para gerar oxalacetato e ácidos pirúvicos, concomitantemente, além de importantes contribuintes para o ciclo do ácido cítrico (DUFOUR et al., 2000). As aminotransferases são encontradas no fígado em altas concentrações, mas o aumento dos níveis séricos ALT é mais característica para danos hepáticos do que a AST. Porém a AST está disseminada em vários tecidos do organismo, podendo ser encontrada no coração, cérebro, rins, pulmões, músculo esquelético e glóbulos vermelhos, o que diminui a sua especificidade para a lesão hepática. Mas a ALT apresenta baixas concentrações no músculo esquelético, coração e rim (AL-BUSAFI; HILZENRA, 2013; OZER et al., 2008).

A célula HEK 293 (Figura 27), ao ser exposta a substância PMF na menor concentração ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) resultou em alterações significativas nos níveis séricos de ácido úrico em comparação com o controle. O sinergista PBO demonstrou uma variação na concentração intermediária ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) com o aumento significativo nos níveis séricos de ácido úrico. Essa análise do marcador ácido úrico indica que a célula HEK 293 ao ser exposta o PMF e ao PBO, nestas concentrações citadas podem modular o metabolismo da célula renal.

A ureia e a creatinina são resíduos gerados do metabolismo das proteínas e necessitam ser eliminadas pelos rins. Logo, um aumento proeminente na ureia e creatinina sérica indica um dano funcional no rim (GARBA et al., 2007). Porque o dano renal é o único fator significativo que aumenta a creatinina sérica (NWANJO et al., 2005), o presente estudo indica que células HEK 293 foram afetadas negativamente pelas substâncias testadas.

A ureia e creatinina são marcadores das funções renais e alterações nos níveis séricos são relacionadas a danos renais. Porque os desequilíbrios eletrolíticos consistir em implicações causando insuficiência renal, caso não sejam tratadas, podem gerar complicações metabólicas secundárias (SABIU et al., 2017).

A ureia é um composto nitrogenado, desenvolvido no fígado como produto final ou metabolismo proteico e ciclo da ureia. A ureia é eliminada cerca de 85% pelos rins; o restante é excretado pelo trato gastrointestinal. A ureia sérica é aumentada em condições em que a depuração renal diminui (insuficiência renal aguda e crônica), mas pode ser alterada em

outras condições não associadas a doenças renais, como hemorragia digestiva alta, desidratação, estados catabólicos e dietas ricas em proteínas. A diminuição da ureia é observada por fraqueza, dieta com pouca proteína e doença hepática grave (GOUNDEN; JIALAL, 2019). A creatinina sérica é uma avaliação da função renal mais precisa em comparação a ureia; contudo, a ureia aumentada é um dos primeiros sinais de doença renal, (SABIU et al., 2017; GOUNDEN; JIALAL, 2019).

Na literatura há uma carência de trabalhos, que avaliam a bioquímica do PMF e PBO *in vitro* das células, mas Rajini e Krishnakumari (1988) fizeram um estudo agudo com ratos albinos de ambos os sexos que receberam por via oral doses graduadas de PMF. Em outro estudo subagudo, grupos de ratos machos foram alimentados com PMF na dieta a 0, 10, 250, 500 e 1000 ppm por 28 dias. E constataram que ingestão de alimentos e a taxa de desenvolvimento não foram comprometidas ao longo do estudo, além de não serem observadas diferenças estatísticas nos níveis de transaminases hepáticas, porém foi constatado um aumento significativo das transaminases séricas. Aumento significativo nas atividades de ALP hepática, beta-GLR e ALP sérica foram evidentes em 500 e 1000 ppm.

Rajini e Krishnakumari (1988), realizou outro estudo em ratos machos que foram alimentados com PMF dietético a 0, 500, 1000 e 1500 ppm por 28 dias. Foram coletados sangue e urina e medidos em intervalos semanais. A ingestão dietética de PMF ocasionou uma hipoglicemia inicial, rápida e elevação exacerbada da ureia no sangue em todas as dosagens. Apesar de inicialmente não ter produzido alteração significativa na produção de urina, observou-se oligúria exacerbada após 12 dias de alimentação. As alterações observadas nos elementos da urina foram: aumento da ureia, proteinúria, aumento transitório da creatinina e aumento significativo da excreção de ácido glucurônico e sulfato etéreo em todos os intervalos.

No estudo de Singh e colaboradores (2011), avaliaram simultaneamente o dano ao DNA juntamente com a atividade da AChE e vários parâmetros bioquímicos relacionados à toxicidade hepática (AST, ALT e ALP) e renal (ureia e creatinina) em 70 trabalhadores rurais expostos à mistura de pirimifós metil, clorpirifós, temefós e malatião. O ensaio do cometa usando linfócitos de trabalhadores expostos mostrou valor percentual da média de DNA da cauda do cometa significativamente maior (60,43% vs. 31,86%, $p < 0,001$) e valor do momento da cauda (14,48 μm vs. 6,42 μm , $p < 0,001$) em trabalhadores ocupacionais em comparação com controles. A atividade da AChE nos eritrócitos mostrou-se diminuída (3,45 KAU/L vs. 9,55 KAU/L nos controles, $p < 0,001$) e associada ao tempo de exposição aos agrotóxicos utilizados pelos trabalhadores. Os níveis das enzimas para as funções hepática

e renal também foram significativamente diferentes em trabalhadores rurais do que em controles saudáveis. Esses resultados sugerem que a exposição à mistura de pirimifós metil, clorpirifós, temefós e malatão pode induzir danos ao DNA, diminuição da atividade da AChE, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade.

No presente trabalho observou-se que pirimifós metil na concentração $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ gerou aumento significativo no ácido úrico em comparação ao controle, mas no estudo *in vivo* com PMF realizando por Gad e colaboradores (2020), observaram que PMF induziu disfunção e dano renal em camundongos, que alterou biomarcadores antioxidantes, como: glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase e peroxidação lipídica no rim. Eles aumentaram a concentração de ácido úrico e creatinina no soro.

Neste cenário é necessário avaliar a possibilidade do PMF e o PBO (isolados e combinados) serem genotóxicos para os seres humanos. Com este objetivo de investigar estes possíveis efeitos sobre o fígado e sobre as células sanguíneas. Muitos pesquisadores têm utilizado células derivadas do fígado para realização de testes de genotoxicidade, *in vitro*, como uma alternativa ao uso de hepatócitos normais, a célula HepG2 (KASSIE; et al 2003, KNASMÜLLER et al., 1998). As células HepG2 possuem enzimas de fase I e fase II do processo de metabolização de xenobióticos, as quais desempenham um papel essencial na ativação de detoxificação de agentes pro-mutagênese e pro- carcinógenos (WESTERINK; SCHOONEN, 2007a, WESTERINK; SCHOONEN, 2007b, JIN et al., 2009); retém a maioria das funções normais dos hepatócitos humanos (NAJI-ALI et al., 1994). As outras células necessitam de uma ativação metabólica para realizar sua atividade de metabolização, em testes de genotoxicidade tem importância fundamental para uma interpretação correta dos resultados (AUDEBERT et al., 2010).

Um fator de risco primário dos pesticidas genotóxicos é que eles atuam diretamente ou indiretamente no DNA cromossômico, causando genotoxicidade crônica, como toxicidade reprodutiva e carcinogênica (XIANG et al., 2013). Os pesticidas podem ser genotóxicos e causar efeitos carcinogênicos e/ou mutagênicos para os seres humanos, gerando doenças genéticas hereditárias, disfunção reprodutiva, carcinogênese e até deformidades congênitas. A clivagem do DNA da cromatina em fragmentos internucleossomais é uma ocorrência celular fundamental durante o desenvolvimento crucial para a genotoxicidade induzida por agrotóxicos (LI et al, 2015).

Foram investigados os efeitos do PMF e PBO na viabilidade celular e dano ao DNA em células HepG2 e células de sangue total de camundongos usando ensaios de detecção quantitativa, e foram comparados seu efeito no dano ao DNA. O ensaio do cometa alcalino

não detecta mutações pontuais, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em quebras simples e/ou duplas na cadeia de DNA nas células HepG2 e células de sangue total de camundongos.

As genotoxinas podem provocar uma variedade de tipos de danos ao DNA, incluindo modificação de base, adução de DNA, quebras de fita simples, quebras de fita dupla e ligações cruzadas intra ou interfitas, entre as quais as quebras de fita dupla são consideradas o tipo de dano mais grave (COLLINS, 2004). Na literatura Kasuba e colaboradores (2017), observaram que os agrotóxicos têm a tendência de aumentar os níveis de Espécies reativas de oxigênio (ROS) na produção de DNA, pois afetam a capacidade mitocondrial de produzir energia, induzindo estresse oxidativo. Espécies reativas causam danos ao nível celular, como interagem com as moléculas biológicas e interrompem a síntese normal e o reparo do DNA. A interrupção da síntese normal do DNA está associada à inibição/inativação de proteínas-chave, bem como enzimas de reparo de DNA induzidas por danos de ROS a essas biomoléculas. O ROS que acontece nas células inclui radical livre e outros tipos são altamente reativos de oxigênio (por exemplo: peróxido de hidrogênio, radical ânion superóxido, radical hidroxila) causam a oxidação do DNA, sendo o tipo mais comum que gera dano ao DNA da célula. O ânion superóxido e o H_2O_2 são capazes de gerar as quebras de cadeia e oxidação de bases no DNA intracelular. O principal oxidante responsável pelo dano ao DNA é o radical hidroxila (OH), pois reage diretamente com a molécula de DNA (FRIEDBERG et al.; 2005). O dano oxidativo do DNA pode ser medido empregando endonucleases, específico para bases oxidadas, que reconhecem as bases purinas e pirimidinas oxidadas (AZQUETA, et al; 2009; COLLINS et al.; 2001).

As células HepG2 foram analisadas no presente estudo para predizer os possíveis efeitos tóxicos do PMF e do PBO sobre o fígado que representa o órgão de importância no metabolismo destas substâncias. Alterando os níveis das enzimas bioquímicas que estão expostas, ocorrem alterações como disfunção hepática. Como doença hepática inclui-se hipóxia, doenças metabólicas, intoxicação, inflamação, neoplasia, traumatismo mecânico e obstrução de ducto biliar extra ou intrahepática. A células HepG2 foi selecionada por causa de sua origem humana e suas atividades de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, o que as torna o melhor modelo para refletir os processos no fígado intacto do que outros sistemas de teste *in vitro* (COHEN, 2010; GOLD et al., 2005; KNASMÜLLER et al., 1998).

Previamente ao ensaio de genotoxicidade (COMETA) foi realizado o ensaio de citotoxicidade em células HepG2 e células sanguíneas de camundongos. O ensaio de citotoxicidade visou estabelecer as faixas de concentrações utilizadas para o ensaio Cometa,

onde devem ser evitadas concentrações que forem superiores a 20% de decréscimo da viabilidade celular, quando comparadas com as culturas controles. Então as células HepG2 e as células de sangue total de camundongos foram selecionadas para o ensaio cometa por serem células metabolicamente competentes em relação as outras células do presente estudo, pois não necessitam de estímulo.

As amostras de PMF, PBO e o MIX não foram citotóxicas em nenhuma das concentrações avaliadas (100, 50, 10 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) tanto nas células HepG2 quanto nas células sanguíneas obtidas de camundongo Balb-c. Os controles utilizados nos ensaios genotoxicidade apresentaram respostas esperadas, tendo o controle de solvente metanol apresentou baixo dano ao DNA e os controles positivos, MMS e H_2O_2 , apresentaram resultados de genotóxicos significativos em sangue total ($p < 0,05$) e significativos em células HepG2, respectivamente ($p < 0,001$).

A partir da avaliação de genotoxicidade através do Ensaio cometa foi observado que as amostras de PMF, PBO e MIX não foram genotóxicas, ou seja, não causaram quebras significativas nas fitas de DNA, em nenhuma das concentrações (100, 50, 10 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e condições experimentais analisadas nas células HepG2, expostas por 24 horas às substâncias, ou em sangue total de camundongos, exposto por 2 horas. No entanto, somente um ensaio não é capaz de detectar todos os mecanismos que podem causar danos ao DNA. Deste modo é recomendada a realização de outros ensaios para a confirmação dos resultados de genotoxicidade, tais como ensaios de clastogenicidade e mutagenicidade.

Na pesquisa realizada de Piatti e colaboradores (1994), utilizaram o ensaio do micronúcleo realizado em cultura de hepatócitos de rato, também foram encontrados resultados do PMF tanto individualmente e em mistura com benomil em exposição de 48h, o qual observou que PMF individualmente, não teve efeito genotóxico em nenhuma das concentrações testadas (de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de 0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). As doses da mistura variaram de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + 0,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + 4,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de benomil e pirimifós-metil, respectivamente). Porém, o PMF em mistura com benomil na proporção de 6:1 foi genotóxico. Houve uma diferença significativa entre controles e grupos dos tratamentos ($P < 0,01$), com um aumento progressivo na frequência de micronúcleos semelhante ao do benomil isolado, sugerindo que o efeito genotóxico da mistura é devido ao benomil. Corroborando com o presente estudo que também não houve efeito genotóxico em nenhuma das concentrações analisadas do PMF.

Nos estudos de Koop e colaboradores (2018), também estudaram os efeitos dos danos ao DNA e citotoxicidade do PMF, PBO ou combinados em célula HepG2 foi incubada por 24

horas em cinco concentrações (500, 250, 100, 10 e 1 μM), observaram que as substâncias não causaram danos ao DNA nem citotoxicidade nas concentrações testadas. Os resultados deste trabalho confirmam a ideia que as substâncias PMF e PBO não possuem atividade genotóxica em células HepG2.

A importância de se analisar o sangue total dos camundongos, é que alguns agrotóxicos podem ser genotóxicos, inclusive tem sido grande a incidência de casos de linfoma em humanos. Na literatura tem relato que em populações com melhores condições econômicas, o pico de incidência ocorre em adultos jovens, enquanto naquelas com condições econômicas desfavoráveis, ocorre na infância, principalmente entre meninos (MUELLER; GRUFFERMAN, 2006). Evidências sugerem que as exposições a agrotóxicos possam causar leucemia, assim como outros fatores capazes de interagir de alguma maneira com o sistema imune, causando efeito de estimulação antigênica crônica ou imunossupressão (FARREL; JARRET, 2011; FISHER; FISHER, 2004), seria capaz de suprimir o sistema imunológico e facilitar o desenvolvimento de linfomas (PAHWA et al., 2012).

Os linfomas são agrupados em Linfoma de Hodgkin (LH), também chamado de Doença de Hodgkin, e Linfoma Não Hodgkin (LNH), uma vez que apresentam características bastante distintas (OTTENSMEIER, 2001). O LH é uma doença maligna que abrange os órgãos do sistema imunológico, a patologia e epidemiologia indicam uma etiologia infecciosa (MUELLER; GRUFFERMAN, 2006). Os LNH são originados nos órgãos linfáticos durante os estágios evolutivos das células linfoides. São heterogêneos quanto à clínica e à etiologia, uma vez que juntam uma variedade de formas histológicas (HARTGE et al., 2006).

O trabalho de Ojha e Gupta (2015) diverge dos resultados do presente trabalho, pois avaliaram o potencial genotóxico dos pesticidas organofosforados (Clorpirifós (CPF) 0,2 mg/L, parationa metil (MPT) 0,135 mg/L e malationa (MLT) 5,2 mg/L) individuais e associados, por exposições 2, 4, 8 e 12 horas através do ensaio cometa em linfócitos do sangue periférico de ratos, e observaram que os pesticidas do seu estudo causaram um aumento significativo no dano ao DNA das células pela diminuição da viabilidade, que é dependente do tempo de exposição. Os dados mostram uma diminuição de 7–12% e 15–18% na viabilidade celular após 2 horas de exposição de linfócitos de rato com 1/10 e 1/4 LC_{50} da dose de CPF, MPT, MLT e sua mistura, respectivamente, quando comparados com o controle celular. Após 4 h de exposição os linfócitos de rato com 1/10 e 1/4 LC_{50} equivalentes de CPF, MPT, MLT e sua mistura, causaram 10-12% e 16-27% de diminuição na viabilidade celular, respectivamente, em comparação com o controle. Incubação de linfócitos de rato com 1/10 e 1/4 LC_{50} equivalente de CPF, MPT, MLT e sua mistura por 8 h causaram 18-22% e 21-

27% de diminuição na viabilidade celular, respectivamente, em comparação com o controle. Na exposição de 12 horas de exposição os linfócitos de ratos com 1/10 e 1/4 LC₅₀ da dose de CPF, MPT, MLT individualmente e em mistura causaram 26-30% e 22-34% de diminuição na viabilidade celular, respectivamente, em comparação com o controle.

Embora tenha sido apontado que essas substâncias não apresentaram efeito genotóxico, não pode ser excluída a capacidade delas de causar danos mínimos ao DNA da célula, mas ao ponto de não serem considerados mutagênicos ou teratogênicos. Portanto, mais estudos são necessários para investigar se o PMF e PBO representam um potencial mutagênico e/ou teratogênicos. Estudos anteriores indicaram que o PMF não é um agente cancerígeno (GOUVÊA et al., 2015). No entanto, estudos conduzidos Gouvêa et al., 2015 e Vardavas et al, 2016 descobriram que o PBO *in vivo* tem o potencial carcinogênico sobre o fígado e a tireoide, em doses elevadas.

Os dados *in vitro* do presente estudo apontam que o PMF, o PBO individualmente e a mistura das duas substâncias analisadas nas diferentes linhagens celulares podem gerar efeitos tóxicos diferenciados, o que podem interferir no estabelecimento do grau de segurança dessas substâncias.

6- CONCLUSÃO

O potencial citotóxico do agrotóxico PMF e do sinergista PBO (isolados e combinados), foram examinados usando sistemas baseados em cultura de celular com as seguintes linhagens: AMJ2-C11, RAW 264-7, H9C2, HepG2 e HEK 293. Este trabalho aponta que nas exposições mais longas e as maiores concentrações o PMF, PBO e a mistura inibem a viabilidade das células em vários níveis de susceptibilidade e a sensibilidade dependente do tipo celular. O grau de citotoxicidade não foi significativo para as células nos menores tempos de exposições e nas menores concentrações das substâncias testes comparados com as exposições prolongadas e nas maiores concentrações.

A análise bioquímica revelou que PBO e a mistura aumentaram significativamente as enzimas AST e ALT na célula HepG2. Na célula HEK 293 o PMF e o PBO aumentaram significativamente o marcador ácido úrico.

O PMF, PBO e a mistura não induziram os efeitos citotóxicos e genotóxicos na célula HepG2 e na célula de sangue total de camundongos.

Os resultados apresentados neste estudo fornecem uma base teórica para a toxicidade subjacente e provável risco à saúde de seres humanos ao serem expostos ao PMF e PBO tanto isolados como em misturas.

REFERÊNCIAS

ABRASCO. Associação Brasileira de Saúde Coletiva. Parecer Técnico sobre processo de reavaliação do glifosato, 2019.

ANDRADES, T.O.; GANIMI, R.N. **Revolução verde e a apropriação capitalista**. V.21, Juiz de Fora. CES Revista 2007. Disponível em:

<http://web2.cesjf.br/sites/cesjf/revistas/cesrevista/edicoes/.../revolucao_verde.pdf>. Acesso em: 15 de outubro de 2021.

ANDREOLI, C. V. et al. Agrotóxicos. In PATRICIA, L. T. (org.). Alguns fios para entretecer o pensar e o agir. Curitiba: SENAR-PR, p. 349-367. 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografia Pirimifós metil, 2022.

[https://www.gov.br/anvisa/pt-](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/p/4468json-file-1)

[br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/p/4468json-file-1](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/p/4468json-file-1)

Acesso em: 14 de dezembro de 2022.

ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA).

Relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. Gerência Geral de

Toxicologia. Brasília, 2019. Disponível em: [https://www.gov.br/anvisa/pt-](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1)

[br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1)

[alimentos/arquivos/3770json-file-1](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1). Acesso em: 18 jun. 2022.

ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia. Monografias de Agrotóxicos [monografia na Internet] 2021a. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>. Acesso em: 18 jun.

2022.

ANVISA. - Gerência de Processos Regulatórios – GPROR. Biblioteca de Agrotóxicos. 8 p.

2020. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/4967127/Biblioteca+de+Agrot%C3%B3xicos_Portal.pdf. Acesso em: 23 abril 2022.

ANVISA. Novo Marco Regulatório para a Avaliação Toxicológica de Agrotóxicos. DF, 2019. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/4340788/Apresenta%C3%A7%C3%A3o+agrot%C3%B3xicos+Dicol/3e2ee4c0-0179-485b-a30b-27d9eaff696b>>. Acesso: 20 de julho de 2022.

ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia. Monografias de Agrotóxicos [monografia na Internet]. 2021a. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>. Acesso em: 18 jun. 2022.

ANVISA. Painel de monografias de agrotóxicos. Brasília, DF, 2021b. Disponível em:

<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/dadosabertos/informacoes-analitic/monografias-de-agrotoxicos>. Acesso em: 18 jun.2022.

ALABI, et al. Genotoxic potential of pirimiphos-methyl organophosphate pesticide using the mouse bone marrow erythrocyte micronucleus and the sperm morphology assay. **Journal of Environmental and Occupational Science**, v. 3, n. 2, p. 81, 2014. DOI: 10.5455/jeos.20140303015734.

AL-BUSAFI, S. A.; HILZENRA, T. N. Mild Hypertransaminasemia in Primary Care. **ISRN Hepatology**. v. 2013, p. 1-6, 2013.

AL-SARAR A.S, et al.; Evaluation of genotoxicity and mutagenicity of mixtures of Hematological and biochemical changes in workers occupationally exposed to pesticides in the municipality of Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia. **Res. J. Environ. Tóxico**. 3 e (4) pp. 179 – 185. 2009.

ATALE, N. et al; Protective effect of *Syzygium cumini* against pesticide- induced cardiotoxicity. **Environ Sci Pollut, Res** 21, páginas 7956-7072. 2014.

ALTENHOFEN, S., et al. Tebuconazole Alters Morphological, Behavioral and Neurochemical Parameters in Larvae and Adult Zebrafish (*Danio Rerio*). **Chemosphere**, 180, 483-490. 2017.

AMARAPURKAR, D. N.; PATEL, N. D. Clinical spectrum and natural history of nonalcoholic steatohepatitis with normal alanine aminotransferase values. **Tropical gastro. official J. of the Digestive Dis. Found.**, v. 25, p. 130-134, 2004.

ANAKWUE, R. Cardiotoxicity of pesticides: are Africans at risk? **Cardiovasc. Toxicol.** 19 (2), 95–104. 2019.

ANDRADE, S. A. et al. Análise de risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em municípios do Alto Paranaíba - MG. **Química Nova** v. 34, n. 7, p. 1129-1135, 2011.

ARAGON, G.; YOUNOSSI, Z. M. “When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients”. **Cleveland Clinic. J. of. Medicine**, v. 77, p. 195– 204, 2010.

ARAÚJO, C. R. M., Santos, V. L. A., Gonçalves, A. A. (2016). Acetylcholinesterase - AChE: An Enzyme of Pharmacological Interest. **Rev. Virtual Quim**, 8(6), 1818-1834.

ARBUCKLE, T.E., Lin, L., Mery, L.S. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. **Environ. Health Perspect.** 109, 851–857. 2001.

AUDEBERT, M. et al. Use of the λ H2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. **Toxicology Letters**, v. 199, p. 182–192, 2010.

AZQUETA A., SHAPOSHNIKOV S., COLLINS A. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Pesquisa de Mutação/Toxicologia Genética e Mutagênese Ambiental**. Volume 674, edições 1–2 , 31 de março de 2009, páginas 101-108. 2009.

BALSAN, R. Impactos decorrentes da modernização da agricultura brasileira. In: Campo e território: **Revista de Geografia Agrária**. Rio Grande, v. 1, n. 2, p. 123- 151, ago. 2006.

BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO. **Ensaio de Potencial de Citotoxicidade in vitro**. Disponível em: <<http://bcry.org.br/servico/testes-de-citotoxicidade>>. Acesso em: 21 dezembro. 2022.

BANERJEE, I. et al. Clinical and epidemiological characteristics of patients with organophosphate intoxication. **N Am J Med Sci**. 2012 Mar;4(3):147-50. doi: 10.4103/1947-2714.93884. PMID: 22454830; PMCID: PMC3309624.

BARIS, D. et al. Occupation, pesticide exposure and risk of multiple myeloma. **Scand. J. Work Environ. Health** 30 (3), 215–222. 2004.

BEANE, F. et al. Cancer incidence among male pesticide applicators in the Agricultural Health Study cohort exposed to diazinon. **Am. J. Epidemiol**. 162 (11), 1070–1079. 2005.

BECKEL H. S.; LORINI I; LAZZARI S. M. N. Efeito do sinergista butóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitrotiom. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, n. 1, p. 10–114, 2006. DOI: 10.1590/s0085-56262006000100016.

BERNARDI, O. et al. **Manejo da resistência de insetos e ácaros a pesticidas. In: O que engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**. 4^o. Ed. Viçosa, MG: UFV, cap. 13, p. 495-525, 2014.

BERNE, R. M., LEVY, M. N. Fisiologia / editores Bruce M. Koeppen, Bruce A. Stanton; tradução Soraya Imon de Oliveira. (7^a ed.), Rio de Janeiro: Elsevier. 2015.

BELDEN, J.B.; LYDY, M.J. Impact of atrazine on organophosphate insecticide toxicity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, p. 2266–2274, 2000.

BELTRANE, A.; JUNIOR, M. M. Principais riscos químicos no leite: Um problema de Saúde Pública. **Arquivos de Ciência da Saúde Unipar**, Umuarama, São Paulo, v 2, n° 2, p. 141-145, maio /ago. 2005.

BERTRAND, K. A. et al., Plasma organochlorine levels and risk of non-Hodgkin lymphoma in a cohort of men. *Epidemiology* 21 (2), 172–180. 2010.

BHALLI, J. A, KHAN Q.M, HAQ M.A, KHALID A.M, NASIM A. Cytogenetic analysis of Pakistani subjects occupationally exposed to pesticides in a pesticide production plant. **Mutagenesis** Volume 21, Edição 2, pp. 143 – 148. 2006.

BIZERRA, P. et al. Enhanced cytotoxicity of imidacloprid by biotransformation in isolated hepatocytes and perfused rat liver. **Bioquímica e Fisiologia de Pesticidas**, v. 164, pp. 183 – 190. 2020.

BLAAUBOER, B. et al. The use of biomarkers of toxicity for integrating in vitro hazard estimates into risk assessment for humans. **ALTEX** 29, 411–425.
Doi:10.14573/altex.2012.4.411, 2016.

BONNER, M.R., et al. Occupational exposure to terbufos and the incidence of cancer in the Agricultural **Health Study**. **Cancer Causes Control** 21 (6), 871–877. 2010.

BRASIL- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Manual de vigilância da saúde de populações expostas por agrotóxicos. Brasília, OPAS Organização Pan- Americana de Saúde, 69p. 1996.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 de julho de 1989, Seção 1, p.11459.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 03 de janeiro de 1992. Diretrizes e exigências do ministério da saúde, referentes à autorização de registro, renovação de registro e extensão de uso de agrotóxicos e afins.

Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, Nº 1, de 09 de dezembro de 1991.

Disponível em:

https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1992/prt0003_16_01_1992.html

Acesso em: 20 de outubro de 2021.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

Portaria normativa IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996.

Diário Oficial da União, de 14 de outubro de 1996. Disponível em:

https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/mma_ibama/1996/prt0084_15_10_1996.html.

Acesso em: 20 de janeiro de 2022.

BRASIL. Decreto n. 4.074, de 4 de janeiro de 2002, regulamenta a Lei nº 7. 802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 139, nº. 5, p. 1-12, 8 jan. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Associação Brasileira de Saúde Coletiva. Fundação Oswaldo Cruz. **Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre o impacto dos agrotóxicos a saúde**. Rio de Janeiro/São Paulo. Editora: Expressão Popular. 628f. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de Procedimentos para Registro de Agrotóxicos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF.

Disponível em: < [ttp://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumosagricolas/agrotoxicos/arquivos/manual-de-procedimentos-para-registro-deagrotoxicos.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumosagricolas/agrotoxicos/arquivos/manual-de-procedimentos-para-registro-deagrotoxicos.pdf)>. Acesso: 05 de junho de 2022.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, p. 245-254, 2005.

BREALEY C.J, WALKER C.H. E BALDWIN B.C. A-Esterase activities in relation to the differential toxicity of pirimiphos-methyl to birds and mammals.

Pestic. ciência 11, p. 546-554 1980.

BRITO, P.F. de; GOMIDE, M.; CAMARA, V. de M. Agrotóxicos e saúde: realidade e desafios para mudança de práticas na agricultura. **Revista de Saúde Coletiva**. v.19, n°.1, p.207-225, 2009.

BROADHEAD, C.L., COMBES, R.D. The current status for food additives toxicity testing and the potential for application of the Three Rs. **ATLA** 29, 471–485, 2001.

CAMATINI, M. et al. In Vitro Biological Systems as Models to Evaluate the Toxicity of Pesticides. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 65:1-4, 153-167, 1996.

CATANO, H.C., et al., Plasma cholinesterase levels and health symptoms in Peruvian farm workers exposed to organophosphate pesticides. Arch. **Environ. Contam. Toxicol.** 55 (1), 153–159. 2008.

COHEN, S.M. Assessment of possible carcinogenic risk for humans based on liver tumors in rodent trials: two-year bioassay no longer needed. **Toxicol Pathol**, 38(3), 487-501, 2010.

COLANTONIO, D.A.; et al. Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: a CALIPER database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. **Clin. Chem.**, v. 58, p. 854–868, 2012.

COLLINS A.R, Dusinska M., Horská A. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. **Acta Biochemica Polonica**, v. 48 n° 3, pp. 611 – 614. 2001.

COLLINS A.R, et al. Interindividual differences in DNA base oxidation repair measured in vitro with the comet assay. **Mutagenesis**, Volume 16, Edição 4, pp. 297 – 301. 2001.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**. v. 26, p.249–261, 2004.

CORSINI, E. et al. Pesticide induced immunotoxicity in humans: a comprehensive review of the existing evidence. **Toxicology**, v. 307, p. 123-135, 2013.

CONTE M. F. et al. Toxicity of widely applied pesticides in soybean crops: synergistic effects of fipronil, glyphosate and imidacloprid on HepG2 cells. **Toxicology *in vitro***. Volume 84, outubro de 2022.

DAGLISH, G.J.; et al. Chlorpyrifos-methyl plus either methoprene or synergized phenothrin for control of Coleoptera in maize in Queensland, Australia. **Journal of Stored Products Research** 31: p. 235-241. 1995.

DAS, P.P.; SHAIK, A.P.; JAMIL, K. Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on human peripheral blood lymphocytes. **Toxicology and Industrial Health**, v. 7, p. 449-458, 2007.

DAVIS DL, BLAIR A, HOEL DG. Agricultural exposures and cancer trends in developed countries. **Environ Health Perspect**; 100: 39-44. 1992

DE OLIVEIRA, E. R. A. et al. Reduction of cell viability induced by IFN-alpha generates impaired data on antiviral assay using Hep-2C cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 400–401, n. 1, p. 97–105, 2013.

DE QUEIROZ, et al. Environmental risk assessment for sustainable pesticide use in coffee production. **Journal of contaminant hydrology**, v. 219, p. 18- 27, 2018.

DAMALAS, I.G. Eleftherohorinos, Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators, **Int. J. Environ. Res. Pub. Health** 6. (web of science). 2011.

DIAS, et. al. Série Fiocruz - Documentos Institucionais. **Fundação Oswaldo Cruz**. V. 2. 120p. 2018.

Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/32385/2/02agrototoxicos.pdf>.

DIERICK, J. P. CYP1/2 activation and glutathione-dependent cytotoxicity of four pesticides in Hep G2 and Fa32 cells. *In Vitro*. 1999.

ECOBICHON D.J. Toxic effects of pesticides, in: C.D. Klaassen, J. Doull (Eds.), Casarett and Doull's **Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 5th ed., Macmillan, New York, pp. 643–689. 1996.

EDWARDS, F.L. et al. Involvement of oxidative stress in methyl parathion and parathion-induced toxicity and genotoxicity for human hepatic carcinoma cells (HepG2 2). **Environmental toxicology**. Volume 28, Edição 6 Páginas 342-348. Junho de 2013.

EMON, J. et al. Effects of chlorpyrifos and trichloropyridinol on HEK 293 human embryonic kidney cells. **Chemosphere**. Volume 191, p 537-547. January 2018.

ERUKAINURE, O. L.; et al. Clerodendrum volubile inhibits key enzymes linked to type 2 diabetes but induces cytotoxicity in human embryonic kidney (HEK293) cells via exacerbated oxidative stress and proinflammation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1144–1152, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.013.

FAIRBAIN D. W. et al. The comet assay: a comprehensive review **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**. V. 339, Issue 1, Pages 37-59.1995.

FARIA, N. M. X.; ROSA, J. A. R.; FACCHINI, L. A. Pesticide poisoning in Brazil: official information systems and challenges for conducting epidemiological studies s. **Ciência Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, V.12 n°.1: p. 25-38, 2007.

FAUST, F. et al. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 566, p. 209–229, 2004.

FELEMBAN, S.G.; GARNER, A.C.; SMIDA, F.A.; BOOCOCK, D.J.; HARGREAVES, A.J.; DICKENSON, J.M. Phenyl Saligenin Phosphate Induced Caspase-3 and c-Jun N-Terminal Kinase Activation in Cardiomyocyte-Like Cells. **Chem. Res. Toxicol.** 28, 2179–2191. 2015.

FARRELL, K, JARRETT R.F. The molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. **Histopathology**. Jan;58(1) 2011. PubMed PMID: WOS:000286512800003.

FISHER, S.G, FISHER, R. I. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. **Oncogene**. Aug 23;23(38) 2004. PubMed PMID: WOS:000223468800016

FRIEDBERG et al. Reparação do ADN e Mutagénese. Segunda Edição, ASM Press, Herndon, VA. 2005.

FRANCHI, L. P. et al. Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbon. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 571–580, 2012.

FUKUYAMA, Tomoki et al. Allergic reaction induced by dermal and/or respiratory exposure to low-dose phenoxyacetic acid, organophosphorus, and carbamate pesticides. **Toxicology**, v. 261, n. 3, p. 152-161, 2009.

FURG. Universidade Federal do Rio Grande. Coleta de sangue de rato por exsanguinação. 2022. Disponível em: <<https://muvie.furg.br/roteiros-de-aulas-praticas/23-roteiros-praticos/roteiros-praticos-do-passado/89-coleta-de-sangue-de-rato-por-exsanguinacao>>. Acesso em 29 dez.2022.

GAD F. M., et al. Gene Expression, DNA, and Kidney Damage Induced by Pymiphos-methyl in Male Mice: Chemical Composition and Enhancing Role of Origanum majorana Leaf Extract. **Revista Egípcia de Química**. Volume 63, Número 10, Página 4141-4155. Outubro de 2020.

GARBA S.H, ADELAIYE A.B, MSHELIA L, Y. Histopathological and biochemical changes in the kidney of rats after exposure to a pyrethroid-based mosquito coil. **J. Appl. Ciência Res**, 3, pp 1788 – 1793. 2007.

GAUTHIER, E., et al., Environmental pesticide exposure as a risk factor for Alzheimer's disease: a case-control study. *Environ. Res.* 86, 37–45. 2001.

GEBHARDT, R. et al. New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. **Journal Drug Metabolism Reviews**, v. 35, p. 145– 213, 2003.

GEORGIADIS, N. et al., 2018. Pesticides and cardiotoxicity. **Where do we stand? Toxicol. Appl. Pharmacol.** 353, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.06.004>.

GOBEL, T. et al. High prevalence of significant liver fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B patients with normal ALT in central Europe. **J. Medi. Virologia**, v. 83 6, p. 968-973, 2011.

GOKALP, O. et al. The effects of diazinon on pancreatic damage and improving the role of vitamin E and vitamin C. **Pestic Biochem Physiol** 81: 123 – 128. 2005.

GOKCIMEN, A. et al.; Efeitos do adiazinon em diferentes doses nos tecidos do fígado e pâncreas de ratos. **Pestic. Bioquim. Physiol**, 87 (2), pp. 103 – 108. 2007.

GOLD, L.S. et al. Potency Database (CPDB): results of animal bioassays published in the general literature up to 1997 and by the National Toxicology Program in 1997-1998. **Toxicol Sci**, 85(2), 747-808. 2005.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Comet test for detection of DNA damage and repair in individualized cells, In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas/RS: ULBRA, 2003.

GOPAL, D. V.; ROSEN, H. R. Abnormal findings on liver function tests. **Postgrad Med.**, v. 107 2, p. 100-14, 2000.

GOUVÊA, A.V.; et al. Evaluation of contamination of soybean samples with pesticide residues by the QuEChERS acetate method with HPLC-MS/MS analysis. **Revista Institucional Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 74, n. 3, p. 225-238, 2015.

GUEDES, R. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae), **Journal of Stored Products Research**, Volume 31, Issue 2, 1995.

GREEN, R. M.; FLAMM, S. AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. **Gastroenterology**, v. 123, p. 1367-84, 2002.

HAMID, R. et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high throughput screening. **Toxicology in vitro**, v. 18, p. 703–710, 2004.

HANDY R.D, et al. Chronic exposure to diazinon: Pathologies of the spleen, thymus, blood cells and lymph nodes are modulated by dietary proteins or lipids in the mouse. **Toxicologia 172**: 13 – 34. 2002.

HARTGE P, WANG SS, BRACCI PM, DEVESA SS, HOLLY EA. Non-Hodgkin Lymphoma. In: Schottenfeld & Fraumeni. **Cancer Epidemiology and Prevention**. 3rd. New York: Oxford University Press, Inc.; 2006. p.898-918.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v.18, p. 45-51, 2003.

HALL, J. E. et al. Hall tratado de fisiologia médica. (13^a ed.), Rio de Janeiro: Elsevier. 2017.

HELALI, Imen et al. Modulation of macrophage functionality induced in vitro by chlorpyrifos and carbendazim pesticides. **Journal of immunotoxicology**, v. 13, n. 5, p. 745-750, 2016.

HERNÁNDEZ, A.F. et al. Toxic effects of pesticide mixtures at the molecular level: their relevance to human health. **Toxicologia**. Volume 307 , Páginas 136-145, 10 de maio de 2013.

HRELJAC, I. et al. Effects of model organophosphate pesticides on DNA damage and HepG2 cell proliferation. Volume 49 , Edição 5. **Sociedade Ambiental de Mutagênese e Genômica**. Junho de 2008. <https://doi.org/10.1002/em.20392>

HODGSON, E. Induction and inhibition of pesticide-metabolizing enzymes: roles in synergism of pesticides and pesticide action. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 6-11, 1999.

HOUCK, K.A. et al. Profiling bioactivity of the ToxCast chemical library using BioMAP primary human cell systems. **Journal Biomol Screen**, v. 14, p. 1054–1066, 2009.

HU, J. et al. Serum alkaline phosphatase levels as a simple and useful test in screening for significant fibrosis in 119 treatment-naive patients with hepatitis B e-antigen negative chronic hepatitis B Month **European J. of Gastroenterol. Hepatol.**, v. 31, p. 817-823, 2019.

IBAMA. Ministério do Meio Ambiente. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: 18 jun. 2021.

Instituto Nacional De Controle De Qualidade em Saúde. POP 65.3330.011: Ensaio Cometa. Rev. 10. Rio de Janeiro, 2018. 77 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

JACOMINI, A. E. et al. Assessment of ametryn contamination in river water, river sediment, and mollusk bivalves in São Paulo State, Brazil. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 60, n. 3, p. 452-461, 2011. 53 Disponível em: < <http://sci-hub.tw/10.1007/s00244-010-9552-z>>. Acesso: 06 de agosto de 2022.

JIN, X. et al. Investigation of quinocetone-induced genotoxicity in HepG2 cells using the comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and RAPD analysis. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p.1209– 1214, 2009.

JAESCHKE, H. et al. Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicology Science**, v. 65, p. 166-176, 2002.

JENNER, P. Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. **Trends Neurosci.** 24, 245–247. 2001.

JOKANOVIC, M. Neurotoxic effects of organophosphate pesticides and possible association with neurodegenerative diseases in man: a review. **Toxicologia**. Volume 410, p125-131.2018.

JORSARAEI, S.G.A. et al. Effects of carbaryl immunotoxicity in vivo and in vitro. **Toxicologia e Farmacologia Ambiental** V. 38, edição 3, páginas 838-844, novembro de 2014.

JUDSON, S. R. et al. In vitro screening of environmental chemicals for targeted testing prioritization: the ToxCast project. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, 4 ed, p. 485-492, 2010.

KASSIE, F.; PARZEFALL, W.; KNASMÜLLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 463, p. 13–31, 2000.

KASUBA, V. et al. Evaluation of genotoxic effects of lead in potteryglaze workers using micronucleus assay, alkaline comet assay and DNA diffusion assay. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 85, p. 807–818, 2012.

KIM, H. S. et, al. Evaluation of immunotoxicity induced by pirimiphos-methyl in male Balb/c mice following exposure to for 28 days. **Journal of oxicology And Environmental Health - Part A: Current Issues** 2007, s.n. p. 1278–1287.
Disponível em: DOI: 10.1080/15287390701434372.

KIM, W. R. et al. Serum activity of alanine aminotransferase ALT as an indicator of health and disease. **Hepatology**, v. 47, p. 1363– 70, 2008.

KLAASSEN, C. D. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poison. **Seventh Edition**, Kansas: 2008.

KNASMÜLLER, S.et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research** 402, 185–202, 1998.

KNASMÜLLER, S. et al. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants current state of knowledge. **Toxicology**, v.198, p.315-328, 2004.

KOOP, B. et al. Evaluation of genotoxicity and mutagenicity of mixtures of food contaminants present in the French diet. **Environmental and Molecular Mutagenesis** Volume 59, Issue 8 p. 742-754. 2018.

KORNUTA, N. Bagley E, Nedopitanskaya N. Genotoxic effects of pesticides. Journal of Environmental Pathology, **Toxicologia e Oncologia: Órgão Oficial da Sociedade Internacional de Toxicologia Ambiental e Câncer**. 1996; 15(2-4):75-78. PMID: 9216788.

KOUTROS, S. et al. Heterocyclic aromatic amine pesticide use and human cancer risk: results from the U.S. **Agricultural Health Study**. **Int. J. Cancer** 124 (5), 1206–1212. 2009.

KRIJT, J. et al. “Effect of diphenyl ether and oxadiazon herbicides on porphyrin biosynthesis in mouse liver, primary mouse hepatocyte culture and HepG2 cells”, **Archives of Toxicology**. Volume 67, edição 4, páginas. 255-261, 1993.

KUZNETSOV, A. V. et al. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct characteristics of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. **Biochimica et Biophysica Acta - Pesquisa em Células Moleculares** Volume 1853, edição 2, páginas 276-284. 2015.

LIEBEL, S. et al. Low concentrations of cylindrospermopsin induce increases of reactive oxygen species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2). **Toxicologia in vitro**. Volume 29, edição 3, pp. 479 – 488. abril de 2015.

LEE, M.; KWON, J.; CHUNG, M.K. Enhanced prediction of potential rodent carcinogenicity by utilizing comet assay and apoptotic assay in combination. **Mutation Research**, v. 541, p. 9–19, 2003.

LEIST; JAATTELA. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v 2, n 8, p.589-98, 2001.

LI, D. et al. The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. **Chemosphere** Volume 135, p. 387-393, September 2015.

LI, Q. New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity. **Journal of Nippon Medical School**, v. 74, n. 2, pág. 92-105, 2007.

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA – **Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Familiar e Agroecologia**, 1º ed. p.191, 2011.

LORINI, I; GALLEY, D.J. Effect of the synergists piperonyl butoxide and DEF in deltamethrin resistance on strains of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 29: p.749-755, 2000.

LUCAS, D. et al., Cytochrome CYP2E1 phenotyping and genotyping in the evaluation of health risks from exposure to polluted environments. **Toxicol. Lett.** 124, 71–81. 2001.

MACKENZIE-ROSS, S.J., et al., Neuropsychological and psychiatric functioning in sheep farmers exposed to low levels of organophosphate pesticides. **Neurotoxicol. Teratol.** 32 (4), 452–459. 2010.

MAGALHÃES, W.L.E; Thá, E.L; Leme D.M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA.

EMBRAPA, Comunicado Técnico 427, Colombo, PR- dezembro, 2018.

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/191253/1/CT-427-1572-final2.pdf>.

Acesso em: 18 ago. 2022.

MAIA, J. M. M., LIMA, J. L., ROCHA, T. J. M., FONSECA, S. A., MOUSINHO, K. C., & SANTOS, A. F. Perfil de intoxicação dos agricultores por agrotóxicos em Alagoas Profile of intoxication of farmers by agrochemicals in Alagoas. **Diversitas Journal**. 3(2), 486-504. 2018

MARINOVICH, M., GUIZZETTI, M.; GALLI C.L. Mixtures of benomyl, pirimiphos-methyl, dimethoate, diazinon and azinphos-methyl affect protein synthesis in HL-60 cells differently. **Toxicology** 94(1-3), 173–185, 1994.

MATSUMOTO, S.T. et al., Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.148-158, 2006.

MILLS, P.K., ZAHM, S.H. Organophosphate pesticide residues in urine of farm workers and their children in Fresno County, California. **Am. J. Ind. Med.** 40, 571–577. 2001.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journam of immunological methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MOLLER, P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.98, p. 336–345, 2006.

MOORE, et al. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (hepg2) cells. **Environmental Toxicology**.volume 25, issue 3 p. 221-226. 2010.

MUELLER, N.E. GRUFFERMAN S. Hodgkin lymphoma. In: schottenfeld & fraumeni. **Cancer Epidemiology and Prevention**. 3rd. New York: Oxford University Press, Inc. p.872-897. 2006.

NAGY, K. et al. Systematic review of comparative studies evaluating the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. **Environmental Research**. v. 181, p. 108926. 2020.

NAJI-ALI, F. et al., Human Bioassays to Assess Environmental Genotoxicity: Development of a DNA Repair Assay in HepG2 Cells. **Clinical Biochemistry**, v. 27, p. 44-448, 1994.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Database. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>. Acesso em: 24 jan. 2022.

NEISHABOURI E.Z, Hassan Z.M, Azizi E, Ostad S.N. Avaliação da imunotoxicidade induzida por diazinon em camundongos C57bl/6. *Toxicologia* **196**: 173 – 179. 2004

NERILO, S. B., et al., Pesticide use and cholinesterase inhibition in small-scale agricultural workers in southern Brazil. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 50(4). 2014.

NGOULA F, et. al., Effects of pirimiphos-methyl (an organophosphate insecticide) on the fertility of adult male rats. *Afr Health Sci.*7 (1) p.3-9, 2007.

NWANJO, U.; OKAFOR M.C, OZE G.O. Alterações nos parâmetros bioquímicos da função renal em ratos coadministrados com cloroquina e aspirina *J. Clin. Ciência*, 23, pp. 10 – 12. 2005.

OJHA A, GUPTA Y. Evaluation of the genotoxic potential of commonly used organophosphate pesticides in rat peripheral blood lymphocytes. *Toxicologia Humana e Experimental*. 2015;34(4):390-400. doi: 10.1177/0960327114537534

OLIVE, P.L; WLODECK, D; BABÁTH J. P. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Research*, v.51, p.4671-4676, 1991.

OKI, N.O. et al., Integrated analysis of in vitro data and the adverse outcome pathway framework for prioritization and regulatory applications: an exploratory case study using publicly available data on piperonyl butoxide and liver models. *Toxicology in Vitro*. V. 54 , páginas 23-32. 2019.

OGASAWARA, N. et al. Diazinon-induced modulation of immune activity in macrophages. *Toxicologia*. Volume 379, páginas 22-30, 15 de março de 2017.

ORSI, L. et al., Occupational exposure to pesticides and lymphoid neoplasms among men: results of a French case-control study. *Occup. Environ. Med.* 66 (5), p. 291–298. 2009.

OLSVIK P. A., BERNTSSEN M.H.G., SØFTELAND L., In vitro toxicity of pirimiphos-methyl in Atlantic salmon hepatocytes, **Toxicology in Vitro**, Volume 39, Pages 1-14. 2017.

OTTENSMEIER, C. The classification of lymphomas and leukemias. **Chemico Biological Interactions**. 135-136: p 653 – 664. 2001

OZER, J. et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, p. 194–205, 2008.

PACIFICO, L. et al. Upper limit of normal for alanine aminotransferase: quo vadis? **Chimica Acta.**, v. 422, p. 29– 39, 2013.

PAHWA M, HARRIS SA, HOHENADEL K, MCLAUGHLIN JR, SPINELLI JJ, PAHWA P, et al. Pesticide use, immunologic conditions, and risk of non-Hodgkin lymphoma in Canadian men in six provinces. **International Journal of Cancer**. 2012 Dec;131(11):2650-9. PubMed PMID: WOS:000309185400020.

PANDEY, A.K. et al. In silico studies with human DNA topoisomerase-II alpha to unravel the mechanism of in vitro genotoxicity of benzene and its metabolites. **Mutation Research**, v. 661, p. 57-70. 2009.

PALMA, D. C. A. 2011 **Agrotóxicos em leite humano de mães residentes em Lucas do Rio Verde – MT**. (Dissertação Mestrado- Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. 2011.

PARNEY, M. et al. Differential immunomodulatory effects of six pesticides from different chemical classes on human monocyte-derived macrophage functions. **Toxicologia Alimentar e Química**. Volume 163, maio de 2022.

PATIL J. A, et al. Biochemical effects of various pesticides on grape orchard sprayers. **Ind. J. Clin. Bioquim**. 18, pp. 16 – 22.2003.

PIATTI, E.; MARABINI, L; CHIESARA, E. Increase of micronucleus frequency in cultured rat hepatocytes treated in vitro with benomyl and pirimiphos-methyl separately and in mixture. *Mutat Res.* Volume 324, edições 1–2, p 59-64. junho de 1994.

PELAEZ, V. et al. Regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, Editora UFPR. v. 36, n. 1 (ano 34), p. 27-48, jan/abr. 2010.

PEREIRA, J. N. 2019. **Assistência de enfermagem realizada a agricultores em uso de agrotóxico** (Dissertação Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Pombal, Paraíba, Brasil. 2019.

PERRILLO, R. P.; LAI, C. L.; LIAW, Y. F.; DIENSTAG, J. L; SCHIFF, E. R. et al. Predictors of HBeAg loss after lamivudine treatment for chronic disease progression. **Hepatology hepatitis B. Hepatology**, v. 36, p.186-194, 2002.

PFALLER, W; GSTRAUNTHALER, G. Nephrotoxicity testing in vitro-what we know and what we need to know. **Environmental Health Perspectives**, v 106, p.559-569, 1998.

PFUHLER, S. et al., *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: summary of an IWGT workshop. **Mutation Research**, v, 723, p. 101–107, 2011.

PERES, F; MOREIRA, J; DUBOIS, G. Agrotóxicos, Saúde E Ambiente: Uma Introdução Ao Tema. In: Peres, F.; Moreira, J.C. (orgs.). **É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro. Editora: Fiocruz, p. 384, 2003.

PRATT, D.S; KAPLAN, M.M. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, p. 1266-1271, 2000.

PRICE, M; SAFIRSTEIN, R.; MEGYESI, J. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v.286, p 378-84, 2004.

PROSKOCIL, Becky J. et al. Organophosphorus pesticides induce cytokine release from differentiated human THP1 cells. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 61, n. 5, p. 620-630, 2019.

PUBCHEM. **Butóxido de piperonila**. U.S. National Library of Medicine, 2021.

Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Piperonyl-butoxide#section=Solubility>>. Acesso em: 21 nov. 2021.

PUBCHEM. **Pirimifós**. U.S. National Library of Medicine, 2021.

Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=PIRIMIFOS>>. Acesso em: 21 nov. 2021.

RACINE, C. et al. Nephrotoxicity of 3,4,5-trichloroaniline in vitro: potential role of free radicals and renal biotransformation. **Int J Mol Sci** 15: 20900 – 20912 2014.

RAJINI, P.S. KRISHNAKUMARI M.K. Toxicity of pirimiphos-methyl: I. The acute and subacute oral toxicity in albino rats. **J Environ Sci Health B**. (2):127-44. 1988

RAJINI P.S, KRISHNAKUMARI M. K Toxicity of pirimiphos-methyl: II. Effect of dietary feeding on blood and urine constituents in albino rats. **Journal of Environmental Science and Health**, Parte B, 23:2, 145-158 1988.

RISS, T.L; MORAVEC.A.R. Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based cytotoxicity Assays. **Assay Drug Dev. Technol.** 2, 51–62. 2004.

ROJAS, E.; LOPEZ, M.C; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. S. 225–254, 1999.

RUMBOS C. I., DUTTON A CRISTINA, CHRISTOS G. ATHANASSIOU. Comparison of two pirimiphos-methyl formulations against major stored-product insect species. **Journal of Stored Products Research**, Volume 55, Pages 106-115, 2013.

SABIU, S. et al. Toxicopathological evaluation of a 28-day repeated dose administration of Zea mays L. (Poaceae), Stigmamaydisaqueous extract on key metabolic markers of Wistar rats. **Transactions of the Royal Society of South Africa**, v. 72, n. 3, p. 225-233, 2017.

SALATI P. Número de agrotóxicos registrados em 2021 é o mais alto da série histórica; maioria é genérico, diz governo. G1, Rio de Janeiro, **Agro** 18 jan. 2022.

SAMSON. P.R. et. al. Synergized deltamethrin as a protectant against Sitophilus zeamais Motsch. and S. oryzae (L.) (Coleoptera: Curculionidae) on stored maize. **Journal of Stored Products Research** 26. p.155-161. 1990.

SAMPAIO et al. Receituário agrônômico – **Guia prático para a nova lei dos agrotóxicos**. Publicações Globo, São Paulo 2º ed. 436p. 1991.

SAMPAIO, J.; et al. Study of in vitro and in vivo genotoxicity after acute and subchronic exposure to aqueous extracts of Ilex paraguariensis A. St.-Hil. Obtained by infusion. **Revista Brasileira de Biociências**, v.10, n.4, p.462-467, 2012.

SANTOS, T.C.C; Câmara, J.B.D. (Org.). **GEO Brasil: perspectivas do meio ambiente no Brasil**. Brasília, DF: IBAMA, p.447, 2002.

SCHREINEMACHERS D, CREASON J, GARRY V. Cancer Mortality in Agricultural Regions of Minnesota. **Environ Health Perspect**. Mar;107(3):205-11. 57 23. 1999.

SCHVARTSMAN, S. Produtos Químicos de Uso Domiciliar: segurança e riscos toxicológicos. 2ed. São Paulo. **ALMED** 179p. 1988.

SCOTT, J.G.; WEN, Z. Cytochromes P450 of insects: the top of the iceberg. **Pest Manag Sci** 57. p.958-967. 2001.

SHARMA, A. et al. Worldwide use of pesticides and their impacts on the ecosystem. **SN Aplic. Sci.** V. 1 p. 1446. 2019.

SILVA, J.M. et al. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a Saúde do agricultor rural. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.10, n°. 4, p. 891- 903; 2005.

SINGH, N.P et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, p. 184–191. 1988.

SINGH, S., et al. DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticide. **Toxicologia Ambiental e Farmacologia**, 31, 278-285. 2011.

SPADOTTO, C.A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. In: Jornada Jurídica da Faculdade Marechal Rondon, **Revista do Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, São Manuel, SP v.4, p. 1-9, maio 2006. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1026375>
Acesso em: 21 de outubro de 2021.

SPEIT, G; HARTMANN, A. The Comet Assay. **DNA Repair Protocols**, v. 291, p. 275–286, 2006. DOI: 10.1385/1-59259-973-7:275.

SOUZA, J.S.I. et al. **ENCICLOPÉDIA Agrícola Brasileira**: Editora da Universidade de São Paulo, vol.1, 85 p, São Paulo 1995.

SONG, M.K. et al. Formation of a 3,4-diol-1,2-epoxide metabolite of benz[a]anthracene with cytotoxicity and genotoxicity in a human in vitro hepatocyte culture system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 33, p. 212-225, 2012.

SHUKLA, V.K., et al., Organochlorine pesticides in carcinoma of the gallbladder: a case-control study. **Eur. J. Cancer Prev.** 10, 153–156. 2001.

SKULACHEV.V.P. Mitochondria in programmed death phenomena: a principle of biology: it is better to die than to be wrong. **IUBMB Life**, v. 49, p. 365-373, 2000.

SYME, T., et al. Pyrethroid-piperonyl butoxide (PBO) nets reduce the efficacy of indoor residual spraying with pirimiphos-methyl against pyrethroid-resistant malaria vectors. *Sci Rep* 12, 6857 2022.

TIAN, L., et al. Serological AFP/golgi protein 73 could be a new diagnostic parameter of hepatic diseases. *Int. J. Cancer*, v. 129, p. 1923–31, 2011.

TICE, R.R. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoresis technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D.H.; VENITT, S. (Ed.). **Environmental mutagenesis**. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers, p. 315– 339. 1995.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206–221, 2000.

TICE, R.R.; ANDREWS, P.W; SINGH, N.P. The single cell gel assay. A sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In: suntherland, b.m.; wordhead, a.d. (Ed.). **DNA Damage and Repair in Human Tissues**. New York: Plenum, 1990.

TROMPOWSKY, A. C. M. V. Estudo da genotoxicidade in vitro de substâncias nitroimidazólicas como instrumento para busca de novos agentes tripanomicidas. 2016. 151 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais. **Recordista em liberações, governo Bolsonaro autoriza 51 novos agrotóxicos apenas em julho**. 2021. Disponível em:< <https://manuelzao.ufmg.br/recordista-em-liberacoes-governo-bolsonaroautoriza-51-novos-agrotoxicos-apenas-em-julho/>>. Acesso em 10 de nov. 2022.

VARDAVAS, A.I., et al., Long-term exposure to cypermethrin and piperonyl butoxide cause liver and kidney inflammation and induce genotoxicity in New Zealand white male rabbits. **Food and Chemical Toxicology** 2016.

VAN DE LOOSDRECHT, et al. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. **Journal of immunological methods**, v. 174, p. 311–320, 1994.

VINKEN, M., BLAAUBOER, B.J., In vitro testing of basal cytotoxicity: Establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. **Toxicologia. Vitro**. 2016.

WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. **PloS one**, v. 4, n. 4, p. 1–12, 2010.

WEIS, Grazielle Castagna Cezimbra et al. Immunomodulatory effect of mancozeb, chlorothalonil, and thiophanate methyl pesticides on macrophage cells. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 182, p. 109420, 2019.

WESTERINK, W.M.; SCHOONEN, W.G. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells, **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1581–1591, 2007a.

WESTERINK, W.M.; SCHOONEN, W.G. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells, **Toxicology in Vitro**, v.21, p.1592–1602, 2007b.

WHO. World Health Organization. **Who specifications and evaluations for public health pesticides pirimiphos-methyl**. WHO Library, Geneva, 2016.

XIÃO, L.; et al. Parameters associated with significant liver histological changes in patients with chronic hepatitis B. **ISRN Gastroenterol**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

YASUNAGA, Sho et al. Methoxychlor enhances degranulation of murine mast cells by regulating FcεRI-mediated signal transduction. **Journal of immunotoxicology**, v. 12, n. 3, p. 283-289, 2015.

YUN X.; et al. A comparative assessment of cytotoxicity of commonly used agricultural insecticides to human and insect cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Volume 137, p. 179-185, March 2017.

ZAFIROPOULOS, A., et al. Cardiotoxicity in rabbits after a lowlevel exposure to diazinon, propoxur, and chlorpyrifos. **Hum. Exp. Toxicol.** 33 (12), 1241–1252. 2014.

ZAMBRONE, F.A.D. **Perigosa família: Agrotóxicos**. *Ciência hoje*. V. 4, n°.22, p.44-47,1986.

ZEGURA, B. et al. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Quimiosfera**. Volume 75, Edição 11, junho de 2009 p. 1453-1460.

ŽELJEŽIĆ, D. et al. Cytotoxic, genotoxic and biochemical markers of insecticide toxicity evaluated in human peripheral blood lymphocytes and an HepG2 cell line. **Food and Chemical Toxicology**, v. 96, p. 90–106, 2016.

ZHANG, N. et al. Evaluation of toxicological effects of organophosphorus pesticide metabolites on human HepG2 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Volume 88, 103741, November 2021.