

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação *in vitro* da hepatotoxicidade da mistura de agrotóxicos utilizados em cultivo de soja no Rio Grande do Sul

FERNANDA MOCELLIN CONTE

PORTO ALEGRE, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação *in vitro* da hepatotoxicidade de mistura de agrotóxicos utilizada em cultivo de soja no Rio Grande do Sul

Dissertação apresentada por **Fernanda Mocellin Conte** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo

Porto Alegre, 2020

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e aprovada em 27.05.2020 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Gabriela Göethel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Prof. Dr. José Roberto Santin

Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI).

Profa. Dra. Luciana Grazziotin Rossato Grando

Universidade de Passo Fundo (UPF).

CIP - Catalogação na Publicação

Mocellin Conte, Fernanda
Avaliação in vitro da hepatotoxicidade da mistura de agrotóxicos utilizados em cultivo de soja no Rio Grande do Sul / Fernanda Mocellin Conte. -- 2020.
98 f.
Orientador: Marcelo Dutra Arbo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Agrotóxicos. 2. Hepatotoxicidade. 3. Cultura de células. 4. Sinergismo. 5. Toxicologia. I. Dutra Arbo, Marcelo, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo, na sala de cultura celular do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelas oportunidades que tive durante a minha vida, por ter colocado no meu caminho pessoas muito especiais e pela saúde de poder realizar o meu trabalho todos os dias.

A minha mãe e a minha irmã por todo auxílio durante este período, paciência, incentivo e amor durante todos os dias de toda a minha vida. Agradeço por cuidarem das minhas coisas, cuidarem da Meg e não medirem esforços para eu chegasse até aqui. Faço tudo na minha vida pensando nelas e não consigo agradecer todo amor que recebo.

Agradeço ao professor Marcelo pela oportunidade de realizar o trabalho, pela paciência, pelos ensinamentos e pela compreensão durante este período. Agradeço pela orientação e por ele ser essa pessoa a quem sempre nos espelhamos e de quem temos muito orgulho. Sempre fiz e farei o melhor que posso para realizarmos um bom trabalho.

As minhas colegas de laboratório pela companhia, principalmente a Larissa e a Yasmin por toda a ajuda que recebi neste período, por me ensinarem a realizar o trabalho com as células e pela amizade.

A minha amiga Su por ter me incentivado a realizar este trabalho e me acolher nos dias que precisei. A minha colega de trabalho Taline pela amizade, pela companhia e por sempre me ajudar principalmente nos dias que eu ia direto da UFRGS para o hospital.

Aos meus amigos e colegas do Pronto Socorro Nossa Senhora Aparecida – Camaquã, por dividirem comigo as madrugadas durante estes dois anos, pelo companheirismo e pela amizade. Por serem pessoas em quem eu me espelho e por não medirem esforços para cuidar dos pacientes. Levo para minha vida toda.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade da realização deste trabalho.

RESUMO

O consumo de agrotóxicos tem um crescimento acentuado, principalmente no Brasil através da monocultura de soja transgênica. Este modelo de produção gera situações de risco, acidentes naturais ampliados e complexos através da utilização combinada de agrotóxicos durante o cultivo. O fígado, órgão responsável por metabolizar estas substâncias, pode ser altamente susceptível. Desse modo, este trabalho visou avaliar, através de um modelo *in vitro*, os efeitos tóxicos do uso individual e combinado de glifosato, fipronil e imidacloprido. As células de hepatoblastoma humano HepG2 foram cultivadas em meio DMEM e incubadas a 37°C em 5% de CO₂. A citotoxicidade individual dos agrotóxicos foi avaliada através dos ensaios de redução do MTT e captação do vermelho neutro. Com base na citotoxicidade individual de cada agrotóxico, os efeitos da mistura foram previstos utilizando os modelos matemáticos de adição da concentração (AC) e ação independente (AI). Foram avaliadas experimentalmente duas misturas, a Mix A, composta pelos agrotóxicos em concentrações equipotentes, que provocam 50% do efeito máximo de cada agrotóxico (EC₅₀) e, a Mix B, composto por concentrações equivalentes aos níveis de ingesta diária aceitável (IDA). Adicionalmente, os agrotóxicos isolados e em mistura foram avaliados quanto à produção de radicais livres, potencial de membrana mitocondrial, dano ao DNA e liberação das enzimas hepáticas utilizando concentrações equivalentes ao EC₂₅, EC₅₀ e EC₇₅. Os valores de EC₅₀ obtidos para fipronil, glifosato e imidacloprido foram 37,59; 41,13; e 663.66 mg/l, respectivamente. Para as misturas, foi observado um efeito sinérgico, ou seja, maior que o esperado pelas previsões. Os agrotóxicos isolados e as misturas não produziram aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nem dano ao DNA. Entretanto, foi observada uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial das células HepG2 e um aumento da liberação de transaminases e FAL para o meio extracelular, indicando despolarização e dano celular, respectivamente. Com este trabalho, foi possível observar um aumento da toxicidade quando os agrotóxicos estão em mistura, mostrando a necessidade da avaliação combinada dos efeitos destes compostos.

Palavras-chave: agrotóxicos; células HepG2; avaliação de misturas; hepatotoxicidade *in vitro*; riscos a saúde humana.

ABSTRACT

The consumption of pesticides has grown sharply, mainly in Brazil, through the transgenic soy monoculture. This production model generates risk situations and extended and complex natural accidents, through the combined use of pesticides during cultivation. The liver is the main organ responsible for the biotransformation of these substances, being highly susceptible to their effects. Therefore, this work aimed to evaluate, through an *in vitro* model, the toxic effects of individual and combined use of glyphosate, fipronil and imidacloprid. HepG2 human hepatoblastoma cells were cultured in DMEM medium and incubated at 37 ° C in 5% CO₂. The individual cytotoxicity of pesticides was evaluated through MTT reduction and neutral red uptake assays. Based on the individual cytotoxicity of each pesticide, the effects of the mixture were predicted using the mathematical models of concentration addition (CA) and independent action (IA). Two mixtures were experimentally evaluated, Mix A, formed by the pesticides at equipotent concentrations, which cause 50% of the maximum effect of each pesticide (EC₅₀), and Mix B, formed by concentrations equivalent to the levels of acceptable daily intake (ADI). In addition, the pesticides alone and in mixture were evaluated for free radical production, mitochondrial membrane potential, DNA damage and liver enzyme release using concentrations equivalent to EC₂₅, EC₅₀ and EC₇₅. The EC₅₀ values obtained for fipronil, glyphosate and imidacloprid were 37.59; 41.13; and 663.66 mg/l, respectively. For mixtures, a synergism was observed, characterized by an effect greater than the expected by the previsions. The isolated pesticides and mixtures did not increase reactive oxygen and nitrogen species or damage DNA. However, a decrease in the mitochondrial membrane potential of HepG2 cells and an increase in the release of transaminases and ALP into the extracellular medium were observed, indicating depolarization and cell damage, respectively. With this work, it was possible to observe an increase in toxicity when the pesticides are mixed, showing the need for a combined evaluation of the effects of these compounds.

Keywords: pesticides; HepG2 cells; mixtures; *in vitro* hepatotoxicity; risks to human health.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada na forma de encarte de publicação submetida e dividida em seções da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Estado da Arte, Artigo científico submetido presente no Capítulo I, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas.

A Introdução apresenta o embasamento teórico que nos levou ao desenvolvimento desta proposta de trabalho. Os Materiais, Métodos, Resultados e as Referências específicas encontram-se no corpo do manuscrito, denominado Capítulo I.

A seção Discussão contém uma interpretação geral dos resultados obtidos. A seção Conclusões aborda as conclusões gerais dos principais resultados da dissertação.

A seção Referências Bibliográficas lista a bibliografia utilizada nas seções Introdução e Discussão da dissertação.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
OBJETIVOS	21
1. Objetivo geral.....	23
2. Objetivos Específicos	23
ESTADO DA ARTE	25
1.1 Cultivo de soja.....	27
1.2 Impactos do uso de agrotóxicos na saúde humana.....	28
1.3 Glifosato.....	29
1.4 Fipronil.....	32
1.5 Imidacloprido.....	35
1.6 Avaliação da toxicidade das misturas.....	39
CAPÍTULO I: ARTIGO	41
Synergistic toxicity of the pesticides fipronil, glyphosate and imidacloprid, applied in soybeans cultivation, in HepG2 cells.	
DISCUSSÃO	75
CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

INTRODUÇÃO

A prática da agricultura é muito desenvolvida no Brasil, atuando como uma fonte de alimento, de trabalho e principalmente na economia local com comercialização e exportação dos produtos agrícolas. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de *commodities* agrícolas e é o segundo país que mais exporta estes produtos, destacando-se principalmente a soja. Devido a este fato, observamos um aumento do consumo de insumos agrícolas, onde em 2015 no Brasil, foram consumidos em média 570.060.129,90 litros de agrotóxicos (PIGNATI et al., 2017). Entre 2000 e 2012, o aumento do uso destes químicos foi mais que o dobro por unidade de área, sendo este um fato preocupante pelos impactos do uso excessivo de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana (ALMEIDA et al., 2017).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nos últimos dez anos o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93% enquanto o mercado brasileiro cresceu 190%. Esse consumo elevado de agrotóxicos é consequência da necessidade de produção de alimentos, devido à extensa área do nosso país e de sua grande população, assim como as condições climáticas, os hábitos de cultivo e o aumento no cultivo de transgênicos (CARNEIRO et al., 2010). A soja é a principal oleaginosa produzida no Brasil, e nesta monocultura o cultivo de soja transgênica é um dos fatores que mais implica na utilização de agrotóxico, pois este grão foi modificado geneticamente para suportar uma quantidade maior, principalmente de herbicidas.

A ampla utilização dos agrotóxicos pode implicar em utilização excessiva nas plantações (mais do que a necessária), além de erros em diluições facilitando a contaminação de solos e águas. Este fato pode colaborar para um efeito cumulativo destes agrotóxicos no organismo humano que já está exposto aos agrotóxicos através da ingestão de alimentos oriundos da agricultura. Além de acumular-se no meio ambiente onde contaminam águas e solo, prejudicando as espécies que nele vivem. Atualmente existem aproximadamente 1.400 formulações de agrotóxicos registradas no Brasil e, das 50 mais utilizadas 22 foram proibidas pela União Européia (CARNEIRO, et al., 2015).

Os efeitos à saúde humana estão sendo amplamente estudados, pois além da toxicidade aguda, que ocorre logo após a exposição aos agrotóxicos, podem ser

encontrados outros efeitos em longo prazo no organismo humano. Estes efeitos podem incluir mutações no DNA, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, problemas renais, alterações endócrinas, depressão e desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (AGOSTINI et al., 2020).

Para os humanos não expostos pela prática da agricultura a exposição depende do tempo e da quantidade de agrotóxico aplicado nos insumos. Para analisar estes efeitos utilizam-se modelos de estudo, como o modelo *in vitro* utilizando células saudáveis e células tumorais, modelos com ratos e com peixe-zebra. Estes estudos são necessários para avaliar o efeito crônico de pequenas concentrações de agrotóxicos, como as permitidas pela ANVISA que incluem a ingestão diária aceitável (IDA) e, o nível de exposição ocupacional (OEL).

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar, através de modelo *in vitro*, os efeitos tóxicos do uso individual e combinado de glifosato, fipronil e imidacloprido.

2. Objetivos Específicos:

- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos agrotóxicos glifosato, fipronil e imidacloprido, isoladamente e em mistura, nas células de hepatoblastoma humano HepG2.
- ✓ Avaliar a produção de radicais livres induzido pelos agrotóxicos glifosato, fipronil e imidacloprido, isolados e em mistura.
- ✓ Investigar os efeitos dos agrotóxicos glifosato, fipronil e imidacloprido, isolados e em mistura, sobre o potencial de membrana mitocondrial.
- ✓ Avaliar o dano ao DNA induzido pelos agrotóxicos glifosato, fipronil e imidacloprido, isolados e em misturas.
- ✓ Investigar danos citotóxicos induzidos pelos agrotóxicos glifosato, fipronil e imidacloprido, isolados e em misturas através das enzimas hepáticas AST, ALT, FAL e LDH.
- ✓ Avaliar o possível efeito sinérgico, aditivo ou antagônico da mistura de glifosato, fipronil e imidacloprido.

ESTADO DA ARTE

1.1 Cultivo de soja

A soja *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae) é a principal oleaginosa cultivada no mundo, faz parte do conjunto de atividades agrícolas com maior destaque no mercado mundial e destaca-se pelo crescimento acentuado na produção agrícola. O aumento desse cultivo deve-se a diversos fatores, entre eles a soja apresenta grande quantidade de proteínas de excelente qualidade; possui considerável teor de óleo; é uma *commodite* com padronização e uniformidade; e, devido ao crescimento de sua demanda nos últimos anos, aumentou o desenvolvimento de tecnologias para cultivo e produtividade (ALMEIDA et al., 2017).

No final da década de 60 o plantio da soja começou a ser introduzido no Brasil, neste período o que mais se produzia no país era o trigo. O teor de óleo e proteína do grão da soja despertou o interesse das indústrias mundiais, fazendo o Brasil enxergar a soja como um produto comercial. Com a explosão de preço da soja no mercado mundial na década de 70, o Brasil começou a investir em tecnologias de plantio da soja e assim o grão pode ser plantado com sucesso em regiões de baixas latitudes (EMBRAPA, 2016).

O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo e também está entre um dos maiores exportadores de soja mundial e muito tem se investido no aperfeiçoamento da produção. Apesar de alguns fatores diminuírem as vantagens do Brasil na produção de soja, como a logística de transporte, problemas de escoamento e deficiências na capacidade de armazenamento, no contexto mundial o Brasil apresenta vantagens territoriais, climáticas e tecnológicas no processo de cultivo da soja (PIGNATI et al., 2017). Em 2019, no Brasil foram produzidas 114,843 milhões de toneladas de soja em uma área de 35,822 milhões de hectares.

O Rio Grande do Sul tem sido um dos maiores produtores e exportadores de soja no Brasil, ocupou o segundo lugar na produção de soja no ano de 2019 ficando atrás somente do estado de Mato Grosso. O Rio Grande do Sul produziu 19,187 milhões de toneladas de soja, sendo o município de Tupanciretã o maior produtor estadual, com cerca de 500 toneladas de soja em 2017, enquanto o município de Ijuí teve o maior número de estabelecimentos produtores de soja, sendo eles 1235 (EMBRAPA, 2019).

O cultivo de soja demanda um uso extenso de diferentes classes de agrotóxicos, principalmente com o cultivo da soja transgênica. Os produtos transgênicos são modificados geneticamente para receberem uma quantidade maior de agrotóxico, principalmente o glifosato, sem afetar o produto cultivado, conseqüentemente a comercialização e o consumo de agrotóxicos aumentam. O plantio para comercialização dos produtos transgênicos está autorizado no Brasil desde 1998. Alguns dos objetivos deste cultivo são aumentar a produtividade, melhorar a resistência a pragas e aos agrotóxicos, o tempo de estocagem e a duração do produto. Dentre as classes de agrotóxicos mais aplicados na cultura de soja três foram selecionados, com base na maior frequência de uso, para os estudos do presente trabalho, sendo eles glifosato, fipronil e imidacloprido.

1.2 Impactos do uso de agrotóxicos na saúde humana

No Brasil, o uso de agrotóxicos é considerado importante devido ao modelo de agricultura utilizado no país. Em consequência disso, o país é considerado um dos maiores consumidores de agrotóxicos desde 2008. Com um crescimento acentuado nas vendas e na utilização, estima-se que o consumo anual de agrotóxicos supere um milhão de litro. Esta prática, entretanto aumenta a probabilidade de impactos negativos em organismos não alvo, como organismos aquáticos, plantas e mamíferos. Um único evento de chuva pode levar a perdas de até 2% da dose de agrotóxico aplicada e estes resíduos podem atingir o meio ambiente e serem responsáveis por efeitos adversos (SIGRH, 2005).

O ser humano é exposto aos agrotóxicos por diferentes meios, seja através do consumo de alimentos, através da ingestão de águas contaminadas, ambientalmente durante a pulverização dos agrotóxicos e, ocupacionalmente pela aplicação dos produtos na agricultura. Por isso, o impacto do uso extensivo de agrotóxicos na saúde humana vem sendo muito estudado e diversos estudos já comprovam os malefícios para a saúde humana. Os efeitos da exposição podem incluir náuseas e dor de estômago, dores de cabeça, gastrite, depressão e ansiedade (CARGNIN et al., 2017). Já foram observados danos nos mecanismos de defesa celular, alteração nas atividades dos telômeros e danos ao DNA (KAHL et al., 2016). Além disso, agricultores expostos aos agrotóxicos têm mais chances de

cometer suicídio (KRAWCZYK et al., 2014; KIM et al., 2017).

As alterações causadas pelos agrotóxicos podem estar associadas ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Bocooline et al., 2016, estudaram a relação de indivíduos expostos e a mortalidade por linfoma não-Hodking (NHL) e, encontraram relações positivas entre a mortalidade por NHL no grupo exposto aos agrotóxicos. Outros estudos relatam a associação da exposição aos agrotóxicos com o aumento dos casos de melanoma cutâneo (FORTES et al., 2016).

Sendo o fígado o órgão mais complexo e versátil do mamífero, desempenhando funções metabólicas únicas, ele torna-se o órgão alvo de substâncias tóxicas, como os agrotóxicos, causando lesões e perda de função hepática importante aos mamíferos (MAHAJAN et al., 2018). Entretanto, além de afetar a função hepática estudos evidenciam que outros órgãos são afetados pela exposição aos agrotóxicos. Mossa et al., 2015, avaliaram a exposição sub-crônica ao fipronil em ratos machos albinos e evidenciaram lesão hepática e renal. Em um estudo realizado por Hao et al., 2019, a exposição ao glifosato causou uma forte toxicidade as células humanas A549, sugerindo um risco de toxicidade pulmonar e, neste mesmo estudo, os efeitos de neurotoxicidade também foram evidenciados na linhagem celular SH-SY5Y (HAO et al., 2019).

1.3 Glifosato

Sendo o ingrediente ativo do Roundup®, o glifosato [N-(fosfometil) glicina] é o herbicida sintético mais utilizado na agricultura latino-americana, principalmente em culturas de soja transgênica (LAJMANOVICH et al., 2019). A exposição ambiental do glifosato é intensa e os seres vivos vêm sendo afetados por esta exposição há muitas décadas. O glifosato, assim como os seus metabólitos, pode ser encontrado no solo, no ar, nas águas superficiais e águas subterrâneas, e também nos produtos alimentares derivados e não derivados da soja e, nos humanos. Esta contaminação ocorre devido à utilização excessiva deste produto, assim, a exposição atinge também organismos não alvos (MESNAGE et al., 2017).

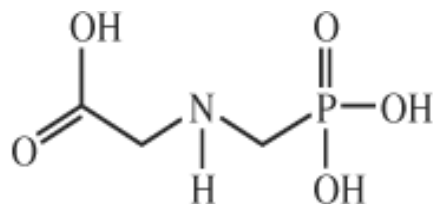


Figura 1: fórmula estrutural do glifosato (adaptado de ANVISA).

A produção de herbicidas à base de glifosato, como o Roundup®, vem sendo desenvolvida desde 1974 e nestes compostos o glifosato está presente como uma isopropilamina, sódio ou sal de amônio, em concentrações que são solúveis em água (SZÉKÁCS e DARVAS, 2012; WILLIAMS et al., 2016). Também podem ser adicionados outros produtos como surfactantes (adjuvantes) com o objetivo de facilitar a absorção do herbicida pelas plantas (KWIATKOWSKA et al., 2016). O consumo deste agrotóxico teve um aumento de mais de 250% em 40 anos, podendo chegar a um milhão de toneladas utilizadas globalmente (LANDRIGAN e BELPOGGI, 2018). Em 2017, segundo a ANVISA, foram comercializadas 175 toneladas de glifosato, sendo o ingrediente ativo mais utilizado no Brasil.

Por ser um herbicida sistêmico de amplo espectro e não seletivo para ervas daninha, ele atua inibindo e competindo com a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), causando uma escassez de aminoácidos aromáticos, dificultando o crescimento de certas plantas. Atualmente ele atua como herbicida contra mais de 100 espécies de plantas daninhas e mais de 60 espécies de ervas daninhas perenes (DILL et al., 2010). Além do uso agrícola, o glifosato também tem aplicações em uso residencial e industrial, como o controle de plantas em estradas e em linhas de rede elétrica.

A soja transgênica sofreu modificação genética para que o grão pudesse suportar uma quantidade muito grande de glifosato, assim este herbicida é utilizado principalmente na cultura de soja e pode ser aplicado como único herbicida na plantação (LANDRIGAN e BELPOGGI, 2018), entretanto, como consequência, os resíduos apresentados pelos herbicidas no cultivo de soja transgênica são maiores do que os resíduos apresentados no cultivo da soja convencional. Em 2018, a ANVISA realizou uma revisão da Ingestão Diária Aceitável (IDA), tendo como base para o cálculo o NOAEL — *No Observed Adverse Effect Level* — que é de 50

mg/kg/dia. Atualmente, a IDA do glifosato é de 0,5 mg/kg/dia.

Os principais produtos da degradação do glifosato são o ácido aminometilfosfônico (AMPA) e o dióxido de carbono (CO₂). Nos mamíferos, o glifosato não é totalmente metabolizado, podendo ser excretado inalterado na urina, entretanto em humanos já foram encontrados níveis elevados de AMPA no sangue após intoxicação fatal, porém, o herbicida pode ter sido metabolizado por bactérias da microbiota intestinal (MOTOJYUKU et al. 2008).

Vários estudos determinaram a meia vida do glifosato no ambiente, entretanto este período pode variar de alguns dias a semanas e, em alguns casos, a meia vida pode ser superior a 60 dias. Essa variação tem como característica as condições locais onde o herbicida foi aplicado, podendo existir fatores químicos, físicos e biológicos que modifiquem a dissipação do produto (MYERS et al., 2016).

Sua ampla utilização nas últimas quatro décadas deve-se ao pressuposto de que os efeitos colaterais sobre a saúde humana eram mínimos. Porém, a preocupação com esta grande utilização vem aumentando, direcionada ao potencial amplo de efeitos diretos e indiretos na saúde da população. Geralmente, o glifosato é considerado um herbicida toxicologicamente e ambientalmente seguro e eficaz, e estava sendo classificado como praticamente não tóxico (Classe IV). Entretanto, desde 2015 a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) já o descrevia como provável carcinogênico para humanos, o que levou a reclassificação do glifosato pela Organização Mundial da Saúde em 2018, após a IARC confirmar o risco de exposição ao glifosato, embora os efeitos agudos em humanos sejam baixos, existe a possibilidade de este herbicida causar efeitos a saúde associado ao acúmulo de pequenas doses (VAN BRUGGEN et al., 2018). Assim, as incertezas e a preocupação sobre a utilização do produto continuam e os níveis de segurança para consumo e os efeitos carcinogênicos para os seres humanos continuam a serem estudados.

O primeiro estudo a avaliar os efeitos do glifosato em humanos foi realizado em 1980 e foi observado um aumento significativo no índice de trocas de cromátides irmãs em linfócitos, no entanto as concentrações utilizadas do herbicida eram muito altas (VIGFUSSON e VYSE, 1980). A partir disso, muitos estudos utilizando linfócitos foram desenvolvidos buscando alterações no DNA e alguns efeitos foram

encontrados, como: alterações cromossômicas, aumento na frequência de micronúcleos e aumento no índice mitótico. Entretanto estes efeitos só foram evidenciados em doses altas de glifosato, pressupondo inicialmente que a dose de exposição diária aceitável não causaria danos ao DNA, assim o efeito genotóxico estaria dependendo da dose e da magnitude da exposição (ALVAREZ MOYA et al., 2014; MAÑAS et al., 2009).

Na linhagem celular de queratinócitos HaCaT, o glifosato causou depleção de GSH, depleção enzimática (catalase, glutathiona peroxidase e distúrbios da superóxido dismutase), reduzindo a capacidade de defesa antioxidante e aumentando a peroxidação lipídica. Como consequência, houve enrijecimento da membrana celular, alterações no citoesqueleto, indução de necrose e apoptose. Outros desequilíbrios celulares também são observados, entre eles a redução de Ca^{2+} , gerando um aumento das espécies reativas de oxigênio, que por sua vez facilitam a regulação negativa das vias de sinalização apoptótica mitocondrial (GEORGE e SHUKLA, 2013; HEU et al., 2012).

1.4 Fipronil

O fipronil [5-amino-1-(2,6-dicloro-4-(trifluorometilfenil)-4-(trifluorometilsulfinil)pirazol-3-carbonitrila)] é um inseticida derivado quimicamente da família dos fenilpirazólicos, desenvolvido pela empresa francesa Rhone-Poulenc Agro (agora Bayer CropScience) desde 1985, chegando ao mercado em 1993 com o princípio de um potente inseticida. É considerado um inseticida de segunda geração, altamente ativo, de amplo espectro, além de ser considerado mais eficaz que os organofosforados, carbamatos e piretróides contra várias espécies (HAINZL e CASIDA, 1996).

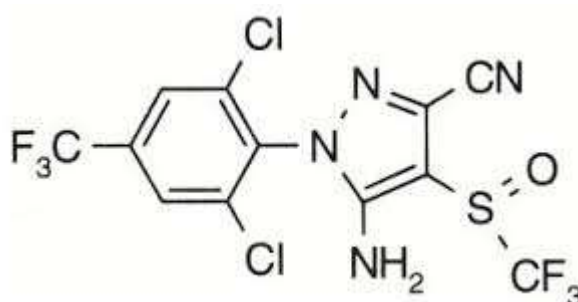


Figura 2: fórmula estrutural do fipronil (adaptado de ANVISA).

Frente a grande resistência das pragas das lavouras, o fipronil apresentava atributos que quebravam essa resistência, como menor eficiência de ligação aos receptores dos vertebrados em comparação aos de invertebrados, indicando toxicidade seletiva para artrópodes, alta persistência, natureza sistêmica, versatilidade na aplicação (especialmente como tratamento de sementes), baixa solubilidade em água e supostos impactos menores em peixes e outros vertebrados (SIMON-DELSO et al., 2014). Porém, os efeitos negativos do uso desse inseticida estão aparecendo em organismos não alvos. Através da pulverização ele eventualmente flui para águas superficiais, podendo afetar mais o ambiente aquático e chegando até os humanos por este meio. Estudos já detectaram o fipronil em ambientes aquáticos no Texas (EUA) em valores que excedem os níveis ambientais permitidos e concluíram que a sobrevivência de camarões diminuiu rapidamente durante a primeira semana de exposição (AL-BADRAN et al., 2019). Outro estudo realizado com peixes-zebra expostos ao fipronil mostrou que o metabolismo fosfolipídico foi afetado pela exposição ao inseticida (LIU et al., 2020).

Sua ação inseticida ocorre pela inibição dos canais de cloreto do receptor $GABA_A$ ativados por glutamato (receptor ionotrópico), causando depressão no sistema nervoso central do inseto e morte (SAYED et al., 2019). Assim, o fipronil impede a absorção intracelular de íons cloreto, resultando em excesso de estimulação neuronal. A afinidade de ligação do fipronil para as subunidades do receptor $GABA_A$ é diferenciada e, este mecanismo de toxicidade está descrito na literatura com maior afinidade pelo sistema nervoso central dos insetos do que dos mamíferos (KARTHEEK e DAVID, 2018). O fipronil também impede os sistemas enzimáticos metabólicos que contém grupos sulfidril e desacoplamento da fosforilação oxidativa no complexo mitocondrial, o que resulta em hipóxia de órgãos vitais e morte, com aumento da produção de radicais livres (MOSSA et al., 2015). Em condições normais de uso são considerados tóxicos no fipronil: o composto original, o seu principal metabólito sulfona e, o seu fotoproduto desulfenil. A sulfona é tóxica para aves e invertebrados e, é nove vezes mais potente que o fipronil na ação bloqueadora no cérebro de camundongos. O desulfenil mesmo não sendo um metabólito é o principal fotoproduto em plantas e solos, sendo mais tóxico que o fipronil para ratos (HAINZL et al., 1998).

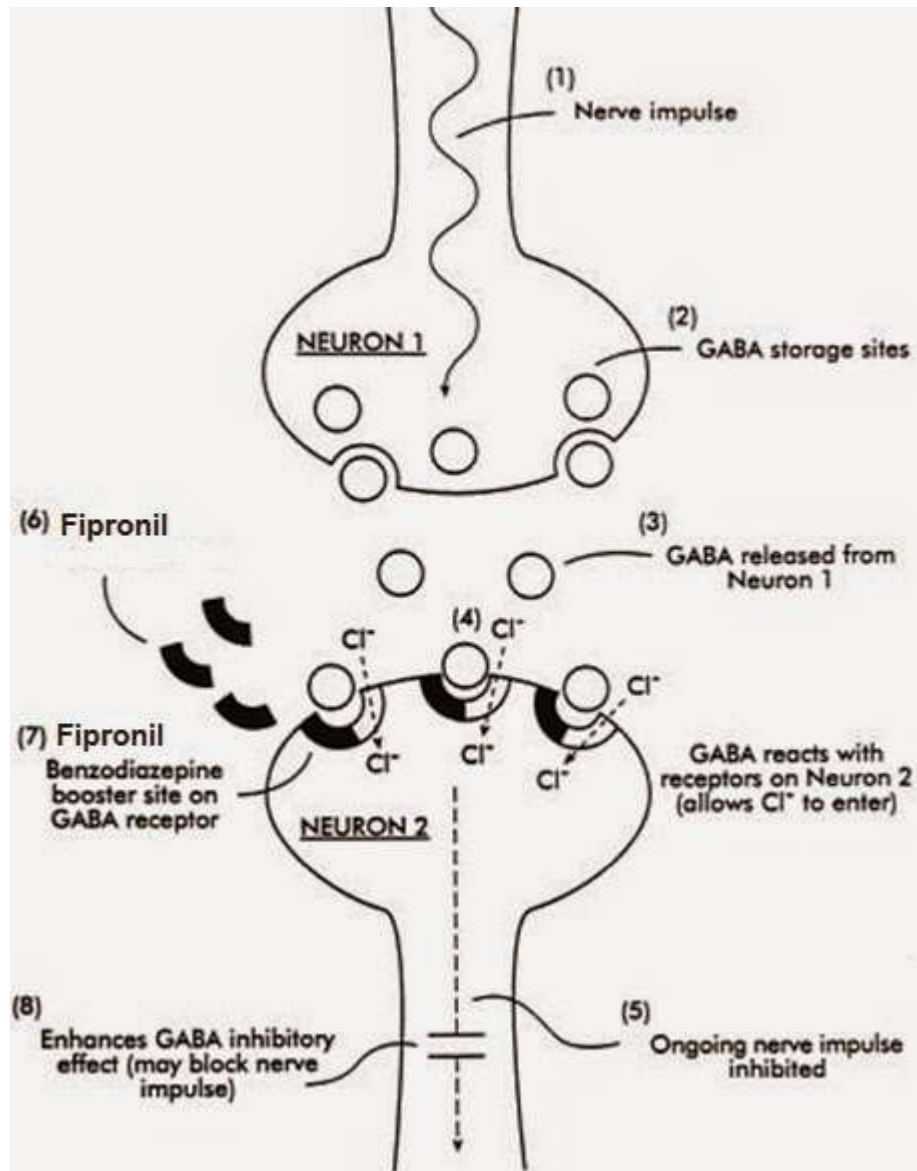


Figura 3: Diagrama de uma sinapse no nervo colinérgico destacando o mecanismo de ação do fipronil (fonte: MATIAS, 2020).

Assim, o fipronil foi reconhecido como de baixa toxicidade, entretanto estudos já descrevem efeitos adversos do fipronil em sítios não neuronais como o fígado, sendo ele metabolizado em fipronil sulfona por enzimas do complexo citocromo P-450 (MEDEIROS et al., 2015). Kartheek e David (2018) avaliaram a função hepática de ratos Wistar machos com oito semanas, que receberam durante 90 dias doses de fipronil, apresentando toxicidade hepática durante o período do estudo. Em outro estudo realizado em ratos albinos machos, a exposição ao fipronil causou aumento das aminotransferases (AST, ALT), aumento da fosfatase alcalina (ALP) e da desidrogenase láctica (LDH), indicando lesão hepática e, a exposição

também aumentou significativamente os níveis séricos de ácido úrico, creatinina e proteínas totais, indicando também um comprometimento da função renal dos animais estudados (MOSSA et al., 2015).

O fipronil também tem sido relacionado com efeitos na desregulação da tireoide (LEQHAIT et al., 2009) e na função reprodutiva (KHAN et al., 2015). O inseticida também está associado com o aparecimento de micronúcleos (OLIVEIRA et al., 2012), e danos ao DNA de forma dose-dependente em linfócitos humanos (CELIK et al., 2014). Dentro da mitocôndria, o fipronil interfere na síntese de ATP aumentando o fluxo de cálcio e diminuindo o potencial de membrana mitocondrial (TAVARES et al., 2015).

Desde 2013, a União Européia e a China impõem fortes restrições ao uso deste inseticida, entretanto sua utilização continua extensa no controle de pragas estruturais e paisagísticas, levando a contaminação de solos e de águas (XU et al., 2018). No Brasil, segundo dados da ANVISA (2019), não existem intervalos de segurança e de doses determinados para aplicação deste inseticida, podendo estes ser variados conforme o tipo de cultura agrícola. Além do uso agrícola, este inseticida também é utilizado como produto domissanitário, mesmo tendo classificação II – produto altamente tóxico e, sua ingestão diária aceitável (IDA) é 0,0002 mg/kg/dia (ANVISA 2019).

1.5 Imidacloprido

Os inseticidas neonicotinóides estão entre os mais utilizados no mundo e foram desenvolvidos na década de 1980 para substituir os organofosforados, carbamatos e piretróides que se tornaram resistentes a algumas espécies (GOULSON, 2013). O termo neonicotinóides foi criado por Izuru Yamamoto para designar compostos estruturalmente semelhantes à nicotina (JESCHKE e NAUEN, 2008), atualmente, é a classe de inseticida mais vendida no mundo (ANDERSON et al., 2015).

Devido ao seu caráter sistêmico e sua alta eficiência no controle de insetos, o crescimento dos neonicotinóides no mercado foi rápido e acentuado, sendo atualmente registrado e aprovado em 120 países (JESCHKE et al., 2011). Em comparação com os antigos inseticidas, os neonicotinóides estão sendo

amplamente preferido para o controle de insetos, isto se deve à suas propriedades químicas e biológicas únicas, que incluem principalmente eficiência e versatilidade na aplicação, atividade inseticida de amplo espectro, toxicidade seletiva para artrópodes, alta solubilidade em água e persistência no organismo, além de excelente absorção e translocação nas plantas (são absorvidos pelas raízes ou folhas e translocados por toda a planta) (UNEME, 2011; SIMON-DELSO et al., 2015; ŞENYILDIZ et al., 2018).

O mecanismo de ação dos neonicotinóides interfere no sistema nervoso central e periférico dos insetos, na neurotransmissão pós-sináptica mais especificadamente, induzindo contínua excitação das membranas neurais e, causando efeitos como paralisia, exaustão celular e morte. Estes agrotóxicos são agonistas dos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) imitando a acetilcolina (ACh) no neurônio dos insetos. Na transmissão do impulso, após a excitação, a acetilcolina retorna para o interior do neurônio através da acetilcolinesterase (AChE), assim a célula nervosa volta ao estado de repouso até ser excitada novamente. Na ação deste agrotóxico, a acetilcolinesterase não consegue degradar as moléculas neonicotinóides, assim é como se a acetilcolina estivesse sempre ativa causando constante estimulação do neurônio, podendo causar diminuição da atividade da acetilcolinesterase (AZEVEDO-PEREIRA et al., 2011; ANDERSON et al., 2015; GIBBONS et al., 2015; SIMON-DELSO et al., 2015).

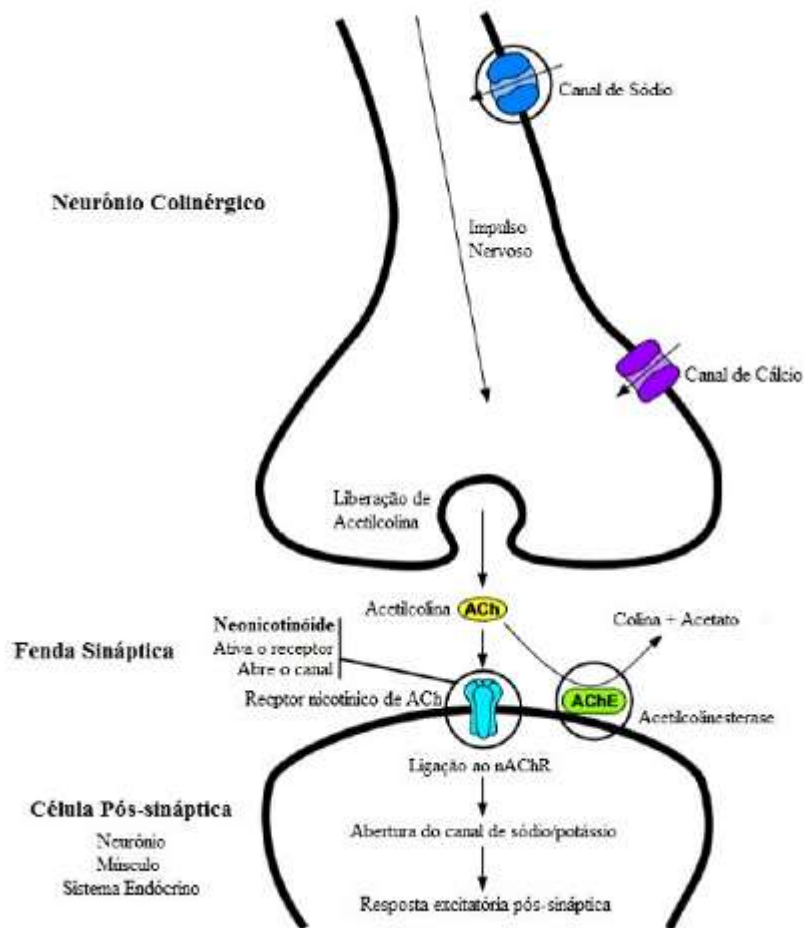


Figura 4: Diagrama de uma sinapse no nervo colinérgico destacando o mecanismo de ação dos neonicotinóides (adaptado de Amiard-Triquet, et al., 2015).

O imidacloprido (1-(6-cloro-3-piridinilmetil)-N-nitroimidazolidim-2-ilideneamino) foi lançado pela Bayer CropScience na década de 1990, sendo o primeiro produto da classe a ser comercializado. Atualmente é o neonicotinóide mais consumido, respondendo por aproximadamente 41,5% de todo mercado de neonicotinóides, sendo considerado o inseticida mais vendido no mundo (JESCHKE et al., 2011). É classificado pela ANVISA como um produto mediamente tóxico (classe III, ANVISA, 2019) e devido a sua maior toxicidade por abelhas e em organismos não alvo, passou por uma reavaliação do IBAMA e está permitida sua pulverização somente em algumas culturas como a de soja (BÚRIGO et al., 2015), no entanto a ANVISA ainda permite a utilização como domissanitário, com uma IDA de 0,05 mg/kg/dia (ANVISA, 2019). Por sua fácil solubilidade, o imidacloprido apresenta maior risco de promover efeitos sobre organismos não alvos, principalmente microrganismos

aquáticos (ANDERSON et al., 2015; RABY et al., 2018).

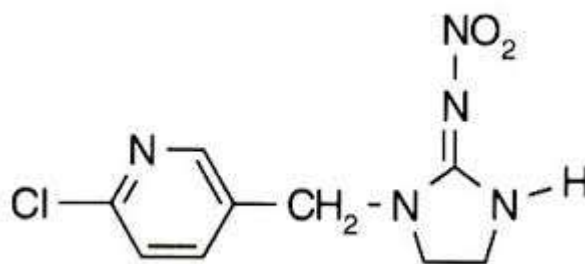


Figura 5: fórmula estrutural do imidacloprido (adaptado de ANVISA).

No organismo humano o imidacloprido é biotransformado em 5-hidroxi-imidacloprido (5-OH-IMI); 4,5-di-hidroxi-imidacloprido; desnitroimidacloprido; derivados de ureia e ácido 6-cloronicotínico, entre outros derivados. A biotransformação ocorre através da rota de hidroxilação do anel do grupo imidazolidina e formação de olefinas que juntamente com 5-OH-IMI causam toxicidade para abelhas tanto por exposição aguda quanto crônica (ANDERSON et al., 2015; SIMON-DELSO et al., 2015). Na exposição aguda dos seres humanos os sintomas de toxicidade incluem tremores, incapacidade de coordenação motora, diarreia e perda de peso. Além disso, a sílice cristalina (ingrediente da formulação comercial do imidacloprido) é considerada carcinogênica pela Agência Internacional para o Câncer (IARC) (RIGOTO et al., 2015).

A toxicidade do imidacloprido aos peixes é considerada baixa, entretanto estudos já mostram alteração na transcrição de genes, desintegração do tecido gonadal, degeneração da notocorda e prejuízos na atividade natatória. Estes efeitos geram uma grande preocupação devido à alta solubilidade do imidacloprido, podendo se acumular em rios e lagos (CHANG et al., 2020; GIBBONS et al., 2015).

Apesar da toxicidade nos vertebrados ser menor, e conseqüentemente a reversibilidade em caso de intoxicação ser maior, grandes quantidades podem causar efeitos aos vertebrados. Em codornas tratadas com imidacloprido, foi observado aumento de transaminases, indicando disfunção hepática, com esteatose, inflamação e fibrose hepática, além de toxicidade hematológica e diminuição de eritropoietina (LV et al., 2020). Em ratos albinos Wistar fêmeas, a exposição prolongada ao imidacloprido foi capaz de causar alterações

histopatológicas no fígado, com aumento de transaminases (AST e ALT) e FAL, indicando aumento de permeabilidade e dano aos hepatócitos (VOHRA et al., 2014).

1.6 Avaliação da toxicidade das misturas

Na agricultura, os agrotóxicos costumam ser utilizado em misturas, dessa forma, o risco associado à ação tóxica de misturas está subestimado, pois tradicionalmente a avaliação do risco tem sido realizada considerando a exposição individual as substâncias químicas, enquanto na prática essas substâncias são utilizadas concomitantemente. O desafio então é avaliar a toxicidade combinada (aditiva, sinérgica ou antagônica) de misturas de agrotóxicos. Deste modo, investigações que abordem uma avaliação correta das misturas de agrotóxicos são de suma importância. A exposição concomitante a essas misturas como glifosato, fipronil e imidacloprido é uma prática comum nas lavouras de soja e seus efeitos podem ocasionar toxicidade reprodutiva, interferir no sistema endócrino e afetar não somente os consumidores da soja, mas principalmente a saúde do trabalhador rural que aplica este produto (CASTRO, 2009).

Atualmente, dois modelos matemáticos têm sido empregados para prever o efeito de misturas, o de adição da concentração (CA) e o de ação independente (IA). O conceito de CA é baseado na suposição de que os componentes da mistura têm mecanismos de ação semelhantes, o que significa que qualquer componente pode ser substituído total ou parcialmente por outro sem alterar o efeito global da mistura. Isto significa que cada componente individual contribui para o efeito global, agindo em proporção à sua concentração, mesmo abaixo das concentrações que não produzem efeito. Por outro lado, o IA considera cada agente interagindo em diferentes locais de ação. A resposta de cada componente individual é independente dos efeitos induzidos por outros componentes, presumindo que os componentes da mistura presentes em concentrações sem efeito não contribuem para o efeito global da mistura (SILVA et al., 2012).

Bianchi et al, (2015) realizaram um estudo com o modelo celular HepG2 e avaliaram os efeitos toxicogénicos dos agrotóxicos imidacloprido e sulfentazona, isoladamente e em misturas. Isoladamente, ambos os agrotóxicos apresentaram

propriedades genotóxicas e induziram danos ao DNA. O imidacloprido provavelmente forma adutos de DNA e quebras cromossômicas (efeito clastogênico). Já a sulfentazona não teve seu mecanismo de ação bem definido. Em mistura, a indução de danos ao DNA continuou, mas com frequências mais baixas do que cada agrotóxico sozinho e o mecanismo de ação não foi mantido, levando a um novo mecanismo de ação sem predominância de uma ação clastogênica ou aneugênica específica.

Demsia et al., 2007, identificaram em seu estudo um possível efeito genotóxico sinérgico entre o imidacloprido e o fungicida metalaxil em linfócitos humanos e na medula óssea de camundongos. A mistura destes dois agrotóxicos induziu alterações significativas nas cromátides irmãs dos linfócitos e aumento na frequência de micronúcleos nas células da medula óssea dos camundongos e também nos linfócitos quando comparadas ao uso isolado destes produtos. Kingsley (2019) utilizou os modelos matemáticos IA e AC para prever a toxicidade da mistura de glifosato e hidróxido do cobre no modelo de alevinos de *Clarias gariepinus*. Neste estudo o modelo AI forneceu uma melhor estimativa da resposta observada em comparação com o modelo AC, mostrando efeito sinérgico nas misturas.

O imidacloprido foi testado juntamente com o arsênio em ratos no estudo de Mahajan et al. (2018) e foi possível observar a potencialização da hepatotoxicidade induzida pelo imidacloprido. As alterações hepáticas foram mais severas, com aumento do estresse oxidativo hepático, redução de antioxidantes e diminuição dos biomarcadores indicativos de função hepática (MAHAJAN et al., 2018).

CAPÍTULO I (ARTIGO)

Synergistic toxicity of the pesticides fipronil, glyphosate and imidacloprid, applied in soybeans cultivation, in HepG2 cells.

Submetido para publicação na revista *Toxicology in vitro*.

**Synergistic toxicity of the pesticides fipronil, glyphosate and imidacloprid,
applied in soybeans cultivation, in HepG2 cells**

Fernanda Mocellin Conte^{a,b}, Larissa V. Cestonaro^{a,b}, Yasmin V. Piton^a, Nicolas Guimarães^a, Solange C. Garcia^{a,b}, Diana Dias da Silva^{c,d,e,f}, Marcelo Dutra Arbo^{a,b*}.

^a Laboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

^c UCIBIO, REQUIMTE, Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

^d Associate Laboratory i4HB – Institute for Health and Bioeconomy, Faculty of Pharmacy, University of Porto, 4050-313 Porto, Portugal.

^e TOXRUN–Toxicology Research Unit, Instituto Universitário de Ciências da Saúde, IUCS-CESPU, Gandra PRD, Portugal.

^f School of Health Sciences, Polytechnic of Leiria (ESSLei-IPL), 2411-901 Leiria, Portugal.

***Corresponding author:**

Rua São Luís 150, 3º andar, Anexo II, Santana, Porto Alegre, RS, CEP: 90620-170, Brazil. Tel.: +55 51 3308 2173; Fax: +55 51 3308 5437.

E-mail address: marcelo.arbo@ufrgs.br (M.D. Arbo).

Highlights

- Fipronil, glyphosate, and imidacloprid acted synergistically on toxicity.
- Fipronil and glyphosate disrupt the mitochondrial membrane potential.
- Fipronil, glyphosate, and their mixtures increase liver enzymes activities

Abstract

The transgenic soy monoculture demands an exaggerated supplementation with pesticides. The aim of this study was to evaluate the individual and mixture effects of fipronil, glyphosate and imidacloprid in human HepG2 cells. Cytotoxicity was evaluated after 48-h incubations through MTT reduction and neutral red uptake assays. Free radicals production, mitochondrial membrane potential, DNA damage, and release of liver enzymes were also evaluated. Data obtained for individual agents were used to compute the additivity expectations for two mixtures of definite composition (one equipotent mixture, based in the EC₅₀ values achieved in the MTT assay; the other one based in the acceptable daily intake of each pesticide), using the models of concentration addition and independent action. The EC₅₀ values for fipronil, glyphosate and imidacloprid were 37.59, 41.13, and 663.66 mg/L, respectively. The mixtures of pesticides elicited significant synergistic effects, which were greater than the expected by both additive predictions. Decreased in mitochondrial membrane potential and increased in the transaminases enzymatic activities were observed. As they occur simultaneously, interactions between pesticides, even at non-effective single levels, can reverberate in significant deleterious effects, justifying the need for a more realistic approach in safety evaluations to better predict the effects to human health.

Keywords: mixture effects; synergism; cytotoxicity; concentration addition (CA); independent action (IA); *in vitro*.

1. Introduction

The use of pesticides has become increasingly important to sustain monocultures such as that of transgenic soybeans in Brazil (PIGNATI et al., 2017). The widespread overuse of pesticides in agricultural practices facilitate soil and water contamination (CARNEIRO et al., 2015). This fact can contribute to a cumulative effect of these pesticides in humans that are already exposed to pesticides through food intake. Within the pesticides used in soybean crops, the most frequently applied are glyphosate, fipronil, and imidacloprid.

Glyphosate is the active ingredient in Roundup[®], being a broad-spectrum and non-selective systemic herbicide. It acts by inhibiting and competing with the enzyme 5-enolpyruvylshiquite-3-phosphate synthase (EPSPS), causing a shortage of aromatic amino acids and hindering the growth of certain plants (DILL et al., 2010). It is the most used pesticide in Latin American agriculture, mainly in genetically modified soy crops (LAJMANOVICH et al., 2019). The main products of glyphosate degradation are aminomethylphosphonic acid (AMPA) and carbon dioxide (CO₂). In mammals, glyphosate is not fully metabolised and can be excreted unchanged in the urine. However, in humans, high levels of AMPA have been found in the blood after intoxication (MOTOJYUKU et al. 2008). Glyphosate and its metabolites can be found in the soil, air, surface waters and groundwater, evidencing the interaction also with non-target organisms. The half-life of glyphosate has been described in several studies, and can last from days to weeks, being greater than 60 days in some cases (MYERS et al., 2016). The effects caused by this pesticide have been extensively researched since 1980. Lymphocytes incubated with high concentrations of the herbicide showed a significant increase in the rate of sister chromatid exchange. In *in vitro* tests, the herbicide caused GSH depletion, reducing the antioxidant capacity and increasing the lipid peroxidation of cells (HEU et al., 2012; GEORGE and SHUKLA, 2013).

The insecticide fipronil, chemically derived from the phenylpiprazoles, is considered to be a second-generation insecticide, highly active and with a broad spectrum because it has less binding efficiency to receptors in vertebrates compare to invertebrates (SIMON-DELSO et al., 2014). Its insecticidal action occurs by inhibiting the chloride channels of the GABAA receptor, activated by glutamate,

preventing the intake of chloride ions and resulting in excess of neuronal stimulation of the central nervous system, and ultimately death (SAYED et al., 2019). Fipronil displays greater affinity for the central nervous system of insects than that of mammals (KARTHEEK and DAVID, 2018). However, studies have already described effects of fipronil toxicity at non-neuronal sites, mainly in the liver where it is metabolised to fipronil sulfone by enzymes of the cytochrome P-450 (P450) complex (MEDEIROS et al., 2015). It is also associated with thyroid dysregulations, endocrine disruption and, at the cellular level, it interferes with ATP synthesis, increasing the calcium flow and decreasing the mitochondrial membrane potential (LEQHAIT et al., 2009; KHAN et al., 2015; TAVARES et al., 2015).

Registered since 1990, neonicotinoids are broad-spectrum systemic insecticides, being among the most used in the world. They are considered substitutes for organophosphates and carbamates and are classified as moderately toxic. Among them, imidacloprid is the most used in plantations and soybeans. Neonicotinoids are antagonists of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), therefore they cause constant nerve stimulation, generating lethal effects in insects. In mammals, toxicity is considered low, however imidacloprid may cause gastrointestinal effects and neurotoxicity (LONARE et al., 2014; RABY et al., 2018). Of note, it is believed that imidacloprid can affect brain function during development, in addition to affecting memory, proliferation and neural formation (CIMINO et al., 2017). It is believed that imidacloprid can bind covalently to DNA, impairing metabolic processes. In a study with HepG2 cells, it was observed that imidacloprid cause genotoxicity, which may reflect damage to exposed humans and the environment (ŞENYILDIZ et al., 2018).

In soybean crops it is common to use glyphosate, fipronil, and imidacloprid in combination, however little is known about the mechanisms of interaction of such pesticides and elicited joint effects. As such, the need to study possible deleterious effects caused by the combination of such chemicals is paramount since significantly increased toxicity may arise from their interaction, even when individual agents are present at concentrations yielding no effects (DIAS DA SILVA et al., 2013). Since humans are exposed to these cocktails of pesticides by the oral route (e.g., by ingestion of contaminated soya or water), the liver is expected to be highly exposed to their toxicity (by virtue of their first pass effect and pesticide metabolic bioactivation). As such, in this study, the HepG2 cells, an in vitro model for the

human liver, were used to evaluate the hepatotoxicity of the three pesticides, both isolated and in mixture as well as the underlying toxicological pathways.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

The pesticides fipronil (Frontline[®], 10 g/L), glyphosate (Syngenta[®], 620 g/L; 62% purity), and imidacloprid (Much[®], 600 g/L; 60% purity) of technical grade were used. Working stock solutions were prepared by diluting the formulations in phosphate-buffered saline (PBS) at the following concentrations: fipronil 2 g/L; glyphosate 10 g/L; and imidacloprid 20 g/L. The stock solutions were filtered through sterile syringe filters and stored at -20°C. Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, amphotericin, trypsin-EDTA, PBS, sodium chloride, triton X-100, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), neutral red dye (NR), tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate (TMRE), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), dimethyl sulfoxide (DMSO), carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP), *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP), GelRed, agarose, and agarose low-melting were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hydrogen peroxide (H₂O₂), tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, EDTA and sodium hydroxide were obtained from Synth (Diadema, SP, Brazil).

2.2 Immortalised cell culture

HepG2 cells are derived from human liver hepatocellular carcinoma. These adherent cells are epithelial in morphology, secrete important plasma proteins and maintain many of the specialised functions of normal human hepatocytes, being therefore widely used in many scientific studies of liver toxicity (BRAVO et al., 2020, 2021). The cells were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ) and were routinely grown in 75 cm² flasks with filter caps, using DMEM medium supplemented with 5% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 250 µg/mL amphotericin B. The cells were maintained in a humidified atmosphere, with

5% CO₂ at 37°C. Cells were subcultivated weekly by trypsinization (0.25% trypsin/EDTA) and were used for experiments over a maximum of 10 passages.

2.3 Mixture design

In this work, two mixtures containing the three pesticides (fipronil, glyphosate and imidacloprid), but at different proportions, were tested. In Mix A all pesticides were combined at concentrations eliciting 50% of their individual maximal effect in the MTT assay (EC₅₀), thus all the components of the mixture are at equipotent concentrations. In the Mix B, all three pesticides were combined in concentrations equivalent to the acceptable daily intake (ADI) of each pesticide, as described by the National Health Surveillance Agency (ANVISA). The ADI is a safety parameter defined as the maximum amount of pesticide that can be ingested per day so as not to cause damage to human health. The ADI established by ANVISA for each pesticide is 0.5 mg/kg/day for glyphosate, 0.0002 mg/kg/day for fipronil and 0.05 mg/kg/day for imidacloprid.

In the two mixtures, the working solutions were prepared from stocks in serial dilution, thus keeping the relationship between each pesticide unchanged and preventing disproportionate contributions from any single component.

2.4 MTT reduction assay

The test principle is based on the reduction of tetrazolium MTT by active reductases, forming formazan crystals only in living cells, and thus being used as a cell viability assay. The cells were seeded at a density of 5×10^4 cells/well in a 96-well plate (Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brazil), in a final volume of 100 µL of culture medium, in order to obtain a confluent monolayer in 24h. Concentration–response curves were obtained incubating the cells with 0-150 mg/L fipronil; 0-250 mg/L glyphosate, and 0-4,500 mg/L imidacloprid for 48h at 37°C. The two mixtures were also tested, in a range of 0-275 mg/L. Such concentrations were selected to cover the whole effect range, from undetectable effects (when compared with negative controls, i.e., 0%) to 100% mortality. Triton X-100 at 1% was used as positive control, while control cells received only culture medium.

After 48-h incubation, the medium was removed and replaced with fresh medium containing 0.5 mg/L MTT. The cells were incubated for 2h at 37°C, under light protection. After incubation, the cell culture medium was removed and the intracellular formazan crystals were dissolved in DMSO (SILVA et al., 2015). The absorbance was measured at 585 nm, using a SpectraMax i3x microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The results were presented graphically in percentage of cell death *versus* concentration. All pesticides were tested in three independent experiments with each concentration tested in six replicates within each experiment.

2.5 Neutral red uptake assay

The neutral red uptake assay was used as an additional viability assay, as it assesses the ability of living cells to incorporate and bind the neutral red dye (NR). This cationic dye penetrates cells by diffusion and accumulates intracellularly in lysosomes. For this test, the cells were seeded at a density of 5×10^4 cells/well in a 96-well plate, with a final volume of 100 μ L of culture medium. After 24h, confluent cell monolayer was incubated at 37°C with the single pesticides at 5, 10, 25, 40, 75, and 85 mg/L fipronil; 5, 10, 30, 40, 75, 85 mg/L glyphosate; or 5, 10, 250, 500, 750, and 1000 mg/L imidacloprid. Triton X-100 at 1% was used as positive control, while negative control was only culture medium. After 48h incubation, the medium was replaced by fresh medium containing 50 μ g/mL NR and cells were incubated at 37°C for 3h. Thereafter, the culture medium was removed, and the cells were lysed with a 50% ethanol/1% glacial acetic solution. The absorbance was measured at 540 nm, in a SpectraMax i3x microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The results were presented graphically in percentage of cell death *versus* concentration. All pesticides were tested in three independent experiments with each concentration tested in six replicates within each experiment.

2.6 Prediction of combination effects

For the evaluation of mixtures, two reference concepts for predicting mixture outcomes were employed: the Loewe additivity or concentration addition (CA) model

(Loewe and Muchnik, 1926); and the independent action (IA) model (Bliss, 1939). The concept of CA is based on the assumption that the mixture constituents have similar modes of action, which means that any component can be replaced partially or totally with another without changing the overall mixture effect (each component acts as a dilution of another one). This means that each individual component contributes to the global joint effect by acting in proportion to its concentration, even when it occurs at concentrations producing no effect. The IA approach considers each agent interacting at differing sites and therefore the fractional response of one individual component is supposed to be independent from those induced by other components. Therefore, mixture components present at zero effect concentrations will not contribute to the overall effect (SILVA et al., 2013). The overall effects of the designed mixtures were predicted using the concepts of CA and IA, as described elsewhere (DIAS DA SILVA et al., 2013, 2014). Effects computed were used as a reference to evaluate the combined effects of mixtures; the mixtures were considered synergistic when the final effect was greater than obtained mixture effects; additive when the result of the mixture obtained experimentally equalled the effects predicted; or antagonistic when the experimental effects fell short from predicted mixtures effects (PAYNE et al., 2000).

2.7 Challenge for other toxicological assays

The subsequent assays were performed to clarify the mechanisms related to the pesticides' hepatotoxicity in this cellular model, by testing three different concentrations for each test substance and their mixtures. Such concentrations corresponded to 3 different cytotoxicity levels, the EC₂₅, EC₅₀ and EC₇₅ according to the MTT concentration–response curves. The concentrations tested were 32.67, 41.13 and 51.89 mg/L for glyphosate; 16.36, 37.59, and 79.37 mg/L for fipronil; 250.52, 663.66, and 1,447.2 mg/L for imidacloprid; 58.63, 136.34, and 275.56 mg/L for Mix A; and 41.97, 65.79 and 93.05 mg/L for Mix B.

2.7.1 Measurement of intracellular reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species

The intracellular production of ROS and RNS was evaluated by the DCFH-DA

assay, as described by Dias da Silva et al. (2015). DCFH-DA is a lipophilic probe that easily penetrates cells, producing 2',7'-dichlorodihydrofluorescein after hydrolysis, which reacts with reactive intracellular nitrogen and oxygen species, generating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), which emits a green fluorescence. Cells were seeded at a density of 5×10^4 cells/well in a 96-well plate, with a final volume of 100 μ L of culture medium. After 24h, cells were incubated with 10 μ M DCFH-DA for 30 min at 37°C, protected from light. DCFH-DA was initially prepared as a 4 mM stock solution in DMSO and made up to the final concentration in fresh culture medium (ensuring that the final concentration of DMSO did not exceed 0.05%) immediately before each experiment. The cells were then rinsed with PBS and incubated with the pesticides individually or as mixtures, at 37 °C. Positive control was 500 μ M TBHP. After 48h incubation, fluorescence was recorded in a microplate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) adjusted for 485 nm excitation and 530 nm emission. Four independent experiments were carried out, with each concentration tested in triplicate.

2.7.2 Assessment of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)

Tetramethyl rhodamine ethyl ester is a positively charged red-orange dye with cellular permeation and accumulation in active mitochondria due to its negative charge. In inactive mitochondria there is a decrease in membrane potential and failure to sequester TMRE (CROWLEY et al., 2016). For this test, the cells were seeded at a density of 5×10^4 cells/well in a 96-well plate, with a final volume of 100 μ L of culture medium. After 24h, the cells were incubated with the pesticides individually and in combination. Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone at 5 μ M, a decoupler of oxidative phosphorylation, was used as positive control. After 48h incubation, the medium was replaced by fresh medium containing 2 μ M TMRE, and incubated at 37 °C, for 30 min, in the dark. As TMRE is a non-water-soluble powder, a 2 mM stock solution was initially prepared in DMSO and stored in the dark. Afterwards, the medium was aspirated and replaced by PBS. The fluorescence was recorded in a microplate reader (SpectraMax i3x Molecular Devices, San Jose, CA, USA) adjusted for 544 nm excitation and 590 nm emission. Four independent experiments were carried out, with each concentration tested in

triplicate.

2.7.3 Determination of liver enzymatic activities

The liver enzymes' activities in the extracellular medium were determined as an indicator of cytotoxic damage (membrane disruption). Cells were seeded in 24-well plates (Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brazil) with a density of 2.0×10^5 cells/per well in a final volume of 1.5 mL. After 24h, they were incubated with the pesticides individually and in mixtures, at 37°C. After 48h incubation, the cell culture medium was collected for determination of enzymatic activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH), using commercially available diagnostic kits (Wiener Lab Group, Rosário, Argentina). Enzymatic activities were carried out on a Mindray® BS-120 Chemistry Analyser (Shenzhen Mindray Bio- Medical Electronics Co Ltd, Shenzhen, China). Three independent experiments were performed, with each concentration tested in two replicates within each experiment.

2.7.4 Comet assay

In this assay, cells were seeded in 24-well plates with a density of 2.0×10^5 cells/well with a final volume of 1.5 mL of medium and, after 24h, they were incubated with the pesticides, individually and in mixtures, at 37°C. Positive control was 3% H₂O₂. After 48-h incubation, the cells were harvested with 0.05% trypsin/EDTA and centrifuged (400 g, 5 min, 4 °C). The obtained cell pellets were resuspended in low-melting point agarose (0.75%, 150 µL) and two 100 µL aliquots were placed on slides, pre-coated with a 1% standard agarose. The samples were incubated in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, 10% DMSO, pH 10; 1% Triton X-100) at 4°C for at least 24h, in the dark. The slides were then incubated with alkaline electrophoresis running buffer (1mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH; pH 13) for 20 min at 4°C, before electrophoresis, which was carried out for 20 min at 25 V and 300 mA. After that, the slides were neutralised with 0.4 M Tris-HCl for 15 min. The DNA was fixed in absolute alcohol for 5 min and left to dry overnight (GIORDANI et al., 2019). The slides were stained with GelRed® (20

$\mu\text{g/mL}$) and DNA migration was observed in at least 100 cells at a 400x magnification in a fluorescence microscope Olympus IX71 fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a 510-550 nm excitation filter connected to a camera. The images were evaluated by the Comet ScoreTM, obtained from the public domain (http://www.tritekcorp.com/products_cometscore.php). DNA damage was quantified by measuring the percentage of DNA in the comet tail (% DNA).

Concurrently, an extra and identical replicate comet slide was prepared, lysed, and immediately fixed and stained without electrophoresis, for evaluation of the cytotoxicity using the low molecular weight (LMW) DNA diffusion assay test. This test detects pre-lethal DNA breaks caused by cytotoxic compounds assisting in verifying whether the comet responses are affected only by cytotoxicity, avoiding false negatives/positives results by the formation of cytotoxic compounds (VASQUEZ, 2010). Gels were prepared in three independent experiments with each concentration tested in two replicates within each experiment.

2.8 Statistical analysis

The normalised cytotoxicity data from the MTT reduction assay were fitted to the logit regression, that was chosen based on a statistical goodness-of-fit principle (SCHOLZE et al., 2001). The results were presented including the 95% confidence intervals (CI) of the mean values. To compare concentration–response curves, overlapping of the 95% CI was used in addition to the extra sum-of-squares *F* test. All other results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) from at least three independent experiments. Normality of the data distribution was assessed by the Kolmogorov-Smirnov normality test. Significance was accepted at $p < 0.05$. Statistical comparisons between groups were performed by one-way ANOVA when the data followed a normal distribution, or by the Kruskal-Wallis test, in the case of non-normal data distribution.

3. Results

3.1 Glyphosate and fipronil are highly cytotoxic for HepG2 cells, as compared to imidacloprid

Figure 1 shows the concentration–response curves of each single pesticide. All tested pesticides produced concentration-dependent cytotoxic effects. Significant differences were observed for the EC₅₀ values of fipronil (EC₅₀ 37.59 mg/L) and glyphosate (EC₅₀ 41.13 mg/L), when compared to imidacloprid (EC₅₀ 663.66 mg/L; $p < 0.001$). Between fipronil and glyphosate EC₅₀, no significant differences were observed. Fipronil was the most cytotoxic of the tested pesticides. A summary of the parameters of the best-fit regressions is provided in Table 1.

3.2 Pesticides interact synergistically to reduce HepG2 cell viability

Assessments of combination effects in terms of synergisms, antagonisms, or additivity critically depend on the determination of the expected effect of a given mixture. As depicted in figure 2, the two additive assumptions, CA and IA models, produced similar expectations. As previously described, in the Mix A all pesticides were combined with basis on their respective EC₅₀, this mixture presenting an equipotent ratio. On the other hand, Mix B was designed to mimic a more realistic combination by taking into account de ADI of each pesticide. The experimental mixture testing found EC₅₀ values of 136.34 mg/L and 65.79 mg/L for Mix A and Mix B, respectively. The experimental values were lower than the predicted ones (239.36 and 340.77 mg/L for Mix A and 82.75 and 87.31 mg/L for Mix B, for CA and IA respectively), evidencing a synergistic effect, as the toxic effects obtained were significantly greater than the predicted ones.

3.3 Glyphosate and fipronil highly interfere with lysosomal function, as compared to imidacloprid

Cell viability as evaluated through the ability for incorporating NR in lysosomes, following exposure to single pesticides for 48h, is described in figure 3. It is possible to observe a significant decrease ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni) in cell viability for all fipronil concentrations. For glyphosate and imidacloprid, cell viability was significantly decreased ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni) at concentrations ≥ 10 mg/L.

3.4 No formation of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species

was elicited by tested pesticides (individually or combined)

The formation of ROS and RNS is an integral part of several physiological processes, including oxidative phosphorylation and metabolism. However, when the increased production of these species overpasses the antioxidant defences, the cell homeostasis is affected. Oxidative stress causes an imbalance between the pro-oxidant and antioxidant systems, causing cell damage. In this study, the production of ROS and RNS in HepG2 was not affected by the incubation with the pesticides fipronil, glyphosate, and imidacloprid, either individually or in mixture, at our experimental conditions. On the contrary, 500 μ M TBHP, used as positive control, significantly increased ($p < 0.01$; ANOVA/Bonferroni) ROS and RNS formation (figure 4), validating the assay.

3.5 Fipronil and glyphosate affect mitochondrial function, both individually and in combination

The mitochondria participate in several vital functions of the cell, mainly energy production through the generation of ATP, and Ca^{2+} buffering. As shown in figure 5A, imidacloprid did not interfere in $\Delta\psi_m$ under our experimental conditions, however fipronil at all concentrations and glyphosate at the EC50 and EC75 induced a significant mitochondrial depolarisation ($p < 0.01$; ANOVA/Bonferroni). When the mixtures were evaluated (figure 5B), all tested concentrations of MIX A and MIX B at the EC50 and EC75 induced a significant loss of the $\Delta\psi_m$ ($p < 0.01$; ANOVA/Bonferroni). The positive control, 5 μ M CCCP, induced the highest cell depolarisation ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni), similar to fipronil, glyphosate and Mix A at the EC75.

3.6 Fipronil, glyphosate and Mix A induced significant release of liver transaminases

The HepG2 cells maintain the basic characteristics of normal hepatocytes and continues to secrete enzymes such as transaminases (AST and ALT), LDH and ALP. The determination of enzymatic activity for individual or combined pesticides is

described in figure 6. Fipronil at all concentrations and glyphosate at the EC₂₅ and EC₇₅ significantly increased the extracellular activity of AST (figure 6A, $p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni). For ALT, the increase in the extracellular enzymatic activity was observed after incubation with all concentrations of both fipronil and glyphosate (Figure 6B, $p < 0.05$; ANOVA/Bonferroni). For the ALP, the enzymatic activity increased only at the EC₇₅ for fipronil (figure 6C, $p < 0.05$; ANOVA/Bonferroni). The enzymatic activity of LDH had a significant increase at the EC₇₅ of both fipronil and glyphosate (figure 6D, $p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni). Under our experimental conditions, imidacloprid induced no changes in the extracellular activities of the tested enzymes. For the mixtures, a significant increase in the enzymatic activities was only observed for AST and ALT at the EC₇₅ of MIX A (figures 6, E and F, $p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni).

3.7 No DNA damage was induced by the tested pesticides (individually or combined)

The comet assay is considered a more sensitive method than cytogenetic tests for assessing DNA damage induced by genotoxic agents, being used as a biomarker for genotoxicity. In our study, no significant changes were found for the comet assay after exposure of HepG2 cells to individual or combined pesticides for 48h, however it was observed a significant increase in % DNA in tail at the EC₇₅ of fipronil (figure 7C, $p < 0.05$ ANOVA/Bonferroni) in the LMW assay.

4. Discussion

The cytotoxicity elicited by fipronil, glyphosate and imidacloprid to HepG2 cells after 48h incubation, by the MTT assay was very similar to that described by the NR up-take assay, meaning that even using different endpoints (cell metabolic competence *versus* lysosome integrity, respectively) data were in agreement. For example, 25 mg/L fipronil and 30 mg/L glyphosate elicited a 60% effect both by MTT and NR up-take assays. Fipronil cytotoxicity was previously evaluated in HepG2 cells, a 25% effect was observed after 48h incubation with 5.7 mg/L fipronil, as evaluated by the trypan blue exclusion assay, a marker of cell membrane integrity (DAS et al., 2006) comparatively, in our experiments, 25% effect was obtained with

around 15 mg/L fipronil. Imidacloprid presented around 50% effect at 3,600 mg/L in HepG2 cells after 24h (BIANCHI et al., 2015). After 48h incubation, as performed in our work, the EC₅₀ was 666.36 mg/L, representing almost 80% in the potency of the pesticide due to the increased incubation time. Evaluating the cytotoxicity of five neonicotinoids insecticides, Senyildiz et al. (2018) found that among them, imidacloprid was the fourth most cytotoxic compound after 48h, around 45% effect was observed at 4 mM (approximately 1.02 g/L) in both the MTT reduction and NR up-take assays.

In the monoculture of transgenic soybeans, there is not the application of just one type of pesticide therefore, the farmers, as well as the consumers of soy-derived products, are exposed to a myriad of compounds whose interaction among each other may originate results significantly different from those elicited by the single chemicals even when all chemicals are present at individual no effect concentrations (DIAS DA SILVA et al., 2013, 2014). The mixtures tested herein were planned either i) to assess the validity of the two competing prediction models, CA and IA, by combining all chemicals at equieffective concentrations, thus ensuring that each drug contributed equally to the overall mixture effect and avoiding the disproportionate contribution of any one single agent (Mix A); or ii) to simulate the exposure of soybean derived products consumers through the food, as mixture design was selected based on the ADI established for each single pesticide. Both CA and IA yielded relatively similar predictions of the mixtures' effects (although IA provided more conservative effects in both cases), but when the experimental data obtained were compared to these expectations, a synergistic interaction among the three pesticides was disclosed, regardless of the mixture design. Synergisms are rare and indicate that the combined effects are higher than the expected from information on the individual toxicities, thus jeopardizing risk assessments delivered based on single drug approaches. Of relevance, the synergistic effects observed for Mix B indicate that, even at ADI levels, the pesticides can act together to elicit significant cell damage, probably due to important differences in the molecular structures targeted by fipronil, glyphosate and imidacloprid.

Synergistic effects have already been observed between glyphosate and copper hydroxide. In this case, copper is likely to inhibit biotransformation enzymes and lead to glyphosate accumulation in fish *Clarias gariepinus*, causing greater toxicity (KINGSLEY, 2019). Glyphosate and arsenic also showed synergism when

evaluated in the toad *Rhinella arenarum* (LAJMANOVICH et al., 2019). In addition, Wistar rats treated with arsenic-associated imidacloprid showed more severe changes in liver damage biomarkers and histopathological analysis than rats treated with arsenic or imidacloprid alone (MAHAJAN et al., 2018). Glyphosate (at 3 and 5 mg/L) and fipronil (0.018 mg/L), tested alone and in combination, caused behavioural anxiolytic effects in zebrafish, turning the fish more vulnerable to predators (CHAULET et al., 2019). However, in this work the authors did not use mathematical models to predict mixture effects and the concentrations used for the mixtures were the same as for the isolated pesticides, precluding significant conclusions on the type of interaction at play.

Wang et al. (2017) tested fifteen mixtures with five pesticides, two organophosphates (phoxim and chlorpyrifos), one pyrethroid (*l*-cyhalothrin), one triazine herbicide (atrazine) and one chloroacetranilide herbicide (butachlor). Of these mixtures, ten mixtures designed at equivalent concentrations and equitoxic ratios exhibited synergistic effects in the zebrafish. Wang et al. (2018) also tested in zebrafish four pesticides, including one dicarboximide fungicide iprodione, one anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil, one strobilurin fungicide pyraclostrobin and one neonicotinoid insecticide acetamiprid, in eleven mixtures prepared at the same equitoxic concentrations. Of all the mixtures evaluated, six presented synergisms. As many pesticides coexist in different ecosystems, humans are exposed to multiple classes of compounds present at individual concentrations that vary for each single moment (as ecosystems are dynamic, the concentration of each chemical in one fraction of second is not the same as in the immediately following one). Therefore, investigating the type of pesticides' interactions is crucial, as the risk assessment strategies that consider only the individual toxicity of each compound can substantially underestimate the real risk for the population exposure.

Pesticides tend to increase the levels of ROS and RNS, as they compromise the mitochondrial capacity to produce energy, inducing oxidative stress in the human body (KALUBA et al., 2017). Reactive species cause damage at the cellular level, such as DNA breaks, lipid peroxidation and protein degradation. Interestingly, the studied pesticides, as well as the two mixtures, did not induce the formation of ROS and RNS under our experimental conditions. Similarly, 24h incubation of HepG2 cells with glyphosate at 0.5 mg/L, 2.91 mg/L, and 3.5 mg/L did not increased free radicals (KALUBA et al., 2017), although in this case, both concentrations and time point

(48h) were lower than those used by us (32.67–51.89 mg/L; 48h).

The mitochondria are responsible for the generation of cellular energy, supplying ATP to cells. In our study, fipronil and glyphosate depolarised the $\Delta\psi_m$, especially at its highest concentration (79.37 and 51.89 mg/L, respectively). In SH-SY5Y cells, 11.5 mg/L fipronil inhibited the ATP production after 24h by mitochondrial decoupling (VIDAU et al., 2011), a mechanism that can also occur in HepG2 cells. However, the effect of fipronil in a neuronal in vitro model, such as SH-SY5Y cells, could be higher because of its mechanism of action, which is related to GABA receptors blockade. In addition, 48h incubation with 0.01 – 2.8 mg/L fipronil mediated cytotoxicity by apoptosis, a pathway that has the mitochondria as an initial step (DAS et al., 2006). Increasing fipronil concentrations (0.05 – 2.9 mg/L) also caused an increase in the release of adenylate kinase into the culture medium after 24h incubation. Adenylate kinase is a phosphotransferase enzyme that catalyses the interconversion of adenine nucleotides, and plays an important role in cellular energy homeostasis, being essential for many vital processes. With the loss of the enzyme, there is an imbalance in the ATP levels, which are controlled by the combined action of adenylate kinase and the oxidative phosphorylation (DAS et al., 2006). Once fipronil depolarised the mitochondria, the oxidative phosphorylation and thus ATP production are impaired. Loss of $\Delta\psi_m$ was also observed for both Mix A and B, but it was markedly observed at EC₇₅ Mix A (275.56 mg/L). This marked effect could be due to the higher amount of fipronil, which seems to greatly affect the $\Delta\psi_m$, in Mix A compared to Mix B.

Cell culture medium levels of enzymes such as AST, ALT, ALP and LDH are markers of liver injury, as substances that cause hepatocyte membrane disruption increase their activity extracellularly. Imidacloprid did not generate significant changes in liver enzymes in our study, which was corroborated by Bizerra et al. (2020) who also did not find transaminases alterations in rat primary hepatocytes incubated for 2h at 3 mM imidacloprid. Increased AST is mainly related to hepatocyte mitochondrial damage, as 80% of this enzyme is found in the organelle, and results in loss of cellular energy and anaerobic metabolism. This mechanism can be associated with the increased levels of extracellular transaminases observed for fipronil, glyphosate and Mix A, the mixture in which fipronil is in greater proportion, incubations. Albasher et al. (2019) also reported increase in transaminases in serum of male Wistar rats exposed to 10 mg/kg fipronil for four weeks. Glyphosate at 180

mg/L increased transaminases in L-02 hepatocytes after 24h of incubation; although we herein used a maximum concentration of 51.89 mg/L for glyphosate, time exposure was double. The ALP is found in the cell membrane of various tissues and in different hepatic cell lines, such as HepG2.. The increase in ALP activity observed for fipronil only at 79.37 mg/L may indicate a possible damage in microvilli of the bile canaliculi, a zone with high ALP activity in the Hep-G2 cells (YAMAMOTO et al., 2003).. The results of Mahajan et al. (2018) are in agreement with our study, where no increase in ALP was observed in Wistar rats orally treated with 16.9 mg/kg imidacloprid for 28 days.

In our study, it was observed DNA damage through the LMW-DNA diffusion assay only for fipronil at 79.37 mg/L (EC₇₅) after 48h of incubation. The comet measurement is indicative of initial damage to the genome, if the repair of the DNA does not occur (FENG et al., 2004; M et al., 2009), which was not evaluated in our study. Interestingly, 79.37 mg/L fipronil also induced an increase in extracellular ALP, an enzyme that is also located in the nucleus of HepG2 cells, indicating the nuclear penetration of the pesticide. On the other hand, DNA damage has been described after 24h incubation with 5 mg/L of a commercial glyphosate formulation (GASNIER et al., 2009) and 3.6 mg/L of a commercial imidacloprid formulation (BIANCHI et al., 2015) in HepG2 cells. DNA damage was also observed in human peripheral blood after 72h incubation with 0.0001 mg/L fipronil (ÇELİK et al., 2014). Kwiatkowska et al. (2017) found genotoxicity in human blood mononuclear cells incubated for 24h with glyphosate in concentrations ranging from 84.75 to 1,695 mg/L, however these concentrations are higher than the concentration levels evaluated in our study. Imidacloprid and the commercial formulation Confidor 200SL® Bayer (200 g/L imidacloprid) induced DNA damage at 5.11 mg/L (49x lower than the lowest concentration tested herein) in lymphocyte cultures after 24h incubations. A relevant factor is that imidacloprid biotransformation, which is higher for longer exposures, increases cytotoxicity and DNA damage induced by the pesticide (COSTA et al., 2009). Similar to our results, 0.1 – 115 mg/L glyphosate, concentrations even higher than the ones tested in our study, did not induce DNA damage in human mononuclear white blood cells after 4h incubation (NAGY et al., 2019), neither in HepG2 cells even at 169 mg/L after 24h (KALUBA et al., 2017).

5. Conclusions

In summary, this study demonstrated that the pesticides fipronil (EC_{50} 37.59 mg/L) and glyphosate (EC_{50} 41.13 mg/L) were more cytotoxic than imidacloprid (EC_{50} 663.66 mg/L) to HepG2 cells. Fipronil (≥ 16.36 mg/L) and glyphosate (≥ 41.13 mg/L) altered the mitochondrial membrane potential of the cells and increased the AST and ALT activities (≥ 16.36 mg/L and ≥ 32.67 mg/L, respectively). The pesticide fipronil caused damage to the DNA of HepG2 cells at 79.37 mg/L (EC_{75}).

The use of pesticides in mixtures is a very common practice in soybean crops and the evaluation of the toxicity of isolated pesticides may significantly underestimate the effects of mixtures. In our study, the three pesticides had a synergistic effect, regardless of the mixture ratio and single chemical's contribution for the overall effect. The mixture at equipotent ratios of the pesticides (Mix A) did not induce the formation of reactive oxygen and nitrogen species, but promoted mitochondrial depolarization (≥ 58.63 mg/L) and increased AST and ALT enzymatic activities (≥ 275.56 mg/L). On the contrary, Mix B, based on single ADI, was less potent than Mix A, promoting only mitochondrial membrane depolarization (≥ 65.79 mg/L). Assessments of the combined effects of the pesticides and the understanding of the type of interaction that occurs between them are of paramount importance, as they can actually help predict more accurately the toxic effects to human health in exposed populations.

Conflict of interest

Declarations of interest: none.

Funding

This work was supported by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* – Brazil (CAPES/PROEX) and *Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento* (CNPq)/Universal (n°420379/2016-9, grant to M.D. Arbo). This work was also supported by the *Fundação para a Ciência e para a Tecnologia* (FCT, Portugal) through the projects UIDP/04378/2020 and UIDB/04378/2020 of the Research Unit on Applied Molecular Biosciences–UCIBIO and the project LA/P/0140/2020 of the Associate Laboratory Institute for Health and Bioeconomy–i4HB.

References

ABDEL-MISIH, S.; BLOOMSTON, M. Liver anatomy. **Surgical Clinics of North America**, v. 90, n. 4, p. 643-653, 2010.

ALBASHER, G. et al. Synergistic antioxidant effects of resveratrol and curcumin against fipronil-triggered oxidative damage in male albino rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 6, p. 6505-6514, 2019.

BERTOLAMI, M. C. Mecanismos de hepatotoxicidade. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, p. 133-141, 2005.

BIANCHI, J. et al. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p.174-183, 2015.

BIZERRA, P. F. et al. Enhanced cytotoxicity of imidacloprid by biotransformation in isolated hepatocytes and perfused rat liver. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 164, p. 183-190, 2020.

BRAVO, R. R. et al. Emerging club drugs: 5-(2-aminopropyl)benzofuran (5-APB) is more toxic than its isomer 6-(2-aminopropyl)benzofuran (6-APB) in hepatocyte cellular models. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 609-629, 2020.

BRAVO, R. R. et al. From street to lab: in vitro hepatotoxicity of buphedrone, butylone and 3,4-DMMC. **Archives of Toxicology**, v. 95, p. 1443-1462, 2021.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W. A.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; PINHEIRO, A. R. O.; FARIA, N. M. X.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. Segurança alimentar e nutricional e saúde. In: CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BURIGO, A. C. (Org.). **Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; Sao Paulo: Expressao Popular, 2015. Parte 1.

CIMINO, A. M. et al. Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: a systematic review. **Environmental Health Perspectives**, v. 125, n. 2, p. 155-162, 2017.

CHAULET, F. C. et al. Glyphosate- and fipronil-based agrochemicals and their mixtures change zebrafish behavior. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, n. 3, p. 443-451, 2019.

COSTA, C. et al. Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. **Mutation Research/genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 672, n. 1, p. 40-44, 2009.

CROWLEY, L. C. et al. Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 12, p. 1092-1096, 2016. Cold Spring Harbor Laboratory.

DAS, P.C. et al. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemico-biological Interactions**, v. 164, n. 3, p. 200-214, 2006.

DIAS DA SILVA, D. et al. The risky cocktail: what combination effects can we expect between ecstasy and other amphetamines? **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 1, p. 112-122, 2013.

DIAS DA SILVA, D. et al. Mixtures of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) and its major human metabolites act additively to induce significant toxicity to liver cells when combined at low, non-cytotoxic concentrations. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 6, p. 618-627, 2014.

DIAS DA SILVA, D. et al. Hepatotoxicity of piperazine designer drugs: comparison of different in vitro models: Comparison of different in vitro models. **Toxicology In Vitro**, v. 29, n. 5, p. 987-996, 2015.

DILL, G. M. et al. Glyphosate: discovery, development, applications, and properties:

Discovery, Development, Applications, and Properties. **Glyphosate Resistance in Crops and Weeds**, p. 1-33, 2010.

FENG, S. et al. Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 2, p. 239-246, 2005.

GASNIER, C. et al. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 184-191, 2009.

GIORDANI, C. F. A. et al. In vitro toxic evaluation of two gliptins and their main impurities of synthesis. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2019.

GEORGE, J.; SHUKLA, Y. Emptying of intracellular calcium pool and oxidative stress imbalance are associated with the glyphosate-induced proliferation in human skin keratinocytes HaCaT cells. **Isrn Dermatology**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

HAO, Y. et al. Evaluation of the cytotoxic effects of glyphosate herbicides in human liver, lung, and nerve. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 54, n. 9, p.737-744, 2019.

HEU, C. et al. Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a peak force tapping study on living cells. **Journal of Structural Biology**, v. 178, n. 1, p. 1-7, 2012.

JIN, X. et al. The evaluation of p,p'-DDT exposure on cell adhesion of hepatocellular carcinoma. **Toxicology**, v. 322, p. 99-108, 2014.

KALUBA, V. et al. Effects of low doses of glyphosate on DNA damage, cell proliferation and oxidative stress in the HepG2 cell line. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 23, p. 19267-19281, 2017.

KHAN, S. et al. Fipronil induced spermatotoxicity is associated with oxidative stress,

DNA damage and apoptosis in male rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 124, p. 8–14, 2015.

KARTHEEK, R. M.; DAVID, M. Assessment of fipronil toxicity on wistar rats: A hepatotoxic perspective. **Toxicology Reports**, v. 5, p.448-456, 2018.

KINGSLEY, K. C. Acute toxicity of copper hydroxide and glyphosate mixture in *Clarias gariepinus*: interaction and prediction using mixture assessment models: interaction and prediction using mixture assessment models. **Environmental Health and Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 1-8, 2019.

KWIATKOWSKA, M. et al. DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 93-98, 2017.

LAJMANOVICH, R. C. et al. First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. **Heliyon**, v. 5, n. 10, p.1-11, 2019.

LEQHAIT, J. et al. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**, v. 255, p. 38–44, 2009.

LONARE, M. et al. Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: a protective effect of curcumin. **Neurochemistry International**, v. 78, p. 122–129, 2014.

MAHAJAN, L. et al. Toxic effects of imidacloprid combined with arsenic: oxidative stress in rat liver: Oxidative stress in rat liver. **Toxicology and Industrial Health**, v. 34, n. 10, p. 726-735, 2018.

MEDEIROS, H. C. D. et al. Effect of fipronil on energy metabolism in the perfused rat liver. **Toxicology Letters**, v. 236, p. 34–42, 2015.

MYERS, J. P. et al. Concerns overuse of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement: a consensus statement. **Environmental Health**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2016.

MOTOJYUKU, M. et al. Determination of glyphosate, glyphosate metabolites, and glufosinate in human serum by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 875, n. 2, p. 509-514, 2008.

NAGY, K. et al. Comparative cyto- and genotoxicity assessment of glyphosate and glyphosate-based herbicides in human peripheral white blood cells. **Environmental Research**, v. 179, p. 108851-108874, 2019.

PAYNE, J. et al. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 10, p. 983-987, 2000.

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p.3281-3293, 2017.

RABY, M. et al. Chronic effects of an environmentally-relevant, short-term neonicotinoid insecticide pulse on four aquatic invertebrates. **Science of the Total Environment**, v. 639, p. 1543-1552, 2018.

SAYED, A. A. et al. Garlic and allopurinol attenuate hepatic apoptosis induced by fipronil in male albino rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 107, p.1-9, 2019.

ŞENYILDIZ, M. et al. Investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of widely used neonicotinoid insecticides in HepG2 and SH-SY5Y cells. **Toxicology and Industrial Health**, v. 34, n. 6, p.375-383, 2018.

SCHOLZE, M. et al. A general best-fit method for concentration-response curves and the estimation of low-effect concentrations. **Environmental Toxicology and**

Chemistry, v. 20, n. 2, p. 448-457, 2001.

SIMON-DELSO, N. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites: trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5-34, 2014.

SILVA, D. D. et al. Cytotoxic effects of amphetamine mixtures in primary hepatocytes are severely aggravated under hyperthermic conditions. **Toxicology In Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1670-1678, 2013.

TAVARES, M. A. et al. Comparative effects of fipronil and its metabolites sulfone and desulfinyl on the isolated rat liver mitochondria. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 206-214, 2015.

VASQUEZ, MZ. 2010. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. **Mutagenesis** 25: 187–199.

VIDAU, C. et al. Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 6, p. 935-943, 2011.

WANG, Y. et al. Single and joint toxic effects of five selected pesticides on the early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 170, p. 61-67, 2017.

WANG, Y. et al. Single and joint toxicity assessment of four currently used pesticides to zebrafish (*Danio rerio*) using traditional and molecular endpoints. **Chemosphere**, v. 192, p. 14-23, 2018.

YAMAMOTO, K. et al. Nuclear localization of alkaline phosphatase in cultured human cancer cells. **Medical Electron Microscopy**, v. 36, p. 47–51, 2003.

Figure captions

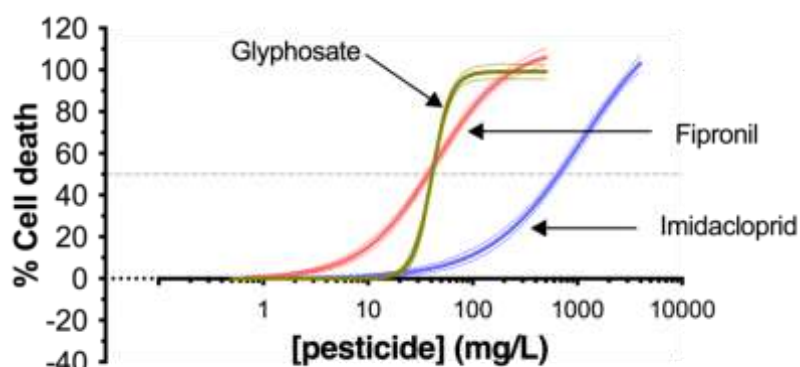


Figure 1. Concentration–response curves of the tested pesticides after 48h incubation in HepG2 cells at 37°C. Cell mortality was evaluated by the MTT reduction assay. Data are presented as percentage of cell death relative to the respective negative controls, after normalisation to the positive control. Three independent experiments were performed (six replicates tested for each concentration within each experiment). Curves were fitted to the logit function.

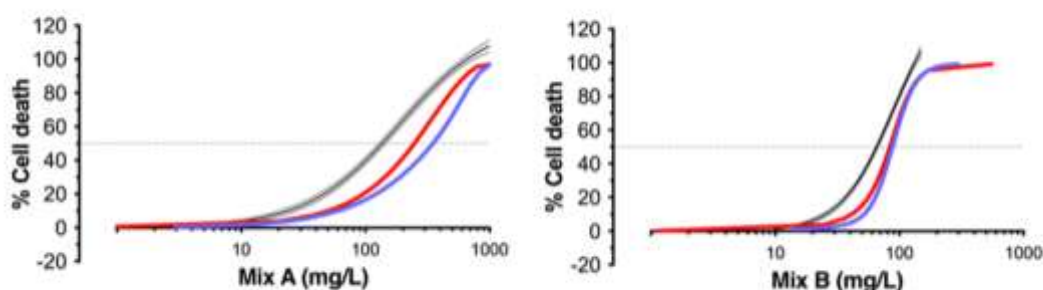


Figure 2. Predicted and observed cytotoxic effects for a mixture of fipronil, glyphosate and imidacloprid, as obtained with the MTT assay after 48h incubations of HepG2 cells at 37°C. **(A)** The individual components were mixed in proportion to their EC50 values calculated from the best-fit regression model for the MTT data of each individually tested drug. **(B)** The individual components were mixed in proportion to their Acceptable Daily Intake (ADI). On the basis of the single pesticide concentration–response relationships, additive combination effects were predicted

using the models of concentration addition (CA, red line) and independent action (IA, blue line). The obtained experimental data are represented by the black line.

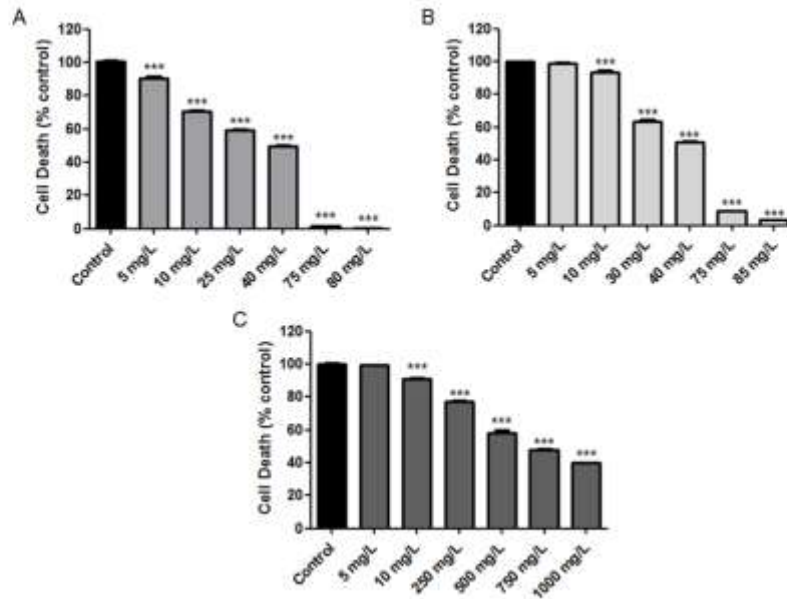


Figure 3. Cell viability of HepG2 cells measured by the neutral red (NR) uptake assay after 48h incubation in at 37 °C with fipronil (A), glyphosate (B), and imidacloprid (C). Data are presented as percentage of cell death relative to the negative controls. Three independent experiments were performed (six replicates tested for each concentration within each experiment). Statistical comparisons were made using ANOVA/Bonferroni (** $p < 0.001$ vs. control).

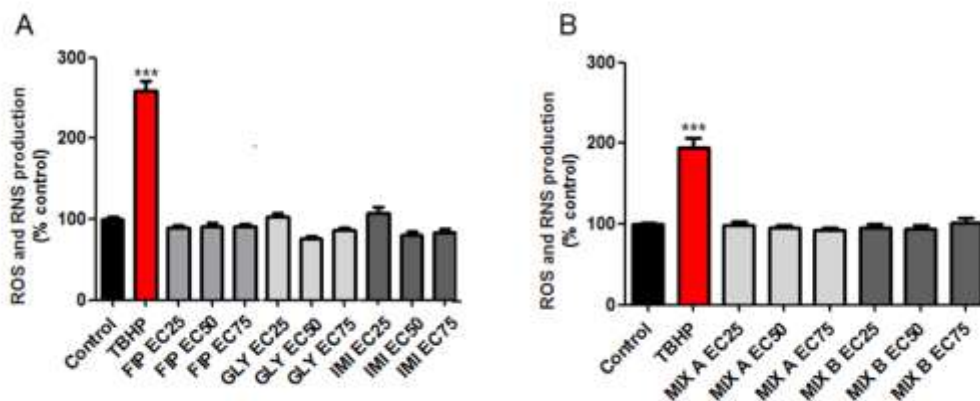


Figure 4. Reactive species of oxygen and nitrogen (ROS/RNS) production, measured by the DCFH-DA assay, in HepG2 cells after 48h incubations with each pesticide individually (A) and in mixture (B) at 37°C. In Mix A the three pesticides were combined in proportion to their EC₅₀ values (assessed by the MTT assay); in Mix B the individual pesticides were mixed in proportion to their Acceptable Daily Intake (ADI). Results are expressed as percentage control ± SEM. Four independent experiments were performed (triplicates for each concentration within each experiment). Statistical comparisons were made using one-way ANOVA/Bonferroni *post hoc* test (***p*<0.01 vs. control). EC₂₅ (concentration eliciting 25% effect in the MTT assay); EC₅₀ (concentration eliciting 50% effect in the MTT assay); EC₇₅ (concentration eliciting 75% effect in the MTT assay); FIP (fipronil); GLY (glyphosate); IMI (imidacloprid); TBHP (tert-butyl hydroperoxide; positive control at 500 μM).

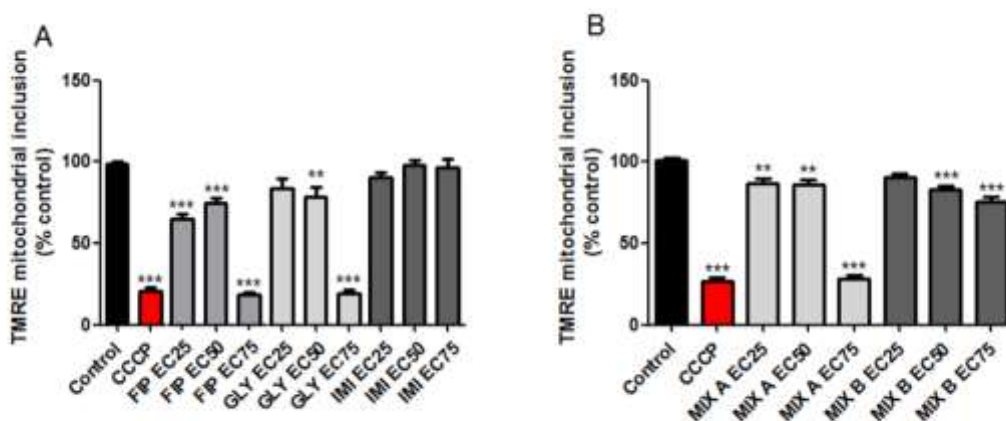


Figure 5: Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) production, measured by the TMRE assay, in HepG2 cells after 48h incubations with each pesticide individually (A) and in mixture (B) at 37°C. In Mix A the three pesticides were combined in proportion to their EC₅₀ values (assessed by the MTT assay); in Mix B the individual pesticides were mixed in proportion to their Acceptable Daily Intake (ADI). Results are expressed as percentage control ± SEM. Four independent experiments were performed (triplicates for each concentration within each experiment). Statistical comparisons were made using one-way ANOVA/Bonferroni *post hoc* test (***p*<0.01; ****p*<0.001 vs. control). CCCP (carbonyl cyanide chlorophenylhydrazone; positive control at 5 μM); EC₂₅ (concentration eliciting 25% effect in the MTT assay); EC₅₀

(concentration eliciting 50% effect in the MTT assay); EC₇₅ (concentration eliciting 75% effect in the MTT assay); FIP (fipronil); GLY (glyphosate); IMI (imidacloprid).

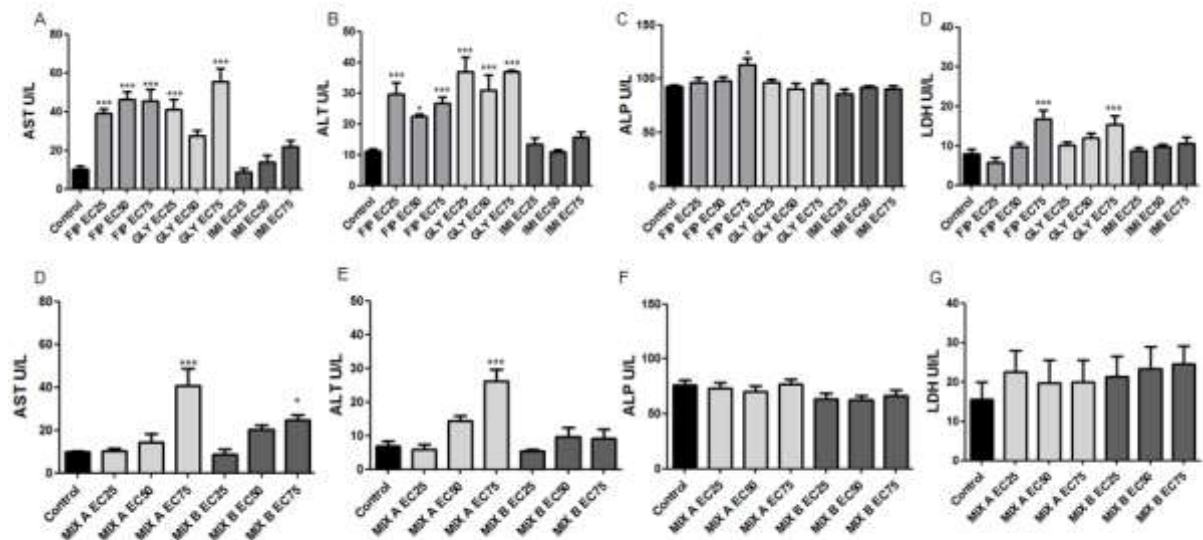


Figure 6. Enzymatic activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH) in extracellular medium of HepG2 cells after 48h incubations with each pesticide individually (A-D) and in mixtures (E-H), at 37°C. In Mix A the three pesticides were combined in proportion to their EC₅₀ values (assessed by the MTT assay); in Mix B the individual pesticides were mixed in proportion to their Acceptable Daily Intake (ADI). Results are expressed as percentage control \pm SEM. Three independent experiments were performed (duplicates for each concentration within each experiment). Statistical comparisons were made using ANOVA/Bonferroni *post hoc* test (* p <0.05; *** p <0001 vs. control). EC₂₅ (concentration eliciting 25% effect in the MTT assay); EC₅₀ (concentration eliciting 50% effect in the MTT assay); EC₇₅ (concentration eliciting 75% effect in the MTT assay); FIP (fipronil); GLY (glyphosate); IMI (imidacloprid).

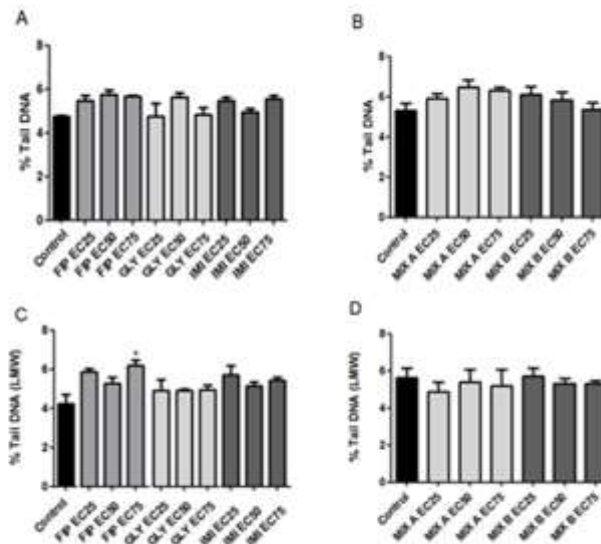


Figure 7. Comet and low molecular weight (LMW) DNA diffusion assays in HepG2 cells after 48h incubation with each pesticide individually (A, C) and in mixtures (B, D), at 37°C. In Mix A the three pesticides were combined in proportion to their EC₅₀ values (assessed by the MTT assay); in Mix B the individual pesticides were mixed in proportion to their Acceptable Daily Intake (ADI). Results are expressed as mean ± SEM. Three independent experiments were performed (duplicates for each concentration within each experiment). Statistical comparisons were made using ANOVA/Bonferroni *post hoc* test (**p*<0.05 vs. control). EC₂₅ (concentration eliciting 25% effect in the MTT assay); EC₅₀ (concentration eliciting 50% effect in the MTT assay); EC₇₅ (concentration eliciting 75% effect in the MTT assay); FIP (fipronil); GLY (glyphosate); IMI (imidacloprid).

Table 1. Parameters derived from the asymmetric Logit fits for pesticides tested individually and in combination.

	Estimated parameters			EC ₅₀ (mM)	Relative proportion (%)	
	θ_1^a	θ_2^b	θ_{max}^c		Mix A	Mix B
Fipronil	-	2,87E+00	1,11E+02	3,75E+01	5,07E-	2,17E-
Glyphosate	-	1,12E+01	9,92E+01	4,11E+01	5,54E-	4,56E-
Imidacloprid	-	2,27E+00	1,32E+02	6,63E+02	8,94E-	5,42E-
Mix A	-	2,69E+00	1,23E+02	1,36E+02	100	-
Mix B	-	4,77E+00	1,43E+02	6,58E+01	-	100

Concentration–response data from the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay in HepG2 cells, after 48-h incubations, at 37°C.

^aLocation parameter of the Logit function

^bSlope parameter

^cMaximal effect, expressed as corrected % cell death

DISCUSSÃO

A utilização de agrotóxicos é uma tecnologia inerente ao processo da monocultura agrícola em larga escala e, ainda que existam legislações para utilização segura, a fiscalização normalmente é precária e pode determinar danos à saúde do trabalhador, população e meio ambiente. Os danos à saúde podem ser ainda mais graves pela combinação na utilização dos agrotóxicos, normalmente duas classes são utilizadas juntas, sendo elas herbicidas e inseticidas (LARA et al., 2019). A intoxicação aguda normalmente induz efeitos colaterais aos trabalhadores rurais, entretanto intoxicações subagudas e crônicas podem ser decorrentes da exposição diária a pequenas concentrações de agrotóxicos e podem atingir além dos trabalhadores rurais a população em geral, apresentando sintomas inespecíficos e tendo como principal causa à exposição a múltiplos agrotóxicos. A comercialização de diversos agrotóxicos, como o glifosato, teve um crescimento exacerbado através da monocultura de soja transgênica que foi modificada geneticamente para receber uma maior quantidade deste agrotóxico, expondo a população através consumo deste grão e de seus derivados.

A utilização dos agrotóxicos em larga escala pode causar efeitos drásticos e indesejáveis em organismos não alvo como os seres humanos. Danos hepáticos podem ser consequência da exposição aos agrotóxicos, pois o fígado torna-se o principal órgão envolvido na biotransformação destes compostos químicos. Quando ocorre a exposição aos agrotóxicos o fígado para de exercer suas funções vitais para metabolizar a substância química, assim, a homeostasia de nutrientes, a formação e secreção da bile e síntese de proteínas são interrompidas, causando efeitos prejudiciais consideráveis ao organismo humano. A biotransformação, dos compostos químicos ocorre para que as substâncias tóxicas sejam inativadas e excretadas pelo organismo. Entretanto os metabólitos formados por ela podem ser mais tóxicos do que o composto de origem e desencadear mecanismo de hepatotoxicidade, como os agrotóxicos Pentaclorofenol e Paraquat (ABDEL-MISIH; BLOOMSTON, 2010). Nesta dissertação, foi utilizada a linhagem celular humana HepG2 como modelo *in vitro* para avaliar a ação citotóxica de duas classes de agrotóxicos, um herbicida e dois inseticidas, isolados e em misturas, após 48 horas de exposição. Foram utilizadas formulações comerciais dos agrotóxicos fipronil, glifosato e imidacloprido, que não possuem 100% de pureza, entretanto melhor representam a real exposição das populações, seja ocupacional, ambiental, ou

através da dieta. Os agrotóxicos isolados apresentaram citotoxicidade às células HepG2 após 48 de incubação, o fipronil foi o composto que apresentou maior potência, com EC₅₀ de 37,59 mg/L, o glifosato apresentou um valor de EC₅₀ de 41,10 mg/L, enquanto o agrotóxico imidacloprido foi o que apresentou menor potência, com EC₅₀ de 663,66 mg/L. As curvas de concentração-efeito foram obtidas através do ensaio de redução MTT, e foram confirmadas pelo ensaio de captação do vermelho neutro, dois ensaios que avaliam a citotoxicidade através de dano mitocondrial e dano lisossomal, respectivamente.

A citotoxicidade do glifosato em células hepáticas foi previamente avaliada, com efeitos citotóxicos aparecendo em concentrações maiores de 10 mg/L após 48 horas de exposição (GASNIER et al., 2009), estando em acordo com os dados obtidos neste trabalho. Em células RTL-W1, oriundas de fígado de *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris), o glifosato grau técnico e a formulação comercial Roundup® apresentaram citotoxicidade em concentrações superiores a 250 mg/L e 200 mg/L, respectivamente. Os valores de EC₅₀ obtidos para o ensaio de redução do MTT foram 700 mg/L e 710 mg/L (SANTOS et al., 2019). Em células HepG2, incubadas por 24 h com glifosato grau técnico não houve diminuição significativa na viabilidade celular, nem na maior concentração testada, correspondendo a 3.200 µg/mL. Entretanto, quando adicionados formulações comerciais, a viabilidade diminuiu de forma concentração-dependente (HAO et al., 2019).

O principal mecanismo de ação do imidacloprido nas células é causar danos às mitocôndrias afetando a capacidade metabólica e conseqüentemente levando a morte celular. O imidacloprido de grau técnico apresentou citotoxicidade para a linhagem celular HepG2 em concentrações superiores a 500 µM (aproximadamente 1278 mg/L) de forma concentração-dependente após 48 horas de incubação (GUIMARÃES, 2020). Nesta concentração, a formulação comercial do imidacloprido utilizada em nosso estudo (Rotam® 60% de pureza, 600g/L) já diminuiu a viabilidade celular em mais de 95% no mesmo período de incubação. Já a formulação comercial Bayer S/A (concentração de 480g/L) demonstrou citotoxicidade nas células HepG2 somente em concentrações superiores a 3600mg/L em 24 horas de incubação (BIANCHI et al., 2014). A concentração necessária para que a formulação da Bayer S/A cause citotoxicidade em 48 horas de incubação seria de aproximadamente 1800mg/L, em comparação ao nosso estudo nesta concentração a formulação da

Rotam® poderia ter afetado a viabilidade celular em 100%. Curiosamente, Bizerra et al., 2020 demonstrou que o imidacloprido, em concentração de 3,0 mM (aproximadamente 767 mg/L), não afetou a viabilidade celular de hepatócitos isolados de ratos. Entretanto, a mesma concentração de imidacloprido diminuiu a viabilidade celular de hepatócitos isolados dos ratos previamente tratados com dexametasona. A biotransformação do imidacloprido é mediada pelo citocromo P450 que, quando em presença da dexametasona, tem a biotransformação do imidacloprido induzida, causando maior citotoxicidade sendo um fator importante que está diretamente relacionada com a toxicidade em tempos maiores de incubação (COSTA et al., 2009; BIZERRA et al., 2020).

Não há muitos relatos na literatura sobre a exposição das células HepG2 ao fipronil, porém Das et al., (2006) avaliou a citotoxicidade deste agrotóxico através do ensaio exclusão do azul de tripan em 48 horas de incubação. As células HepG2 foram sensíveis a este agrotóxico em uma concentração de 50 µM (aproximadamente 21,85 mg/L) apresentando aproximadamente 25% de citotoxicidade, estando de acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, onde essa citotoxicidade seria descrita em 18,79 mg/L. O resultado do EC₅₀ deste estudo também corrobora com nossas descrições.

Avaliando os dados de toxicidade das formulações comerciais e dos agrotóxicos de grau técnico, descritos em diversos modelos, podemos concluir que o uso de formulações comerciais tende a apresentar maior toxicidade que o princípio ativo do agrotóxico isoladamente. Este fato ocorre devido a presença de outros constituintes nas formulações, chamados nos rótulos como “ingredientes inertes”, que normalmente são surfactantes e promotores de absorção que potencializam o efeito tóxico dos agrotóxicos, evidenciando que os riscos a saúde humana podem ser mais sérios já que os agrotóxicos aplicados na agricultura são formulações comerciais (HAO et al., 2019).

A toxicidade destes três agrotóxicos também foi avaliada em outro modelo experimental, o zebrafish. O fipronil altera os padrões de atividade do peixe, induz comportamento ansiolítico em larvas de zebrafish e induz a deformidades locomotoras (CHAUTET et al., 2019). Além de atuar em diversas vias metabólicas, podendo ser um potencial desregulador de neurotransmissores como a glicina, que

atua no sistema nervoso central, principalmente na medula espinal (WANG et al., 2016). O glifosato atua como desregulador endócrino do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e inibidor da acetilcolinesterase em cérebro e músculo de diferentes organismos aquáticos, efeito relacionado com o aumentando da hiperatividade em zebrafish (ANNETT et al., 2014; KOAKOSK et al., 2014). Isoladamente, o imidacloprido apresentou baixa toxicidade em organismos aquáticos como no zebrafish (CHANG et al., 2020), entretanto quando combinado a outros agrotóxicos, produziu efeitos agudos.

O uso de agrotóxicos em misturas é uma prática frequente e, normalmente, os efeitos combinados de toxicidade não são avaliados. No presente estudo utilizamos dois modelos matemáticos, CA e AI, para prever os possíveis efeitos aditivos da utilização combinada dos agrotóxicos fipronil, glifosato e imidacloprido em duas misturas. No Mix A, todos os compostos estavam em concentrações equivalentes aos valores de EC_{50} de cada agrotóxico, previamente determinados no ensaio de redução MTT. O Mix B foi formulado a partir dos valores de ingestão diária aceitável (IDA) de cada agrotóxico, preconizadas pela ANVISA, simulando a exposição a pequenas concentrações através da alimentação. Quando comparadas aos modelos matemáticos, ambas as misturas apresentaram efeito sinérgico entre os três agrotóxicos. No efeito sinérgico, o efeito da mistura é maior que a soma dos efeitos de cada agrotóxico isoladamente. Observamos que nos níveis de IDA os agrotóxicos isoladamente não apresentaram toxicidade nas células HepG2, entretanto o efeito combinado mostrou-se tóxico, justificando a necessidade avaliação toxicológica de misturas.

Os estudos dos efeitos tóxicos dos agrotóxicos em misturas têm se concentrado em avaliar efeitos ecotoxicológicos e de bioacumulação, devido à presença constante destes produtos em águas superficiais, como lagoas e rios. Chang et al. (2020) avaliaram a toxicidade dos agrotóxicos imidacloprido (inseticida), acetoclor (herbicida) e tebuconazol (fungicida) em misturas no modelo zebrafish e, descreveram sinergismo entre os três agrotóxicos quando o herbicida e o fungicida estavam em concentrações maiores em comparação ao inseticida na mistura. Efeitos de antagonismo também foram observados em misturas com concentrações maiores de imidacloprido. O fipronil e glifosato, já foram avaliados em mistura no modelo experimental zebrafish. Curiosamente, os efeitos causados aos peixes pela

exposição combinada foram semelhantes na exposição individual, não apresentando efeitos aditivos no modelo (CHAULET et al., 2019). Entretanto efeitos sinérgicos já foram descritos no modelo *Cnesterodon decemmaculatus* (peixe de água doce da família Poeciliidae) exposto a misturas de glifosato e clorpirifós (inseticida organofosforados) em formulações comerciais (BONIFACIO et al., 2016). O arsênio (As) é um metal tóxico, cancerígeno, bioacumulável, e utilizado como aditivo das formulações comerciais de agrotóxicos que potencializou o efeito do imidacloprido e seu sinergismo com o glifosato também foi relatado no modelo de girinos *Rhinella arenarum* (sapo-de-areia família Bufonidae) (LAJMANOVICH et al., 2019). Mahajan et al., (2018) avaliaram a toxicidade combinada de imidacloprido e arsênio (As) em ratos Wistar após 28 dias de exposição aos compostos e concluíram que o As pode potencializar o efeito hepatotóxico do imidacloprido em ratos. Entretanto, diferentemente do nosso trabalho, estes estudos não utilizaram modelos matemáticos para prever os efeitos aditivos.

Entre os mecanismos relacionados à toxicidade causada pelos agrotóxicos, a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) na linhagem celular HepG2 foi avaliada. Mesmo sendo um processo natural do organismo, a produção de espécies reativas em excesso gera um desequilíbrio na homeostase celular levando a danos e morte celular. O imidacloprido provocou dano oxidativo nos tecidos cerebrais de ratos em doses de 1 mg/kg por via oral. Este efeito foi evidenciado pelos altos níveis de proteínas carboniladas, 8-hidroxi-guanosina e malondialdeído e redução da capacidade antioxidante total (ABD-ELHAKIM et al., 2018). Kaluba et al. (2017) avaliaram a produção de ROS e RNS em células HepG2 incubadas com glifosato, concluindo que não houve aumento nos níveis de espécies reativas após 24h de incubação. A produção de ROS com 100 µM de fipronil foi demonstrada na linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (KI et al., 2012). Em nosso estudo, avaliamos a produção de ROS e RNS de cada agrotóxico isoladamente e nas misturas Mix A e Mix B em células HepG2. Sob as nossas condições experimentais, tanto os agrotóxicos isolados como em misturas não aumentaram os níveis de ROS e RNS, provavelmente, as espécies que foram produzidas durante às 48 horas de exposição podem ter sido removidas com eficiência pelo sistema antioxidante das células HepG2.

Indicações de lesão celular também podem ser avaliadas pela despolarização

mitocondrial, uma vez que o colapso do potencial de membrana mitocondrial compromete a energia e, conseqüentemente, causa danos à integridade da célula (BERTOLAMI, 2005). Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de xenobióticos. Os efeitos tóxicos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e indiretos, levando a disfunções mitocondriais (PEREIRA et al., 2012). A diminuição no potencial de membrana mitocondrial gerada pelos agrotóxicos fipronil e glifosato, assim como pelo Mix A, afetou o comprometimento celular interferindo na síntese de ATP e conseqüentemente na homeostase celular, explicando o meio pelos quais estes agrotóxicos e a mistura afetaram a capacidade metabólica das células gerando diminuição da viabilidade celular.

Outro parâmetro analisado em nosso estudo foi atividade das enzimas hepáticas AST (aspartato aminotransferase ou TGO), ALT (alanina aminotransferase ou TGP), FAL (fosfatase alcalina) e LDH (desidrogenase láctica), sendo estas enzimas marcadores de função hepática. A AST promove a catálise de transaminação reversível de aspartato e 2-cetoglutarato em oxalacetato e glutamato, tendo como cofator piridoxal-fosfato e, cerca de 80% da enzima está presente na mitocôndria. Os valores aumentados de AST indicam que ocorreu dano maior a nível mitocondrial, como observado para o fipronil e glifosato e as misturas, e corroborado pela despolarização mitocondrial induzida por estes agrotóxicos. A ALT catalisa a reação de transaminação reversível de alanina e 2-cetoglutarato em piruvato e glutamato, utilizando como cofator o piridoxal-fosfato e é encontrada principalmente no citoplasma. Níveis elevados de ALT indicam danos mais leves, ocorridos a nível citoplasmático, como observado também para o fipronil e glifosato. Níveis mais elevados de AST aumentam a relação AST/ALT indicando danos graves, entretanto, em nosso estudo, a relação AST/ALT não indicou danos graves nas concentrações estudadas. A FAL promove a hidrólise de ésteres do ácido fosfórico sob condições alcalinas, tendo um pH de ótima atividade *in vitro* em torno de 10, existindo isoenzimas de FAL na membrana celular de vários tecidos, está localizada na membrana de revestimento dos canalículos biliares, estando aumentada em desordens do trato biliar. O aumento da atividade da FAL observado para o fipronil, glifosato e Mix A pode indicar um possível início de desordem biliar. A LDH é a enzima de transferência de hidrogênio que catalisa a oxidação do L-lactato a

piruvato com a mediação de NAD^+ como receptor de hidrogênio (MOTTA, 2009; TELLI et al., 2016). Alterações de LDH estão associadas a grande destruição tecidual, em nosso estudo, não houve alteração significativa para esta enzima, evidenciando que o dano celular não foi extenso.

Em relação à genotoxicidade, avaliada pelo ensaio cometa, não encontramos resultados significativos entre a exposição aos agrotóxicos isolados e os testes utilizando as misturas. Danos ao DNA podem ser causados por agentes químicos que danificam a informação genética das células, podendo gerar mutações e levar ao desenvolvimento de câncer. Estes danos podem ser permanentes e transmitidos às gerações futuras. Os possíveis efeitos genotóxicos causados pelo glifosato são frequentemente estudados, principalmente as formulações comerciais como o Roundup® que é descrito como um produto potencialmente genotóxico (HAO et al., 2019). Na literatura, o glifosato tem sido ligado ao surgimento de linfoma não-Hodgkin (ZHANG et al., 2019). Após 48 horas de incubação não encontramos danos ao DNA causados pelo glifosato e, com a mesma linhagem celular o glifosato (padrão 100%, Pestanal®) em concentrações de 0,0005; 0,00291 e 0,00350 g/L não causou dano ao DNA após 4 e 24 h de incubação no estudo de KALUBA et al., (2017). Estudos avaliando a toxicidade endócrina relatam que o glifosato pode gerar efeitos tóxicos no sistema endócrino de mamíferos, entretanto o período de incubação pode ser longo. Estes efeitos podem ocorrer após muitos anos de exposição, sugerindo que em períodos mais longos de exposição o glifosato também possa causar danos ao DNA (RICHARD et al., 2005; BENACHOUR et al., 2007). O imidacloprido apresentou danos ao DNA em células HepG2, que foi relacionado aos aditivos presentes na formulação comercial, metabólitos formados durante biotransformação e sua possível atuação como agente quelante (BIANCHI et al., 2015). Em outro estudo, o imidacloprido apresentou dano ao DNA em células HepG2 após 24 e 48 horas de incubação, apenas para concentrações superiores a 3600 mg/L, entretanto para este estudo o imidacloprido utilizado apresentava 100% de pureza (SENYILDIZ et al., 2018). As informações sobre o potencial genotóxico do fipronil ainda são limitadas e os mecanismos pelo qual ele causa danos ao DNA não são descritos claramente. Apesar disso, foram observados danos ao DNA em sangue periférico humano após 72 h de incubação de fipronil nas concentrações de 0,7; 0,3 e 0,1 mg/L (ÇELIK et al., 2014). Também foi observado dano ao DNA em

células sanguíneas de peixes (*Rhamdia quelen*) após 30 dias de exposição a 0,05 e 0,23 µg/l de fipronil (GHISI et al., 2010).

CONCLUSÃO

- As células HepG2 foram sensíveis aos agrotóxicos fipronil, glifosato e imidacloprido após 48h de incubação;
- Observou-se efeito sinérgico entre os três agrotóxicos nas misturas estudadas, que é maior que a soma dos efeitos individuais de cada agrotóxico;
- Não houve produção de radicais livres pelos agrotóxicos isolados e pelas misturas;
- Fipronil e glifosato e mistura dos três agrotóxicos causaram alteração no potencial de membrana mitocondrial, indicando uma despolarização mitocondrial;
- Alterações nas enzimas hepáticas AST, ALT e FAL foram observados após incubação das células HepG2 com os agrotóxicos;
- É necessário que os efeitos de toxicidade combinada sejam avaliados a fim de predizer os verdadeiros perigos à saúde humana na exposição ocupacional e através da dieta a estes agrotóxicos.

Referências Bibliográficas

ABD-ELHAKIM, Y. et al. Imidacloprid impacts on neurobehavioral performance, oxidative stress, and apoptotic events in the brain of adolescent and adult rats. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 66, p. 13513-13524, 2018.

ABDEL-MISIH, S.; BLOOMSTON, M. Liver Anatomy. **Surgical Clinics of North America**, v. 90, n. 4, p. 643-653, 2010.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. F43-Fipronil. **Monografias Autorizadas**. ANVISA, Brasilia, 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/F43+%E2%80%93Fipronil/cee42727-46ab-44a2-b88e-10ea4e8faab9>> Acesso em: 18 fev. 2020.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. G01-Glifosato. **Monografias Autorizadas**. ANVISA, Brasilia, 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/G01%2B%2BGlifosato.pdf/6a549ab8-990c-4c6b-b421-699e8f4b9ab4>> Acesso em: 18 fev. 2020.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. I13-Imidacloprido. **Monografias Autorizadas**. ANVISA, Brasilia, 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/I13+%E2%80%93Imidacloprido/9d08c7e5-8979-4ee9-b76c-1092899514d7>> Acesso em: 20 fev.2020.

AGOSTINI, L. P. et al. Effects of glyphosate exposure on human health: insights from epidemiological and in vitro studies: Insights from epidemiological and in vitro studies. **Science of the Total Environment**, v. 705, p. 135808-135879, 2020.

AL-BADRAN, A. A. et al. Effects of insecticides, fipronil and imidacloprid, on the growth, survival, and behavior of brown shrimp *Farfantepenaeus aztecus*. **Plos One**, v. 14, n. 10, p.1-20, 2019.

ALMEIDA, V. E. S. et al. Use of genetically modified crops and pesticides in Brazil: growing hazards. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p.3333-3339, 2017.

ALVAREZ-MOYA, C. et al. Comparison of the in vivo and in vitro genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 105-110, 2014.

AMIARD-TRIQUET, C et al. **Aquatic Ecotoxicology**: advancing tools for dealing with emerging risks. London, San Diego, Waltham, Oxford: Elsevier, 2015. 504 p.

ANDERSON, J.C. et al. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: A literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. **Science of the Total Environment**, v. 505, p. 409–422, 2015.

ANNETT, R. et al. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 458-479, 2014.

AZEVEDO-PEREIRA, H. et al. Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: Linking acetylcholinesterase activity to behaviour.

Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 74, n. 5, p. 1210-1215, 2011.

BENACHOUR, N. et al. Time- and Dose-Dependent Effects of Roundup on Human Embryonic and Placental Cells. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 126-133, 2007.

BERTOLAMI, M. C. Mecanismos de hepatotoxicidade. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, p. 133-141, 2005.

BIANCHI, J. et al. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p.174-183, 2015.

BIZERRA, P. F. et al. Enhanced cytotoxicity of imidacloprid by biotransformation in isolated hepatocytes and perfused rat liver. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 164, p. 183-190, 2020.

BOCCOLINI, P. M. M. et al. Non-Hodgkin lymphoma among Brazilian agricultural workers: A death certificate case-control study. **Archives of Environmental & Occupational Health**, v. 72, n. 3, p.139-144, 2016.

BONIFACIO, A. F. et al. Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. **Ecological Indicators**, v. 67, p. 88-97, 2016.

BURIGO, A. C. et al. A crise do paradigma do agronegócio e as lutas pela agroecologia. In: CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BURIGO, A. C. (Org.). **Dossiê Abrasco**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. Parte 4.

CASTRO, V.I. Uso de Misturas de Agrotóxicos na Agricultura e Suas Implicações Toxicológicas na Saúde. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 4, n. 1-3, p.87-94, 2009.

CARGNIN, M. C. S. Fumicultura: uso de equipamento de proteção individual e intoxicação por agrotóxico. Rev. Pesq.: Cuidado Fund. Online. [internet]. 2017 [acesso em 05 de abril de 2020]; 9(2):466-472. Disponível em: <http://www.seer.unirio.br/index.php/cuidadofundamental/article/view/5444>

CARNEIRO, F. F. et al. Dossiê da ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO, 30 abril de 2012.1ª. Parte, 98p.
CARSON, R. Primavera Silenciosa. São Paulo, Gaia Editora, 2010, 328p

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W. A; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; PINHEIRO, A. R. O.; FARIA, N. M. X.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. Segurança alimentar e nutricional e saúde. In: CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BURIGO, A. C. (Org.).

Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 71 2015. Parte 1.

CHANG, Y. et al. Combined toxicity of imidacloprid, acetochlor, and tebuconazole to zebrafish (*Danio rerio*): acute toxicity and hepatotoxicity assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 10, p.10286-10295, 2020.

CELIK, A. et al. In vitro genotoxicity of fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test, and comet assay. **DNA and Cell Biology**, v. 33, p. 148–154, 2014.

CHAULET, F. C. et al. Glyphosate- and fipronil-based agrochemicals and their mixtures change zebrafish behavior. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, n. 3, p. 443-451, 12 jun. 2019.

COSTA, C. et al. Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 672, p. 40-44, 2009.

DAS, P. C. et al. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 164, n. 3, p. 200-214, 2006.

DILL, G. M. et al. Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. **Glyphosate Resistance in Crops and Weeds**, p. 1-33, 2010.

DEMSIA, G. et al. Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. **Mutation Research/genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 634, n. 1-2, p.32-39, 2007.

EMBRAPA – Agência Embrapa de Informação Tecnológica. [Home page]. **Agrotóxicos no Brasil**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acessado em 10 de abril 2020.

EMBRAPA - Agência de Informação Embrapa. [Home page]. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/historia>>. Acessado em 10 de abril 2020.

FORTES, C. et al. Occupational exposure to pesticides with occupational sun exposure increases the risk for cutaneous melanoma. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 58, n. 4, p.370-375, 2016.

GASNIER, C. et al. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 184-191, 2009.

GEORGE, J.; SHUKLA, Y. Emptying of intracellular calcium pool and oxidative stress imbalance are associated with the glyphosate-induced proliferation in human skin keratinocytes HaCaT cells. **Isrn Dermatology**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

GIBBONS, D. et al. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and

fipronil on vertebrate wildlife. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 103–118. 2015.

GHISI, N. C. et al. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, n. 1-4, p. 589-599, 2010.

GOULSON, D. Review: an overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, p. 977–87, 2013.

GUIMARÃES, A. R. J. S. **Citotoxicidade induzida pelo inseticida imidacloprido em células HepG2**. 2020. 54 f. Tese - Curso de Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Universidade Estadual Paulista, Dracena São Paulo, 2020.

HAINZL, D.; CASIDA, J. E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 23, p.12764-12767, 1996.

HAINZL, D. Et al. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, n. 12, p. 1529-1535, 1998.

HAO, Y. et al. Evaluation of the cytotoxic effects of glyphosate herbicides in human liver, lung, and nerve. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 54, n. 9, p.737-744, 2019.

HEU, C. et al. Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a peak force tapping study on living cells. **Journal of Structural Biology**, v. 178, n. 1, p. 1-7, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2012.02.007>

JESCHKE, P.; NAUEN, R. Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry. **Pest Management Science**, Hoboken, v. 64, n. 11, p. 1084-1098. 2008.

JESCHKE P. et al. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p.2897-2908, 2011.

KALUBA, V. et al. Effects of low doses of glyphosate on DNA damage, cell proliferation and oxidative stress in the HepG2 cell line. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 23, p. 19267-19281, 2017.

KARTHEEK, R.M.; DAVID, M. Assessment of fipronil toxicity on wistar rats: A hepatotoxic perspective. **Toxicology Reports**, v. 5, p.448-456, 2018.

KAHL, V. F. S. et al. Influence of exposure to pesticides on telomere length in tobacco farmers: a biology system approach: A biology system approach. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 791-792, p. 19-26, 2016.

KI, Y. et al. Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce

apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to fipronil. **Toxicology Letters**, v. 211, n. 1, p. 18-28, 2012.

KIM, J. et al. Effect of prohibiting the use of Paraquat on pesticide-associated mortality. **BMC Public Health**, v. 17, n. 1, p.1-11, 2017.

KINGSLEY, K. C. Acute toxicity of copper hydroxide and glyphosate mixture in *Clarias gariepinus*: interaction and prediction using mixture assessment models: interaction and prediction using mixture assessment models. **Environmental Health and Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 1-8, 2019.

KRAWCZYK N. et al. Suicide mortality among agricultural workers in a region with intensive tobacco farming and use of pesticides in Brazil. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 56, n. 9, p.993-1000, 2014.

KWIATKOWSKA, M. P. et al. The impact of glyphosate, its metabolites and impurities on viability, ATP level and morphological changes in human peripheral blood mononuclear cells. **PLoS ONE**, v.11, n.6, p. 1–13, 2016.

KOAKOSKI, G. et al. Agrichemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish. **Chemosphere**, v. 112, p. 85-91, 2014.

LAJMANOVICH, R. C. et al. First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. **Heliyon**, v. 5, n. 10, p.1-11, 2019.

LANDRIGAN, P. J.; BELPOGGI, F. The need for independent research on the health effects of glyphosate-based herbicides. **Environmental Health**, v. 17, n. 1, p.1-4, 2018.

LARA, S. S. et al. A agricultura do agronegócio e sua relação com a intoxicação aguda por agrotóxicos no Brasil. **Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 15, n. 32, p. 1-19, 2019.

LEQHAIT, J. et al. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**, v. 255, p. 38–44, 2009.

LIU, W. et al. Phospholipid imaging of zebrafish exposed to fipronil using atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Talanta**, v. 209, p.120357-120377, 2020.

LV, Y. et al. Imidacloprid-induced liver fibrosis in quails via activation of the TGF- β 1/Smad pathway. **Science of the Total Environment**, v. 705, p. 135915-135925, 2020.

MAHAJAN, L. et a. Toxic effects of imidacloprid combined with arsenic: oxidative stress in rat liver: Oxidative stress in rat liver. **Toxicology and Industrial Health**, v. 34, n. 10, p. 726-735, 2018.

MAÑAS, F. et al. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 37-41, 2009.

MATIAS, Ricardo Soares. **Pragas e eventos: como agem os inseticidas nos insetos?** 2020. Disponível em: <https://www.pragaseeventos.com.br/saude-ambiental/como-agem-os-inseticidas-nos-insetos/>. Acesso em: 15 abr. 2020.

MYERS, J.P. et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement: a consensus statement. **Environmental Health**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2016

MOSSA, A. et al. Sub-chronic exposure to fipronil induced oxidative stress, biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of male albino rats. **Toxicology Reports**, v. 2, p.775-784, 2015.

MEDEIROS, H.C.D. et al. Effect of fipronil on energy metabolism in the perfused rat liver. **Toxicology Letters**, v. 236, p. 34–42, 2015.

MESNAGE, R. et al. Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p.30-42, 2017.

MOTTA, V. T. *Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações*. 5ª ed. São Paulo: Robe, 2009.

MOTOJYUKU, M. T. et al. Determination of glyphosate, glyphosate metabolites, and glufosinate in human serum by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 875, n. 2, p. 509-514, 2008.

OLIVEIRA, P.R. et al. Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, p. 569– 573, 2012.

PEREIRA, L. C. et al. Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico, **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 25, p. 1-14, 2012.

PIGNATI, W. A et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p.3281-3293, 2017.

RABY, M. et al. Chronic effects of an environmentally-relevant, short-term neonicotinoid insecticide pulse on four aquatic invertebrates. **Science of the Total Environment**, v. 639, p.1543-1552, 2018.

RICHARD, S. et al. Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 716-720, 2005.

RICUPERO, M. et al. Target and non-target impact of systemic insecticides on a polyphagous aphid pest and its parasitoid. **Chemosphere**, v. 247, p.125728-125761,

2020.

RIGOTTO, R. M.; PORTO, M. F. S.; FOLGADO, C. A. R.; FARIA, N. M. X.; AUGUSTO, L. G. S.; BEDOR, C. N. G.; BURIGO, A. C.; CARNEIRO, F. F.; CASTRO, F. P.; FERNANDES, G. B.; FERREIRA, M. J. M.; FRIEDRICH, K.; MARINHO, A. M. C. P.; MONTEIRO, D.; PIGNATI, W. A.; PINHEIRO, T. M. M.; PINHEIRO, A. R. O.; SILVA, N. R.; TYGEL, A. Conhecimento científico e popular: construindo a ecologia de saberes. In: CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BURIGO, A. C. (Org.). **Dossiê Abrasco**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. Parte 3.

SANTOS, S. W. et al. A glyphosate-based herbicide induces sub-lethal effects in early life stages and liver cell line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquatic Toxicology**, v. 216, p. 105291-105300, 2019.

SAYED, A. A. et al. Garlic and allopurinol attenuate hepatic apoptosis induced by fipronil in male albino rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 107, p.1-9, 2019.

SIGRH: Sistema de Informações para o Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo, 2005. Relatório de Situação dos Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Alto Paranapanema-Relatório 1. Uso de Agrotóxicos na Agricultura. Available at: http://www.sigrh.sp.gov.br/sigrh/ARQS/RELATORIO/CRH/CBHALPA/1121/uso_de_agrototoxicos_na_agricultura.html

ŞENYILDIZ, M. et al. Investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of widely used neonicotinoid insecticides in HepG2 and SH-SY5Y cells. **Toxicology and Industrial Health**, v. 34, n. 6, p.375-383, 2018.

SIMON-DELISO, N. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p.5-34, 2014.

SILVA, D. D. et al. The risky cocktail: what combination effects can we expect between ecstasy and other amphetamines? **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 1, p. 111-122, 2012.

SZEKACS, A.; DARVAS, B. Forty Years with Glyphosate. **Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds**, p. 247-284, 2012.

TAVARES, M.A. et al. Comparative effects of fipronil and its metabolites sulfone and desulfinyl on the isolated rat liver mitochondria. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 206–214, 2015.

TELLI, E. M. R. P. et al. Evaluation of hepatic enzyme activity in dependent, ex-dependent and non-users of ethanol. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, p. 1-5, 2016.

UNEME, H. Chemistry of clothianidin and related compounds. **Journal of**

Agricultural and Food Chemistry, v. 59, p. 2932-2937. 2011.

VAN BRUGGEN, A. H. C. et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of the Total Environment**, v. 616-617, p.255-268, 2018.

VIGFUSSON, N. V, E. R. V. The Effect of the Pesticides, dexton, captan and Roundup, on sister-chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro. **Mutation Research - Genetic Toxicology**, v. 79, p. 53–57, 1980.

VOHRA, P. et al. Physiological, biochemical and histological alterations induced by administration of imidacloprid in female albino rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 110, p. 50-56, 2014.

WANG, C. et al. A metabolomic study of fipronil for the anxiety-like behavior in zebrafish larvae at environmentally relevant levels. **Environmental Pollution**, v. 211, p. 252-258, 2016.

WILLIAMS, G. M. M. et al. A review of the carcinogenic potential of glyphosate by four independent expert panels and comparison to the IARC assessment. **Critical Reviews In Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 3-20, 2016

XU, H. et al. Fipronil-induced toxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) larvae by using digital gene expression profiling. **Science of the Total Environment**, v. 639, p.550-559, 2018.

ZHANG, L. et al. Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis and supporting evidence.: A meta-analysis and supporting evidence. **Mutation Research/reviews In Mutation Research**, v. 781, p. 186-206, 2019.