



Avaliação do efeito citotóxico e mutagênico do Gramocil® em células de mamíferos e de anfíbios

Evaluation of the cytotoxic and mutagenic effect of Gramocil® in mammalian and amphibian cells

Kayani Dal Pra Rosa¹, Anna Karolina Gomes Oliveira², Patricia Aline Bressiani³, Elisangela Dusman⁴, Eduardo Michel Vieira Gomes⁵

RESUMO

Os pesticidas são amplamente utilizados nas práticas agrícolas atuais. O Paraquat é um herbicida utilizado para combater as ervas daninhas, entretanto, teve seu uso proibido em diversos países devido à sua extrema toxicidade para a saúde humana. Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar a linhagem de células de fígado humano (HuH7.5) e os girinos de rã touro (*Lithobates catesbeianus*) para avaliar a citotoxicidade e a mutagenicidade do agroquímico Paraquat (Gramocil®), através do teste do MTT (por 24, 48 e 72 horas) e do teste do micronúcleo (14 dias de exposição). Foram avaliadas as concentrações de 0,005%, 0,01% e 0,025% de Gramocil® diluídas em água destilada estéril. Os resultados do teste do MTT com as células HuH7.5 mostraram baixa viabilidade celular em todas as concentrações (0,01%, 0,025% e 0,05%) e tempos (24h, 48h e 72h), sendo citotóxico para as células humanas avaliadas. Para os girinos foi observada mortalidade de 100% dos organismos após 72 horas de exposição às diferentes concentrações do agroquímico. Os dados sugerem que o Gramocil® possui um alto potencial de contaminação ambiental com capacidade de afetar a biodiversidade aquática.

PALAVRAS-CHAVE: bioindicadores; micronúcleo; mortalidade; MTT.

ABSTRACT

Pesticides are widely used in today's agricultural practices. Paraquat is a herbicide used to combat organic weeds, however, its use has been banned in several countries due to its extreme toxicity to human health. Then, the objective of this work was to use a cell line from human liver (HuH7.5) and bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) to evaluate the cytotoxicity and mutagenicity of the agrochemical Paraquat (Gramocil®), through the MTT test (by 24, 48 and 72 hours) and the micronucleus test (14 days of exposure). Concentrations of 0.005%, 0.01% and 0.025% of Gramocil® diluted in sterile distilled water were evaluated. The results of the MTT test with HuH7.5 cells showed low cell specifications at all concentrations (0.01%, 0.025% and 0.05%) and times (24h, 48h and 72h), being cytotoxic to human cells evaluated. For tadpoles, 100% mortality of organisms was observed after 72 hours of exposure to different concentrations of the

¹Voluntária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: kayanirosa@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 6830828239898329.

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: annoli@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 2077709013393753.

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: pbressiani@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 6244294104014856.

⁴ Docente no Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: edusman@utfpr.edu.br. ID Lattes: 08342282115894459.

⁵ Docente no Departamento Acadêmico de Física, Estatística e Matemática. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: eduardogomes@utfpr.edu.br. ID Lattes: 7293677011271209.



agrochemical. The data suggests that Gramocil® has a high potential for environmental contamination with the capacity to affect aquatic biodiversity.

KEYWORDS: bioindicators; micronucleus; mortality; MTT.

INTRODUÇÃO

Os pesticidas são amplamente utilizados nas práticas agrícolas atuais (SINGH *et al.*, 2020), porém, apenas 0,1% da quantidade de agroquímicos aplicados atinge os organismos alvo, enquanto mais de 95% afeta organismos não alvo (MEENA *et al.*, 2020).

O Paraquat (Gramocil®) tem seu uso proibido na Europa desde 2007 devido à sua extrema toxicidade para a saúde humana (PIZZUTTI *et al.*, 2016) e desde setembro de 2020 também foi proibido no Brasil (BRASIL, 2020).

Para avaliar a segurança dos agroquímicos, diferentes bioindicadores e biomarcadores podem ser utilizados. O método colorimétrico baseado na redução de sais de tetrazólio, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), é um teste quantitativo utilizado em diferentes linhagens celulares para avaliar o efeito citotóxico de diferentes compostos (MOSMANN, 1983).

Os anfíbios são frequentemente utilizados como indicadores biológicos do estado de saúde ambiental devido a sua pele fina e porosa e por residirem na interface sedimento-água, que é um local ideal para exposição a pesticidas (RIOS *et al.*, 2017). O teste do micronúcleo (MN) tem sido utilizado para verificar a possível existência de danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) decorrentes de impactos ambientais. Dessa forma, um aumento significativo destes danos em relação a uma amostra de controle pode fornecer informações das alterações ambientais num microhabitat (PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2015; FERNANDO *et al.*, 2016).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi utilizar a linhagem de células de fígado humano (HuH7.5) e os girinos de rã touro (*Lithobates catesbeianus*) para avaliar a citotoxicidade e a mutagenicidade do agroquímico Paraquat (Gramocil®), através do teste do MTT e do teste do micronúcleo.

METODOLOGIA

SOLUÇÃO TRATAMENTO

O agroquímico Gramocil® foi adquirido em comércio local. Foram preparadas suspensões nas concentrações de 0,005%, 0,01%, 0,025% de Gramocil® diluídas em água destilada estéril.

TESTE DE CITOTOXICIDADE COM CULTURA DE CÉLULAS

As células hepáticas (HuH7.5) foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo 10 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA) e incubadas em estufa tipo BOD a 37 °C com 5% de CO₂.

Para realizar o teste da atividade citotóxica foi utilizado o ensaio MTT, de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações. Foram utilizadas placas de cultivo de 96 poços onde, em cada poço, foram semeadas 1,0x10⁴ células HuH7.5. Após



24 horas, o meio de cultura de cada poço foi descartado e adicionou-se 100 µL de meio completo para os grupos: controle negativo (CO-) (meio de cultura), controle positivo (CO+) com o agente citotóxico metil metanossulfanato (MMS 500 µM) e os tratamentos com as concentrações de 0,01%, 0,025% e 0,05% do agroquímico. Antes do tratamento, as soluções de Gramocil® foram filtradas em millipore 0,22µm.

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas e, após esse tempo, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de meio de cultura não suplementado, acrescido de MTT (0,167 mg mL⁻¹). A placa foi incubada novamente por mais 4 horas e, na sequência, foi descartado o meio contendo MTT e aos poços foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em uma leitora de microplaca (Thermo Plate) a 492 nm.

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão das absorbâncias e submetidos à análise de variância (one way ANOVA), seguido do teste de Dunnet, com o uso do programa Action Stat. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados por meio da Equação 1.

$$VC = \left(\frac{ABS_T}{ABS_{CO-}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

- VC = Viabilidade celular [%];
- ABS_T = Absorbância do tratamento;
- ABS_{CO-} = Absorbância do controle negativo.

TESTE DE CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE EM GIRINOS DE *Lithobates catesbeianus*

O teste do micronúcleo com sangue de girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) seguiu a metodologia descrita por Gauthier et al. (2004) e Gonçalves et al. (2015), com modificações. Os girinos foram obtidos de uma fonte comercial, todos provenientes da mesma desova e na mesma fase de desenvolvimento (entre fases 26 a 39 de Gosner). Eles foram aclimatados em aquários contendo 5 litros de água mineral por 7 dias. Em seguida, foram separados em grupos de 5 girinos por aquário, juntamente com 5 litros das amostras de cada concentração do Gramocil® (0,01%, 0,025% e 0,05%). O grupo controle negativo foi realizado com 5 litros de água mineral. O projeto tem aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Protocolo 20.594.198-3).

Os girinos permaneceram por 14 dias nestas soluções controle e tratamento, a temperatura de 22±2°C, com aeração constante e foram alimentados com ração de peixe a cada 2 dias. A cada 48 horas os parâmetros pH, oxigênio dissolvido e temperatura, foram determinados das soluções controle e tratamento, por meio de uma sonda multiparâmetro portátil Horiba U-52, mantendo o meio adequado ao crescimento e desenvolvimento dos animais.

Após os 14 dias, os girinos foram anestesiados e eutanasiados, sendo retirado seu sangue caudal. As lâminas com o sangue foram analisadas determinando a frequência de

micronúcleos e outras alterações nucleares (células segmentadas, células binucleadas, células com broto e células reniforme) em 1000 eritrócitos para cada girino, usando o microscópio óptico de luz, com aumento da objetiva de imersão (100 X).

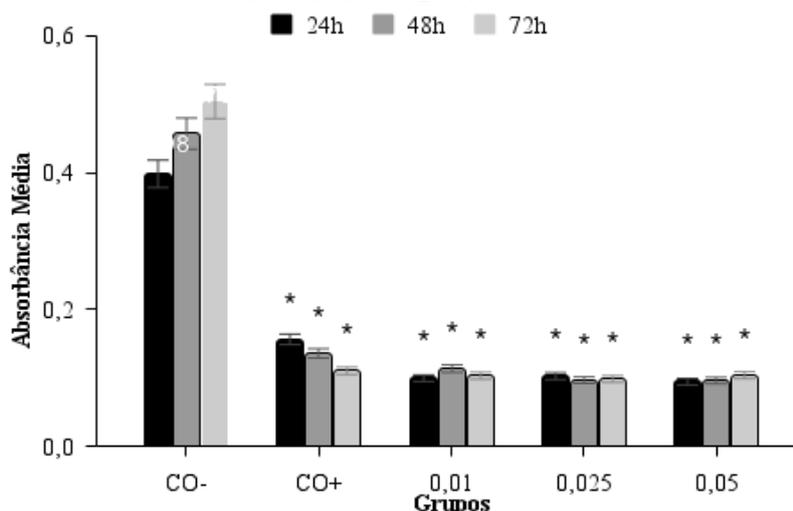
Os cálculos do número médio de micronúcleos, do percentual de micronúcleos, do número médio de alterações nucleares e do percentual de alterações nucleares de cada grupo controle foram realizados e tratados. A análise estatística foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$; $n=5$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CÉLULAS HuH7.5

Os dados das absorvâncias médias das diferentes concentrações do agroquímico Gramocil® estão representados na Figura 1. É possível observar que todas as concentrações (0,01, 0,025 e 0,05%) do agroquímico, nos diferentes tempos de avaliação (24, 48 e 72h), apresentaram absorvâncias médias estatisticamente menores que as do controle negativo e, assim, citotoxicidade. Inclusive, as viabilidades celulares foram menores que 26% (24 horas), 25% (48 horas) e 21% (72 horas).

Figura 1 - Absorvâncias médias de células hepáticas humanas tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações (%) do agroquímico Gramocil®.



CO-: Controle Negativo, CO+: Controle Positivo.

* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (CO-).

Fonte: Autoria própria (2023).

As viabilidades celulares foram evidentemente baixas e citotóxicas desde a menor concentração e o menor tempo de exposição (Tabela 1). Entretanto, ainda é possível observar redução da viabilidade celular com o aumento da concentração (de 0,01% para 0,05%) nos tempos de 24 e 48 horas. E redução da viabilidade com o tempo de exposição (de 24 para 72 horas) para todas as concentrações avaliadas. Os dados indicam que a citotoxicidade do Gramocil® para as células hepáticas humanas possui efeito dependente da dose e do tempo.

Tabela 1 - Percentuais das viabilidades celulares de células hepáticas tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações (%) do agroquímico Gramocil®.

Grupos	HuH7.5		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	39,20	29,67	21,84
0,01	25,00	24,79	20,45
0,025	25,69	21,13	19,50
0,05	23,68	20,96	20,55

CO-: Controle Negativo, CO+: Controle Positivo.
Fonte: Autoria própria (2023).

GIRINOS DE *Lithobates catesbeianus*

Os girinos expostos às diferentes concentrações do agroquímico Gramocil® (0,01%, 0,025% e 0,05%) apresentaram 100% de mortalidade após 48 horas (0,025% e 0,05%) e 72 horas (0,01%) (Tabela 2). Assim, apenas na menor concentração (0,01%) foi possível observar a sobrevivência de um indivíduo em 48 horas. Dessa forma, não restaram girinos vivos após a exposição ao agroquímico Gramocil® ao final do tempo de tratamento (14 dias) para a realização do teste do micronúcleo e posterior avaliação da mutagenicidade.

Tabela 2 - Taxa de mortalidade (%) acumulada dos girinos expostos às diferentes concentrações (%) do agroquímico Gramocil®.

[0,01]			[0,025]			[0,05]		
24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
0	80	100	0	100	100	0	100	100

Fonte: Autoria própria (2023).

CONCLUSÃO

O agroquímico Gramocil® apresentou efeito letal, mesmo em baixas concentrações, para os girinos e, efeito citotóxico para a cultura de células hepáticas HuH7.5, ou seja, mesmo em bioindicadores de diferentes níveis tróficos foi possível observar um efeito negativo a exposição a este composto.

A alta taxa de letalidade observada no bioindicador *Lithobates catesbeianus* sugere que o Gramocil® possui um alto potencial de contaminação ambiental com capacidade de afetar a biodiversidade aquática.

Agradecimentos



À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela infraestrutura e estímulo à produção científica e tecnológica de qualidade.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta SDA-MAPA/ANVISA-INC nº 3, de 22 de outubro de 2020.

FERNANDO, V. A. K. *et al.* Lethal and sub-lethal effects on the Asian common toad *Duttaphrynus melanostictus* from exposure to hexavalent chromium. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 98-105, 2016.

GAUTHIER L. *et al.* Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. **Science of Total Environment**, v. 323, p. 47–61, 2004.

GONÇALVES, M.W. *et al.* Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 5, p. 3947–3954, 2015.

MEENA, R. S. *et al.* Impact of agrochemicals on soil microbiota and management: A review. **Land**, v. 9, n. 2, p. 34, 2020.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

PÉREZ-IGLESIAS, J. M. *et al.* Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 119, p. 15-24, 2015.

PIZZUTTI, I. R. *et al.* Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation. **Food chemistry**, v. 209, p. 248-255, 2016.

RIOS, F. M. *et al.* Effects of imidacloprid on *Rana catesbeiana* immune and nervous system. **Chemosphere**, v. 188, p. 465-469, 2017.

SINGH, A. *et al.* Advances in controlled release pesticide formulations: Prospects to safer integrated pest management and sustainable agriculture. **Journal of hazardous materials**, v. 385, p. 121525, 2020.