

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS**

Grazielle Castagna Cezimbra Weis

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO PRÓ-INFLAMATÓRIO E OXIDATIVO DOS
PESTICIDAS MANCOZEBE, CLOROTALONIL E TIOFANATO METÁLICO**

Santa Maria, RS
2017

Grazielle Castagna Cezimbra Weis

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO PRÓ-INFLAMATÓRIO E OXIDATIVO DOS
PESTICIDAS MANCOZEBE, CLOROTALONIL E TIOFANATO METÁLICO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ijoni Hilda Costabeber

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Weis, Grazielle Castagna Cezimbra
Avaliação in vitro do efeito pró-inflamatório e oxidativo dos pesticidas mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico / Grazielle Castagna Cezimbra Weis.- 2017.
83 f.; 30 cm

Orientadora: Ijoni Hilda Costabeber
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2017

1. Pesticidas 2. Mancozebe 3. Clorotalonil 4. Tiofanato metílico 5. Pró-inflamatório I. Costabeber, Ijoni Hilda II. Título.

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Grazielle Castagna Cezimbra Weis. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: grazielle.castagna@gmail.com

Grazielle Castagna Cezimbra Weis

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO PRÓ-INFLAMATÓRIO E OXIDATIVO DOS
PESTICIDAS MANCOZEBE, CLOROTALONIL E TIOFANATO METÁLICO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovado em 02 de março de 2017:



Ijoni Hilda Costabeber, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Tatiana Emanuelli, Dr^a. (UFSM)



Margarete Dulce Bagatini, Dr^a. (UFFS)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

A minha família, que sempre esteve e estará comigo nos momentos de risos e lágrimas, ainda que alguns somente em espírito e não mais fisicamente. Essa base sólida, exemplo de amor e união, me traz segurança e impulsiona para voos mais altos.

AGRADECIMENTOS

A Deus que, em sua infinita bondade, amparou-me nas horas difíceis e me guiou em busca dos melhores caminhos.

A minha mãe e ao meu pai, Agueda e Farley, que são meus pilares, exemplo de amor, dedicação e trabalho, muito obrigada pelo incentivo e amor incondicional.

A minha irmã Gabrielle, por ser essa pessoa especial, que dividiu comigo desde a mesma barriga, as mamadeiras e até confidências e risadas.

A minha amada vó Roma, que com seu amor infinito, é alento para meu coração. Obrigada por tudo vó, especialmente pelos deliciosos “cafés da manhã”.

Ao meu namorado Jean, pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão. Muito obrigada por ser o meu porto seguro nas horas difíceis.

A minha família como um todo: tios e tias, primos e primas, avós, especialmente minha vó Maria Lacy (*in memoriam*), sem essa família eu não seria nada.

A minha orientadora, Prof^a. Ijoni Hilda Costabeber, meu sincero agradecimento pela oportunidade, troca de saberes e confiança depositada em meu trabalho.

A minha co-orientadora, Prof^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz, por me receber de portas abertas em seu laboratório, pela amizade e pelos ensinamentos compartilhados.

As colegas do Laboratório de Análises de Poluentes Persistentes (LAPP), Giane e Anelise, pela amizade, conversas, parceria e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Biogenômica, pela troca de conhecimento, pelos experimentos e pelo convívio diário com muitas conversas e risadas. Um muito obrigada em especial, para os amigos Charles, Francine e Alencar que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho e foram companheiros de todas as horas.

As amigas Audrei e Beatriz, inicialmente apenas colegas de laboratório, mas que hoje são muito mais do que amigas. Obrigada pela amizade, companheirismo, apoio, incentivo, conversas, risadas e lágrimas.

A amiga Daniele Bobrowski, por ter sido minha primeira mamãe científica, pelos ensinamentos compartilhados e pela amizade.

A Milena Sulzbach, pela amizade valiosa desde a época do colégio, pelas conversas, risadas e pelo apoio.

As colegas e amigas da graduação, Letícia, Luana e Mariane, pelas risadas, conversas e parceria sempre.

As colegas de mestrado, por dividirem comigo momentos de desespero, angústias e alegrias nestes dois anos. Especialmente as amigas Jéssica Righi e Eduarda da Rosa, pela amizade, conversas e apoio.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela formação proporcionada.

A todos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho e deste sonho.

Muito obrigada!

“Porque eu sou do tamanho do que vejo, e não do tamanho da minha altura. E o que vejo são os meus sonhos”.

Alberto Caeiro

RESUMO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO PRÓ-INFLAMATÓRIO E OXIDATIVO DOS PESTICIDAS MANCOZEBE, CLOROTALONIL E TIOFANATO METÍLICO

AUTORA: Grazielle Castagna Cezimbra Weis

ORIENTADORA: Ijoni Hilda Costabeber

Os pesticidas são amplamente utilizados na agricultura e na saúde pública para o controle e prevenção de pragas. O uso indiscriminado desses compostos pode desencadear a contaminação ambiental por agrotóxicos e aumentar o risco de exposição dos seres humanos. A exposição aos agrotóxicos pelos humanos pode ocorrer de forma direta, através de atividade ocupacional, ou de forma indireta, pelo ambiente e pela alimentação. A exposição crônica aos pesticidas pode resultar em distúrbios neurológicos, reprodutivos, teratogênicos e imunológicos. Os pesticidas mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico são fungicidas amplamente utilizados no mundo. Apesar de suas características de baixa toxicidade aguda e baixa persistência no ambiente, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram os efeitos citotóxicos desses compostos. Entretanto, os efeitos imunológicos que esses pesticidas podem desencadear são pouco explorados. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o efeito pró-inflamatório e oxidativo dos pesticidas mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico. Os macrófagos RAW 264.7 (ATCC[®] TIB-71[™]) foram expostos a diferentes concentrações (0,1 – 100 µg/mL) de cada pesticida por 72 horas, sendo mantidos em atmosfera com 5% CO₂ a 37°C. Os pesticidas foram dissolvidos em dimetilsulfóxido, o qual foi utilizado como controle negativo. Como controle positivo para a ativação inflamatória, utilizou-se a fitohemaglutinina. A avaliação da proliferação celular, do metabolismo oxidativo e dos níveis das citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, TNF-α e IFN-γ), da citocina anti-inflamatória (IL-10) e das caspases (Casp1, Casp3, Casp8) foi realizada por testes fluorimétricos e moleculares. Os resultados obtidos demonstraram efeito pró-inflamatório significativo dos pesticidas mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico nas respectivas concentrações de 1, 3 e 100 µg/mL, ocorrendo aumento da proliferação celular e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e caspases. Entretanto, o efeito oxidativo somente foi observado nos macrófagos expostos ao clorotalonil na concentração de 3 µg/mL. Assim, nessas condições de análise, os pesticidas estudados atuam ativando o sistema imune. Os resultados encontrados contribuem para a melhor compreensão dos efeitos imunológicos que a exposição a estes pesticidas pode desencadear.

Palavras-chave: Pesticidas. Mancozebe. Clorotalonil. Tiofanato metílico. Macrófagos RAW 264.7. Pró-inflamatório. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

IN VITRO EVALUATION OF PRO-INFLAMMATORY AND OXIDATIVE EFFECT OF MANCOZEB, CHLOROTHALONIL AND THIOPHANATE METHYL PESTICIDES

AUTHOR: Grazielle Castagna Cezimbra Weis

ADVISOR: Ijoni Hilda Costabeber

Pesticides are widely used in agriculture and public health for pest control and prevention. The indiscriminate use of these compounds can trigger environmental contamination by pesticides and increase the risk of human exposure. Human exposure to pesticides can occur directly, through occupational activity, or indirectly, through the environment and food. Chronic exposure to pesticides may result in neurological, reproductive, teratogenic and immunological disorders. Mancozeb, chlorothalonil and thiophanate methyl are fungicides widely used in the world. Despite their characteristics of low acute toxicity and low persistence in the environment, *in vitro* and *in vivo* studies demonstrate the cytotoxic effects of these compounds. However, the immunological effects that these pesticides can trigger are unexplored. Therefore, the objective of this study was to evaluate *in vitro* the pro-inflammatory and oxidative effects of mancozeb, chlorothalonil and thiophanate methyl pesticides. RAW 264.7 (ATCC[®] TIB-71[™]) macrophages were exposed to different concentrations (0.1-100 µg/mL) of each pesticide for 72 hours, and maintained in 5% CO₂ atmosphere at 37°C. The pesticides were dissolved in dimethylsulfoxide, which was used as negative control. Phytohemagglutinin was used as positive control for inflammatory activation. The evaluation of cell proliferation, oxidative metabolism and pro-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α and IFN-γ), anti-inflammatory cytokine (IL-10) and caspases (Casp1, Casp3, Casp8) levels were performed by fluorimetric and molecular tests. The results showed a significant pro-inflammatory effect of mancozeb, chlorothalonil and thiophanate methyl pesticides at respective concentrations of 1, 3 and 100 µg/mL, with increase in cell proliferation and pro-inflammatory cytokines and caspases levels. However, the oxidative effect was only observed in macrophages exposed to chlorothalonil at 3 µg/mL. Thus, in these analysis conditions, the studied pesticides acted by activation of the immune system. The results found contribute to better understanding of immunological effects caused by exposure to these pesticides.

Keywords: Pesticides. Mancozeb. Chlorothalonil. Thiophanate methyl. Macrophages RAW 264.7. Pro-inflammatory. Oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
CASP1	Caspase 1
CASP3	Caspase 3
CASP8	Caspase 8
DAMPs	Damage associated molecular patterns
DTC	Ditiocarbamatos
EBDC	Etileno-bis-ditiocarbamatos
EPA	Environmental Protection Agency
EPI	Equipamento de proteção individual
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ETU	Etilenotiouréia
DDT	Diclorodfeniltricloroetano
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IARC	Internacional Agency for Research on Cancer
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IFN- γ	Interferon gamma
IL-6	Interleucina 6
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
LMR	Limites Máximos de Resíduos
MBC	Metil-2-benzimidazole carbamato
MS	Ministério da Saúde
NF κ B	Nuclear fator κ B
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
O ₂	Superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PARA	Programa para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PRRs	Pattern recognition receptors
TNF- α	Tumoral necrosis fator alpha

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS	13
1.1.1	Objetivo Geral	13
1.1.2	Objetivos Específicos	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	AGROTÓXICOS	14
2.1.1	Conceito	14
2.1.2	Classificação dos agrotóxicos	14
2.1.2.1	<i>Alvos de ação</i>	15
2.1.2.2	<i>Modo de ação</i>	15
2.1.2.3	<i>Estrutura química</i>	15
2.1.2.4	<i>Toxicidade</i>	16
2.1.3	Histórico dos agrotóxicos	19
2.1.4	A utilização de agrotóxicos no Brasil	20
2.1.5	Exposição humana aos agrotóxicos	21
2.1.6	Implicações na saúde humana	22
2.1.7	Mancozebe	23
2.1.8	Clorotalonil	24
2.1.9	Tiofanato metílico	26
2.2	INFLAMAÇÃO	27
2.2.1	O sistema imunológico	27
2.2.2	Ativação inflamatória e o estresse oxidativo	29
2.2.3	Ativação da inflamação	30
2.2.4	Linhagem celular RAW 264.7	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	MANUSCRITO	32
4	DISCUSSÃO	61
5	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO A – NORMAS DE SUBMISSÃO PARA O PERIÓDICO	74

1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são utilizados no controle e na prevenção de pragas durante o cultivo e após a colheita, melhorando a produtividade e a qualidade da produção agrícola (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2008; BRASIL, 2013).

No Brasil, os agrotóxicos são extensivamente utilizados, fazendo com que o país seja considerado o maior consumidor destas substâncias no mundo, representando 19% do uso mundial (BASTOS; CARDOSO, 2011; CARNEIRO et al., 2015). Na safra de 2011, foram pulverizados nas lavouras nacionais 853 milhões de litros de agrotóxicos, representando média de uso de 12 litros por hectare e exposição média ambiental, ocupacional e alimentar de 4,5 litros de agrotóxicos por habitante por ano (SINDAG, 2011).

A exposição humana aos agrotóxicos pode ocorrer de forma direta, através da exposição ocupacional, ou de forma indireta, pela exposição ambiental e pela alimentação (ANDERSON; MEADE, 2014). Análises em alimentos vêm demonstrando quantidades de resíduos de agrotóxicos excessivas em alimentos de origem vegetal, especialmente em frutas e legumes (BRASIL, 2011; CARNEIRO et al., 2015). Por estarem presentes nos alimentos, isso significa que dependendo da higienização, do modo de preparo e forma de consumo, ao ingerir o alimento, o indivíduo estará ingerindo juntamente os agrotóxicos presentes nessa fonte alimentar. Além disso, análises realizadas em leite materno demonstraram a presença de resíduos de pesticidas organoclorados, indicando que a exposição aos agrotóxicos inicia já na infância (PIRSAHEB et al., 2015).

Anualmente no Brasil, segundo o Ministério da Saúde, 400 mil novos casos de intoxicações por agrotóxicos são registrados com uma taxa de 1% de mortes (CARNEIRO et al., 2015). No entanto, acredita-se que exista subnotificação da ocorrência de intoxicações, tendo em vista que o Brasil não possui um sistema adequado de registros, que ateste quais são os agrotóxicos envolvidos nos casos e, tampouco, diferencie as intoxicações agudas e crônicas (CARNEIRO et al., 2015). Além dos efeitos agudos, a exposição humana prolongada aos agrotóxicos pode resultar em distúrbios neurológicos, reprodutivos, teratogênicos e imunológicos (FRANCO et al., 2010; MA, LI, 2015; KIM; KABIR; JAHAN, 2017).

A adoção do modelo agrícola brasileiro, que utiliza em larga escala e indiscriminadamente os agrotóxicos, vem preocupando as autoridades públicas quanto a seus impactos na saúde humana e na sustentabilidade do meio ambiente (BRASIL, 2012; BASTOS; CARDOSO, 2011). Devido à isso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou o Programa para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

(PARA), visando estabelecer e fiscalizar os Limites Máximos de Resíduos (LMR) desses produtos em alimentos (BRASIL, 2011). Os LMR correspondem a maior concentração que o agrotóxico pode estar presente nos alimentos sem causar malefícios à saúde humana, não apresentando efeitos citotóxicos (COOPER; DOBSON, 2007). Além disso, estabeleceu-se os valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) para cada composto conforme o peso corporal (BRASIL, 2011).

Os pesticidas mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico são amplamente utilizados no Brasil e no mundo (PATHAK et al., 2008; IBAMA, 2014; AGROFIT, 2016). Apesar destes fungicidas possuírem baixa persistência no ambiente e apresentarem baixa toxicidade aguda, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* reportam os efeitos citotóxicos desses compostos. No entanto, os efeitos imunológicos que a exposição a estes pesticidas pode desencadear são pouco explorados (TESSIER et al., 2001; CORSINI et al., 2005; YU et al., 2009).

O processo inflamatório tem como características a proliferação celular, a liberação de citocinas inflamatórias e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (AUFFRAY et al., 2007). O desbalanço entre os níveis de EROs produzidas e as defesas antioxidantes caracteriza um quadro de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A ativação do processo inflamatório e oxidativo está associada com a patogenia de diversas doenças crônicas degenerativas, neurodegenerativas e neoplasias (KIM; KABIR; JAHAN, 2017).

Desse modo, torna-se oportuna a realização de estudos de modo a avaliar os efeitos pró-inflamatórios e oxidativos dos pesticidas mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico, ainda pouco explorados pela ciência.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* o efeito pró-inflamatório e oxidativo dos pesticidas mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico em macrófagos RAW 264.7.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a proliferação celular e o estresse oxidativo gerado pelas diferentes concentrações dos pesticidas;
- Estabelecer a concentração mínima dos pesticidas capaz de desencadear o processo inflamatório e oxidativo;
- Verificar a modulação do ciclo celular pela exposição às concentrações mínimas dos fungicidas;
- Quantificar os níveis das citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ) e da citocina anti-inflamatória (IL-10) gerados pelas concentrações mínimas;
- Mensurar os níveis das caspases (Casp1, Casp3, Casp8) produzidos pelas doses mínimas dos fungicidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGROTÓXICOS

2.1.1 Conceito

Em meados da década de 1950, com o crescimento da população mundial e, conseqüentemente, o aumento da demanda por alimentos, impulsionou-se o desenvolvimento de sistemas agrícolas cada vez mais eficientes (SHARMA et al., 2010). Desde então, o uso de agrotóxicos vêm sendo a principal estratégia de controle e prevenção de pragas durante o cultivo e após a colheita, melhorando a produtividade e a qualidade da produção agrícola (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2008; BRASIL, 2013).

No Brasil, de acordo com a Lei nº 7.802 de 1989 e a Lei nº 9.974 de 2000, os agrotóxicos são definidos como:

Produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento (BRASIL, 1989; 2012).

Estas substâncias utilizadas possuem várias denominações, entre elas estão agrotóxicos, biocidas, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, venenos e agroquímicos. No Brasil, o termo “agrotóxico” é mais utilizado ao invés de “defensivo agrícola”, de modo a evidenciar a toxicidade desses produtos para o meio ambiente e para a saúde humana (BARBOSA, 2004).

2.1.2 Classificação dos agrotóxicos

Os agrotóxicos podem ser classificados segundo aos alvos de ação, o modo de ação, a estrutura química e a toxicidade (BRASIL, 2008). Essa classificação possibilita conhecer informações acerca do comportamento químico da substância usada como agrotóxico, tais

como a persistência no ambiente e sua ação sobre o organismo alvo e nos seres humanos que venham a se contaminar (LARINI, 1999).

2.1.2.1 Alvos de ação

Devido aos diferentes alvos biológicos, o mercado de agrotóxicos é segmentado em diferentes alvos de ação, sendo os principais: herbicidas, fungicidas e inseticidas. Destes, os herbicidas e os fungicidas são os que apresentam maior volume de exportações e importações no mundo, com 45% e 14%, respectivamente (BRASIL, 2012).

2.1.2.2 Modo de ação

Os pesticidas podem ser classificados como de contato, de ingestão ou sistêmicos conforme o modo de ação. Os agrotóxicos de contato atuam na superfície do alimento, atingindo diretamente o organismo alvo, enquanto os de ingestão atuam após o biocida ser ingerido pelo alvo biológico. Já os pesticidas sistêmicos penetram na seiva da planta e percorrem todos os tecidos vasculares, exercendo uma ação fitotóxica no caso de herbicidas ou atuando contra insetos quando estes se alimentam da seiva (BARBOSA, 2004).

Os agrotóxicos sistêmicos e parte dos agrotóxicos de contato são absorvidos pelos tecidos internos da planta e, caso não seja respeitado a dosagem adequada e o período de carência ou não tenham sido degradados pelo próprio metabolismo vegetal, podem permanecer nos alimentos mesmo que estes sejam higienizados (BRASIL, 2008).

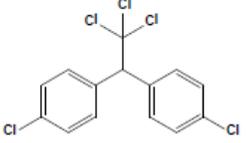
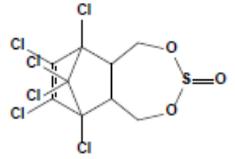
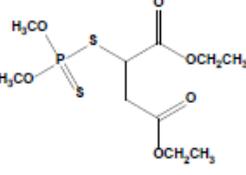
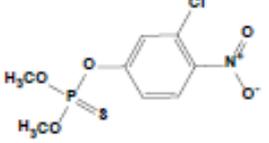
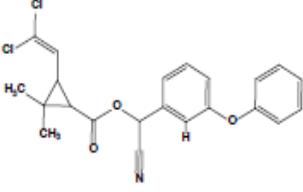
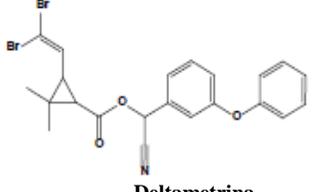
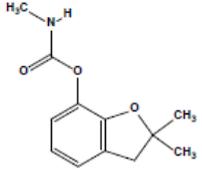
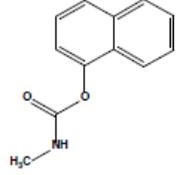
2.1.2.3 Estrutura química

Quanto à estrutura química, as principais classes de agrotóxicos são organoclorados, organofosforados, piretróides e carbamatos (BARBOSA, 2004). No Quadro 1, são apresentadas algumas características acerca do comportamento químico, persistência no ambiente e ação sobre os organismos, e exemplos de estruturas químicas de cada classe.

2.1.2.4 Toxicidade

Um significativo critério de classificação dos agrotóxicos é quanto ao seu grau de toxicidade. Esta classificação é fundamental para o conhecimento dos efeitos agudos que os pesticidas podem provocar (OMS, 1991).

Quadro 1 – Classificação quanto a estrutura química, características acerca do comportamento, persistência no ambiente e ação sobre os organismos, e exemplos de estruturas químicas de cada classe de agrotóxico

Classe	Características	Exemplos
Organoclorados	Possuem o elemento cloro em suas moléculas. Apresentam elevada estabilidade físico-química, com alta persistência no ambiente e baixas taxas de degradação e de biotransformação. São lipossolúveis com tendência de se bioacumular ao longo da cadeia alimentar, porém com baixa toxicidade aguda (FLORES et al., 2004; ALVES et al., 2010).	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>DDT – Dicloro Difetil Tricloroetano</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Endossulfam</p> </div> </div>
Organofosforados	São derivados orgânicos dos ácidos fosfórico, ditiofosfórico e tiofosfórico. Apresentam baixa volatilidade e baixa persistência no ambiente, decompondo-se dentro de poucos dias. São lipossolúveis, possuindo toxicidade aguda mais elevada para os mamíferos do que os organoclorados (SANTOS, DONNICI, 2007).	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Malation</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Clortion</p> </div> </div>
Piretróides	São derivados sintéticos das piretrinas, ésteres tóxicos isolados das flores das espécies de <i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> . São pouco persistentes no ambiente e menos tóxicos para os mamíferos do que os organofosforados e carbamatos (SANTOS, AREAS, REYES, 2007).	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Cipermetrina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Deltametrina</p> </div> </div>
Carbamatos	São derivados do ácido carbâmico. Apresentam alta eficiência e amplo espectro de uso. Possui baixa persistência no ambiente, apresentando rápida decomposição em ambientes aquáticos. Demonstra baixa toxicidade em longo prazo (SANCHES et al., 2003; SANTOS, DONNICI, 2007).	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Carbofuram</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Carbaril</p> </div> </div>

A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1991) considera três fatores: a dose letal média (DL50) do agrotóxico formulado, a forma de contato do agrotóxico (oral ou dérmica) e o tipo de formulação (sólida ou líquida). Referindo-se a DL50, esta consiste na quantidade da substância tóxica que produz uma mortalidade de 50% dos animais de prova, em condições controladas por um tempo de 24 horas, sendo expressa em miligrama de agrotóxico por quilograma de peso do animal (mg/Kg) (COPPLESTONE, 1988).

No Brasil, a classificação toxicológica está a cargo do Ministério da Saúde, que determina que todos os produtos devem apresentar nos rótulos uma faixa colorida indicativa de sua classe toxicológica (SANTOS; DONNICI, 2007). Na Tabela 1, pode-se visualizar as classes toxicológicas, a coloração da faixa e a DL50 conforme o tipo de formulação e a forma de contato.

Outra classificação existente, fornecida pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), é quanto ao potencial cancerígeno de substâncias químicas, agentes e exposições para os seres humanos. Esta classificação é realizada baseando-se em evidências de estudos epidemiológicos e laboratoriais sobre a carcinogenicidade das substâncias (IARC, 1987) (Tabela 2).

Tabela 1 – Classificação toxicológica dos agrotóxicos

Classe do agrotóxico	DL50 para ratos (mg.kg ⁻¹ de peso corporal)			
	Via de entrada			
	Oral		Dérmica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Classe I – Extremamente tóxico (faixa vermelha)	< 5	< 20	< 10	< 40
Classe II – Altamente tóxica (faixa amarela)	5 a 50	20 a 200	10 a 100	40 a 400
Classe III – Medianamente tóxica (faixa azul)	50 a 500	200 a 2000	100 a 1000	400 a 4000
Classe IV – Pouco tóxica (faixa verde)	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

Fonte: (BRASIL, 1992).

Tabela 2 – Classificação conforme o potencial cancerígeno de substâncias químicas, agentes e exposições

Grupo	Características
Grupo 1	Cancerígeno para os seres humanos
Grupo 2A	Provavelmente cancerígeno para os seres humanos
Grupo 2B	Possivelmente cancerígeno para os seres humanos
Grupo 3	Não classificável como carcinogênico em humanos
Grupo 4	Provavelmente não carcinogênico para humanos

Fonte: (IARC, 1987).

É necessário observar que, mesmo os ingredientes ativos sendo classificados como medianamente ou pouco tóxicos, a exposição prolongada por meses, anos e até décadas pode desencadear efeitos crônicos, como o desenvolvimento de câncer, malformações congênitas, distúrbios endócrinos e neurológicos (CARNEIRO et al., 2015).

2.1.3 Histórico dos agrotóxicos

A utilização de substâncias químicas no controle e eliminação de pragas data da época dos romanos, gregos e chineses há mais de 3000 anos. Existem relatos que estas civilizações utilizavam o cloreto de sódio para matar ervas daninhas e o pó de enxofre para controlar insetos (BARBOSA, 2004).

No século XIX, com a descoberta do acetoarceñito de cobre, popularmente conhecido como “Verde de Paris”, para combater o escaravelho da batata, teve-se o primeiro grande marco na história dos pesticidas sintéticos (BARBOSA, 2004).

Durante o século XIX até meados do século XX, as substâncias químicas desenvolvidas foram utilizadas para saúde pública ou para fins bélicos. A exemplo disso tem-se o diclorodifeniltricloroetano (DDT), descoberto em 1874, amplamente utilizado pelos soldados durante a Segunda Guerra Mundial, os quais pulverizavam o composto pelo corpo para prevenir e controlar doenças como a malária e o tifo. As propriedades pesticidas desse composto foram descobertas somente sessenta e cinco anos depois (BARBOSA, 2004).

Em 1943, desenvolveram-se os organofosforados, também conhecido como “gás dos nervos”, sendo utilizado para combater tropas inimigas durante a Segunda Guerra Mundial (SILVA; COSTA, 2012).

Terminado o período das grandes guerras, foram criadas estratégias de crescimento das empresas do ramo químico em busca de novos mercados nos quais pudessem utilizar as

moléculas desenvolvidas até o momento. A partir disso, as indústrias de agrotóxicos, as quais já existiam desde a Primeira Guerra Mundial, começaram a se expandir (BARBOSA, 2004).

No Brasil, o uso dos agrotóxicos foi difundido durante os anos de 1945 a 1985, conhecido como o período da modernização da agricultura nacional. Foi neste período também que efetivou-se a instalação de indústria de agrotóxicos no país, pelas principais empresas fabricantes destes produtos em nível mundial (BARBOSA, 2004).

2.1.4 A utilização de agrotóxicos no Brasil

O Brasil caracteriza-se como um país de ampla área rural e clima favorável para a produção agrícola. Devido a isso e ao modelo agrícola, os agrotóxicos são extensivamente utilizados nas lavouras brasileiras (BASTOS; CARDOSO, 2011).

O mercado brasileiro de agrotóxicos apresentou crescimento significativo de 10% por ano, entre 1977 a 2006, de forma que o Brasil esteve, desde meados dos anos 1970 até 2007, entre os seis maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (BRASIL, 2012). A partir do ano de 2008, o Brasil assumiu o posto de maior consumidor de agrotóxicos do mundo, posição antes ocupada pelos Estados Unidos, representando 19% do uso mundial e movimentando mais de US\$ 7 bilhões em agrotóxicos (BRASIL, 2012; BASTOS; CARDOSO, 2011; CARNEIRO et al., 2015). Entretanto, este dado contradiz a relação produtividade e consumo, tendo em vista que o principal produtor agrícola mundial são os Estados Unidos, com 27%, enquanto o Brasil ocupa a segunda posição, com 19% da participação na produção de alimentos no mundo (FAO, 2014).

No Brasil, as culturas agrícolas que mais utilizam agrotóxicos são soja, milho, algodão, café e cana-de-açúcar, sendo essas responsáveis por 80% do total das vendas de agrotóxicos em 2011 (SINDAG, 2012). Territorialmente, as regiões brasileiras de maior intensidade dessas culturas coincidem com as maiores concentrações de utilização de agrotóxicos: Mato Grosso (18,9%), São Paulo (14,5%), Paraná (14,3%), Rio Grande do Sul (10,8%), Goiás (8,8%), Minas Gerais (9,0%), Bahia (6,5%), Mato Grosso do Sul (4,7%) e Santa Catarina (2,1%) (IBGE, 2006; SINDAG, 2011).

Outro ponto característico acerca da utilização dos agrotóxicos no Brasil, é que diversos pesticidas reconhecidos cientificamente como danosos à saúde pública e ao meio ambiente, proibidos em diferentes países, continuam em circulação no Brasil. Segundo a ANVISA, dos 50 princípios ativos mais utilizados e permitidos nas lavouras do país, 22 são

proibidos na União Europeia, fazendo do Brasil o maior consumidor de agrotóxicos já banidos em outros países (BRASIL, 2008, 2012).

A adoção do modelo agrícola brasileiro, que utiliza em larga escala e indiscriminadamente os agrotóxicos, vem preocupando as autoridades públicas quanto a seus impactos na saúde humana e na sustentabilidade do meio ambiente (BRASIL, 2012; BASTOS; CARDOSO, 2011).

2.1.5 Exposição humana aos agrotóxicos

A exposição aos agrotóxicos pode ocorrer de forma direta, através da exposição ocupacional, ou de forma indireta, pela exposição ambiental e pela alimentação (ANDERSON; MEADE, 2014).

O trabalho agrícola constitui uma das mais perigosas ocupações na atualidade, sendo os trabalhadores ou moradores de áreas próximas às plantações expostos direta e indiretamente aos agrotóxicos (CARNEIRO et al., 2012).

A população em geral, que não trabalha diretamente com os agrotóxicos ou não vive em regiões rurais, não está isenta dos impactos desses compostos, tendo contato com os pesticidas através do ambiente e da alimentação (CARNEIRO et al., 2012).

As principais rotas da exposição humana aos pesticidas ocorrem pelos resíduos em alimentos, ar, água, solo, flora e fauna (ANDERSON; MEADE, 2014). Segundo Pinheiro, Moraes e Silva (2011), isso ocorre porque uma vez no ambiente, os pesticidas podem se distribuir, degradar ou acumular nos compartimentos do ambiente e nos seres vivos.

No Brasil, durante o período de 2002 a 2011, ocorreu o aumento do consumo médio de agrotóxicos em relação à área plantada, passando de 10,5 litros por hectare (L/ha) em 2002 para 12 L/ha em 2011 (BRASIL, 2012) aumentando o risco de contaminação do solo, água e alimentos pelos agrotóxicos, assim como a exposição dos seres humanos a estes compostos.

Análises em alimentos vêm demonstrando quantidades de resíduos de agrotóxicos excessivas em alimentos vegetais, especialmente em frutas e legumes. Dados indicam que um terço dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros apresenta contaminação por agrotóxicos acima do permitido pela legislação (BRASIL, 2011). Em estudo realizado por Granella et al. (2013), observou-se contaminação acima dos valores legais e por agrotóxicos proibidos no Brasil em amostras de leite convencional e orgânico. Além disso, análises realizadas em leite materno demonstraram a presença de resíduos de pesticidas organoclorados, indicando que a exposição aos agrotóxicos inicia já na infância (PIRSAHEB et al., 2015).

2.1.6 Implicações na saúde humana

A utilização de agrotóxicos no Brasil tem trazido sérias consequências para a saúde da população. Essas consequências são, na maioria das vezes, condicionadas pela atividade ocupacional, pela toxicidade dos princípios ativos utilizados como agrotóxicos, pelo uso inadequado ou falta de equipamentos de proteção individual (EPI) (KIM; KABIR; JAHAN, 2017).

Os impactos na saúde humana são divididos em duas formas: a forma aguda, a qual ocorre por intoxicação direta pelo agrotóxico, seja essa no momento da aplicação deste ou da ingestão de um alimento altamente contaminado, e a forma crônica, devido a exposição a longo prazo (GANGEMI et al., 2016).

A OMS estima que cerca de 3% dos trabalhadores que são expostos aos agrotóxicos acabam sofrendo alguma forma de intoxicação, perfazendo um total de aproximadamente três milhões de envenenamentos humanos por agrotóxicos em todo o mundo ao longo de um ano (OMS, 2009).

Estudos demonstram que o perfil epidemiológico das intoxicações por pesticidas no Brasil ocorre na maioria dos casos em indivíduos do sexo masculino, em idade produtiva, com maior percentual de intoxicação acidental, seguida de circunstâncias intencionais (REBELO et al., 2011; MALASPINA; ZINILISE; BUENO, 2011).

Além dos efeitos agudos, como intoxicações, a exposição humana prolongada aos agrotóxicos pode resultar em distúrbios neurológicos, reprodutivos, teratogênicos e imunológicos (FRANCO et al., 2010; MA; LI, 2015; KIM; KABIR; JAHAN, 2017).

Em estudo realizado por Fassa et al. (2014), evidenciou-se que os agrotóxicos aplicados no cultivo do tabaco, se associam significativamente com distúrbios neurocomportamentais nos produtores desse cultivo. Algumas substâncias possuem propriedades que podem afetar o sistema nervoso central, provocando transtornos psiquiátricos e podendo levar ao suicídio (RILEY et al., 2011). Além disso, estudos epidemiológicos encontraram relação positiva entre a exposição ocupacional aos pesticidas e o risco de desenvolver doença de Parkinson (MOISAN et al., 2015; JAMES; HALL, 2015).

Em estudos realizados por Raafat, Abass e Salem (2012) e Malekirad et al. (2013), evidenciou-se que pesticidas organofosforados podem ocasionar resistência insulínica em agricultores, estando estes mais susceptíveis a desenvolver diabetes mellitus.

O câncer está entre uma das principais doenças causadas pela exposição crônica aos agrotóxicos. Evidências sugerem que a exposição à baixas concentrações dos agrotóxicos já é

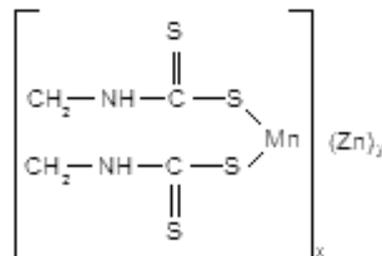
capaz de aumentar o risco de desenvolver câncer de próstata, pâncreas, fígado, mama e colón retal, além de leucemias e linfomas (VAN MAELE-FABRY et al., 2006; ANTWI et al., 2015; FENGA, 2016).

Estudos sugerem que os pesticidas atuam influenciando na atividade do sistema imunológico, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α , do inglês *tumoral necrosis factor- α*), promovendo a progressão do tumor através da ativação do processo inflamatório (COSTA et al., 2015; MEDINA-DÍAZ et al., 2016).

2.1.7 Mancozebe

O princípio ativo mancozebe, fórmula molecular $(C_4H_6N_2S_4Mn)_x (Zn)_y$, é um fungicida da família dos etileno-bis-ditiocarbamatos (EBDC), do subgrupo dos ditiocarbamatos e do grupo dos carbamatos. Este fungicida é uma combinação de outro princípio ativo EBDC, o maneb, e o elemento zinco.

Figura 1 – Estrutura química do mancozebe



O mancozebe atua nos microrganismos inibindo a ação de enzimas envolvidas na produção de energia. Apresenta-se sob a forma de um pó amarelo claro, com baixa volatilidade e solubilidade em solventes orgânicos (LARINI, 1999). Este princípio ativo é amplamente utilizado no mundo, especialmente na Índia (PATHAK et al., 2008). No ano de 2009, devido a abrangência de culturas que o utilizam, o mancozebe foi o 5º princípio ativo mais vendido no Brasil (IBAMA, 2014).

Este fungicida de contato é amplamente empregado nas culturas de abacate, abóbora, alho, amendoim, arroz, banana, batata, berinjela, beterraba, brócolis, café, cebola, cenoura, cevada, citros, couve, couve-flor, ervilha, feijão, feijão-vagem, figo, fumo, maçã, mamão, manga, melancia, melão, pepino, pêra, pêssego, pimentão, repolho, tomate, trigo, uva e vagem

(AGROFIT, 2016). A IDA para este composto é de 0,03 mg/kg de peso corporal (AGROFIT, 2016).

A exposição ao mancozebe através dos alimentos representa a principal fonte de contaminação para a população em geral. Os fungicidas do grupo ditiocarbamatos (DTC), como o mancozebe, figuram entre os agrotóxicos mais detectados na União Europeia e que ultrapassam com maior frequência os LMR, conforme o programa de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em produtos de origem vegetal na União Europeia (EC, 2007).

Resíduos dos fungicidas mancozebe, manebe e propinebe, do subgrupo dos ditiocarbamatos, foram determinados em amostras de tomate, alface, pimentão, maçã, uva e morango procedentes das quatro províncias de Galícia (noroeste da Espanha). O pimentão foi o vegetal com mais amostras positivas (96,9%) para resíduos desses compostos, seguido pelo tomate (87,5%), alface (71,9%), uva (33,3%) e maçã (15,6%), mas não sendo encontrados no morango. Além disso, 6% das amostras analisadas de alface e pimentão excederam os LMR (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012).

O mancozebe possui baixa persistência no ambiente e baixa toxicidade aguda em mamíferos, sendo rapidamente excretado pela urina (48-96h). Além disso, apresenta alta taxa de degradação, decompondo-se a etilenotiouréia (ETU), sendo o principal metabólito, o qual pode persistir no ambiente por meses (KOMÁREK et al., 2010). De acordo com a classificação da IARC (1991), a ETU é classificada como pertencente ao grupo 2B, ou seja, possivelmente cancerígeno para os humanos. Em estudo realizado por Calviello et al. (2006) e Tyagi et al. (2011) evidenciou-se potenciais efeitos neoplásico e teratogênico do mancozebe e de seu metabólito ETU.

Estudos *in vitro* indicam que a produção de espécies reativas de oxigênio é um dos mecanismos primários de toxicidade do mancozebe, sendo um agente pró-oxidante (CALVIELLO et al., 2006; DOMICO et al., 2007).

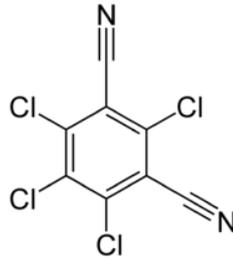
A exposição ocupacional ao mancozebe tem demonstrado aumento da proliferação celular e diminuição do TNF- α , fatores desencadeantes de diversas doenças imunológicas (CORSINI et al., 2005).

2.1.8 Clorotalonil

O clorotalonil (tetracloroisoflalonitrilo), fórmula química $C_8Cl_4N_2$, é um fungicida de contato, do grupo químico das isoflalonitrilas. Este princípio ativo apresenta-se sob a forma

de um pó branco, com baixa volatilidade, solubilidade em solventes orgânicos e persistência de baixa a moderada no solo, com meia vida de 5 a 90 dias (LARINI, 1999).

Figura 2 – Estrutura química do clorotalonil



O clorotalonil é largamente utilizado para controlar infestações fúngicas em diversas culturas, incluindo alface, amendoim, arroz, banana, berinjela, café, cebola, cenoura, citros, feijão, maçã, mamão, melão, melancia, milho, pepino, pimentão, repolho, soja, tomate, trigo e uva (AGROFIT, 2016). No Brasil, este princípio ativo figura o terceiro fungicida mais comercializado no país (IBAMA, 2014; AGROFIT, 2016).

Em estudo realizado por Gebara e colaboradores (2005), foram monitorados 2.223 amostras, sendo 700 vegetais e 1.523 frutas coletadas e analisadas para 100 resíduos de agrotóxicos. Destes, em 67,4% das amostras foram detectados resíduos de clorotalonil, captana, endossulfam e procimidona, sendo que entre todas as hortaliças, os conteúdos foram superiores na cultura de vagem e tomate, e dentre as frutas, nas culturas de pêssigo e morango.

A maioria das marcas comerciais que possui o clorotalonil como ingrediente ativo é classificada toxicologicamente como produto moderadamente tóxico (Classe III) ou altamente tóxico (Classe II). A IDA deste composto é de 0,03 mg/kg de peso corporal (AGROFIT, 2016).

Em estudo realizado por Maggioni et al. (2017), estimou-se que o consumo de clorotalonil por crianças argentinas de 6 a 23 meses era superior a IDA estabelecida.

O potencial carcinogênico do clorotalonil tem sido avaliado em roedores, e as evidências mostram relação entre o princípio ativo e carcinomas renais e tumores de estômago (MOZZACHIO et al., 2008). Em linhagens celulares de câncer de próstata, o clorotalonil apresentou regulação positiva sobre determinados genes, induzindo a proliferação celular (TESSIER et al., 2001).

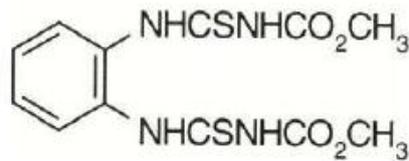
O clorotalonil é considerado não genotóxico mas classificado como possivelmente carcinogênico humano por todas as vias de exposição (KLEINSTREUER et al., 2013).

Também, atua no citocromo P-450, induzindo a formação de EROS e da proliferação do peroxissomo, aumentando, subseqüentemente, o risco do desenvolvimento de tumores (RAKITSKY et al., 2000).

2.1.9 Tiofanato metílico

O tiofanato metílico, dimetil 4,4'-(o-fenileno) bis(3-tioalofanato), fórmula química $C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$, é um fungicida sistêmico do grupo dos benzimidazóis. Este princípio ativo apresenta-se sob a forma de um pó branco, com baixa volatilidade e solubilidade em solventes orgânicos (TRAINA et al., 1998).

Figura 3 – Estrutura química do tiofanato metílico



O tiofanato metílico atua no mecanismo de divisão celular dos microrganismos alvos, através da inibição da síntese do DNA do microrganismo (SEILER, 1975). Este fungicida é utilizado em diversas culturas, como de abóbora, alho, banana, berinjela, citros, ervilha, feijão, maçã, melancia, melão, morango, pepino, pêra, quiabo, tomate, trigo e uva (AGROFIT, 2016).

Este princípio ativo é classificado toxicologicamente como pouco tóxico (Classe IV), apresentando baixa toxicidade aguda aos mamíferos. A IDA deste composto é de 0,08 mg/kg de peso corporal (AGROFIT, 2016).

O tiofanato metílico possui baixa persistência no ambiente, sendo rapidamente degradado na água, no solo, plantas e animais, e metabolizado principalmente em metil-2-benzimidazole carbamato (MBC) (ROBERTS; HUTSON, 1998).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*), o tiofanato metílico e seu metabólito MBC estão associados com baixa toxicidade aguda. No entanto, evidências *in vivo* indicam que estes compostos podem causar danos hepáticos e hormonais, sendo, portanto, classificados como prováveis carcinogênicos para os humanos (EPA, 1996; LU et al., 2004; YU et al., 2009).

2.2 INFLAMAÇÃO

2.2.1 O sistema imunológico

O sistema imunológico tem como principal função proteger o organismo humano contra agentes externos, como microrganismos patogênicos e substâncias químicas, a exemplo, os pesticidas, e eliminar células senescentes ou fenotipicamente alteradas que não estão desempenhando suas funções (DHOUIB et al., 2016).

O corpo humano possui dois tipos principais de respostas imunes, a resposta imunológica inata e a adquirida. Apesar da divisão, ambas atuam em sinergismo mantendo a homeostase do organismo. A resposta imune inata é responsável pelas respostas imediatas, sendo a primeira a ser ativada através das barreiras físicas, químicas e biológicas que são produzidas por células e moléculas especializadas, independentemente do sistema já ter possuído contato prévio com o agente externo. Enquanto isso, a resposta imune adquirida, que é estimulada pela exposição prévia a agentes infecciosos, demora mais tempo para ser elaborada, no entanto, mostra-se mais efetiva (CRUVINEL et al., 2008).

As principais células responsáveis pela resposta imune inata são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014). Nesse sistema, que regula diretamente os processos inflamatórios, os monócitos/macrófagos têm função destacada (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006). Nesse sentido, quando ocorre algum tipo de invasão por um agente externo ou lesão microbiana, os monócitos deixam a circulação sanguínea e se infiltram nos tecidos, sofrendo alterações citofisiológicas, sendo então denominados de macrófagos, os quais desempenham funções fagocíticas (AUFRAY et al., 2007; CRUVINEL et al., 2008).

Os monócitos/macrófagos apresentam papel fundamental durante uma resposta inflamatória, pois desempenham uma variedade de funções, tais como controlar o início e a resolução da inflamação através da fagocitose, liberar citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, produzir EROs, além de ativar o sistema imune adquirido (FAHY; DOSEFF; WEWERS, 1999; AUFRAY et al., 2007).

Em circunstâncias normais, em que não há presença de agentes externos ou lesões teciduais, os monócitos circulam na corrente sanguínea por curto período de tempo antes de entrarem fisiologicamente em apoptose (FAHY; DOSEFF; WEWERS, 1999). Todavia, na presença de agentes externos, os monócitos resistem à morte celular programada e originam os macrófagos, que são células que podem manter-se viáveis por um longo período de tempo

em um tecido corporal lesionado (WIKTOR-JEDRZEJCZAK et al., 1996). Uma vez eliminado o agente agressor, a cascata apoptótica dos monócitos é restabelecida e as células excedentes voltam a entrar em apoptose (SAVILL, FADOK, 2000).

Além das células do sistema imunológico, existem proteínas que desempenham papel primordial na resposta imune, sendo elas as citocinas. Durante a ativação inflamatória, primeiramente, tem-se o aumento da produção e dos níveis séricos de IL-1 β e TNF- α , atuando como mediadores primários da inflamação. Após, a IL-1 β e o TNF- α atuam ativando a produção do fator nuclear kB (NFkB, do inglês *nuclear factor kB*). O NFkB por sua vez atua ativando as demais citocinas, incluindo IL-6 e interferon- γ (IFN- γ) (GORDON, MARTINEZ, 2010). Além das citocinas pró-inflamatórias, o sistema imunológico também produz citocinas anti-inflamatórias, a exemplo da interleucina 10 (IL-10), que é capaz de atenuar a resposta inflamatória após a resolução do agente causal da inflamação, inibindo, por exemplo, a produção de TNF- α e IFN- γ (DHANDE; MA; HUSSAIN, 2015).

Apesar da fundamental importância do sistema imune, quando a resposta inflamatória é ativada de maneira inapropriada, o organismo pode apresentar resposta inflamatória crônica ou mesmo contra antígenos específicos dos próprios tecidos, caracterizando, nesse caso, as doenças autoimunes (BETTELLI et al., 2006; IVANOV et al., 2006; O'CONNELL et al., 2010).

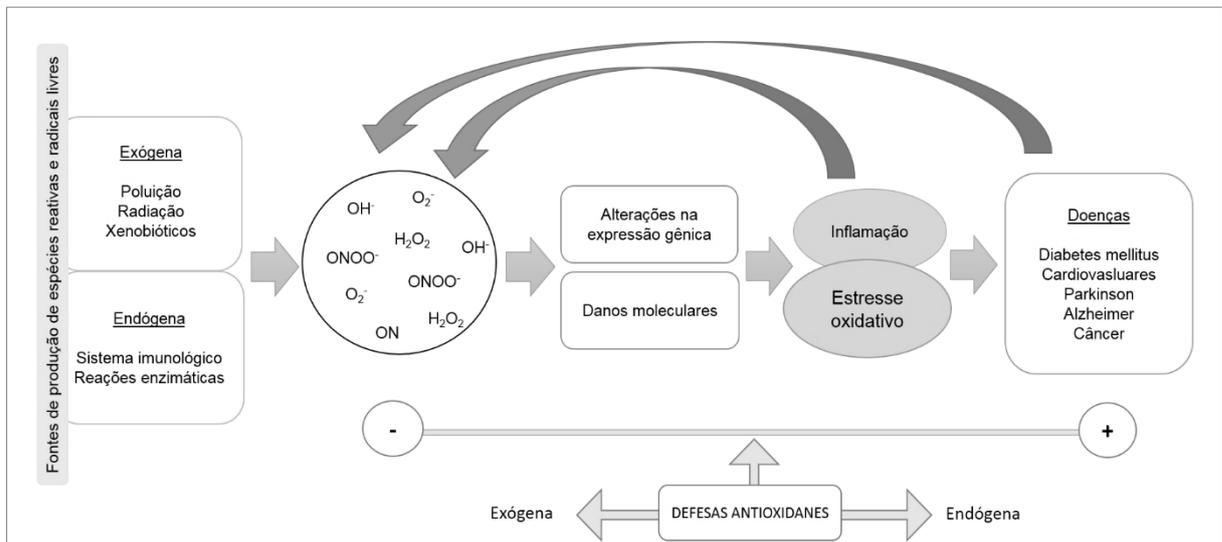
Estudos recentes tem evidenciado a resposta inflamatória crônica em indivíduos que apresentam obesidade (BYUNG-CHEOL; JONGSOON, 2014), diabetes (VOZAROVA et al., 2002), hipercolesterolemia e problemas cardíacos (KRALISCH; FASSHAUER, 2013), bem como parece estar envolvido no desenvolvimento de cânceres (BALKWILL; MANTOVANI, 2012; KIDANE et al., 2014).

2.2.2 Ativação inflamatória e o estresse oxidativo

O estresse oxidativo caracteriza-se como o desbalanço entre a quantidade de EROs em relação às defesas antioxidantes. As EROS podem ser produzidas por fontes exógenas ou endógenas, sendo a exposição à radiação, fumo, estresse, a administração de alguns medicamentos e compostos xenobióticos, como os pesticidas, alguns exemplos de fontes exógenas. Já as fontes endógenas incluem a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, a enzima NADPH oxidase nos fagócitos e o sistema imunológico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Durante a resposta imune, os macrófagos produzem EROs, como o radical superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como intermediários reativos como é o caso do óxido nítrico (NO) (GORDON, 2003).

Em condições fisiológicas, as EROs atuam positivamente na proteção do organismo contra agentes externos e no funcionamento celular, como mediadores de sinalização de proliferação e diferenciação celular (GOUCH; COTTER, 2011; RUPÉREZ; GIL; AGUILERA, 2014). Entretanto, o aumento na produção de EROs ou a redução na produção das enzimas antioxidantes caracteriza o estresse oxidativo e compromete o funcionamento celular (RUPÉREZ; GIL; AGUILERA, 2014). Várias doenças crônicas têm sido associadas ao desbalanço oxidativo celular, tais como o câncer (DA COSTA; BADAWI; EL-SOHEMY, 2012), obesidade (RUPÉREZ; GIL; AGUILERA, 2014), diabetes e doenças cardiovasculares (VALKO et al., 2007) (Figura 4). Lavieri et al. (2014) sugerem que o estresse oxidativo celular induz a formação de proteínas defeituosas que são capazes de recrutar processos inflamatórios crônicos. Apesar das células possuírem um sistema de reparo de proteínas disfuncionais, muitas vezes tal maquinaria não consegue suprir adequadamente a demanda intracelular e as proteínas danificadas acabam por se acumular podendo interagir com as vias inflamatórias, aumentando a produção de EROs, de NFkB e fatores de transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Assim, a produção de proteínas danificadas pode ser uma via ligada ao estresse celular que atua sinergicamente na ativação da cascata inflamatória (MARTINON et al., 2010).

Figura 4 – O estresse oxidativo, fontes endógenas e exógenas produtoras de EROs e outras espécies reativas, e algumas doenças que possuem associação com esse desbalanço



Fonte: adaptado de Da Costa, Badawi e El-Soheemy (2012).

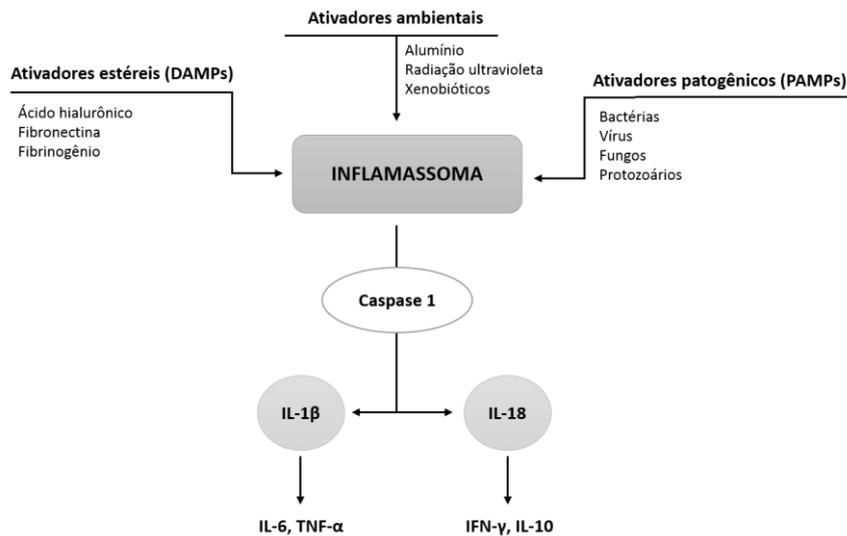
2.2.3 Ativação da inflamação

A inflamação pode ser classicamente ativada por meio de agentes infecciosos patogênicos (PAMPs, do inglês *pathogen associated molecular patterns*), pela liberação de substâncias em decorrência de lesão tecidual (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*) ou por agentes ambientais, tais como radiação ultravioleta e determinadas substâncias químicas (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; CHEN; NUÑEZ, 2010). O início de um processo inflamatório começa quando os receptores de reconhecimento de hospedeiros (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) detectam os agentes invasores. Alguns PRRs atuam via ação pró-inflamatória ou na resposta transcricional antimicrobiana através das rotas NF κ B e INF- γ . Já outros promovem a defesa do organismo via aglomeração de moléculas sinalizadoras complexas chamadas de inflamassomas (TASSI et al., 2010).

Os inflamassomas são complexos macromoleculares que se unem no citoplasma e ativam a proteína caspase 1 (Casp1). A ativação da Casp1 tem como consequência a clivagem da pró IL-1 β formando a IL-1 β madura e a liberação da IL-18. A Casp1 também pode desencadear um tipo de morte celular programada muito rapidamente, conhecida como piroptose. A IL-1 β inicia e propaga a inflamação, principalmente pela indução da síntese de uma rede de citocinas que aumentam a infiltração de células inflamatórias no local, e de moléculas de adesão que ligam os leucócitos as células endoteliais, permitindo posteriormente a migração das células imunes para o local da inflamação (TSCHOPP; SCHRODER, 2010;

HANAMSAGAR; HANKE; KIELIAN, 2012). A IL-1 β ativa rotas como NF κ B e MAPK capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias adicionais como a TNF- α e a IL-6. Além disto, a IL-18 estimula a produção do INF- γ principalmente pelos linfócitos T e células NK (TSCHOPP; SCHRODER, 2010; HANAMSAGAR; HANKE; KIELIAN, 2012). Esse mecanismo de ativação inflamatória via inflamassoma encontra-se esquematizado na figura a seguir (Figura 5).

Figura 5 – Fatores responsáveis pela ativação inflamatória da via inflamassoma e seu mecanismo de ação



2.2.4 Linhagem celular RAW 264.7

Para a investigação *in vitro* de efeitos pró-inflamatórios que envolvem ativação de macrófagos, o uso de linhagens celulares comerciais de células mononucleares é bastante apropriado, tendo em vista a reprodutibilidade do estudo e devido ao fato de evitar a potencial interferência de moléculas produzidas por outras células do sistema imunológico (DEL-ÁNGEL et al., 2015).

Uma linhagem que tem sido amplamente utilizada em estudos que envolvem análise de atividade pró-inflamatória ou anti-inflamatórias de fármacos, extratos de plantas ou outros agentes químicos é a linhagem de macrófagos RAW 264.7 (DEL-ÁNGEL et al., 2015). Esta linhagem é constituída por células de camundongos Balb-C que possuem propriedades de macrófagos normais artificialmente obtidas a partir da infecção com o vírus Albelson (RASCHKE et al., 1978). A linhagem RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) é comercializada pela ATCC (do inglês, *American Type Culture Collection*), uma organização não governamental sem fins lucrativos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MANUSCRITO

Os itens “Materiais e Métodos” e “Resultados e Discussão” referentes a esta dissertação, estão apresentados sob a forma de um manuscrito a seguir. O manuscrito intitulado “*Pro-inflammatory and oxidative effect of mancozeb, chlorothalonil and thiophanate methyl pesticide in murine macrophage cells*” está formatado nas normas de submissão da revista *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, a qual será submetido.

Pro-inflammatory and Oxidative Effects of Mancozeb, Chlorothalonil and Thiophanate methyl Pesticides in Murine Macrophage Cells

Grazielle Castagna Cezimbra Weis^{1,4,5}, Francine Carla Cadoná^{2,4}, Charles Elias Assmann^{2,4}, Beatriz da Silva Rosa Bonadiman^{3,4}, Audrei de Oliveira Alves^{3,4}, Alencar Kolinski Machado^{3,4}, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte³, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{2,3,4}, Ijoni Hilda Costabeber^{1,5}

1 Graduate Program of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

2 Graduate Program of Biological Sciences (Toxicological Biochemistry), Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

3 Graduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

4 Laboratory of Biogenomics, Department of Morphology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

5 Laboratory of Persistent Pollutant Analyses, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

Corresponding author: Ijoni Hilda Costabeber

E-mail: ijonicostabeber@gmail.com

Tel: +55 55 3220 9375

Address: 1000 Roraima Av. Building #19, Suite 3201/3204. Santa Maria – RS – Brazil.

Zipcode: 97105-900.

ABSTRACT

The extensive and indiscriminate use of pesticides, especially in agriculture and public health, causes global environmental pollution and increase the exposure risk of humans to these pesticides. Chronic exposure to pesticides can cause several effects to health, such as immune disorders. In this study, pro-inflammatory and oxidative effects of mancozeb, chlorothalonil and thiophanate methyl pesticides, which are widely used in the world, in murine macrophages cell were investigated. Macrophages RAW 264.7 cell line was exposed for 72 hours to different concentration (0.1 – 100 $\mu\text{g/mL}$) of mancozeb, chlorothalonil and thiophanate methyl. Cell proliferation, oxidative stress, pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IFN- γ), anti-inflammatory cytokine (IL-10) and caspases (Casp1, Casp3, Casp8) production were evaluated by colorimetric, fluorimetric and molecular assays. Results demonstrated significant pro-inflammatory effect of mancozeb, chlorothalonil and thiophanate methyl pesticides at concentration of 1, 3 and 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively, characterized by increased cell proliferative response, pro-inflammatory cytokines and caspases production. However, oxidative effect was observed just in macrophages exposed to chlorothalonil at 3 $\mu\text{g/mL}$. Thus, in these analysis conditions, the studied pesticides acted by activation of the immune system. This data contribute to better understanding of immune effects of these pesticides and their risk to human health.

Keywords: Pesticides. Mancozeb. Chlorothalonil. Thiophanate methyl. Macrophages RAW 264.7. Pro-inflammatory. Oxidative stress.

INTRODUCTION

Pesticides are widely used in agriculture and public health to control pest-induced diseases. Indiscriminate use of pesticides causes global environmental contamination, as well as increases the risk of human exposure to these substances.^[1] Chronic exposure to pesticides may result in neurological, reproductive, teratogenic and immunological disorders.^[2-4]

Mancozeb (MZ), chlorothalonil (CT) and thiophanate methyl (TM) are fungicides widely used in agriculture due to their low acute toxicity to mammals and short environmental persistence.^[5]

Mancozeb is an ethylene-bis-dithiocarbamate, from the carbamates group. This pesticide presents quick urinary excretion and, its main metabolite, ethylthiourea (ETU), can persist in soils for 5-10 weeks.^[6] ETU has been reported to have carcinogenic, teratogenic and goitrogenic effects.^[7]

Chlorothalonil is from isophthalonitriles group, classified as possibly being a human carcinogen by all routes of exposure.^[8] Evidence *in vivo* suggest carcinogen potential of chlorothalonil, inducing renal carcinomas and stomach tumors.^[9]

Thiophanate methyl belongs to the benzimidazole group, being degraded in water, soil, plants and animals, and metabolized in methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC).^[10] Studies

have reported that thiophanate methyl and its metabolite induce histopathological damage in thyroid and adrenal glands. ^[11-12]

Several *in vivo* and *in vitro* studies report cytotoxic effects of these pesticides. ^[8, 13, 14] However, the influence of these important pesticides in the immune system and inflammatory activation is still unexplored and unclear.

The immune system is strongly important to protect the organism against potential pathogenic agents that could cause cellular imbalance and tissue damages via inflammatory activation. However, this response needs to be controlled. Pesticides inducing immune system deregulation has been associated with increased risk of allergic processes ^[15], autoimmune disorders ^[16], neurodegenerative diseases ^[17] and cancer development. ^[18,19]

In this sense, pesticides can affect all biological systems in the human body by acting on inflammatory cells. For these reasons, it is necessary to understand how these fungicides could modulate inflammatory cellular response and, consequently, the influence of these chemical compounds in the immune system.

Thus, the present study was performed to investigate the pro-inflammatory and oxidative effects of mancozeb, chlorothalonil and thiophanate methyl pesticides in murine macrophages cells.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and Equipment

Mancozeb, chlorothalonil and thiophanate methyl pesticides were purchased from Sigma[®] (St. Louis, MO, USA). Cell culture medium, molecular biology, reagents, and plastics used in this study were purchased from Gibco[®] Life Technologies Inc. (Grand Island, NY, USA), Sigma[®] (St. Louis, MO, USA) and Invitrogen Life Technologies (São Paulo, SP, Brazil). Cells were cultured in a humidified CO₂ incubator (Costar, Cambridge, MA, USA). The protocols involving spectrophotometric, fluorimetric and immunological analysis were performed using a 96-well microplate reader SpectraMax[®] i3 Multimode Plate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Double-strand (ds) DNA was quantified by Quant-IT[™] PicoGreen[®] dsDNA kit (Thermo Fischer, São Paulo, SP, Brazil). Flow cytometry analysis was performed using Propidium Iodide (PI) staining kit (BD FACsVerse[™] Flow Cytometer – BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Quantikine Human Caspase Immunoassay[®] kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was used for caspases 1, 3 and 8 quantification, while inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α and INF- γ) measurements were determined by Quantikine Cytokines Immunoassay[®] (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Cell Culture and Treatments

Murine macrophages RAW 264.7 cell line (ATCC[®] TIB-71[™]) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC[®], Manassas, VA, USA) and cultured in

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% of fetal bovine serum (FBS) and supplemented with 1% of antibiotics penicillin and streptomycin. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ until the ideal cell number and confluence to perform all the experiments.

All treatments performed in this study were conducted to evaluate the pro-inflammatory effect of mancozeb, clorothalonil and thiophanate methyl pesticides on macrophage cells at the concentration of 2×10^5 cells/mL. Initially, RAW 264.7 macrophages were exposed to different concentrations (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 and 100 µg/mL) of each fungicide. Dimethylsulfoxide (DMSO) was used as the solvent to dilute all pesticides as well as it was used as negative control vehicle. The final DMSO concentration in the treated and control cultures never exceeded 0.5% (v:v). A previous study did not show significant cytotoxicity at this concentration.^[13] Phytohemagglutinin (PHA) was used as a pro-inflammatory positive control (1µL/50µL; v:v) as previously published by Hamelryck et al.^[20] All treatments were performed during 72 hours of incubation at optimal cell culture conditions.

Cell Proliferation Analysis

Cellular proliferation was measured by MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay following instructions described by Fukui et al.^[21] After treatments and periods of incubation, RAW 264.7 cells were washed and resuspended in phosphate buffered saline (PBS 0.01M, pH 7.4) to completely remove the treatments and avoid interference. Cells were exposed to MTT reagent during 1 hour at 37°C. After the

period of incubation, formazan crystals were solubilized with DMSO and absorbance was measured at 560nm wavelength.

Further, double-strand (ds) DNA was also used as indicator of cell proliferation, quantified by Quant-IT™ PicoGreen® dsDNA kit following instructions previously described by Há et al. [22] Treated cells were incubated during 5 minutes with PicoGreen® reagent at room temperature in a dark 96-well plate and fluorescence was measured at 480nm excitation and 520 emission wavelength.

Reactive Oxygen Species Measurement

Reactive oxygen species (ROS) generation was determined using dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe assay as previously described by Costa et al. [23] Briefly, treated cells were incubated in the dark with DCFH-DA reagent (10µM) for 1 hour at 37°C and the fluorescence was measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525 nm.

Nitric Oxide Quantification

Nitric oxide (NO) production was measured by the modified Griess method previously described by Choi et al. [24] Treated cells were incubated at room temperature with Griess reagent for 10 minutes and the absorbance was measured at 550 nm.

Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry

Cell cycle phases of mitotic process were analyzed by flow cytometry method using a BD FACsVerse™ Flow Cytometer. Cell cycle analyses was performed with the most pro-inflammatory concentration of each pesticide (MZ 1 µg/mL, CT 3 µg/mL, TM 100 µg/mL). After treatment with these concentrations and time of incubation, cells were stained with propidium iodide (PI) following the instructions described by William-Faltaos et al. [25]

Caspases and Cytokines Immunoassays

Caspases levels analyses indicate apoptosis pathway activation whereas cytokines levels analyses can indicate inflammatory route activation. Caspases and cytokines levels were determined in RAW 264.7 cells exposed to the most pro-inflammatory concentration of each pesticide.

The apoptosis cascade (Quantikine Caspase Immunoassay® R&D Systems) and inflammatory cytokines (Quantikine Cytokines Immunoassay® R&D Systems) were analyzed through different enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) following manufacturer`s instructions. The apoptosis protein measurement included caspase 1 (Casp1), caspase 3 (Casp3) and caspase 8 (Casp8), while pro-inflammatory cytokines evaluation comprised IL-1β, IL-6, TNF-α and INF-γ, and anti-inflammatory cytokine evaluation included IL-10.

Statistical Analysis

All tests were performed in triplicate and data obtained were presented as percentages of negative control. Results were statistically analyzed by one way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test using Graphpad Prism Software, version 5.0 (Graphpad Prism Software Company, 2015, San Diego, CA, USA). The results were expressed as mean \pm standard deviation. Data with $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Initially the proliferative effect of pesticides mancozeb, chlorothalonil and thiophanate methyl at different concentrations was evaluated (figure 1 – A,B,C). In this test, the data were compared with negative control. For macrophages treated with mancozeb, higher cellular proliferation was observed at 0.3, 1 and 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations. The exposure to chlorothalonil showed a significant proliferative effect just at concentration of 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, being cytotoxic at higher concentrations. Furthermore, for macrophages treated with thiophanate methyl cell proliferation significantly increased at the concentration of 0.1 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This result was also similar to the found for double-strand (ds) DNA quantification (figure 1 – D,E,F), which fluorescein levels quantified in treatments supernatant showed low cellular mortality.

FIGURE 1 HERE

Total levels of oxidative molecules were also measured. PHA-exposed cells presented higher ROS production compared to negative control, however, the levels of NO did not increase. Also, macrophages treated with mancozeb and thiophanate methyl remained ROS and NO production at similar levels than untreated cells. Higher ROS and NO levels were observed just in chlorothalonil exposed cells (figure 2).

FIGURE 2 HERE

The following pesticide concentrations that caused higher cell proliferation, it is indicative of inflammatory macrophage response were used to evaluate the effect on cell cycle and cytokines modulation: mancozeb 1 $\mu\text{g/mL}$, chlorothalonil 3 $\mu\text{g/mL}$ and thiophanate methyl 100 $\mu\text{g/mL}$. Cell cycle, cytokines and caspases levels were evaluated using just these concentrations of each pesticide.

Figure 3 showed the potential effect of pesticides on macrophages cell cycle. As expected, cells exposed to PHA increased the frequency of S phase ($118.7 \pm 0.8\%$) when compared to untreated control group ($p < 0.05$). PHA-exposed cells and pesticide-exposed cells showed G1 phase frequency similarity with the untreated cells. Cells treated with mancozeb (1 $\mu\text{g/mL}$) presented a slight increase in the frequency of S phase ($111.9 \pm 1.6\%$), but this difference was not significant when compared to negative control group. Macrophages RAW 264.7 exposed to chlorothalonil (3 $\mu\text{g/mL}$) and thiophanate methyl (100 $\mu\text{g/mL}$) increased the frequency of S phase ($148.6 \pm 6.3\%$ and $150.9 \pm 4.0\%$, respectively) when compared to control group ($p < 0.05$). This increase was even higher than cells exposed to PHA.

FIGURE 3 HERE

PHA-exposed macrophages showed increased levels of all pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ , and decreased anti-inflammatory cytokine IL-10 levels when compared to negative control (figure 4). In the same way, cells treated with the most pro-inflammatory concentration of mancozeb, chlorothalonil and thiophante methyl increased levels of all pro-inflammatory cytokines and decreased IL-10 levels.

FIGURE 4 HERE

Finally, some markers of apoptosis cascade were also measured at untreated and treated macrophages (figure 5). Cells exposed to PHA presented increased caspase 1, caspase 3 and caspase 8 protein expression when compared to control group. This same profile was observed in cells treated with the most pro-inflammatory concentration of each pesticide, indicating activation of apoptotic cascade.

FIGURE 5 HERE

DISCUSSION

The present investigation showed inflammatory activation on murine macrophages exposed to mancozeb, chlorothalonil and thiophanate methyl at concentrations of 1, 3 and 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively, characterized by increased cell proliferative responses, pro-inflammatory cytokines and caspases production. Whereas the effect of mancozeb on inflammatory

modulation was previously described ^[26], to our knowledge, this effect triggered by chlorothalonil and thiophanate methyl has not previously reported.

Evidences have shown that pesticides can affect immune system through a set of different mechanisms ^[27, 28], mainly by inducing immunosuppression ^[29] or immunostimulation. ^[30] Usually, immune suppression is the major mechanism by which pesticides exert their immunomodulatory activity, affecting immunocompetence and consequently increasing host susceptibility to diseases. However, for pesticides that act as immunostimulators, immunocompetence cells is exacerbated, leading to the production of inflammatory mediators, such as cytokines, ROS and reactive nitrogen species (RNS). ^[31]

In these terms, results described here corroborate with previous studies that reported immunomodulatory effects of mancozeb on peripheral blood mononuclear cells by increasing cell proliferation and IFN- γ cytokine production ^[26] and in human lymphocytes by increasing caspases levels. ^[13] However, these results are controversies, since some investigations also reported immunotoxic effect of mancozeb by inhibition of IL-6 ^[26] and TNF- α production. ^[26,32] Different results on the mancozeb action on inflammatory response could be related with some experimental conditions, such as cell type, time of exposure and pesticide concentration. ^[33] These results also could indicate that, in different conditions, mancozeb could present immunosuppressive or immunostimulation effect, being in both cases harmful to the organism. ^[31]

Oxidative stress can be associated as well with immune response, acting as a mediator for inflammatory process activation. Increase in ROS and NO production characterizes oxidative stress and affect cellular functions. Several diseases have been associated with oxidative stress including metabolic diseases ^[34], obesity ^[35], cancer ^[36] and chronic immune activation. ^[37]

In this study, just chlorothalonil exposure triggered higher ROS and NO levels production. A study performed by Baier-Anderson and Anderson ^[38] corroborate this data, showing increase in ROS production for chlorothalonil, directly acting on cytochrome P-450. ^[39] Unlike the results found in this study, Corsini et al. ^[32] reported that lymphocytes exposed to mancozeb (0.5, 2 and 5µg/mL) increased ROS levels. In the same way, another study showed that increasing concentrations of thiophanate methyl enhances ROS production in human lymphocytes. ^[40] Different effect of pesticides on oxidative markers could be associated with experimental design and also kind of oxidative molecules analyzed.

The close association between cellular oxidative damage and inflammatory response could to explain, in part the effect of chlorothalonil on macrophage inflammatory response. However, the association between pro-inflammatory effect and higher oxidative molecules was not so clear when cells were treated with mancozeb and thiophanate methyl.

Evidences reported that inflammation can be classically activated by pathogen agents (pathogen associated molecular patterns, PAMP), by the release of substances due to tissue

damage (damage associated molecular patterns, DAMP) or by environmental agents, including ultraviolet radiation and xenobiotics, such as pesticides. ^[41, 42] The onset of an inflammatory process begins when pattern recognition receptors (PRR) detect the external agent. Some PRR act via antimicrobial transcriptional response through the nuclear factor $\kappa\beta$ and INF- γ pathways. Other PRR promote the defense of the organism through agglomeration of complex signaling molecules called inflammasomes. ^[43]

There are some studies reporting pesticides, such as chlorpyrifos and paraquat, as potential agents able to induce inflammation activation through NLRP3 inflammasome. ^[44, 45] This inflammasome is involved in inflammatory activation response via caspase 1 activation, followed by IL-1 β release and the subsequent pro-inflammatory cytokines cascade activation. ^[46] Oxidative imbalance is described as a crucial activator of NLRP3 inflammasome. ^[47, 48] In this way, perhaps chlorothalonil can be inducing NLRP3 inflammasome overexpression, as this pesticide increased oxidative molecules levels, as well caspase 1, IL-1 β cytokine levels and other pro-inflammatory cytokines. However, mancozeb and thiophanate methyl appear to be acting on another pathway, as these pesticides did not change ROS and NO production compared to untreated cells. More studies are necessary to confirm these results and to analyze the inflammatory pathway activated by these pesticides.

The differences among the most pro-inflammatory concentrations of each pesticide may be related to their chemical structure. Pesticides of carbamates group, such as mancozeb, present higher toxic effects when compared to other pesticides groups ^[49], such as isophthalonitriles

and benzimidazoles. Then, at low concentrations carbamates are already able to affect human health, justifying why mancozeb presented the lowest pro-inflammatory concentration.

All data presented in this study were obtained from *in vitro* experiments. Due to *in vitro* methodological limitations, complementary studies using, for example, *in vivo* approaches may be performed to confirm the evidences here reported.

CONCLUSION

The present study demonstrated that mancozeb, chlorothalonil and thiophante-methyl concentrations are able to exert pro-inflammatory effects in murine macrophages cells, increasing cellular proliferation, pro-inflammatory cytokine and caspases production. However, the oxidative effects was observed just in cells exposed to chlorothalonil, not being increased with the exposure to the other pesticides. The results presented in this study will certainly contribute to a better understanding of the effects of pesticides on the immune function and will help to explain many diseases associated with the exposure to these compounds. Besides, given that just a few studies were performed to explore these effects, the data presented here could help to improve research in this field and serve as a base to further studies addressing this issue.

REFERENCES

- [1] Kapka-Skrzypczak, L.; Cyranka, M.; Skrzypczak, M.; Kruszewski, M. Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure - state of the art. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2011**, *18* (2), 294-303.
- [2] Franco, R.; Li, S.; Rodriguez-Rocha, H.; Burns, M.; Panayiotidis, M.I. Molecular Mechanisms of Pesticide-Induced Neurotoxicity: Relevance to Parkinson's Disease. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *188* (2), 289-300.
- [3] Ma, J.; Li, X. Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. *Chemosphere* **2015**, *128* (1), 293-298.
- [4] Kim, K.H.; Kabir, E.; Jahan, S.A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* **2017**, *575* (1), 525-535.
- [5] Hasan, H.O. Fungicides and Their Effects on Animals. *Fungicides*; Carisse, O. Ed.; InTech: Rijeka, 2010; 1-15.
- [6] Komárek, M.; Cadková, E.; Chrástný, V.; Bordas, F.; Bollinger, J.C. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environ. Int.* **2010**, *36* (1), 138-151.

- [7] Calviello, G.; Piccioni, E.; Boninsegna, A.; Tedesco, B.; Maggiano, N.; Serini, S.; Wolf, F.I.; Palozza, P. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *211* (2), 87–96.
- [8] Kleinstreuer, N.C.; Dix, D.J.; Houck, K.A.; Kavlock, R.J.; Knudsen, T.B.; Martin, M.T.; Paul, K.B.; Reif, D.M.; Crofton, K.M.; Hamilton, K.; Hunter, R.; Shah, I.; Judson, R.S. *In vitro* perturbations of targets in cancer hallmark processes predict rodent chemical carcinogenesis. *Toxicol. Sci.* **2013**, *131* (1), 40–55.
- [9] Mozzachio, A.M.; Rusiecki, J.; Hoppin, J.A.; Mahajan, R.; Patel, R.; Beane-Freeman, L.; Alavanja, M.C.R. Chlorothalonil exposure and cancer incidence among pesticide applicator participants in the agricultural health study. *Environ. Res.* **2008**, *108* (3), 400-403.
- [10] Roberts, T.R.; Hutson, D.H. *Metabolic pathways of agrochemicals: insecticides and fungicides*. Royal Society of Chemistry: Great Britain, 1998; 1447 pp.
- [11] De Falco, M.; Sciarrillo, R.; Capaldo, A.; Russo, T.; Gay, F.; Valiante, S.; Varano, L.; Laforgia, V. The Effects of the Fungicide Methyl Thiophanate on Adrenal Gland Morphophysiology of the Lizard, *Podarcis sicula*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2007**, *53* (1), 241-248.
- [12] Sciarrillo, R.; De Falco, M.; Virgilio, F.; Laforgia, V.; Capaldo, A.; Gay, F.; Valiante, S.; Varano, L. Morphological and functional changes in the thyroid gland of methyl thiophanate-injected lizards, *Podarcis sicula*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2008**, *55* (1), 254-261.

- [13] Srivastava, A.K.; Ali, W.; Singh, R.; Bhui, K.; Tyagi, S.; Al-Khedhairi, A.A.; Srivastava, P.K.; Musarrat, J.; Shukla, Y. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. *Life Sci.* **2012**, *90* (1), 815-824.
- [14] Ben Amara, I.; Ben Saad, H.; Cherif, B.; Elwej, A.; Lassoued, S.; Kallel, C.; Zeghal, N. Methyl-thiophanate increases reactive oxygen species production and induces genotoxicity in rat peripheral blood. *Toxicol. Mech. Methods.* **2014**, *24* (9), 679-687.
- [15] Corsini, E.; Sokooti, M.; Galli, C.L.; Moretto, A.; Colosio, C. Pesticide-induced immunotoxicity in humans: A comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology* **2013**, *307* (1), 123–135.
- [16] Kassi, E.; Moutsatsou, P. Estrogen receptor signaling and its relationship to cytokines in systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, *1* (1), 1-14.
- [17] Baltazar, M.T.; Dinis-Oliveira, R.J.; De Lourdes Bastos, M.; Tsatsakis, A.M.; Duarte, J.A.; Carvalho, F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases - a mechanistic approach. *Toxicol. Lett.* **2014**, *230* (1), 85-103.
- [18] Alavanja, M.C.; Ross, M.K.; Bonner, M.R. Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *CA Cancer J. Clin.* **2013**, *63* (1), 120-142.
- [19] Fenga, C. Occupational exposure and risk of breast cancer. *Biomed. Rep.* **2016**, *4* (3), 282-292.

- [20] Hamelryck, T.W.; Minh-Hoa, D.T.; Poortmans, F.; Chrispeels, M.J.; Wyns, L.; Loris, R. The Crystallographic Structure of Phytoemagglutinin-L. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (1), 20479-85.
- [21] Fukui, M.; Yamabe, N.; Zhu, B.T. Resveratrol Attenuates the Anticancer Efficacy of Paclitaxel in Human Breast Cancer Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46* (10), 1882-1891.
- [22] Há, T.T.N.; Huy, N.T.; Murao, L.A.; Lan, N.T.P.; Thuy, T.T.; Tuan, H.M.; Nga, C.T.P.; Tuong, V.V.; Dat, T.V.; Kikuchi, M.; Yasunami, M.; Morita, K.; Houg, V.T.Q.; Hirayama, K. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. *PLoS One* **2011**, *6* (10), 1-7.
- [23] Costa, F.; Dornelles, E.; Mânica-Cattani, M.F.; Algarve, T.D.; Souza Filho, O.C.; Sagrillo, M.R.; Garcia, L.F.; Cruz, I.B. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. *Reprod. Biome. Online.* **2012**, *24* (4), 474-481.
- [24] Choi, W.S.; Shin, P.G.; Lee, J.H.; Kim, G.D. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cell Immunol.* **2012**, *280* (2), 164-170.

- [25] William-Faltaos, S.; Rouillard, D.; Lechat, P.; Bastian, G. Cell cycle arrest and apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines. *Anticancer Res.* **2006**, *26* (3A), 2093-2099.
- [26] Mandarapu, R.; Ajumeera, R.; Venkatesan, V.; Prakhya, B.M. Proliferation and T_H1/T_H2 Cytokine Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells after Treatment with Cypermethrin and Mancozeb *In vitro*. *J. Toxicol.* **2014**, *1* (1), 1-8.
- [27] Li, Q.; Nagahara, N.; Takahashi, H.; Takeda, K.; Okumura, K.; Minami, M. Organophosphorus pesticides markedly inhibit the activities of natural killer, cytotoxic T-lymphocyte and lymphokine-activated killer: A proposed inhibiting mechanism via granzyme inhibition. *Toxicology* **2002**, *172* (3), 181–190.
- [28] Li, Q. New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity. *J. Nihon Med. School* **2007**, *74* (2), 92–105.
- [29] Peden-Adams, M.M.; EuDaly, J.G.; Dabra, S.; EuDaly, A.; Heesemann, L.; Smythe, J.; Keil, D.E. Suppression of humoral immunity following exposure to the perfluorinated insecticide sulfluramid. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2007**, *70* (13), 1130–1141.
- [30] García-Hernandez, M.; Castro-Corona, M.A.; Segoviano-Ramírez, J.C.; Brattig, N.W.; Medina-De la Garza, C.E. Immunomodulatory effect of diethylcarbamazine in mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *23* (1), 113–120.

- [31] Hayashi, K.; Fukuyama, T.; Ohnuma, A.; Tajima, Y.; Kashimoto, Y.; Yoshida, T.; Kosaka, T. Immunotoxicity of the organochlorine pesticide methoxychlor in female ICR, BALB/c, and C3H/He mice. *J. Immunotoxicol.* **2013**, *10* (2), 119–124.
- [32] Corsini, E.; Viviani, B.; Birindelli, S.; Gilardi, F.; Torri, A.; Codecà, I.; Lucchi, L.; Bartesaghi, S.; Galli, C.L.; Marinovich, M.; Colosio, C. Molecular mechanisms underlying mancozeb-induced inhibition of TNF- α production. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *212* (2), 89–98.
- [33] Taghavian, F.; Vaezi, G.; Abdollahi, M.; Malekirad, A.A. Comparative Toxicological Study between Exposed and Non-Exposed Farmers to Organophosphorus Pesticides. *Cell J.* **2016**, *18* (1), 89-96.
- [34] Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39* (1), 44-84.
- [35] Rupérez, A. I.; Gil, A.; Aguilera, C. M. Genetics of oxidative stress in obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (2), 3118-3144.
- [36] Da Costa, L.A.; Badawi, A.; El-Soheily, A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. *Ann. Nutr. Metab.* **2012**, *60* (3), 27-36.
- [37] Berk, M.; Kapczinski, F.; Andreazza, A.C.; Dean, O.M.; Giorlando, F.; Maes, M.; Yücel, M.; Gama, C.S.; Dodd, S.; Dean, B.; Magalhães, P.V.; Amminger, P.; McGorry, P.; Malhi,

G.S. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosc. Biobehav. Res.* **2011**, *35* (3), 804-817.

[38] Baier-Anderson, C.; Anderson, R.S. The Effects of Chlorothalonil on Oyster Hemocyte Activation: Phagocytosis, Reduced Pyridine Nucleotides, and Reactive Oxygen Species Production. *Environ. Res. Section A* **2000**, *83* (1), 72-78.

[39] Rakitsky, V.N.; Koblyakov, V.A.; Turusov, V.S. Nongenotoxic (epigenetic) carcinogens: pesticides as an example. A critical review. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **2000**, *20* (4), 229–240.

[40] Saquib, Q.; Al-Khedhairy, A.A.; Singh, B.R.; Arif, J.M.; Musarrat, J. Genotoxic fungicide methyl thiophanate as an oxidative stressor inducing 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine adducts in DNA and mutagenesis. *J Environ Sci Health B.* **2009**, *45* (1), 40-45.

[41] Takeuchi, O.; Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **2010**, *140* (6), 805-820.

[42] Chen, G.Y.; Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10* (12), 826-837.

[43] Tassi, S.; Carta, S.; Delfino, L.; Caorsi, R.; Martini, A.; Gattorno, M.; Rubartelli, A. Altered redox state of monocytes from cryopyrin-associated periodic syndromes causes accelerated IL-1 β secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (21), 9789-9794.

- [44] Jang, Y.; Lee, A.Y.; Jeong, S.H.; Park, K.H.; Paik, M.K.; Cho, N.J.; Kim, J.E.; Cho, M.H. Chlorpyrifos induces NLRP3 inflammasome and pyroptosis/apoptosis via mitochondrial oxidative stress in human keratinocyte HaCaT cells. *Toxicology* **2015**, *338* (1), 37-46.
- [45] Chen, L.; Na, R.; Boldt, E.; Ran, Q. NLRP3 inflammasome activation by mitochondrial reactive oxygen species plays a key role in long-term cognitive impairment induced by paraquat exposure. *Neurobiol. Aging* **2015**, *36* (9), 2533-2543.
- [46] Kim, H.K.; Andreazza, A.C.; Elmi, N.; Chen, W.; Young, L.T. Nod-like receptor pyrin containing 3 (NLRP3) in the post-mortem frontal cortex from patients with bipolar disorder: a potential mediator between mitochondria and immune-activation. *J. Psychiatr. Res.* **2016**, *72* (1), 43-50.
- [47] Kepp, O.; Galluzzi, L.; Kroemer, G. Mitochondrial control of the NLRP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* **2011**, *12* (3), 199-200.
- [48] Zhou, R.; Yazdi, A.S.; Menu, P.; Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* **2011**, *469* (7329), 221-225.
- [49] Yamamoto, M.; Toda, M.; Tanaka, K.; Sugita, T.; Sasaki, S.; Unevama, C.; Morikawa, K. Study on usage of pesticides in various countries. *Koku. Iyak. Shok. Eisei Kenkyusho Hokoku.* **2007**, *125* (1), 92-100.

Figure 1: Cellular proliferation of murine macrophages cells exposed to different concentrations of pesticides. Cell proliferation measured by MTT assay in macrophages exposure to mancozeb (A), chlorothalonil (B) and thiophanate methyl (C). Cell free dsDNA quantification in cell treated with mancozeb (D), chlorothalonil (E) and thiophanate methyl (F). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus zero control.

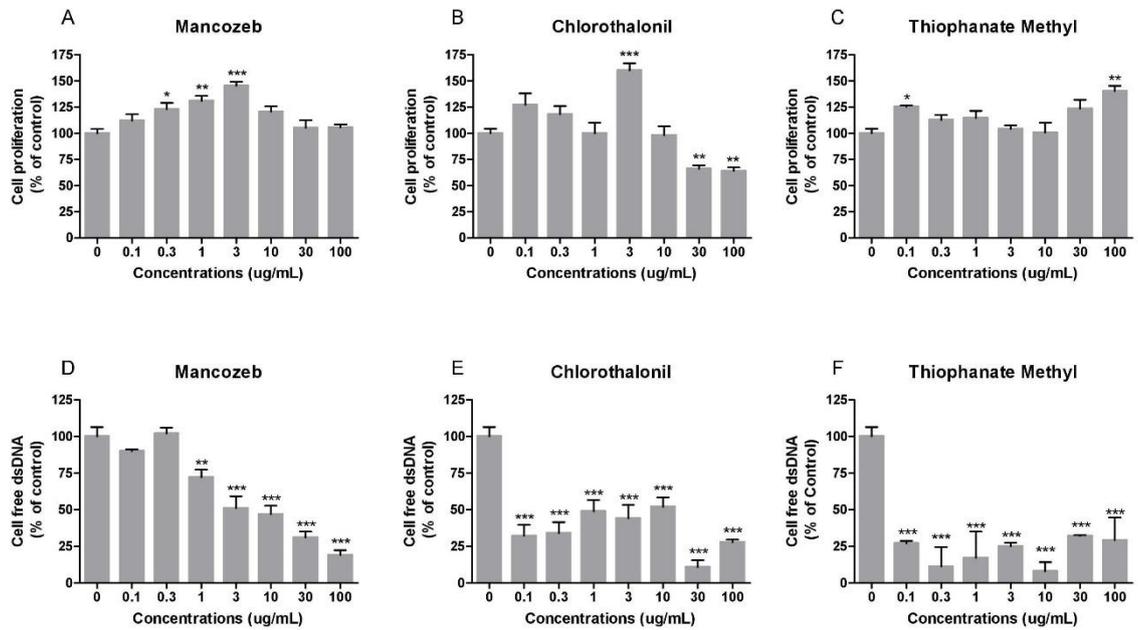


Figure 2: Oxidative metabolism of murine macrophages cells exposed to pesticides. Total levels of ROS production of macrophages exposed to different concentration of mancozeb (A), chlorothalonil (B) and thiophanate methyl (C). NO levels quantification of RAW 264.7 cells treated with mancozeb (D), chlorothalonil (E) and thiophanate methyl (F). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus zero control.

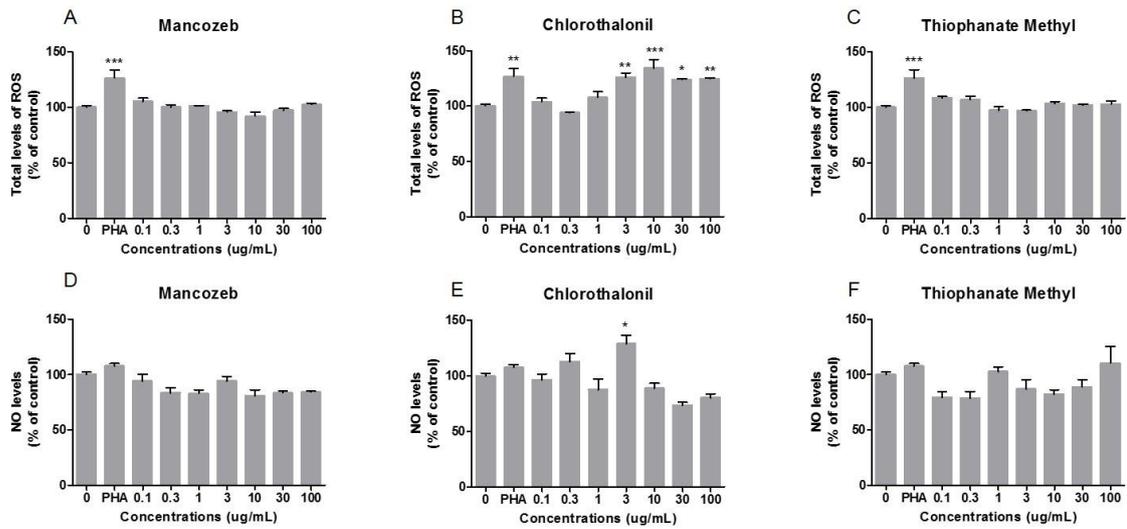


Figure 3: Macrophage cell cycle modulation under exposure to the most pro-inflammatory concentration of each pesticide. Untreated cells (A), PHA-induced (B), mancozeb 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ exposition (C), chlorothalonil 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ exposition (D), thiophanate methyl 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ exposition (E). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus zero control.

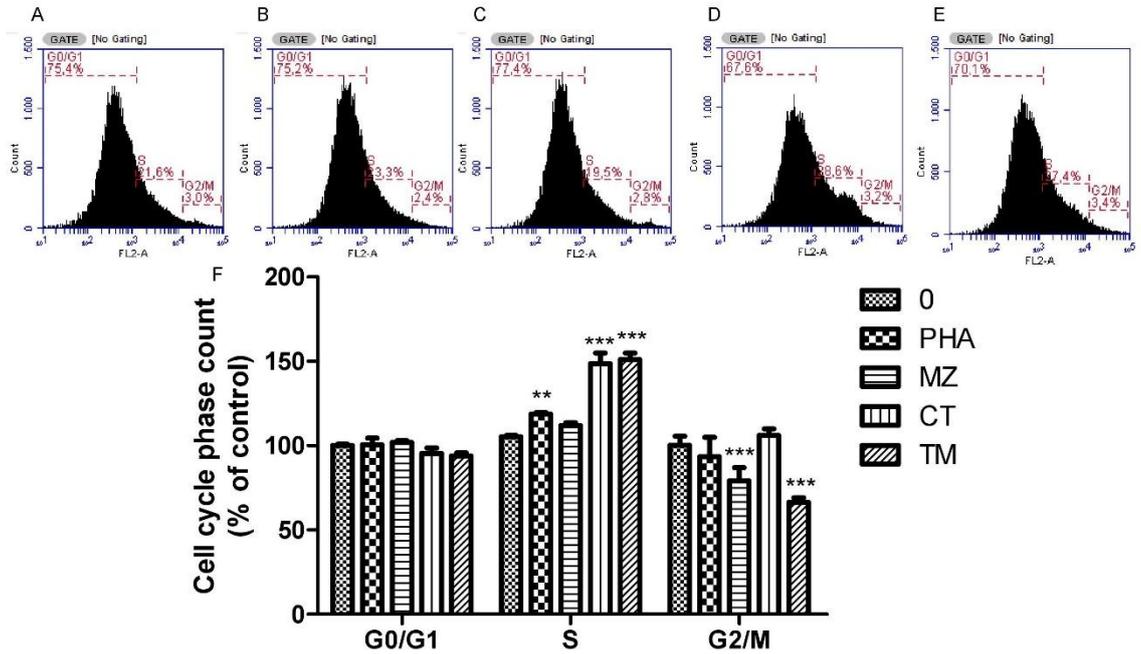


Figure 4: Inflammatory system cytokines production of RAW 264.7 macrophages exposed to most pro-inflammatory concentration of each pesticide, MZ 1 $\mu\text{g/mL}$, CT 3 $\mu\text{g/mL}$, TM 100 $\mu\text{g/mL}$. IL-1 β protein quantification (A), IL-6 protein quantification (B), TNF- α protein quantification (C), IFN- γ quantification (D), IL-10 protein quantification (E). Statistical differences are shown by different letters.

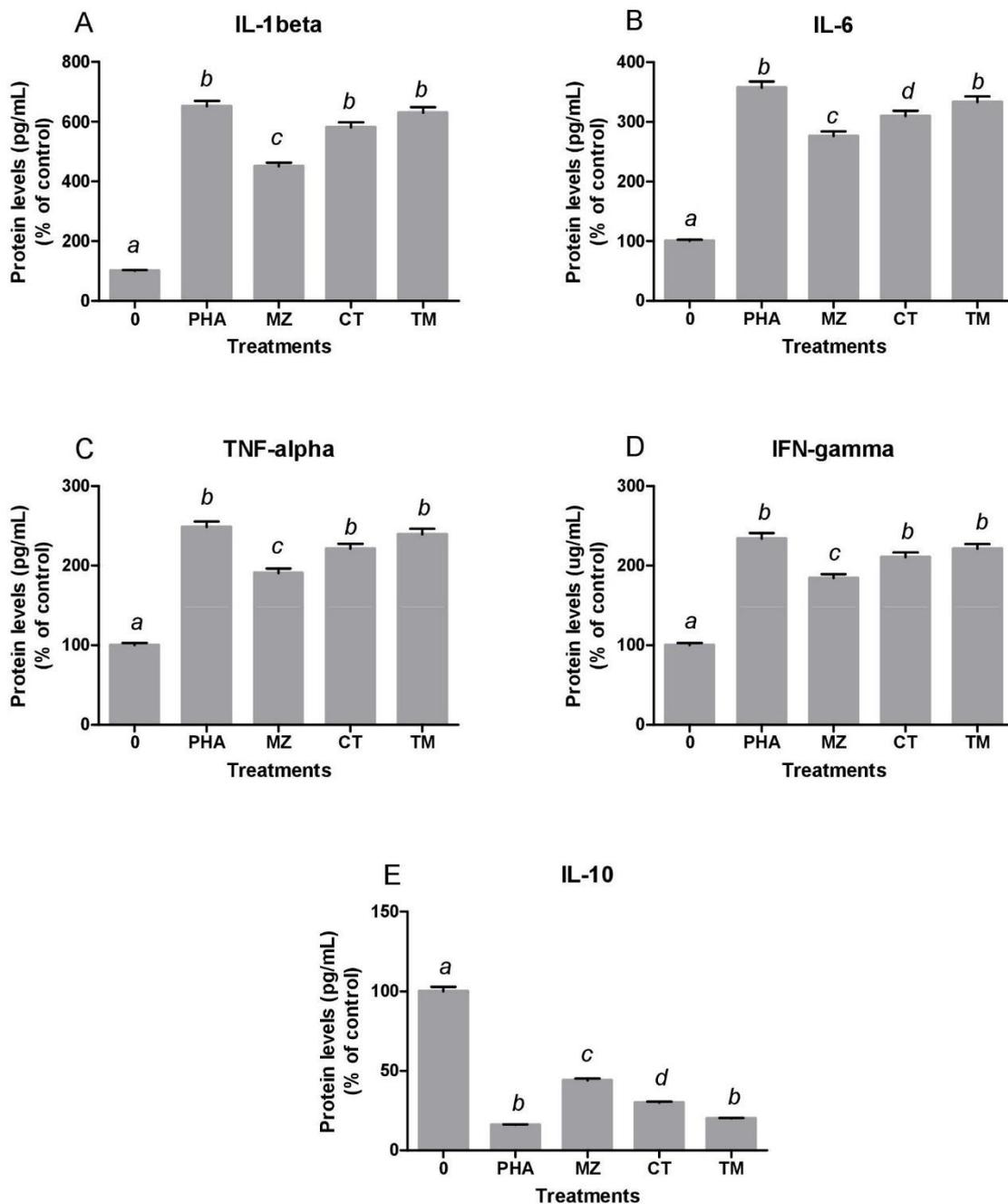
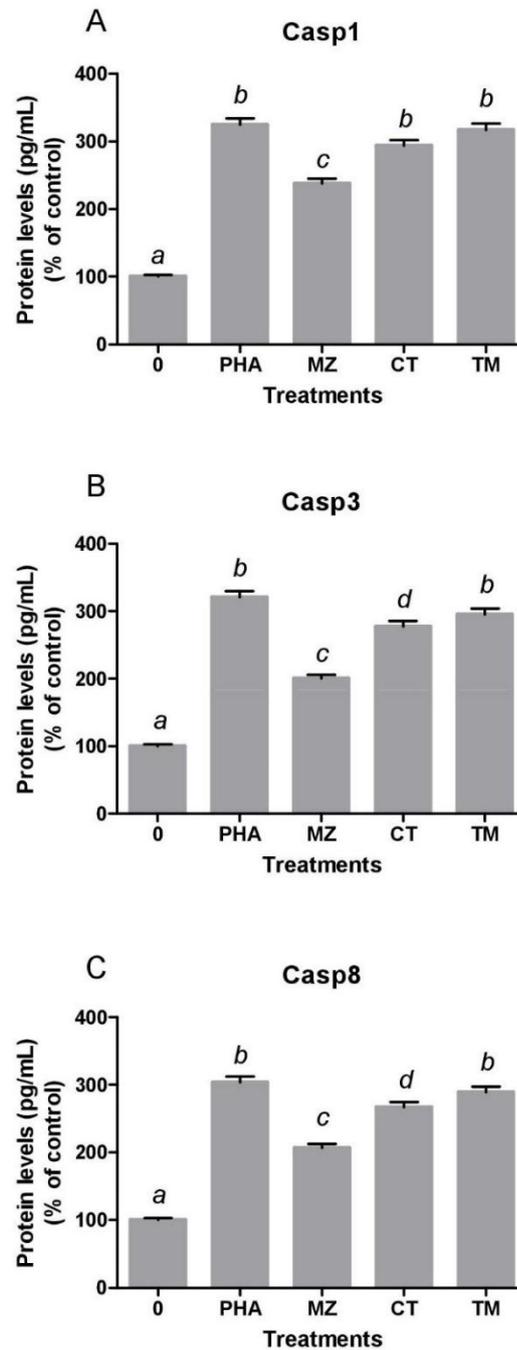


Figure 5: Caspases levels of murine macrophage cells exposed to the most pro-inflammatory concentration of each pesticide, MZ 1 $\mu\text{g/mL}$, CT 3 $\mu\text{g/mL}$, TM 100 $\mu\text{g/mL}$. Casp1 quantification (A), Casp3 quantification (B), Casp8 quantification (C). Statistical differences are shown by different letters.



4 DISCUSSÃO

Evidências vêm demonstrando que os pesticidas podem afetar o sistema imune através de diferentes mecanismos (LI et al., 2002; LI, 2007), principalmente induzindo imunossupressão (PEDEN-ADAMS et al., 2007) ou imunoestimulação (GARCÍA-HERNANDEZ et al., 2014). Usualmente, os pesticidas exercem atividade imunomoduladora através do mecanismo de imunossupressão, afetando o desempenho do sistema imunológico e consequentemente aumentando a susceptibilidade a doenças. Entretanto, nos pesticidas que atuam como imunoestimuladores, a resposta imune é exacerbada, ocorrendo elevada produção de mediadores inflamatórios, como citocinas, EROs e NO (HAYASHI et al., 2013).

O presente estudo mostrou ativação inflamatória de macrófagos murinos expostos ao mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico nas concentrações de 1, 3 e 100 µg/mL, respectivamente, caracterizado pelo aumento da proliferação celular e dos níveis das citocinas pró-inflamatórias e caspases. Enquanto que o efeito do pesticida mancozebe na modulação inflamatória já fora previamente descrito na literatura (CORSINI et al., 2006), a ação imunomoduladora dos fungicidas clorotalonil e tiofanato metílico, até onde sabido, ainda não foi reportada.

Os resultados obtidos corroboram com estudos prévios que reportam o efeito imunomodulador do mancozebe em células do sangue humano aumentando a proliferação celular e a produção de IFN- γ (CORSINI et al., 2006) e em linfócitos humanos através do aumento dos níveis das caspases (SRIVASTAVA et al., 2012). Entretanto, estes resultados são controversos, uma vez que alguns estudos também reportaram efeito imunotóxico do mancozebe através da inibição da produção da IL-6 e do TNF- α (CORSINI et al., 2006; MANDARAPU et al., 2014). Esta diferença de ação do mancozebe na resposta inflamatória pode estar relacionada com as condições experimentais, como o tipo de células, tempo de exposição e a concentração utilizada do pesticida (TAGHAVIAN et al., 2016). Estes resultados também podem indicar que, em diferentes condições, o mancozebe pode apresentar efeito imunossupressor ou imunoestimulador, sendo prejudicial à saúde humana em ambos os casos (HAYASHI et al., 2013).

O estresse oxidativo também pode estar associado com a resposta inflamatória, atuando como um mediador para a ativação do processo inflamatório. O aumento da produção de EROs e NO caracteriza o estresse oxidativo e afeta as funções celulares. Diversas doenças têm sido associadas com o estresse oxidativo, incluindo doenças metabólicas (VALKO et al.,

2007), obesidade (RUPÉREZ; GIL; AGUILERA, 2014), câncer (DA COSTA; BADAWI; EL-SOHEMY, 2012) e ativação imune crônica (BERK et al., 2011).

Os resultados obtidos demonstraram que a exposição ao pesticida clorotalonil aumentou os níveis de EROs e NO, corroborando com resultados previamente descritos por Baier-Anderson e Anderson (2000). Entretanto, diferindo dos demais resultados encontrados, Corsini et al. (2006) relatou que linfócitos expostos ao mancozebe apresentaram aumento nos níveis de EROs. Do mesmo modo, Saquib et al. (2009) demonstrou que a exposição a elevadas concentrações de tiofanato metílico aumentava a produção de EROs em linfócitos humanos. O diferente efeito dos pesticidas nos marcadores oxidativos pode estar associado com o desenho experimental e também com o tipo de moléculas oxidativas analisadas.

Uma vez que este estudo foi realizado *in vitro* e que os valores admitidos pela legislação brasileira referem-se a consumo oral, não tendo nenhuma referência sobre valores séricos permitidos, realizou-se uma estimativa do quanto desse valor máximo “ingerido” estaria presente na célula após sua ingestão. Para tal, considerou-se os valores de IDA para cada um dos pesticidas e o seu percentual de absorção, o peso e volume médio de sangue de um indivíduo adulto.

Para os cálculos considerou-se o peso médio de um adulto de idade entre 20 a 64 anos de 61,5 Kg (IBGE, 2011). Ainda, tendo em vista que um adulto possui volume de sangue de 4 a 6 litros no corpo, variando conforme seu sexo e composição corporal, utilizou-se para a estimativa o valor de 5 litros de sangue corporal para um adulto (GUYTON, 1985).

A IDA do mancozebe e do clorotalonil é de 0,03 mg/kg de peso corporal (AGROFIT, 2016). Considerando um indivíduo adulto com peso de 61,5 kg, tem-se a ingestão diária de 1,845 mg desses compostos. Distribuindo ao longo do corpo, ou seja, dividindo pelo seu volume sanguíneo (5 litros), têm-se 0,369 mg/L de cada composto. No entanto, considerando que a absorção do mancozebe é de 50% (AGROFIT, 2016), a contração final na célula seria de 0,1845 µg/mL de mancozebe. Já para o clorotalonil, considerando que a absorção deste composto é de 30% (AGROFIT, 2016), a concentração final na célula seria de 0,1107 µg/mL. Quanto ao tiofanato metílico, a IDA é de 0,08 mg/kg de peso corporal (AGROFIT, 2016). Realizando o mesmo cálculo feito com os demais compostos, porém considerando esse valor de IDA e levando em consideração que a absorção do clorotalonil é de 80% (AGROFIT, 2016), a concentração final deste composto na célula seria de 0,7872 µg/mL.

Após realizar esta estimativa e comparar com as concentrações utilizadas neste estudo, as quais variaram de 0,1 – 100 µg/mL, pode-se observar que teoricamente o valor estabelecido pela legislação brasileira como de ingestão aceitável mostra-se abaixo dos

valores encontrados neste estudo como capazes de desencadear um processo inflamatório. No entanto, é necessário considerar que a distribuição destes compostos no corpo humano não ocorre de forma uniforme, como calculado nesta estimativa. Dessa forma, pode-se ter valores maiores em alguns tecidos como fígado e rins, onde estas substâncias tendem a se acumular.

Além disso, é importante ressaltar que a IDA corresponde ao valor considerado seguro para consumo humano sem gerar malefícios a saúde humana. Entretanto, tendo em vista a alimentação do indivíduo e a faixa etária, o real consumo desses compostos pode ser superior aos valores da IDA. Em estudos realizados por Santos et al. (2015) e Maggioni et al. (2017), observou-se que a ingestão diária estimada de alguns pesticidas era superior a IDA estabelecida.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram efeito pró-inflamatório em macrófagos RAW 264.7 expostos aos pesticidas mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico nas respectivas concentrações de 1, 3 e 100 µg/mL. Nessas doses de exposição, ocorreu com aumento da proliferação celular e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e das caspases. Assim, como observou-se a diminuição da citocina anti-inflamatória. No entanto, o efeito oxidativo foi observado somente nos macrófagos expostos ao clorotalonil na concentração de 3 µg/mL. Assim, pode-se concluir que nessas condições de estudo, os pesticidas estudados atuaram ativando o sistema imunológico.

A ativação inflamatória crônica pode estar relacionada com o surgimento de algumas doenças como doenças autoimunes, hipercolesterolemia, problemas cardíacos, bem como parece estar envolvida no desenvolvimento de cânceres.

Essas informações contribuem para a melhor compreensão dos efeitos imunológicos que a exposição a estes pesticidas pode desencadear. Além disso, estes resultados servem de evidência para estudos futuros tendo em vista a escassez de trabalhos na literatura sobre esse tema e com esses compostos.

Tendo em vista as limitações metodológicas do estudo *in vitro*, mais estudos em caráter *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para confirmar as evidências reportadas por esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Basic immunology: Functions and disorders of the immune system**. 4. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2014. 336 p.

AGROFIT. MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Consulta de ingrediente ativo: Mancozebe**. 2016. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 dez. 2016.

AGROFIT. MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Consulta de ingrediente ativo: Clorotalonil**. 2016. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 dez. 2016.

AGROFIT. MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Consulta de ingrediente ativo: Tiofanato metílico**. 2016. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 17 dez. 2016.

ALVES, M. I. R. et al. Avaliação da contaminação por pesticidas organoclorados em recursos hídricos do Estado de Goiás. **Rev. Bras. Recur. Hídricos**, v. 15, n. 1, p. 67-74, 2010.

ANDERSON, S. E.; MEADE, B. J. Potential health effects associated with dermal exposure to occupational chemicals. **Environ. Health. Insights**, v. 8, n. 1, p. 51-62, 2014.

ANTWI, S. O. et al. Exposure to environmental chemicals and heavy metals, and risk of pancreatic cancer. **Cancer Causes Control**, v. 26, n. 11, p. 1583-1591, 2015.

AUFFRAY, C. et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. **Science**, v. 317, n. 5838, p. 666-670, 2007.

BAIER-ANDERSON, C.; ANDERSON, R. S. The Effects of Chlorothalonil on Oyster Hemocyte Activation: Phagocytosis, Reduced Pyridine Nucleotides, and Reactive Oxygen Species Production. **Environ. Res. Section A**, v. 83, n. 1, p. 72-78, 2000.

BARBOSA, L. C. A. B. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. 1 ed. Viçosa: Editora UFV, 2004. 215 p.

BASTOS, L. H. P. B.; CARDOSO, M. H. W. M. Possíveis fontes de contaminação do alimento leite, por agrotóxicos, e estudos de monitoramento de seus resíduos: uma revisão nacional. **Cad. Saúde Colet.**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 51-60, 2011.

BYUNG-CHEOL, L.; JONGSOON, L. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1842, n. 3, p. 446-462, 2014.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 (Lei Federal dos Agrotóxicos). **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 12 jul. 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Legislação Federal de Agrotóxicos e afins. Portaria SNVS nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das “Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 09/12/91”. **Lex**: Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento; 1998. p. 153-177.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA), dados da coleta e análise de 2001 a 2007**. Brasília: ANVISA, 2008. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 18 dez. 2016.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA), dados da coleta e análise de 2010**. Brasília: ANVISA, 2011. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 18 dez. 2016.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Seminário Mercado de Agrotóxico e Classificação**. Brasília: Anvisa, 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrototoxicos+em+2012>>. Acesso em: 07 dez. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Segurança Química. Agrotóxicos**. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrototoxicos>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

BALKWILL, F. R.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. **Semin. Cancer Biol.**, v. 22, n. 1, p. 33-40, 2012.

BERK, M. et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neurosc. Biobehav. Res.**, v. 35, n. 3, p. 804-817, 2011.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 1, p. 235-238, 2006.

CALVIELLO G. et al. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 211, n. 2, p. 87-96, 2006.

CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. 1 ed. Rio de Janeiro: ABRASCO; 2012. 88 p.

CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. 1 ed. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624 p.

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews: Immunology.**, v.10, p.826-837, 2010.

COOPER, J.; DOBSON, H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. **Crop Protection.**, v. 26, n. 9, p. 1337-1348, 2007.

COPPLESTONE, J.F. The development of the WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 66, n. 5, p. 545-551, 1988.

CORSINI, E. et al. Immunomodulatory effects of the fungicide Mancozeb in agricultural workers. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 208, n.1, p. 178-185, 2005.

CORSINI, E. et al. Molecular mechanisms underlying mancozeb-induced inhibition of TNF- α production. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 212, n. 2, p. 89-98, 2006.

COSTA C. et al. Oxidative stress biomarkers and paraoxonase1 polymorphism frequency in farmers occupationally exposed to pesticides. **Mol. Med. Rep.**, v. 12, n. 4, p. 6353-6357, 2015.

CRUVINEL, W. M. et al. Natural Regulatory T cells in Rheumatic Diseases. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v. 48, n. 6, p. 342-355, 2008.

DA COSTA, L. A.; BADAWI, A.; EL-SOHEMY, A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 60, n. 3, p. 27-36, 2012.

DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 6, n. 1, p. 24-37, 2006.

DEL-ÁNGEL, M. et al. Anti-inflammatory effect of natural and semi-synthetic phthalides. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 5, n. 752, p. 40-48, 2015.

DOMICO, L. M. et al. Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. **Neurotoxicology.**, v. 28, n. 6, p. 1079-1091, 2007.

DHANDE, L.; MA, W.; HUSSAIN, T. Angiotensin AT2 receptor stimulation is anti-inflammatory in lipopolysaccharide-activated THP-1 macrophages via increased interleukin-10 production. **Hypertens. Res.**, v. 38, n. 1, p. 21-29, 2015.

DHOUIB, I. et al. From immunotoxicity to carcinogenicity: the effects of carbamate pesticides on the immune system. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 23, n. 10, p. 9448-9458, 2016.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Proposed Guidelines for Carcinogen Risk Assessment**. 1996. Disponível em: <https://cfpub.epa.gov/ncea/raf/pdfs/propcra_1996.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2016.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Monitoring of pesticide residues in products of plant origin in the European Union, Norway, Iceland and Lichtenstein, 2005. 2007. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fvo/specialreports/pesticide_residues/report_2005_en.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2016.

FAHY, R. J.; DOSEFF, A. I.; WEWERS, M. D. Spontaneous human monocyte apoptosis utilizes a caspase-3-dependent pathway that is blocked by endotoxin and is independent of caspase-1. **J. Immunol.**, v. 163, n. 4, p. 1755–1762, 1999.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Statistics Division. **Food and nutrition in numbers**. 2014. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 16 dez. 2016.

FASSA, A. G. et al. A. Green Tobacco Sickness Among Tobacco Farmers in Southern Brazil. **Am. J. Ind. Med.**, v. 57, n. 6, p. 223-300, 2014.

FENGA, C. Occupational exposure and risk of breast cancer. **Biomed. Rep.**, v. 4, n. 3, p. 282-292, 2016.

FLORES, A. V. et al. Organoclorados: Um problema e saúde pública. **Ambient. Soc.**, v. 7, n. 2, p. 111-124, 2004.

FRANCO, R. et al. Molecular Mechanisms of Pesticide-Induced Neurotoxicity: Relevance to Parkinson's Disease. **Chem. Biol. Interact.**, v. 188, n. 2, p. 289-300, 2010.

GANGEMI, S. et al. Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases (Review). **Int. J. Mol. Med.**, v. 38, n. 4, p. 1012-1020, 2016.

GARCÍA-HERNANDEZ, M. et al. Immunomodulatory effect of diethylcarbamazine in mice infected with *Nocardia brasiliensis*. **Int. Immunopharmacol.**, v. 23, n. 1, p. 113-120, 2014.

GRANELLA, V. et al. Resíduos de agrotóxicos em leites pasteurizados orgânicos e convencionais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 1731-1740, 2013.

GEBARA, A. B. et al. Pesticide residues in vegetables and fruits monitored in São Paulo city, Brazil, 1994–2001. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 75, n. 1, p. 163-169, 2005.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R. M. et al. Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1342-1347, 2008.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, 2010.

GOUGH, D. R.; COTTER, T. G. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. **Cell Death Dis.**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2011.

GUYTON, A. **Fisiologia Humana**. 3 ed. Rio de Janeiro: Discos CBS, 1985. 834 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. New York: Oxford, 2007. 936 p.

HAYASHI, K. et al. Immunotoxicity of the organochlorine pesticide methoxychlor in female ICR, BALB/c, and C3H/He mice. **J. Immunotoxicol.**, v. 10, n. 2, p. 119-124, 2013.

HANAMSANGAR, R.; HANKE, M. L.; KIELIAN, T. Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. **Trends Immunol.**, v. 33, n. 7, p. 333-342, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Boletim anual de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos. 2014. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>. Acesso em: 18 dez. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo Agropecuário 2006**. 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**. 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. 1987. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. 1991. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

IVANOV, I. I. et al. The orphan nuclear receptor ROR gamma T directs the differentiation program of pro inflammatory IL-17 + T helper cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121-1133, 2006.

JAMES, K. A.; HALL, D. A. Groundwater pesticide levels and the association with Parkinson disease. **Int. J. Toxicol.**, v. 34, n. 3, p. 266–273, 2015.

KIDANE, D. et al. Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 49, n. 2, p. 116-139, 2014.

KLEINSTREUER, N. C. et al. *In vitro* perturbations of targets in cancer hallmark processes predict rodent chemical carcinogenesis. **Toxicol. Sci.**, v. 131, n. 1, p. 40–55, 2013.

KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Sci. Total Environ.**, v. 575, n.1, p. 525-535, 2017.

KOMÁREK, M. et al. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. **Environ. Int.**, v. 36, n. 1, p. 138–151, 2010.

KRALISCH, S.; FASSHAUER, M. Adipocyte fatty acid binding protein: A novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? **Diabetologia**, v. 56, n. 1, p. 10-21, 2013.

- LARINI, Lourival. **Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Editora Manole, 1999. 301p.
- LAVIERI, R. et al. TLR costimulation causes oxidative stress with unbalance of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines production. **J. Immunol.**, v. 192, n. 11, p. 5373-5381, 2014.
- LI, Q. et al. Organophosphorus pesticides markedly inhibit the activities of natural killer, cytotoxic T-lymphocyte and lymphokine-activated killer: A proposed inhibiting mechanism via granzyme inhibition. **Toxicology**, v. 172, n. 3, p. 181-190, 2002.
- LI, Q. New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity. **J. Nihon Med. School**, v. 74, n. 2, p. 92-105, 2007.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, O. et al. Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 366-374, 2012.
- LU, S.Y. et al. Endocrine disrupting activity in carbendazim-induced reproductive and developmental toxicity in rats. **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 67, n. 19, p. 1501-1515, 2004.
- MA J.; LI, X. Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. **Chemosphere**, v. 128, n. 1, p. 293-298, 2015.
- MAGGIONI, D. A. et al. Comprehensive estimate of the theoretical maximum daily intake of pesticide residues for chronic dietary risk assessment in Argentina. **J. Environ. Sci. Health B**, v. 13, n.1, p. 1-11, 2017.
- MALASPINA, F. G.; ZINILISE, M. L.; BUENO, P. C. Perfil epidemiológico das intoxicações por agrotóxicos no Brasil, no período de 1995 a 2010. **Cad. Saúde Colet.**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 425-34, 2011.
- MALEKIRAD, A. A. et al. Neurocognitive, mental health, and glucose disorders in farmers exposed to organophosphorus pesticides. **Arh. Hig. Rada. Toksikol.**, v. 64, n. 1, p. 1-8, 2013.
- MANDARAPU, R. et al. Proliferation and TH1/TH2 Cytokine Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells after Treatment with Cypermethrin and Mancozeb *in vitro*. **J. Toxicol.**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2014.
- MARTINON, F. et al. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 5, p. 411-418, 2010.
- MEDINA-DÍAZ, I. M. et al. Downregulation of human paraoxonase 1 (PON1) by organophosphate pesticides in HepG2 cells. **Environ. Toxicol.**, v. 32, n. 2, p. 490-500, 2016.
- MOISAN, F. et al. Association of Parkinson's disease and its subtypes with agricultural pesticide exposures in men: a case-control study in France. **Environ. Health. Perspect.**, v. 123, n. 11, p. 1123-1129, 2015.

MOZZACHIO, A. M. et al. Chlorothalonil exposure and cancer incidence among pesticide applicator participants in the agricultural health study. **Environ. Res.**, v. 108, n. 3, p. 400–403, 2008.

O'CONNELL, R. M. et al. Micro RNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 607-619, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 1990-1991**. 1991. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/1990/WHO_PCS_90.1_REV.1.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guideline to Classification**. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2016.

PATHAK, R. et al. Endosulfan and other organochlorine pesticide residues in maternal and cord blood in north Indian population. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 81, n. 2, p. 216-219, 2008.

PEDEN-ADAMS, M. M. et al. Suppression of humoral immunity following exposure to the perfluorinated insecticide sulfluramid. **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 70, n. 13, p. 1130-1141, 2007.

PINHEIRO, A.; MORAES, J. C. S; SILVA, M. R. Pesticidas no perfil de solos em áreas de plantação de cebolas em Ituporanga, SC. **Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.**, Campina Grande, v. 15, n. 5, p. 533-538, 2011.

PIRSAHEB, M. et al. Organochlorine pesticides residue in breast milk: a systematic review. **Med. J. Islam. Repub. Iran**, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2015.

RAAFAT, N.; ABASS, M. A.; SALEM, H. M. Malathion exposure and insulin resistance among a group of farmers in Al-Sharkia governo rate. **Clin. Biochem.**, v. 45, n. 18, p. 1591-1595, 2012.

RAKITSKY, V.N. et al. Nongenotoxic (epigenetic) carcinogens: pesticides as an example. A critical review. **Teratog. Carcinog. Mutagen.**, v. 20, n. 4, p. 229–240, 2000.

RASCHKE, W.C. et al. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell.**, v. 15, n. 1, p. 261-267, 1978.

REBELO, F. M. et al. Intoxicação por agrotóxicos no Distrito Federal, Brasil, de 2004 a 2007- Análise da notificação ao Centro de Informação e Assistência Toxicológica. **Ciê. Saúde Colet.**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 8, p. 3493-3502, 2011.

RILEY, P. et al. Herbicide Tolerance and GM crops: Why the World should be Ready to Round Up Glyphosate. **GM Freeze and Greenpeace**. 2011. Disponível em: <<http://www.greenpeace.org/international/en/publications/reports/Herbicide-tolerance-and-GM-crops/>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

ROBERTS, T.R.; HUTSON, D.H. **Metabolic pathways of agrochemicals: insecticides and fungicides**. 1 ed. Great Britain: Royal Society of Chemistry, 1998. 1447 p.

RUPÉREZ, A. I.; GIL, A.; AGUILERA, C. M. Genetics of oxidative stress in obesity. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 2, p. 3118-3144, 2014.

SANCHES, S. M. et al. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Rev. Ecotox. Meio Ambient.**, Curitiba, v. 13, n. 1, p. 53-58, 2003.

SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, n.1, p. 159-170, 2007.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides: uma visão geral. Alimentos e Nutrição. **Alim. Nutri.**, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.

SANTOS, J. S. et al. Estimated daily intake of organochlorine pesticides from dairy products in Brazil. **Food Control**, v. 53, n. 1, p. 23-28, 2015.

SAQUIB, Q. et al. Genotoxic fungicide methyl thiophanate as an oxidative stressor inducing 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine adducts in DNA and mutagenesis. **J. Environ. Sci. Health B**, v. 45, n. 1, p. 40-45, 2009.

SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 784-788, 2000.

SEILER, J. P. Toxicology and genetic effects of benzimidazole compounds. **Mutat. Res.**, v. 32, n. 2, p. 151-168, 1975.

SHARMA, D. et al. Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: a review. **Talanta**, v. 82, n. 4, p. 1077-1089, 2010.

SILVA, M.F.O; COSTA, L.M. A indústria de defensivos agrícolas. **Química BNDES Setorial** 35, p. 233-76, 2012. Disponível em: <<http://bit.do/bndes35>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS (SINDAG). **Dados de produção e consumo de agrotóxicos**. 2011. Disponível em: <www.sindag.com.br>. Acesso em: 20 dez. 2016.

SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS (SINDAG). **Vendas de defensivos agrícolas são recordes e vão a US\$ 8,5 bi em 2011**. 2012. Disponível em: <<http://bit.do/sindag2256>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

SRIVASTAVA, A. K. et al. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. **Life Sci.**, v. 90, n. 1, p. 815-824, 2012.

TAGHAVIAN, F. et al. Comparative Toxicological Study between Exposed and Non-Exposed Farmers to Organophosphorus Pesticides. **Cell J.**, v. 18, n. 1, p. 89-96, 2016.

- TASSI, S. et al. Altered redox state of monocytes from cryopyrin-associated periodic syndromes causes accelerated IL-1 β secretion. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 107, n. 21, p. 9789-9794, 2010.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.
- TESSIER, D.M. et al. Increased ErbB-2 tyrosine kinase activity, MAPK phosphorylation, and cell proliferation in the prostate cancer cell line LNCaP following treatment by select pesticides. **Toxicol. Sci.**, v. 60, n. 1, p. 38-43, 2001.
- TRAINA, M. E. et al. In vivo studies on possible adverse effects on reproduction of the fungicide methyl thiophanate. **J. Appl. Toxicol.**, v. 18, n. 4, p. 241–248, 1998.
- TSCHOPP, J.; SCRODER, K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 3, p. 210-215, 2010.
- TYAGI, S. et al. Neoplastic alterations induced in mammalian skin following mancozeb exposure using in vivo and in vitro models. **OMICS**, v. 15, n. 3, p. 155–167, 2011.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VAN MAELE-FABRY, G. et al. Review and meta-analysis of risk estimates for prostate cancer in pesticide manufacturing workers. **Cancer Causes Control**, v. 17, n. 4, p. 353-373, 2006.
- VOZAROVA, B. et al. Low plasma adiponectin concentrations do not predict weight gain in humans. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 2964-2967, 2002.
- WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W. et al. Colony-stimulating factor 1-dependent resident macrophages play a regulatory role in fighting *Escherichia coli* fecal peritonitis. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 5, p. 1577-1581, 1996.
- YU, G.C. et al. Carbendazim affects testicular development and spermatogenic function in rats. **Zhonghua Nan KeXue**, v. 15, n. 6, p. 505–510, 2009.

ANEXO A – NORMAS DE SUBMISSÃO PARA O PERIÓDICO

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements. For general guidance on the publication process at Taylor & Francis please visit our [Author Services website](#).

Please note that the *Journal of Environmental Science and Health, Part B* uses [CrossCheck™](#) software to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to the *Journal of Environmental Science and Health, Part B* you are agreeing to any necessary originality checks your paper may have to undergo during the peer review and production processes.

MANUSCRIPT PREPARATION

Formats

Journal contributors should model articles after the published articles in the journal to which they are submitting and may contact the Editor for additional information.

Word Processing

The preferred format for submitted manuscript is Microsoft Word for the PC. Submitting your manuscript in this format ensures it will be handled in the most efficient manner.

Please refer to the sections below titled [Math](#) and [Chemical Structures](#) for instructions on how to prepare manuscripts containing these elements.

Use one typeface and size, even for the title of your article and headings (12-point Times New Roman is good). For italicized text, use the *italic* font. Do not use formatting (bold, italic and underline) to indicate article title and headings. Emphasis may appear in these elements where appropriate (e.g., scientific names, etc.). Do not include any commands for page breaks or headers or footers. Do not use an automatic numbering function to create numbered lists since the numbers may be lost when translated to typesetting software.

Title of Your Article and Headings

Use the same typeface and size as your text. Do not boldface, underscore or italicize your article title or headings. Place them flush left (not centered or indented). Insert a double return (or double “Enter”) above and below all headings.

Title Style: Initial Capital Then Lowercase Letters for Each Main Word (chemical prefixes and elemental symbols may include lowercase letters)

First-Level Headings Style: ALL CAPITAL LETTERS

Second-Level: Initial Capital Then Lowercase Letters for Each Main Word

Third-level: Capital letter for the first word only; all lowercase letters thereafter

No Automatic Hyphenation or Justification

Let lines “wrap” from one to the next, inserting hard returns only at the ends of headings, paragraphs, entries in a numbered or bulleted list, and references. Use a hyphen only when it connects part of a word. Do not divide syllables at the end of a line.

Vertical Spacing

Your hard copy printout may be marked up, so please double-space throughout (including “References” and illustration legends) to make it easy to read the final, edited manuscript. Double-space by using the appropriate line spacing command, not by using two returns. To indicate a required line ending—such as at the end of a heading, paragraph, list entry, or references—use a double return (or double “Enter”); do not indent. Do not use any additional vertical space beyond this. Double returns separating elements will convert into the final space you will see in typeset pages.

Horizontal Spacing

Use only a single space after a period or other punctuation; do not use the old typewriter style of hitting the spacebar twice after a period. Do not indent; new paragraphs are to be indicated by a double return (or double “Enter”).

Numbers

Be careful not to type the letter “1” for the number one, or the letter “o” for the number zero.

Dashes

For a dash, use two hyphens—with no spacing before or after.

Symbols

If you use a symbol in one place, continue to do so throughout. Example: If you use the symbol for multiplication, do not use the letter later.

Math

Manuscripts containing significant amounts of mathematical equations should be prepared in TeX/LaTeX. Please submit your TeX or LaTeX files as either plain TeX or standard LaTeX2e languages with little or no customization.

Chemical Structures

Structures should be produced with a chemical drawing program, preferably ChemDraw 4.5 or higher, and submitted in TIFF or Word format to allow use of electronic files in production. Structures should also be submitted in native file formats, e.g., RDX.

INSTRUCTIONS FOR PREPARING REFERENCES

Compliance with reference format instructions will significantly reduce manuscript production time. We understand that some information, e.g., an issue number, may not be available. Please include as much of the specified information as possible. Note that there are different formats for periodicals, books, etc.; please follow the appropriate model for each type of reference. Typefaces, commas, semicolons, and periods will serve as identifiers to a computer program for parsing and adding XML tags to the references. Please cite references in the text by number only superscripted in bracket. At the end of the article, list the references in the order they appear in the text.

Example:

Kaufman et al.^[1] showed that 81% of the nearly 2600 participants had taken one medication in the past week and 25% had taken 5 or more medications. Much of the pharmaceutical dose used therapeutically is not completely degraded in the human body.^[2-3] Heberer^[4] showed

that indeed, many pharmaceuticals are excreted unchanged or as conjugates of metabolic transformation (e.g. gluconurides, sulfates). Note the reference number citation particularly at the end of sentence.

Recommended Format for Periodicals

Author, 1.; Author, 2.; ...Author, X. Title of article. Standard Journal Abbreviation or **Title Year**, *Volume* (issue), Inclusive Pagination.

Examples:

Pimentel, D. Insect population responses to environmental stress and pollutants. *Environmental Reviews* **1994**, 2 (1), 1-15.
 Brown, P.R.; Lundie-Jenkins, G. Non-target mortalities during aerial strychnine baiting of house mice. *Wildl. Res.* **1999**, 26 (1), 117-128.
 Hinesly, T.D.; Zeigler, E.L.; Barrette, G.L. Residual effects of irrigation corn with digested sewage sludge on soil. *Environ. Pollut.* **1979**, 20 (3), 215-230.

Recommended Formats for Books

Author, 1.; Author, 2.; ...Author, X. Chapter title. *Book Title*, Edition Number; Series Information (if any); Publisher: Place of Publication, Year; Volume Number, Inclusive Pagination.

Author, 1.; Author, 2.; ...Author, X. Chapter title. In *Book Title*, Edition Number; Editor, 1.,...Editor, X., Eds.; Series Information (if any); Publisher: Place of Publication, Year; Volume Number, Inclusive Pagination.

Examples:

Pimentel, D.; Kirby, C.; Shroff, A. The relationship between “cosmetic” standards for foods and pesticide use. In *The Pesticide Question: Environment, Economics, and Ethics*; Pimentel, D., Lehman, H., Eds.; Chapman and Hall: New York, 1993; 85-105.
 New, T.R. *Insects as predators*; New South Wales Univ. Press: Kensington, Australia, 1991; 178 pp.
 Bowersock, Terry L.; Park, Kinam. Vaccines and other immunological products. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 1st Ed.; Swarbrick, James, Boylan, James C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1997; Vol. 16, 115-151.

Recommended Formats for Works Presented at Meetings and Conferences

Author, 1.; Author, 2.; ...Author, X. Title of Presentation. In *Title of Collected Work*, Name of Meeting or Proceedings, Location of Meeting, Date of Meeting; Editor, 1.,...Editor, X., Eds.; Publisher: Place of Publication, Year; Abstract Number, Inclusive Pagination.

Examples:

Garrone, E.; Ugliengo, O. In *Structure and Reactivity of Surfaces*, Proceedings of the European Conference, Trieste, Italy, Sept 13-20, 1988; Zecchina, A., Costa, G., Morterra, C., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1988.

Prasad, A.; Jackson, P. Abstracts of Papers, Part 2, 212th National Meeting of the American Chemical Society, Orlando, FL, Aug 25-29, 1996; American Chemical Society: Washington, DC, 1996; PMSE 189.

Recommended Formats for Patents

Patent Owner, 1.; Patent Owner, 2.;...Patent Owner, X. Title of Patent. Patent Number, Date.

Example:

Berson, S.W. Conversion of Methane. US Patent 4,199,533, April 22, 1980.

Please note that Patent Owners are the names of the individuals authoring the patent. If the names are not available, please begin the citation with the title of the patent. You may include the name of the company holding the patent after the date.

Recommended Format for Government Publications

Author, 1.; Author, 2.; ...Author, X. Chapter Title. *Document Title*, Government Publication Number; Publishing Agency: Place of Publication, Year; Inclusive Pagination.

Example:

Hothem, R.L.; DeHaven, R.W.; Fairaizl, S.D. *Bird Damage to Sunflower in North Dakota, South Dakota, and Minnesota, 1979-1981*, Fish and Wildlife Technical Report 15; U.S. Department of the Interior Fish and Wildlife Service: Washington, DC, 1988; 1-11.

For Electronic Publications

Please include the URL and date accessed in the citation, e.g., www.dekker.com (accessed Oct 1999).

“In Press” Designation

- May be used in place of publication and pagination fields.

- Will need to update the field as soon as information becomes available. (Cannot link to an in press reference.)
- Style is *in press*.

Additional Information Field (e.g., supplementary materials)

- Designations or descriptions appear after the final field.
- Replace the period after final field with a semicolon.
- End additional information field with a period.
- There are no absolute formatting requirements for this field.

INSTRUCTIONS FOR PREPARING TABLES

Tables should be numbered with Arabic numbers in order of their mention in the text. Provide a brief title for each table typed directly above and the essential footnote below. Abbreviations should be defined in a footnote at the end of the table or as part of the Table caption. If any material in a table has been taken from a previously copyrighted publication, provide a credit line giving full credit to the original source.

- Please use Word (6.0 or newer) for the PC to format table(s).
- Please use a consistent typeface throughout the table body. Use Italic font when necessary (such as Latin terms) rather than using an underscore.
- Do not use an automatic numbering or bulleted-list function for table entries, as these numbers may become “lost” in translation during the processing of the files.
- Avoid the use of shaded areas and vertical rules within the table body.
- Limit the number of columns to fewer than 10. The use of many columns will most likely create readability problems.
- Avoid “straddle” column heads, i.e., those that span multiple columns. The simpler the table, the more likely it will be rendered accurately.

If graphics (such as structures and/or mathematics) will be included within the table, please include the graphics in separate electronic files, each piece with a separate file name, e.g., TBL1 CHEM1.

INSTRUCTIONS FOR SUPPLYING ILLUSTRATIONS

Illustrations

Illustrations submitted (line drawings, halftones, photos, photomicrographs, etc.) should be clean originals or digital files. Digital files are recommended for highest quality reproduction and should follow these guidelines:

- 300 dpi or higher
- sized to fit on journal page
- The preferred format is Microsoft Word.
- Do not type the figure caption below the diagram or as part of the diagram. At the bottom of the page name the Fig.No. e.g. Fig.1 etc.

Color Reproduction

Color art will be reproduced in color in the online publication at no additional cost to the author. Color illustrations will also be considered for print publication; however, the author will be required to bear the full cost involved in color art reproduction. Please note that color reprints can only be ordered if print reproduction costs are paid. Print Rates: \$900 for the first page of color; \$450 per page for the next three pages of color. A custom quote will be provided for articles with more than four pages of color. Art not supplied at a minimum of 300 dpi will not be considered for print.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Electronic Submission

Manuscripts should be submitted in electronic form directly to the Editor-in-Chief at the e-mail address shown below. Authors should prepare their articles as Microsoft (MS) Word for Windows or WordPerfect files. Electronic submissions should be sent as e-mail attachments. The body of the article should include title, authors' names, with their affiliations, abstract, keywords, introduction, materials and methods, results and discussion, acknowledgment, references, list of figure captions, figures, and tables. All diagrams should be saved in Microsoft WORD format with no captions. Please provide contact information and the e-mail address of the corresponding author as a footnote at the bottom of the first page.

In the cover letter (see below), the authors must attest that the research described in the manuscript is the original work of the author(s) that has not been previously published, in whole or in part, and that it is not under consideration by any other journal.

Manuscripts should be written in clear and grammatical English, double-spaced throughout and organized as follows: The first page should contain the article title, authors' names and complete affiliations, footnotes to the title, and the address for manuscript correspondence including e-mail address and telephone and fax numbers. The ABSTRACT must be a single paragraph that states the specific objective(s) of the study and summarizes the main findings of the paper. After the abstract a list of up to 10 Keywords that will be useful for indexing or searching should be included. The INTRODUCTION should be as concise as possible, without subheadings and explaining the rationale for the study and clearly states the purpose and significance of the research. MATERIALS AND METHODS should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced, followed by the RESULTS AND DISCUSSION section discussing the findings, providing explanations for data and comparing the results with those of others to support the general conclusion and to achieve the states objectives. Results and discussion may be combined or separated. A concise CONCLUSION should appear at the end of the text. ACKNOWLEDGMENTS should be brief and should precede the REFERENCES section, followed by the list of FIGURE CAPTIONS, figures (diagrams), and tables. Tables should be furnished with appropriate titles of one sentence; details or definitions should be placed at the bottom. Linear plots, unless absolutely essential, and other nonessential contents such as raw data, schematics of apparatus, and maps of study sites, should be placed in a supplementary section (Supporting Information) at the end of the paper. Authors must submit the entire manuscript including all items noted above in one WORD file.

Please e-mail your request to the Editor-in-Chief for an electronic copy of a “Sample Paper” for preparing the manuscript in the correct format and style. Please note that assistance is available for non-native English writers from several professional language editing companies to ensure the clarity and accuracy of the manuscript. A list is available from the editor on request.

Submit the electronic form of your paper to the Editor-in-Chief at skhan6@gmu.edu. If you have difficulty with your submission or any other question, please contact

Dr. Shahamat U. Khan

Department of Chemistry & Biochemistry, MSN 3E2

Planetary Hall, Room 301
George Mason University
4400 University Drive
Fairfax, Virginia 22030-4444, U.S.A.

E-mail: skhan6@gmu.edu

Phone: (703) 993-1072; Fax: (703) 993-1055

For a larger file use the following email address: editor.jesh@gmail.com. However, the authors must send a message at skhan6@gmu.edu indicating that they have submitted a paper for publication to the Gmail address. Include the title of the paper in the message.

Cover Letter:

A cover letter for the peer review process must be sent with the manuscript in a separate WORD file that should include the name, complete mailing address, institutional affiliation, and e-mail address of four (4) experts in the research area described in the paper who can serve as potential reviewers for the manuscript. The potential reviewers should not be from any of the authors' institutions. Please also provide a brief description of the experts' current area of research including a recent publication indicating that it is relevant to the research described in your manuscript. Please also make sure that the experts' e-mail addresses are currently active and correct. The cover letter must also provide a rationale for consideration of the paper by this journal and should also include the name and e-mail address of the corresponding author.

COMPLIMENTARY POLICY AND REPRINTS

Authors for whom we receive a valid email address will be provided an opportunity to purchase reprints of individual articles, or copies of the complete print issue. These authors will also be given complimentary access to their final article on *Taylor & Francis Online*.

COPYRIGHT

It is a condition of publication that authors vest or license copyright in their articles, including abstracts, in Taylor & Francis LLC. This enables us to ensure full copyright protection and to disseminate the article, and the Journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the material elsewhere after

publication providing that prior permission is obtained from Taylor & Francis LLC. Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyrighted material from other sources.