

Avaliação do efeito da toxicidade de endossulfan residual quantificado em alface crespa (*Lactuca sativa* var. *crispa*) no desenvolvimento de embriões de Zebrafish (*Danio rerio*)

Evaluation of the effect of quantified residual endosulfan toxicity on curly lettuce (*Lactuca sativa* var. *Crispa*) on the development of Zebrafish embryos (*Danio rerio*)

DOI:10.34117/bjdv6n7-331

Recebimento dos originais: 10/06/2020

Aceitação para publicação: 14/07/2020

Gabriela Godinho Mello

Graduanda no curso de bacharelado em Química pela UFJ.

Instituição: Universidade Federal de Jataí (UFJ) - Unidade Acadêmica Especial de Ciências Exatas

Endereço: Campus Jatobá, BR 364, Km 195, CEP 75801-615, Jataí-GO, Brasil.

Email: gabrielamgodinho@hotmail.com

Gabriela Alba Oliveira

Bacharel em Agronomia pela UFJ.

Instituição: Universidade Federal de Jataí (UFJ) - Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias

Endereço: Campus Jatobá, BR 364, Km 195, CEP 75801-615, Jataí-GO, Brasil.

Email: gabi28jun@gmail.com

Bianca Gonçalves Ferreira

Graduanda no curso de bacharelado em Química pela UFJ.

Instituição: Universidade Federal de Jataí (UFJ) - Unidade Acadêmica Especial de Ciências Exatas

Endereço: Campus Jatobá, BR 364, Km 195, CEP 75801-615, Jataí-GO, Brasil.

Email: bianca_aia@hotmail.com

Isaac Ferreira Chagas Souza

Graduando no curso de biomedicina.

Instituição: Universidade Federal de Jataí (UFJ) - Unidade Acadêmica Especial da Saúde

Endereço: Campus Jatobá, BR 364, Km 195, CEP 75801-615, Jataí-GO, Brasil.

Email: isaac.fchs@gmail.com

Monica Rodrigues Ferreira Machado

Doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás.

Instituição: Universidade Federal de Jataí (UFJ) - Unidade Acadêmica Especial de ciências biológicas

Endereço: Campus Jatobá, BR 364, Km 195, CEP 75801-615, Jataí-GO, Brasil.

Email: monica_rodrigues@ufg.br

Fábio Morato de Oliveira

Doutor em Genética pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP

Instituição: Universidade Federal de Jataí (UFJ) - Unidade Acadêmica Especial da Saúde

Endereço: Campus Jatobá, BR 364, Km 195, CEP 75801-615, Jataí-GO, Brasil.

Email: fabiomorato@ufg.br

Fernando Simões Gielfi

Doutor em Agronomia (Produção Vegetal) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Instituição: Universidade Federal de Jataí (UFJ) - Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias

Endereço: Campus Jatobá, BR 364, Km 195, CEP 75801-615, Jataí-GO, Brasil.

Email: fgielfi@gmail.com

Karla da Silva Malaquias

Doutora em Química Orgânica pela Universidade Federal de São Carlos

Instituição: Universidade Federal de Jataí (UFJ) - Unidade Acadêmica Especial de Ciências Exatas

Endereço: Campus Jatobá, BR 364, Km 195, CEP 75801-615, Jataí-GO, Brasil.

Email: ksmalaquias@ufg.br

RESUMO

O desenvolvimento das práticas agrícolas proporcionou o aumento da produção e redução na perda de produtividade, no entanto vários defensivos fitossanitários foram inseridos nesse meio visando controlar a ação de insetos e doenças que possam prejudicar as plantações. Alguns desses produtos químicos podem causar efeitos adversos em organismos vivos, como é o caso do endossulfan. Este inseticida foi banido do Brasil em 2010, contudo é adquirido de forma ilegal por alguns produtores. No presente estudo foi quantificado resíduos de endossulfan presente em alface crespa. As concentrações encontradas variaram entre 0,007 μ g e 0,018 μ g/Kg. Ainda foi realizada a avaliação da toxicidade das concentrações quantificadas em embriões de Zebrafish. Foi observado que, mesmo com as concentrações encontradas estando abaixo do índice de ingestão diário estabelecido pela ANVISA, houve elevada toxicidade. Causando efeitos como: edemas de pericárdio e saco vitelino, deformação no esqueleto e retardo na eclosão dos embriões.

Palavras-chave: Endossulfan, Alface crespa, Toxicidade, Zebrafish

ABSTRACT

The development of agricultural practices has led to an increase in production and a reduction in the loss of reproduction, however, several pesticides have been inserted in this medium to control the actions of insects and diseases that can harm plants. Some of these chemicals can cause adverse effects on living organisms, such as endosulfan. This insecticide was banned in Brazil in 2010, but it is acquired illegally by some producers. No present study has been quantified as endosulfan residues in relation to curly. The variations found vary between 0.007mg and 0.018mg. A toxicity assessment was also carried out on the quantified in Zebrafish embryos. It was observed that, even with the indicator displayed below the daily intake index established by ANVISA, there was high toxicity. Causing effects such as: edema of pericardium and yolk sac, deformation in the skeleton and delay in the hatching of the embryos.

Keywords: Endosulfan, Curly lettuce, Toxicity, Zebrafish

1 INTRODUÇÃO

No cenário mundial, o Brasil desponta como um dos maiores produtores com aproximadamente 300 milhões de hectares ocupados com culturas, florestas e pastagens (ALVES et

al, 2014). Deste total, quase 1 milhão de hectares são ocupados com hortaliças. Dentre as hortaliças, a alface (*Lactuca sativa*) se destaca como uma das mais produzidas e comercializadas no Brasil. Essa cultura pode ser explorada em diferentes sistemas de cultivo, como convencional, orgânico e hidropônico, sendo sua comercialização realizada desde feiras livres até os grandes centros comerciais, o que lhe assegura uma expressiva importância social e econômica (ALMEIDA et al., 1985; PÓRTO et al., 2008).

Por ser um alimento consumido *in natura*, os cuidados para supressão e/ou controle de insetos praga ocorre em todo ciclo da planta. Para isso, é comum o uso de produtos fitossanitários. As empresas responsáveis pela fabricação destes defensivos, vem investindo em pesquisas com foco em moléculas eficientes e pouco poluentes em substituição a aquelas que apresentam alta toxicidade que são banidas do mercado como o endossulfan (RODRIGUES et al, 2016).

O endossulfan é um inseticida e acaricida organoclorado introduzido no mercado em 1950 sendo utilizado nas culturas de café, chá, algodão, arroz, milho, sorgo, cítricas e hortaliças. No Brasil esse defensivo agrícola foi banido pela ANVISA em 2010 devido sua alta toxicidade, o seu uso deveria ser reduzido gradativamente até 2013, ano em que seria totalmente banido (BRASIL, 2018). Entretanto, apesar da proibição ainda é encontrado em algumas plantações, se trata de um poluente orgânico persistente (POP), ou seja, permanece no ambiente por um longo período resistindo a decomposição entre 2 a 5 anos sendo decomposto na proporção de 75% a 100% após esse período (LARINI,1999).

Após ensaios com microrganismos e em testes do micronúcleo na medula óssea de camundongos foi constatado que o endossulfan possui potencial mutagênico, se acumula no tecido gorduroso afetando o sistema imunológico, imita ou realça o hormônio feminino estrogênio, podendo causar danos na reprodução e desenvolvendo de animais e humanos (LEE et al, 2019). Está relacionando ao câncer e os efeitos de intoxicação aguda incluem tremores, convulsões, dificuldade ao respirar, náuseas, vômitos, diarreia, descamação e pigmentação da pele, seu índice de digestão diária aceitável (IDA) é 0,006 mg/Kg de peso corpóreo (FERREIRA et al, 2018).

Para efeito de avaliação de toxicidade, um modelo que vem sendo usado recentemente é o Zebrafish (*Danio rerio*) (SEIBT, 2009). As vantagens de seu uso são: rápido desenvolvimento, transparência embrionária, facilidade mutagênica, tempo de geração curto, genômica em curso, boa tolerância a elevadas densidades, capacidade de absorver substâncias adicionadas diretamente na água, sensibilidade para drogas e o rápido metabolismo, baixo custo para criação e manutenção e elevado grau de homologia aos genes do ser humano, cerca de 70%. (IGANSI, 2012).

Os objetivos do presente trabalho foram: realizar um estudo quali e quantitativo de endosulfan residual em alface crespa comercializada na cidade de Jataí-GO. Usar os dados quantitativos para avaliar a toxicidade deste defensivo fitossanitário em embriões de Zebrafish .

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no município de Jataí-GO, no laboratório de Química da Universidade Federal de Jataí, entre os meses de março a setembro de 2018. Foram coletada,s para o desenvolvimento do trabalho, amostras aleatórias de alface crespa (*Lactuca sativa var. crispa*), de oito produtores diferentes da região, que vendem diretamente em feiras e/ou daqueles que fornecem a hortaliça para as redes supermercados da cidade.

2.1 EXTRAÇÃO DO PRINCÍPIO ATIVO DO PRODUTO FITOSSANITÁRIO

Aplicou-se a metodologia analítica de análise multirresíduos, empregando a extração líquido-líquido quimicamente ativa seguida da caracterização por cromatografia gasosa aliada à espectrometria de massas (CG-EM). Foram transferidos 2 mL do defensivo Thiodan CE[®] (que apresenta 35% m/v do ativo endosulfan) para um béquer e a este foi adicionado 25mL de clorofórmio. A solução foi transferida para um funil de separação e adicionado 10mL de bicarbonato de sódio e 10mL da solução Braine. Após agitação vigorosa, a fase orgânica foi levada à centrífuga por 10min (5000 rpm à 10°C) para a completa separação da água. A fase orgânica obtida foi seca com 5g de sulfato de sódio anidro, filtrada e levada à capela para completa evaporação do solvente. O Endosulfan isolado foi submetido à análise cromatográfica na concentração de 1mg/mL.

2.2 EXTRAÇÃO DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS DAS AMOSTRAS DE ALFACE

O procedimento experimental de extração do defensivo na matriz vegetal foi o mesmo descrito no item 2.1, com inclusão de três etapas. Inicialmente foram lavadas e pesadas 100g de folhas de alface *in natura*. À esta massa adicionou-se 25mL de etanol para a completa homogeneização do extrato. Este foi filtrado e a porção orgânica extraída com clorofórmio.

2.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Utilizou-se o cromatógrafo gasoso Perkin[®] modelo Clarus S8 acoplado a um espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo e ionização por impacto eletrônico de 70 eV. O aparelho é equipado com coluna Optima-5[®] (250 µm diâmetro interno x 30 m comprimento). As condições de análise foram: temperatura do injetor: 290 °C; temperatura inicial: de 100 °C (*hold* 3min); taxa de

aquecimento 15°C/min; temperatura final: de 250 °C (*hold* 7,5min); vazão do gás de arraste: 1mL/min. A estrutura do defensivo analisado foi confirmada por meio de consulta à biblioteca do equipamento Nist® MS search 8.0 no modo *full scan* para as análises qualitativas e no modo SIM (*Select Ion Monitoring*) para as análises quantitativas.

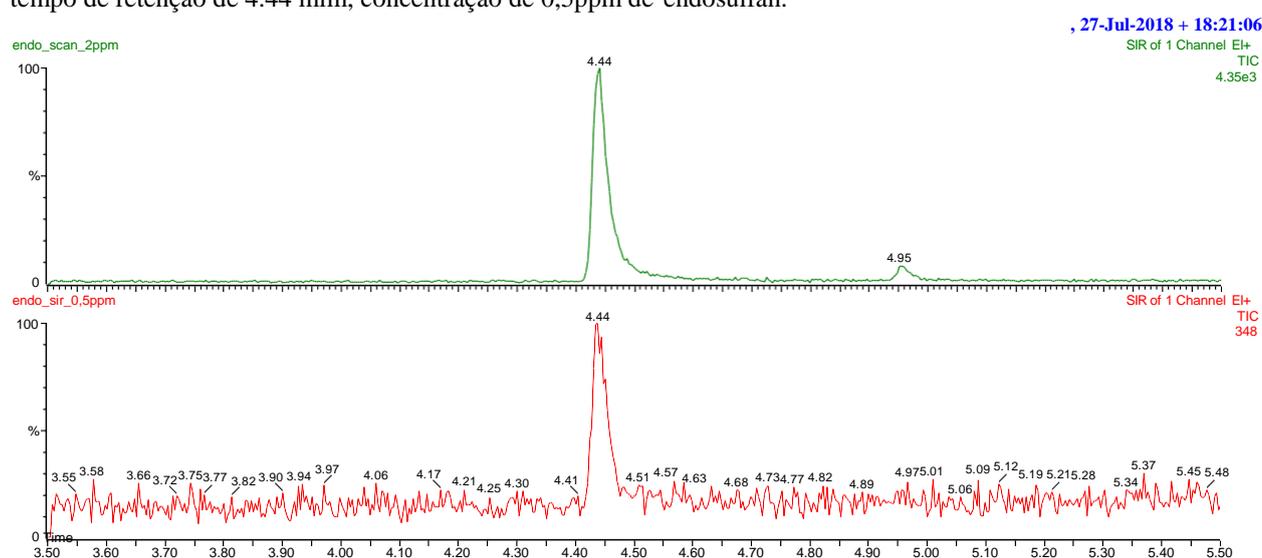
2.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA ENSAIO BIOLÓGICO COM ZEBRAFISH

Para os ensaios de toxicidade, os Zebrafish foram mantidos de acordo com condições laboratoriais padrão de manutenção. Os embriões foram obtidos por cruzamento natural e os viáveis foram selecionados para o estudo. Foram utilizadas as concentrações de endosulfan quantificadas. Para cada concentração, foi utilizado doze embriões distribuídas numa microplaca de cultura de 96 poços contendo um volume final de 200 microlitros. Os efeitos teratogênicos e letalidade, foram analisadas por microscopia de contraste de fase e foram tiradas fotografias a cada 24h. Foi realizada a exposição para o bioensaio agudo, com duração total de 96h.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

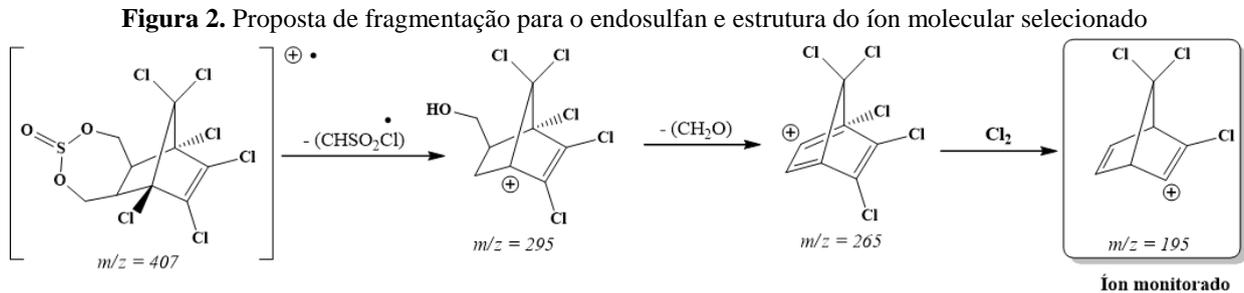
O processo de extração do endosulfan a partir dos produtos comerciais mostrou-se eficaz, sendo extraídos 33mg do ativo. Na Figura 1 são apresentados os cromatogramas obtidos no modo *full scan* e SIM, evidenciando o mesmo tempo de retenção nas duas análises.

Figura 1. (A) Cromatograma de íons totais do endosulfan no modo *full scan* de análise com tempo de retenção de 4.44 mim, concentração de 2ppm de endosulfan. (B) Cromatograma de íons totais do endosulfan no modo SIM de análise com tempo de retenção de 4.44 mim, concentração de 0,5ppm de endosulfan.



O modo SIM de análise foi escolhido pois, aumenta consideravelmente a sensibilidade do equipamento. Assim, é possível alcançar concentrações mais baixas, fator que é fundamental nas

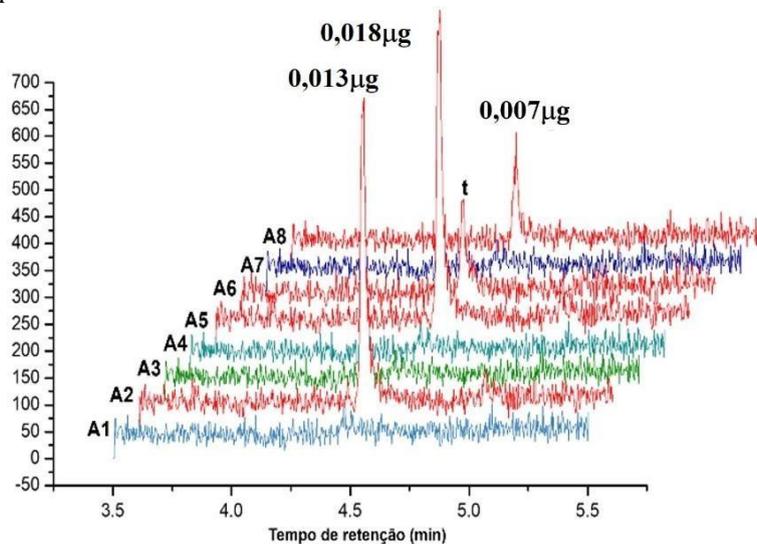
análises de resíduos em matrizes biológicas. O íon monitorado foi o m/z 195, característico do endosulfan (SILVA et al, 2007). A proposta de fragmentação é apresentada na Figura 2.



As condições iniciais estabelecidas para a curva de calibração resultaram na equação de reta $y = 0,438x - 0,0309$ com coeficiente de determinação (r^2) 0,998.

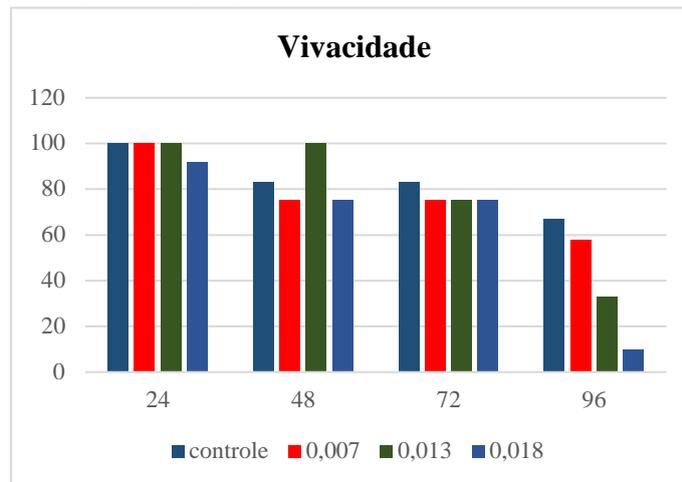
Os limites de detecção e quantificação obtidos pelo modo SIM foram, respectivamente, $\leq 0,006$ ppm e $\leq 0,019$ ppm. A análise qualitativa revelou que das oito amostras analisadas quatro continham resíduos de endosulfan; destas, três foram quantificáveis, todas abaixo do limite de ingestão diária aceitável. Os resultados estão apresentados na Figura 3.

Figura 3. Análise quantitativa de endosulfan residual encontrada nas amostras de alface da cidade de Jataí-GO.



As concentrações encontradas foram de: $0,007\mu\text{g}$, $0,013\mu\text{g}$ e $0,018\mu\text{g}$. Estas tiveram efeito de toxicidade testado em Zebrafish. Os resultados estão expostos nas Figuras 4 e 5 e tabela 1.

Figura 4. Bioensaio de vivacidade do teste agudo (24h, 48h, 72h, 96h) de exposição de endossulfan em Zebrafish nas concentrações de 0,007 μ g, 0,013 μ g e 0,018 μ g/Kg.



A figura 4 mostra a % de vivacidade no teste agudo. Ao fim das 96h, nas concentrações de 0,007 μ g, 0,013 μ g e 0,018 μ g/Kg havia 58%, 33% e 10% dos peixes vivos respectivamente. Para o controle a porcentagem foi de 67. É possível notar que, mesmo a concentração mais baixa testada apresentou considerável toxicidade. Os demais efeitos são expostos na tabela 1.

Tabela 1. Efeitos teratogênicos observados em Zebrafish para teste agudo com endossulfan.

Horas	Média de batimentos (bts/min)		% Eclusão		% Edema de pericárdio		% Edema saco vitelino		% Deformação do esqueleto	
	72	96	72	96	72	96	72	96	72	96
Controle	100	110	90	100	20	12,5	10	0	0	0
0,007	106	99	33,3	75	88,9	0	11,1	0	22,2	0
0,013	96	90	88,9	100	66,7	0	0	0	22,2	0
0,018	116	95	100	100	77,8	71,4	0	14,3	33,3	57,2

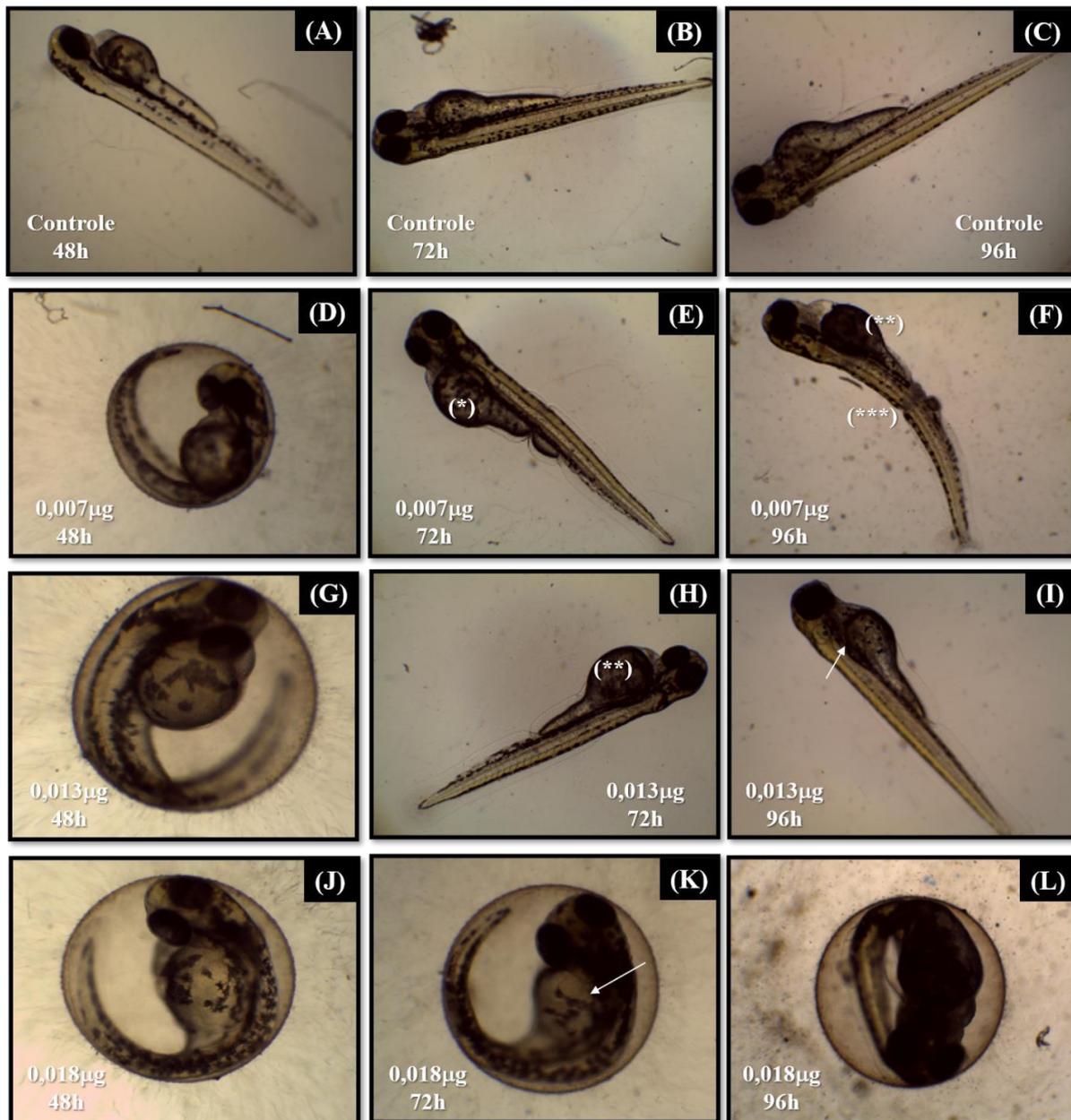
Outros trabalhos presentes na literatura descrevem efeitos tóxicos diversos do endossulfan e derivados em Zebrafish (MUAZZAM et al, 2019; SARAVANAN et al 2019; STANLEY et al, 2009), corroborando os efeitos teratogênicos observados. Cabe ressaltar, que o endossulfan tem efeito sobre as enzimas que agem nos mecanismos de proteção: superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT). Estas enzimas controlam a formação de radicais livres, envolvidas na iniciação de reações em cadeia. Assim, a inibição destas causam danos oxidativos e conseqüentemente danos ao DNA do Zebrafish (SHAO et al, 2012).

A toxicidade ainda pode estar associada aos derivados gerados durante a metabolização do endossulfan. Lee e colaboradores (2019) identificaram 170 metabólitos tóxicos em Zebrafish exposto ao sulfato de endossulfan. Nos bioensaios, as vias metabólicas associadas à alguns destes compostos

ativaram o ciclo do citrato e do metabolismo dos glicerolípídeos, aumentando significativamente a toxicidade oxidativa.

Na Figura 5 são exemplificados alguns dos efeitos teratogênicos observados no ensaio biológico agudo de exposição.

Figura 5. Efeitos teratogênicos observados no ensaio biológico agudo de exposição do endossulfan em Zebrafish . (A - C) tratamento controle com desenvolvimento normal dos embriões de Zebrafish . (D - F) Tratamento na concentração de 0,007 μ g de endossulfan; (D) retardo na eclosão que ocorre após 24h; (E) *Edema de pericárdio; (F) **Edema saco vitelino e ***Deformação do esqueleto. (G - I) Tratamento na concentração de 0,013 μ g de endossulfan. (G) retardo na eclosão; (H) **Edema saco vitelino; (I) **Edema saco vitelino e tumor nos pulmões (seta). (G - I) Tratamento na concentração de 0,018 μ g de endossulfan; (J) retardo na eclosão; (K) retardo na eclosão e formação de tumor; (L) morte do embrião.



4 CONCLUSÃO

O método de extração líquido-líquido e quantificação por CG-EM mostraram-se eficientes, sendo possível estabelecer LD e LQ baixos. A partir das observações dos resultados de toxicidade em embriões de Zebrafish é concludente que, apesar dessas concentrações serem consideradas abaixo do índice de ingestão diário, causam danos no desenvolvimento embrionário tais como: edemas de pericárdio e saco vitelino, deformação no esqueleto e retardo na eclosão. Houve elevada taxa de mortalidade causada pela intoxicação do endosulfan entre os períodos de 72 a 96 horas. A preocupação com a toxicidade dos produtos fitossanitários originou uma estrita regulamentação para proteger consumidores, meio ambiente e os aplicadores dos produtos. Assim, estudos nesta linha são essenciais para proteger a saúde humana e apoiar a conformidade e aplicação de leis e regulamentação relacionadas à segurança alimentar.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, W. F.; FIÚZA, J.; MAGALHÃES, C. M.; JUNGER, C. M. Agrotóxicos. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 220-249, abr./jun. 1985.
- ALVES, R.M.; INACIO, E.M.; MONQUERO, P.A.; MENEGHIN, S.P.; HIRATA, A.C.S. Leaf-surface characterization and the effects of the herbicide saflufenacil on the leaves of weeds. Agrária (Recife. Online), v. 9, p. 550-555, 2014.
- BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 12 jul. 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm>. Acesso em: 8 jun. 2018.
- FERREIRA, V. B.; COSTA DA SILVA, T. T.; GARCIA, S. R. M. C.; SABAA SRUR, A. U. O. Estimativa de ingestão de agrotóxicos organofosforados pelo consumo de frutas e hortaliças Caderno de Saúde Coletiva. Rio de Janeiro, 26, 216-221, 2018.
- IGANSI, G. N. Efeito da exposição ao cádmio sobre dano oxidativo, morte celular e comportamento de Zebrafish . Dissertação e Tese (Biologia Celular e Molecular), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2012.
- LARINI, Lourival. Toxicologia dos praguicidas. In: Ed. Manole Ltda, 1999, São Paulo. p. 35-36.
- LEE, H-K.; KIM K; LEE, J; LEE, J; KIM, S; LEE, S-Eun; KIM, J-H. Targeted toxicometabolomics of endosulfan sulfate in adult Zebrafish (*Danio rerio*) using GC-MS/MS in multiple reaction monitoring mode. Journal of Hazardous Materials, 389, 122, 2019.

MUAZZAM, B.; K. MUNAWAR; I. A. KHAN; S. JAHAN; M. IQBAL; M. R. ASI; A. FAROOQI; A. NAZLI; I. HUSSAIN; M. I. ZAFAR. Stress response and toxicity studies on zebrafish exposed to endosulfan and imidacloprid present in water. *Journal of Water Supply: Research and Technology*. 68 (8), 718–730, 2019.

PÔRTO ML; ALVES JC; SOUZA AP; ARAUJO RC; ARRUDA JA. 2008. Nitrate production and accumulation in lettuce as affected by mineral nitrogen supply and organic fertilization. *Horticultura Brasileira* 26: 227-230.

RODRIGUES, V. C. et al. Aspectos Ambientais, Forenses e de Saúde Pública em relação ao uso de Agrotóxicos em um Município do Estado de Goiás, Brasil. *Sinergia*, Vol. 17, n. 1, p. 56-62, 2016.

SARAVANAN, M.; NAM, S.; RHEE, J. Endosulfan Induces Embryotoxicity in the Marine Medaka *Oryzias javanicus*. *Toxicol. Environ. Health Sci.* 11, 19–26, 2019.

SEIBT, K. J. Influência de fármacos antipsicóticos sobre a hidrólise de nucleotídeos extracelulares e acetilcolina em cérebro de Zebrafish (*Danio rerio*). Dissertação e Tese (Biologia Celular e Molecular). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2009.

SHAO, B., ZHU, L., DONG, M.; WANG, J.; XIE, H.; ZHANG, Q.; DU, Z.; ZHU, S. DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in Zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology* 21, 1533–1540, 2012.

SILVA, R. C.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTO, F. Fiber introduction mass spectrometry: determination of pesticides in herbal infusions using a novel sol–gel PDMS/PVA fiber for solid-phase microextraction. *Journal Of Mass Spectrometry*, 42, 825–829, 2007.

STANLEY, K.A., CURTIS, L.R., MASSEY SIMONICH, S.L., AND TANGUAY, R.L. Endosulfan I and endosulfan sulfate disrupts Zebrafish embryonic development. *Aquatic toxicology*, 95(4): 355-361, 2009.