

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

DANIELA MAGALHAES NOLASCO

**ESTUDO DA GENOTOXICIDADE E DO PERFIL METABÓLICO DE
TRABALHADORES EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE
POTENCIAIS BIOMARCADORES NO BIOMONITORAMENTO DA EXPOSIÇÃO
OCUPACIONAL**

Belo Horizonte

2022

DANIELA MAGALHAES NOLASCO

**ESTUDO DA GENOTOXICIDADE E DO PERFIL METABÓLICO DE
TRABALHADORES EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE
POTENCIAIS BIOMARCADORES NO BIOMONITORAMENTO DA EXPOSIÇÃO
OCUPACIONAL**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Dr.^a Leiliane Coelho André

Coorientadora: Dr.^a. Maria José Nunes de Paiva

Belo Horizonte

2022

N789e Nolasco, Daniela Magalhaes.
Estudo da genotoxicidade e do perfil metabólico de trabalhadores expostos aos agrotóxicos para identificação de potenciais biomarcadores no biomonitoramento da exposição ocupacional [recurso eletrônico] / Daniela Magalhaes Nolasco. – 2022.
1 recurso eletrônico (183 f. : il.) : pdf

Orientadora: Leiliane Coelho André.
Coorientadora: Maria José Nunes de Paiva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Agroquímicos – Teses. 2. Genotoxicidade – Teses. 3. Exposição ocupacional – Teses. 4. Metabolômica – Teses. 5. Cromatografia líquida – Teses. 6. Cromatografia gasosa-espectrometria de massas – Teses. I. André, Leiliane Coelho. II. Paiva, Maria José Nunes de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:615.9



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

"ESTUDO DA GENOTOXICIDADE E DO PERFIL METABÓLICO DE TRABALHADORES EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES NO BIOMONITORAMENTO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL"

DANIELA MAGALHÃES NOLASCO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinte de dezembro de dois mil e vinte e dois**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Isarita Martins Sakakibara
Universidade Federal de Alfenas

Alessandra Cristina Pupin Silvério
Universidade José do Rosário Vellano

Adriana Nori de Macedo
Universidade Federal de Minas Gerais

Adriano de Paula Sabino
Universidade Federal de Minas Gerais

Maria Jose Nunes de Paiva - Coorientadora
Universidade Federal de Minas Gerais

Leiliane Coelho Andre - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Adriano de Paula Sabino, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 13:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Nori de Macedo, Professora do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 13:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isarita Martins Sakakibara, Usuário Externo**, em 20/12/2022, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leiliane Coelho Andre, Diretor(a)**, em 20/12/2022, às 14:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Jose Nunes de Paiva, Professora do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 14:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Cristina Pupin Silvério, Usuária Externa**, em 26/12/2022, às 11:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1960908 e o código CRC 5C680F11.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma oportunidade de crescimento e aprendizado e por Sua presença constante em todos os momentos da minha vida.

À minha família, especialmente meus pais, Lourdes e Edson, que sempre me apoiaram e incentivaram a lutar pelos meus sonhos e nunca desistir diante das dificuldades. Obrigada pela força, incentivo, compreensão, orações e por serem meu porto seguro.

Ao meu marido, Guilherme Neves, que me auxiliou de todas as formas possíveis para que esse trabalho fosse concluído com êxito. Agradeço pelo incentivo permanente e pela força constante, sempre me impulsionando a realizar os meus objetivos. Obrigada pelo companheirismo, amor, amparo nos momentos mais difíceis, conselhos e pela enorme compreensão.

À minha filha, Luísa, por todo amor e carinho, por tornar os meus dias mais alegres e confiantes, por ser minha fonte de energia e motivação para vencer os períodos mais desafiadores.

Às minhas orientadoras, professoras Leiliane e Maria José, pelos ensinamentos e oportunidades que me permitiram crescer profissionalmente, por todo o apoio, compreensão, auxílio, confiança e paciência durante esses anos de trabalho em conjunto. Tenho muito carinho e admiração por vocês.

Às professoras Isarita Martins, Alessandra Pupin e Simone Machado pela grande parceria e por toda a ajuda com as coletas das amostras e o ensaio cometa. À professora Luciana Azevedo pela disponibilização do Laboratório e equipamentos para que eu pudesse realizar o ensaio cometa com tranquilidade e qualidade, além de sua disponibilidade, contribuições, incentivo e força para que a padronização do ensaio fosse concluída com êxito. Aos colegas Luiz Paulo, Luiz Filipe e Laura pela parceria neste estudo, sempre muito atenciosos, disponíveis e cordiais.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas da Fiocruz-MG pela disponibilização do UPLC/Q-TOF MS e ao Markus Kohlhoff, pelo apoio técnico nas análises.

Aos funcionários do Hospital das Clínicas da UFMG e da Faculdade de Farmácia da UFMG por aceitarem participar deste trabalho, por me receberem de portas abertas e permitirem que eu realizasse meu trabalho de forma tranquila e com total liberdade.

Às colegas Michele Mendes, Sumaia Araújo, Camila Moreira e Mirna D'auriol, agradeço o apoio, incentivo, colaboração nas análises, conselhos e também pelas palavras de motivação nos momentos mais tensos.

Aos amigos e familiares, que sempre estiveram ao meu lado, agradeço pelos momentos de descontração, companheirismo, compreensão pelas ausências, apoio e, sobretudo, pela amizade de vocês. Com certeza, tornaram essa caminhada mais leve.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições.

Ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, professores, colegas e funcionários, pela oportunidade e pelo imenso conhecimento adquirido.

RESUMO

Os agrotóxicos constituem uma categoria heterogênea de produtos químicos destinados especificamente para o controle e mitigação de pragas. Com o constante aumento do uso no país, o risco à saúde humana e ao meio ambiente tem aumentado de forma proporcional, ocorrendo devido a exposição ocupacional e ambiental a estes compostos. O uso desses produtos químicos está associado a vários efeitos tóxicos relacionados à toxicidade aguda e crônica, como infertilidade, distúrbios hormonais, alterações psiquiátricas e câncer. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a genotoxicidade, utilizando os ensaios Cometa e Citoma, associada ao estudo do perfil metabólico dos indivíduos expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos, aplicando a ferramenta da metabolômica, para identificação de potenciais novos biomarcadores. Para isso, os testes de genotoxicidade foram realizados em indivíduos do sexo masculino expostos ocupacionalmente e do sexo feminino, expostas ambientalmente aos agrotóxicos. Os resultados do ensaio cometa mostraram um nível de dano ao DNA de $15,93 \pm 3,50$ para o grupo masculino e de $13,02 \pm 1,79$ para o grupo feminino. A comparação foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, o qual demonstrou maior dano genotóxico em voluntários do sexo masculino em relação ao feminino ($p=0,0068$). Com relação às alterações celulares, os resultados foram avaliados estatisticamente e não houve diferença significativa em relação às células binucleadas ($p=0,057$) e às células com cariorrexe ($p=0,159$), mas foi possível perceber um aumento significativo com relação à quantidade de células cariolíticas ($p=0,004$), micronúcleos ($p=0,004$) e células picnóticas ($p=0,0003$) nos indivíduos expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos. A metabolômica foi realizada em plasma e urina dos mesmos indivíduos expostos ocupacionalmente e indivíduos do grupo controle, utilizando as técnicas de cromatografia líquida e cromatografia gasosa acopladas à espectrometria de massas (UPLC-MS e GC-MS). A análise multivariada do metaboloma foi realizada pelos métodos Análise de Componentes Principais (PCA), Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) ou Análise Ortogonal Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA), que demonstraram uma boa separação das amostras dos grupos estudados. A partir dos resultados obtidos por UPLC-MS, foi possível a identificação de 21 metabólitos discriminadores em plasma e 17 em urina. Com a análise da curva ROC, foram revelados os compostos com maior potencial para biomarcadores. A análise abrangente das vias metabólicas influenciadas pela exposição aos agrotóxicos revelou alterações, principalmente, no metabolismo de aminoácidos e de várias classes de lipídios. Foi possível inferir que a exposição a esses produtos químicos produz toxicidade por meio de múltiplos mecanismos, principalmente, estresse oxidativo, reações inflamatórias, alterações de membranas e disfunção mitocondrial. Os resultados encontrados pela análise por GC-MS não foram capazes de discriminar metabólitos com potencial para possíveis biomarcadores. Este estudo indicou que a abordagem integrada, com a utilização da metabolômica e avaliação dos biomarcadores de genotoxicidade, forneceu informações importantes sobre respostas biológicas complexas.

Palavras-chave: agrotóxicos; metabolômica untargeted; LC-MS; GC-MS; genotoxicidade.

ABSTRACT

Pesticides constitute a heterogeneous category of chemical products intended specifically for the control and mitigation of pests. With the constant increase in use in the country, the risk to human health and the environment has increased proportionally, occurring due to occupational and environmental exposure to these compounds. The use of these chemicals is associated with several toxic effects related to acute and chronic toxicity, such as infertility, hormonal disorders, psychiatric disorders and cancer. The present work aimed to evaluate genotoxicity using the Comet and Cytoma assays, associated with the study of the metabolic profile of individuals occupationally exposed to pesticides, applying the metabolomics tool to identify potential new biomarkers. For this, genotoxicity tests were carried out on male individuals occupationally exposed and female individuals environmentally exposed to pesticides. The comet assay results were carried out in males exposed occupationally and females, exposed environmentally to pesticides. The comet assay results showed a DNA damage level of 15.93 ± 3.50 for the male group and 13.02 ± 1.79 for the female group. Comparison was performed using the Mann-Whitney test, which showed greater genotoxic damage in male volunteers compared to female volunteers ($p=0.0068$). With regard to cell alterations, the results were statistically evaluated and there was no significant difference in relation to binucleated cells ($p=0.057$) and cells with karyorrhexis ($p=0.159$), but it was possible to perceive a significant increase in relation to the number of cells karyolytic ($p=0.004$), micronuclei ($p=0.004$) and pyknotic cells ($p=0.0003$) in individuals occupationally exposed to pesticides. Metabolomics was carried out in plasma and urine of the same occupationally exposed individuals and individuals in the control group, using liquid chromatography and gas chromatography techniques coupled with mass spectrometry (UPLC-MS and GC-MS). Multivariate analysis of the metabolome was performed using Principal Components Analysis (PCA), Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) or Partial Least Squares Discriminant Orthogonal Analysis (OPLS-DA), which demonstrated good separation of samples from studied groups. From the results obtained by UPLC-MS, it was possible to identify 21 discriminating metabolites in plasma and 17 in urine. With the analysis of the ROC curve, the compounds with the greatest potential for biomarkers were revealed. Comprehensive analysis of the metabolic pathways influenced by exposure to pesticides revealed changes, mainly, in the metabolism of amino acids and several classes of lipids. It was possible to infer that exposure to these chemicals produces toxicity through multiple mechanisms, such as oxidative stress, inflammatory reactions, membrane changes and mitochondrial dysfunction. The results found by the GC-MS analysis were not able to discriminate metabolites with potential for possible biomarkers. This study indicated that the integrated approach, with the use of metabolomics and evaluation of genotoxicity biomarkers, provided important information on complex biological responses.

Keywords: pesticides; untargeted metabolomics; genotoxicity; LC-MS; GC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação da migração do DNA de acordo com o nucleóide e cauda formados, visualizados em microscópio de fuorescência.	37
Figura 2 - Formação de micronúcleos a partir de cromossomos inteiros ou acêntricos.	39
Figura 3 - Fotomicrografias de células pontuadas no ensaio do citoma.	40
Figura 4 - Localização do Município de Paraguaçu, no Estado de Minas Gerais.	44
Figura 5 – Alterações nos principais sistemas orgânicos de trabalhadores expostos aos agrotóxicos.....	53
Figura 6 - Representação esquemática do ensaio cometa conforme protocolo padronizado.	54
Figura 7 – Imagens de cometas presentes em amostras do grupo exposto.....	55
Figura 8 - Comparação do número de alterações celulares entre os grupos exposto (homens) e controle (mulheres) pelo teste de Mann-Whitney.	61
Figura 9 – Comparação da atividade das enzimas colinesterases entre os grupos estudados pelo teste de Mann-Whitney.	64
Figura 10 – Fases dos estudos de desenvolvimento de biomarcadores.	72
Figura 11 – Fluxo de trabalho em metabolômica.....	73
Figura 12 – metoxiaminação para proteção dos grupos cetonas e aldeídos.	76
Figura 13 – Equação química da reação de siliilação.	76
Figura 14 - Número médio (n=2) de <i>features</i> detectados nos experimentos de otimização para o preparo de amostras de plasma para metabolômica por LC-MS.....	105
Figura 15 – Nota total de cada experimento de amostras de plasma, calculada por meio da soma das notas aferidas na avaliação do número de <i>molecular features</i> e suas intensidades.....	108
Figura 16 - Esquema representativo do preparo de amostras de plasma por UPLC-QToF-MS	108
Figura 17 - Curvas ROC de alguns dos metabólitos plasmáticos discriminantes identificados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.	120
Figura 18 - Curvas ROC de alguns analitos urinários discriminantes identificados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.	138

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Biomarcadores no ensaio de citoma MN bucal	42
Tabela 2 – Parâmetros testados no protocolo do ensaio cometa	47
Quadro 1 - Características e estratificação da população de estudo	51
Tabela 3 - Comparação realizada pelo teste de Mann-Whitney.....	52
Tabela 4 – Condições padronizadas para o Ensaio Cometa	54
Tabela 5 – Comparação dos resultados do ensaio de citoma entre o grupo de indivíduos expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos e o grupo controle pelo teste de Mann-Whitney.....	60
Tabela 6 - Comparação pelo teste de Mann-Whitney da atividade da Colinesterase ...	64
Tabela 7 - Matriz experimental para otimização das condições de preparo de amostras de plasma para análise metabolômica global por UPLC-QToF-MS.....	96
Tabela 8 – Programação da eluição gradiente utilizada na separação cromatográfica.	97
Tabela 9 - Comparação das variáveis entre os grupos exposto e controle.....	103
Tabela 10 - Metabólitos discriminadores putativamente identificados na análise metabolômica pela técnica UPLC-MS, no plasma de trabalhadores expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos.	118
Tabela 11 - Metabólitos discriminadores putativamente identificados na análise metabolômica das amostras de urina de trabalhadores expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos, por UPLC-MS.	137

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Modelo de análise por Componentes Principais (PCA) para amostras de plasma de trabalhadores expostos ocupacionalmente e não ocupacionalmente aos agrotóxicos e amostras de controle de qualidade (QCs).	111
Gráfico 2 - Modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) indicando efetiva discriminação entre o grupo de indivíduos ocupacionalmente expostos e o grupo dos voluntários não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos.....	112
Gráfico 3 – Classificação do modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) pela validação cruzada.....	113
Gráfico 4 - Modelo de Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA) para amostras de plasma de trabalhadores expostos ocupacionalmente e não ocupacionalmente aos agrotóxicos (A) e gráfico de validação do modelo OPLS-DA por permutações (B).	114
Gráfico 5 - Valores VIP de quinze <i>features</i> discriminadores identificados no modelo de OPLS-DA.	115
Gráfico 6 – <i>Volcano Plot</i> aplicado aos dados das amostras de plasma de indivíduos expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos.	116
Gráfico 7 - Representação das vias metabólicas envolvidas na resposta biológica associada à exposição aos agrotóxicos.	123
Gráfico 8 – Modelo de PCA das amostras de urina de trabalhadores expostos ocupacionalmente e não ocupacionalmente aos agrotóxicos e amostras de controle de qualidade (QCs).	132
Gráfico 9 – Modelo PLS-DA construído para as amostras de urina dos indivíduos expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos	133
Gráfico 10 - Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA) para amostras de urina dos indivíduos participantes do estudo.	134
Gráfico 11 - Valores VIP de quinze <i>features</i> discriminadores identificados no modelo de PLS-DA.	135
Gráfico 12 – <i>Volcano Plot</i> aplicado aos dados das amostras de urina de indivíduos expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos.	136
Gráfico 13 - Representação das vias metabólicas envolvidas na resposta biológica associada à exposição aos agrotóxicos.	141
Gráfico 14 – Modelo da Análise por Componentes Principais para as amostras de urina, analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas	146
Gráfico 15 - Modelo PLS-DA construído para as amostras de urina dos indivíduos expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos, analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas quadrupolo.	147

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

DDT - dicloro–difênil–tricloroetano

EPI - Equipamentos de Proteção Individual

HMDB - Banco de Dados do Metaboloma Humano

IE- Ionização por *eletrospray*

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

m/z - Razão massa/carga

MMS - metilmetanosulfonato

MN – micronúcleos

MS – mass spectrometry (espectrometria de massas)

NR – Norma regulamentadora

OIT - Organização Internacional do Trabalho

OMS - Organização mundial da saúde

OPLS-DA - Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais)

PCA - Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)

PLS-DA - Partial Least-Squares Discriminant Analysis (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais)

QC- Controle de qualidade

Q-ToF - analisador de massas tipo quadrupolo-tempo de voo

ROS - espécies reativas de oxigênio

UPLC - cromatografia líquida de ultra alto desempenho

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	14
INTRODUÇÃO.....	15
CAPÍTULO II.....	18
ASPECTOS GERAIS DOS AGROTÓXICOS.....	18
2.1 Histórico	19
2.2 Classificação dos agrotóxicos	22
2.2.1 Inseticidas	22
2.2.2 Fungicidas.....	24
2.2.3 Herbicidas	25
2.3 Exposição ocupacional e ambiental	26
CAPÍTULO III.....	29
ANÁLISE DE BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE	29
3.1 REVISÃO DA LITERATURA	30
3.1.1 Monitorização biológica.....	30
3.1.2 Biomarcadores de genotoxicidade	34
3.1.2.1 Ensaio Cometa.....	35
3.1.2.2 O Ensaio do Citoma	39
3.1.2.3 Ensaio do citoma em mucosa oral.....	41
3.2 OBJETIVOS	43
3.2.1 Objetivo geral	43
3.2.2 Objetivos específicos	43
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.3.1 Descrição do município de Paraguaçu, Minas Gerais	44
3.3.2 População do estudo.....	45
3.3.3 Ensaio Cometa.....	45
3.3.3.1 Material e reagentes.....	45
3.3.3.2 Otimização da técnica do Ensaio Cometa	47
3.3.4 Ensaio de citoma.....	49
3.3.5 Atividade das enzimas colinesterases	50
3.3.6 Análise Estatística	50
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.4.1 Características da população de estudo	51
3.4.2 Ensaio Cometa.....	54

3.4.3 Ensaio de citoma.....	60
3.4.4 Atividade das enzimas colinesterases.....	63
CAPÍTULO IV	67
METABOLÔMICA – ABORDAGEM GLOBAL	67
4.1 REVISÃO DA LITERATURA	68
4.1.1 Fluxo de trabalho em metabolômica global	72
4.1.1.1 Preparo de amostras.....	73
4.1.1.1.1 Preparo de amostras para LC-MS.....	74
4.1.1.1.2 Preparo de amostras para GC-MS.....	75
4.1.1.2 Técnicas analíticas.....	77
4.1.1.2.1 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)	79
4.1.1.2.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)	80
4.1.1.3 Processamento de dados.....	82
4.1.1.4 Análise estatística	86
4.1.1.4.1 Análise univariada de dados	86
4.1.1.4.2 Análises de dados multivariados	87
4.1.1.4.2.1 Métodos de Reconhecimento de Padrões Não Supervisionados	88
4.1.1.4.2.2 Métodos de Reconhecimento de Padrões Supervisionados	89
4.1.1.4.3 Identificação dos metabólitos discriminantes e interpretação biológica	91
4.2 OBJETIVOS	93
4.2.1 Objetivo geral.....	93
4.2.2 Objetivos específicos	93
4.3 MATERIAL E MÉTODO.....	94
4.3.1 População do estudo.....	94
4.3.2 Análise por UPLC-QToF-MS	95
4.3.2.1 Material e reagentes.....	95
4.3.2.2 Preparo de amostras de plasma por UPLC-QToF-MS	95
4.3.2.3 Preparo de amostras de urina por UPLC-QToF-MS.....	97
4.3.2.4 Condições analíticas para plasma e urina por UPLC-QToF-MS.....	97
4.3.3 Análise por GC-MS	98
4.3.3.1 Material e reagentes.....	98
4.3.3.2 Preparo de amostras de urina por GC-MS	99
4.3.3.3 Condições analíticas para urina por GC-MS.....	100
4.3.4 Tratamento dos dados	100

4.3.5 Análise Estatística	102
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
4.4.1 Características da população de estudo	103
4.4.2 Otimização do preparo de amostras biológicas de plasma por UPLC-MS.....	104
4.4.3 Análise metabolômica de plasma por UPLC-QToF-MS.....	109
4.4.3.1 Identificação das entidades moleculares discriminadoras resultantes da análise metabolômica de plasma por UPLC-QToF-MS	115
4.4.3.2 Análise das vias metabólicas afetadas pela exposição aos agrotóxicos a partir dos resultados da metabolômica de plasma por UPLC-QToF-MS	122
4.4.4 Análise metabolômica de urina por UPLC-QToF-MS	132
4.4.4.1 Identificação das entidades moleculares discriminadoras resultantes da análise metabolômica de urina por UPLC-QToF-MS.....	134
4.4.4.2 Análise das vias metabólicas afetadas pela exposição aos agrotóxicos a partir dos resultados da metabolômica de urina por UPLC-QToF-MS	141
4.4.5 Análise metabolômica de urina por GC-MS.....	146
4.4.5.1 Identificação das entidades moleculares discriminadoras resultantes da análise metabolômica de urina por GC-MS	148
CAPÍTULO V	150
5 CONCLUSÕES.....	151
REFERÊNCIAS	153
ANEXOS.....	178

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos constituem uma categoria heterogênea de produtos químicos projetados especificamente para o controle e mitigação de pragas. O termo “agrotóxico” passou a ser utilizado, no Brasil, a partir da Lei Federal nº 7.802, de 1989, para denominar os produtos químicos utilizados na agricultura. Esse termo evidencia não apenas a finalidade de seu uso, mas também o seu caráter tóxico para o meio ambiente e a saúde humana e, por esse motivo, utilizaremos essa denominação neste trabalho, tendo em vista que o mesmo se tornou mais amplo e conhecido por ter sido aceito no âmbito da saúde pública (BRASIL, 1989; BERTOTT, 2020).

A exposição humana aos agrotóxicos ocorre diretamente pelo contato com estas substâncias ou, indiretamente, por meio da contaminação da água ou solo de áreas próximas a plantações agrícolas, que acaba por desequilibrar os ecossistemas locais, trazendo uma série de prejuízos à população. Portanto, além da exposição ocupacional, a contaminação alimentar e ambiental coloca em risco de intoxicação outros grupos populacionais com diferentes níveis: os aplicadores, os membros da comunidade, onde os mesmos estão sendo utilizados e/ou armazenados, os consumidores de alimentos contaminados com resíduos e os indivíduos que utilizam água contaminada (BOLOGNESI, C. 2003; PERES, *et al.*, 2005; SILVA, *et al.*, 2005; PORTO, *et al.*, 2021).

Vários riscos para a saúde e o meio ambiente estão associados aos agrotóxicos, podendo levar à efeitos tóxicos agudos ou crônicos, cujos efeitos incluem infertilidade, distúrbios hormonais, alterações psiquiátricas e câncer. A toxicidade depende de muitos fatores, como a via de absorção, tempo e forma de exposição, as características individuais dos produtos, a suscetibilidade de cada indivíduo exposto, fatores ambientais, entre outros (JOBIM, *et al.*, 2010; SILVA, 2011; CARNEIRO, 2015; AHMAD, 2017; SUR, SATHIAVELU, 2022).

Por todos esses motivos, os agrotóxicos têm sido objeto de vários estudos, tanto pelos malefícios que provocam à saúde humana, como pelos danos ao meio ambiente e pelo aparecimento de resistência em organismos (THEODORIDIS, *et al.*, 2011; AHMAD, 2017).

Como as exposições a esses produtos químicos podem trazer vários danos ao organismo, caracterizar a resposta metabólica aos agrotóxicos e como eles influenciam

a saúde humana é importante. Por isso, a metabolômica é uma abordagem analítica poderosa que pode traçar o perfil de substâncias endógenas e exógenas em espécimes biológicos (QI YAN, *et al.*, 2021).

A metabolômica faz parte das ciências “ômicas”, as quais consistem em uma abordagem que busca a caracterização e a quantificação coletiva de conjuntos de moléculas biológicas. Tal ferramenta permite a medição direta dos metabólitos relacionados a processos biológicos em condições normais ou adversas e confere informações sobre a interação do organismo com o ambiente. A metabolômica permite identificar padrões metabólicos característicos de grupos de indivíduos que compartilhem as mesmas características e/ou doenças. Na área da Toxicologia Ocupacional e Ambiental, a metabolômica é especialmente usada na identificação de novos biomarcadores de contaminantes químicos, além de apresentar um grande potencial para esclarecimento dos mecanismos de toxicidade destes agentes, investigação do metabolismo e outras possíveis interações biológicas (MUÑOZ, B., ALBORES, A., 2010; VLAANDEREN *et al.*, 2010; DUDKA, *et al.*, 2014).

Para estudar o metaboloma é necessário a utilização de metodologias e equipamentos específicos, de acordo com as características de cada classe. Com o desenvolvimento da espectrometria de massas (MS), tornou-se possível medir rapidamente milhares de metabólitos simultaneamente utilizando quantidades mínimas de amostra. Essa é a técnica de análise mais usada na metabolômica, uma vez que proporciona análises rápidas, com alta sensibilidade e seletividade e tem impulsionado a análise de vias metabólicas de diferentes organismos (ABDELNUR, 2011; CANUTO, *et al.*, 2018).

Geralmente, em metabolômica, a espectrometria de massas é precedida por uma etapa de separação que reduz a alta complexidade da amostra biológica e permite a análise de diferentes conjuntos de moléculas em diferentes tempos (THEODORIDIS, *et al.*, 2011).

As aplicações da metabolômica têm se expandido amplamente nos últimos anos, inclusive nas áreas de análises toxicológicas, com o estudo do desenvolvimento de biomarcadores e avaliação de risco de exposição tóxica, respostas metabólicas a

estressores ambientais e monitoramento de doenças (ABDELNUR, 2011; BUJAK *et al.*, 2014).

A fim de elucidar o impacto à saúde pela exposição às substâncias químicas, o uso de biomarcadores de genotoxicidade é aplicado em estudos de exposição ambiental. A partir da compreensão da relação entre a exposição ambiental ou ocupacional e os estudos de genotoxicidade é possível consolidar medidas de prevenção e controle de qualidade para o meio ambiente e seres humanos (YUASA, 2010). Alterações como as aberrações cromossômicas, as trocas entre cromátides irmãs e os micronúcleos (MNs), têm sido consideradas ao longo de vários anos como biomarcadores de substâncias genotóxicas associados a efeitos precoces de carcinógenos (VALVERDE, ROJAS, 2009; CALDERÓN-SEGURA *et al.*, 2012; CIMINO, *et al.*, 2014).

Efeitos genotóxicos associados à exposição às substâncias químicas, como produção de metabólitos tóxicos ativos, adutos de DNA, alteração no material genético, geração de espécies reativas, aberrações cromossômicas entre outros efeitos, podem ser avaliados efetivamente utilizando os ensaios de micronúcleo e cometa (VALVERDE, ROJAS, 2009; CIMINO, *et al.*, 2014).

O ensaio de micronúcleo (MN) é um método de extrema relevância para a Toxicologia Genética e Ambiental, tendo em vista que detecta alterações cromossômicas, podendo ser considerados como marcadores precoces para a carcinogênese (BONASSI *et al.*, 2011, WULTSCH *et al.*, 2011). Já o Ensaio Cometa, além de ser um teste de genotoxicidade, é uma ferramenta importante para a investigação de lesões ao DNA que são passíveis de correção. Esse ensaio é cada vez mais utilizado no biomonitoramento humano, devido à sua sensibilidade para a detecção de níveis baixos de danos ao DNA, à sua aplicabilidade aos diversos tecidos e células, além de ser um método simples, rápido e sensível (GONTIJO; TICE, 2003; COLLINS *et al.*, 2008).

Esse estudo foi gerado a partir da hipótese de que há a possibilidade de identificação de metabólitos que possam predizer o dano ao organismo do indivíduo antes do surgimento dos sintomas, por meio da avaliação da metabolômica e dos biomarcadores de genotoxicidade, nos grupos exposto e controle, para verificação de possíveis diferenças entre eles.

CAPÍTULO II

ASPECTOS GERAIS DOS AGROTÓXICOS

2.1 Histórico

De acordo com a lei nº 7802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto Nº. 4.074/2002, “os agrotóxicos são agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados à produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, florestas, outros ecossistemas e ambientes urbanos, com a finalidade de alterar a composição da flora ou da fauna, preservando-as da ação danosa de seres vivos nocivos, por meio de desfolhantes, desseccantes e inibidores de crescimento” (BRASIL, 1989).

O uso dessas substâncias químicas na agricultura tem aumentado de forma significativa ao longo dos anos, devido ao crescimento populacional e ao aumento da demanda energética, que estimularam os processos de produção agrícola. A aplicação desses produtos ainda é o meio mais eficaz para a proteção de plantas contra pragas e tem contribuído para o aumento da produtividade e do rendimento das colheitas. Dos três bilhões de quilos de agrotóxicos produzidos anualmente, a maioria é utilizada na agricultura. Embora a atuação deles seja direcionada a certos organismos sem afetar outros, sua seletividade é difícil de ser estabelecida, o que os torna um perigo potencial para o meio ambiente e organismos não-alvo, como os seres humanos, devido à contaminação do ar, água, alimentos e uso doméstico (BOLOGNESI, C. 2003; SILVA et al., 2005; VASCONCELOS, 2018; MIGLANI, BISHT, 2019; SARABIA, et al., 2021; GANGOLA, *et al.*, 2022).

Durante os anos 1800, vários herbicidas para controle de plantas daninhas foram desenvolvidos a partir de compostos inorgânicos, mas o primeiro agrotóxico de largo uso no campo, sendo utilizado mundialmente, foi descoberto em 1885, após parreiras francesas serem acometidas por uma doença conhecida pelo nome popular de míldio, do inglês *mildew*, causada pelo fungo *Plasmopara viticola*. Essa doença provocou queima e queda das folhas e destruição dos frutos da videira, chegando a níveis epidêmicos catastróficos. Foi observado que a atividade fungicida do sulfato de cobre, após ser neutralizado por cal hidratada, poderia ser pulverizado nos jovens parreirais no campo, inibindo o desenvolvimento da doença (SILVA, 2012).

Em 1939, foram descobertas as propriedades inseticidas do DDT (dicloro–difênil–tricloroetano), o que originaria um novo grupo de inseticidas denominado

organoclorados. Esse novo inseticida possuía duas grandes características: alto poder inseticida e, sobretudo, alto poder residual, permanecendo no substrato tratado por décadas. Acreditava-se que, se usado corretamente, não causaria nenhum mal em humanos nem aos animais domésticos, pois não induzia nenhum sintoma que pudesse ser notado. Esse inseticida foi utilizado largamente na agricultura, nas residências e na saúde pública. Doenças do homem transmitidas por insetos, a exemplo da malária, tifo e peste-negra, foram erradicadas em muitas localidades no mundo pelo uso do DDT. O efeito era imediato e voltava-se a confirmar a crença de que o DDT não trazia nenhum problema para a saúde do homem e dos animais domésticos, pois não havia nenhum tipo de intoxicação aguda (SILVA, 2012; GANGOLA, *et al.*, 2022).

Durante os anos 1960 e 1970, tiveram início os debates sobre a utilização desses produtos químicos, que atraiu a atenção do público em geral, particularmente em países desenvolvidos. Muitos problemas ambientais emergiram do uso persistente de inseticidas e herbicidas, além dos problemas relacionados à saúde humana. Demonstrou-se a real possibilidade de correlação entre resíduos de agrotóxicos em alimentos e muitas doenças crônicas da população, inclusive o câncer (SOLOMON, *et al.*, 2010; SILVA, 2012; SUR, SATHIAVELU, 2022).

Na década de 1970, o uso foi intensificado devido à política brasileira de estímulo ao crédito agrícola, financiando agricultores e condicionando o empréstimo ao uso de insumos, entre eles, os agrotóxicos. Ainda nesta década, começaram a surgir vários relatos de contaminação ambiental e problemas de saúde associados ao uso excessivo e desordenado desses xenobióticos, principalmente intoxicações de trabalhadores rurais, contaminações de solos e águas, além da constatação de resíduo químico em alimentos cultivados com estes compostos (SOLOMON, *et al.*, 2010; SILVA, 2012; FRIEDRICH, *et al.*, 2021).

Nos anos 80, várias discussões políticas foram feitas no Brasil. Foram elaborados novos instrumentos legais, entre os quais a nova Constituição Brasileira e a Lei 7.802, decretada em 11 de junho de 1989, que regulamenta o uso de agrotóxico no Brasil. A partir desta lei, a comercialização desses produtos passou a depender da obtenção de um registro, sendo avaliados os aspectos de impactos ao meio ambiente, à saúde humana e à eficácia agrônômica do produto (BRASIL, 1989, SOLOMON, *et al.*, 2010;

SILVA, 2012).

Em 2008, o Brasil ocupou a primeira posição no ranking mundial de países consumidores de agrotóxicos e vivencia, desde então, o aumento de sua utilização nos meios urbano e rural. Essa situação coloca em risco boa parte da população, que pode ser exposta a partir das atividades laborais ou da contaminação do meio ambiente, da água e dos alimentos (SILVA, 2012; BRASIL, 2017; SUR, SATHIAVELU, 2022).

Uma forma de incentivo ao uso consiste na criação de políticas de crédito, onde os agricultores devem apresentar um plano de aquisição e uso desses agentes, mesmo sem identificar a real necessidade. A isenção de impostos para esses produtos também tem sido um importante fator que explica a rápida e intensa conversão tecnológica para uma agricultura químico-dependente. Paralelamente, os recursos para controle, fiscalização e monitoramento do uso e os efeitos na saúde dos agrotóxicos estão muito aquém do necessário (FRIEDRICH, *et al.*, 2021).

Desde 2019, foram aprovados no Brasil mais de 400 novos tipos de agrotóxicos, valor muito superior a tendência de crescimento dos outros anos e uma das principais justificativas para esse aumento na aprovação de xenobióticos foi a diminuição da burocracia envolvida no licenciamento de novos produtos comerciais, trazendo preocupação no campo da saúde pública (VASCONCELOS, 2018; BRAGA *et al.*, 2020; PORTO, *et al.*, 2021).

A ampla utilização de agrotóxicos, o desconhecimento dos riscos associados à sua manipulação, o conseqüente desrespeito às normas de segurança, a livre comercialização, a grande pressão comercial por parte das empresas distribuidoras e produtoras e os problemas sociais encontrados no meio rural constituem importantes causas que levam ao agravamento dos quadros de contaminação humana e ambiental observados no Brasil. A elevada demanda de pulverizações e o uso intenso e repetido dessas substâncias químicas causam danos à população exposta e exigem cuidados com a segurança no trabalho por meio da utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPI). A não utilização do EPI acentua os riscos decorrentes da exposição, que podem levar a intoxicações crônicas e agudas, provocando vítimas entre os trabalhadores e também suas famílias (SILVA, 2011; VASCONCELOS, 2018).

2.2 Classificação dos agrotóxicos

Os agrotóxicos englobam uma vasta gama de substâncias químicas que podem ser classificadas de diferentes maneiras e uma das formas mais comuns é quanto ao modo de ação e organismo-alvo, sendo divididos em diversas classes como inseticidas, herbicidas, fungicidas, raticidas, moluscicidas, nematocidas e outros. Dentro desta classificação, as três principais categorias mais utilizadas na agricultura são os inseticidas; fungicidas e herbicidas. É importante destacar que, dentro de cada classe de modo de ação, os xenobióticos também podem ser subdivididos, de acordo com sua estrutura química, em compostos organoclorados, organofosforados, piretroides, benzimidazóis, fenoxiácidos, dinitroanilinas, triazóis, fenóis, entre outros (MIGLANI, BISHT, 2019; SUR, SATHIAVELU, 2022).

2.2.1 Inseticidas

Os inseticidas são produtos químicos utilizados para o controle e/ou morte de insetos e são usados na agricultura, horticultura, silvicultura, jardins e residências. Esse grupo é classificado de acordo com sua composição química, sendo alguns exemplos, os inseticidas organofosforados, organoclorados e os carbamatos (KALYABINA, *et al.*, 2021; GANIE, *et al.*, 2022).

Os compostos organofosforados atuam a partir da inibição de enzimas esterases, principalmente, a acetilcolinesterase, onde essa interação pode ocorrer de forma irreversível. A acetilcolina se comunica com os receptores de acetilcolina, apresentando um papel importante na regulação da frequência cardíaca, contração dos músculos lisos, atividade secretória por glândulas e outras funções do sistema nervoso central. Em uma situação de homeostase, a acetilcolina é degradada pela acetilcolinesterase em acetato e colina. Quando essa atividade é inibida, gera-se um efeito colinérgico excessivo, uma vez que não há a finalização da transmissão dos impulsos nervosos, pelo acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas. Dessa forma, é desenvolvida uma hiper estimulação dos receptores colinérgicos no sistema nervoso central, junções neuromusculares, terminais pós-ganglionares na musculatura lisa, cardíaca, glândulas e no sistema

nervoso autônomo, podendo inclusive ser fatal (SILVA, 2016; MALAKOOTIAN, *et al.*, 2020; SILVA, GARRIDO, 2021).

Estudos revelaram possíveis relações entre a exposição a organofosforados e sérios efeitos à saúde, incluindo doenças cardiovasculares, insuficiência respiratória, demência, aumento do risco de linfoma não-Hodgkin, além de neurotoxicidade, conhecida como polineuropatia retardada induzida, a qual apresenta sintomas como formigamento das mãos e pés, perda sensorial, fraqueza muscular seguida por flacidez dos músculos esqueléticos distais e ataxia (NICOLOPOULOU-STAMATI, *et al.*, 2016; MALAKOOTIAN, *et al.*, 2020; SILVA., GARRIDO, 2021).

Com relação aos inseticidas organoclorados, eles apresentam caráter altamente tóxico para o ambiente e para os indivíduos. Atualmente, são listados como poluentes orgânicos persistentes e estão proibidos na maioria dos países, pois eles se acumulam nos tecidos gordurosos de mamíferos, aves e peixes, podendo contaminar a população pela alimentação. Eles apresentam potencial cancerígeno e podem permanecer na natureza por mais de cem anos (HASSAAN, NEMR, 2020; KALYABINA, *et al.*, 2021; SILVA, GARRIDO, 2021)

A classe geral de organoclorados tem sido associada a distúrbios endócrinos, efeitos no desenvolvimento embrionário, alterações hematológicas e hepáticas e carcinogênese. Outras alterações podem ser manifestadas, havendo variação conforme a via de intoxicação, como vômitos e diarreia por via oral; tosse, bradipneia e broncopneumonia por inalação e desenvolvimento de dermatites em casos de contato com a pele (FILHO, *et al.*, 2017; HASSAAN, NEMR, 2020; KALYABINA, *et al.*, 2021; SILVA, GARRIDO, 2021).

Os inseticidas carbamatos são considerados os inseticidas menos perigosos, sendo comumente utilizados devido à sua baixa bioacumulação, toxicidade relativamente pequena para mamíferos e eficácia no controle de uma grande variedade de pragas. Desempenham um papel importante na agricultura devido à sua natureza de amplo espectro. (FILHO, *et al.*, 2017., MATOŠEVIĆ, BOSAK, 2020; KALYABINA, *et al.*, 2021).

Os efeitos causados por esses compostos geralmente dependem do tipo de carbamato envolvido, a dose e via de exposição. Essa classe de agrotóxicos tem sido

associada à atividade desreguladora endócrina, possíveis distúrbios reprodutivos e efeitos nos mecanismos metabólicos celulares e mitocondriais. Além disso, estudos *in vitro* revelaram a capacidade dos carbamatos de causar efeitos citotóxicos e genotóxicos em células ovarianas de hamster e induzir apoptose e necrose em células do sistema imune humano (NICOLOPOULOU-STAMATI, *et al.*, 2016; MUSTAPHA, *et al.*, 2019).

2.2.2 Fungicidas

Os fungicidas são compostos químicos utilizados no controle de doenças causadas por fungos, bactérias e algas, sendo amplamente utilizados na indústria, agricultura e jardinagem. São utilizados também para aumentar a produtividade, reduzir danos estéticos e aumentar o prazo de armazenamento da produção. Esses produtos podem ser aplicados em vários momentos, como proteção de folhagem, tratamento de sementes, desinfecção do solo, tratamento pós-colheita para proteger a produção (LINI, *et al.*, 2021; FRAC, 2022; SILVA, *et al.*, 2022).

Um dos grupos de fungicidas mais utilizados atualmente são os triazóis, fungicidas orgânicos desenvolvidos por volta de 1960 e que possuem grande importância no controle químico de doenças causadas por fungos. Eles são absorvidos e translocados na planta, onde atuam preventivamente, antes da infecção, ou de modo curativo, na presença de sintomas (MOURA, 2013; CARNEIRO, 2015; MARQUES, 2017; JALAL, *et al.*, 2020).

Os triazóis pertencem ao grupo dos inibidores da síntese de esteróis. São considerados inibidores do CYP51 (lanosterol-14 α -desmetilase), necessário para a biossíntese do ergosterol, que é um importante lipídio fúngico para a formação da membrana das células. A ausência do ergosterol altera a fluidez e a permeabilidade da membrana, levando ao colapso da célula fúngica (micélio) e à interrupção do crescimento micelial (MOURA, 2013; MARQUES, 2017; JALAL, *et al.*, 2020; OTHMÈNE, *et al.*, 2020; MACHADO, *et al.*, 2021).

A exposição à classe dos fungicidas pelos seres humanos induz vários efeitos adversos à saúde. Eles podem causar tremores, irritação cutânea, alterações respiratórias, carcinogenicidade do fígado, toxicidades hepáticas e toxicidades

reprodutivas. Estudos relatam que estes compostos são considerados potenciais desreguladores endócrinos (possuem alta capacidade de interferir com as enzimas do citocromo P450), com atividade antiandrogênica, afetando a produção dos hormônios sexuais feminino e masculino, causando a diminuição da produção de espermatozoides. (CARNEIRO, 2015; MOREAU, SIQUEIRA, 2016; JALAL, *et al.*, 2020; OTHMÈNE, *et al.*, 2020; LINI, *et al.*, 2021).

2.2.3 Herbicidas

Compostos químicos utilizados para destruir ervas daninhas e que são capazes de controlar ou suprimir o crescimento das plantas, são chamados de herbicidas. O glifosato é o herbicida mais utilizado atualmente e seu modo de ação é pela inibição da 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), inibindo a síntese de três aminoácidos essenciais: tirosina, triptofano e fenilalanina, o que afeta o crescimento e desenvolvimento das plantas (BOOTSIKEAW, *et al.*, 2020; HU, *et al.*, 2021; SILVA, *et al.*, 2022).

A exposição cutânea é a mais frequente nos trabalhadores. O glifosato possui uma biotransformação mínima no organismo, portanto, normalmente a quantidade encontrada nos tecidos e na urina é do produto inalterado (BOOTSIKEAW, *et al.*, 2020; LIMBERGER, 2022).

O glifosato pode causar vários efeitos agudos e crônicos, incluindo problemas gastrointestinais, alteração da consciência, hipertensão, desconforto respiratório e insuficiência renal. Estudos relatam que ele pode apresentar atividade de desregulação endócrina, neurotoxicidade e pode estar relacionado a doenças de Parkinson, Alzheimer e câncer. As propriedades citotóxicas e genotóxicas deste produto foram avaliadas e foi constatado um aumento significativo nas pontes nucleoplasmáticas, aberrações nucleares e micronúcleos em indivíduos expostos a esse agrotóxico, indicando danos no DNA (SWANSON, *et al.*, 2014; NICOLOPOULOU-STAMATI, *et al.*, 2016; BOOTSIKEAW, *et al.*, 2020; LIMBERGER, 2022).

2.3 Exposição ocupacional e ambiental

Os seres humanos são expostos diretamente aos agrotóxicos em atividades ocupacionais e, indiretamente, por meios ambientais. Na agricultura, a exposição ocorre durante a preparação e aplicação dos produtos, limpeza dos equipamentos e equipamentos de proteção individual. Já a exposição ambiental atinge a maioria da população e está relacionada à presença dos xenobióticos em diferentes matrizes ambientais, como inalação de ar, contato com o solo e consumo de água e alimentos contaminados (BOOTSIKEAW, *et al.*, 2020; TUDI, *et al.*, 2022).

Após a aplicação, os agrotóxicos entram em contato com a planta, o solo, a água e a atmosfera. No solo, podem sofrer evaporação, escoamento superficial e absorção pelas plantas. No caso da pulverização, eles podem entrar na atmosfera por volatilização no momento de sua aplicação ou evaporar posteriormente a partir da superfície do solo ou da vegetação. Os agrotóxicos presentes no ar podem ser transportados pelo vento para áreas distantes do local de aplicação. A contaminação das águas superficiais e subterrâneas por esses produtos tem sido relatada em todo o mundo, podendo resultar em efeitos tóxicos para a saúde humana devido à sua utilização para o lazer e abastecimento público (MEDEIROS, *et al.*, 2021; SUR, SATHIAVELU, 2022).

Outra importante via da exposição dos seres humanos aos xenobióticos são os alimentos. No Brasil, os níveis de resíduos nos alimentos são monitorados pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), uma ação do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), coordenado pela Anvisa (ANVISA, 2019; MEDEIROS, *et al.*, 2021).

As principais formas de exposição dos agrotóxicos são pelas vias respiratória, dérmica e oral. A exposição respiratória, por inalação de vapores, pode ocorrer durante o manuseio e a aplicação dos produtos. Estes são rapidamente absorvidos pela via respiratória, podendo causar danos ao nariz, garganta e tecidos pulmonares (BOOTSIKEAW, *et al.*, 2020; MEDEIROS, *et al.*, 2021; TUDI, *et al.*, 2022).

A absorção dérmica depende da quantidade do produto, da sua toxicidade para a pele, duração da exposição, formulação do toxicante e do uso de equipamentos de

proteção individual (BOOTSIKEAW, *et al.*, 2020; MEDEIROS, *et al.*, 2021; TUDI, *et al.*, 2022).

A exposição por via oral ocorre por razões acidentais ou intencionais e pode causar graves problemas de saúde. Esse tipo de exposição ocorre quando os trabalhadores não lavam as mãos antes de comer ou fumar, por tentativa de suicídio e também é causa indireta de contaminação da população em geral ao consumirem alimentos com resíduos de agrotóxicos. Após ser ingerido, o toxicante pode ser absorvido ao longo do trato gastrointestinal e atingir a corrente sanguínea (BOOTSIKEAW, *et al.*, 2020; MEDEIROS, *et al.*, 2021; TUDI, *et al.*, 2022).

Aplicado, geralmente, em quantidades excessivas e sem equipamento de proteção individual, os resíduos dos agrotóxicos são absorvidos. Após a entrada no organismo, eles são distribuídos pela corrente sanguínea. A maior parte do metabolismo desses produtos ocorre no fígado e, em menor extensão, nos pulmões e intestinos. A biotransformação ocorre em duas fases, promovendo a conversão dos compostos em metabólitos mais hidrossolúveis e a conjugação com moléculas orgânicas de maior peso molecular, o que favorece a excreção pela urina ou fezes, pois o composto passa a ter uma maior solubilidade em água (MALAKOOTIAN, *et al.*, 2020; MEDEIROS, *et al.*, 2021; GANIE, *et al.*, 2022).

O risco associado aos agrotóxicos para o ser humano não depende apenas da toxicidade dos ingredientes ativos, mas também da quantidade do produto absorvido e do tempo de exposição. Com base nisso, esses produtos podem deixar efeitos a curto prazo, como coceira na pele, irritação nos olhos, tontura, cefaleia, náuseas, vômitos, diarreia, cólica abdominal, irritação da boca e garganta, paralisia muscular, fraqueza, entre outros, ou podem levar a efeitos mais graves a longo prazo, como problemas respiratórios, úlceras, infertilidade, leucemia, linfomas não-Hodgkin e outros tipos de cânceres. Foram observados ainda, alterações no funcionamento do sistema nervoso central e por isso podem estar relacionados ao Mal de Parkinson e Alzheimer. Problemas no funcionamento do sistema endócrino também foram relatados (SILVA, F.R., 2011; KVITKO, *et al.*, 2012; SUR, SATHIAVELU, 2022; TUDI, *et al.*, 2022).

Nas últimas décadas, a toxicologia tem buscado novas estratégias para avaliação do risco frente à exposição química. Uma abordagem integrada, com a utilização das

tecnologias ômicas, como a metabolômica e também de biomarcadores moleculares ou celulares, pode fornecer informações sobre respostas biológicas complexas e descobrir biomarcadores únicos ou de assinatura que possam ser usados na prática clínica para promover a biomonitorização (HERNÁNDEZ, *et al.*, 2017).

CAPÍTULO III

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES DE
GENOTOXICIDADE**

3.1 REVISÃO DA LITERATURA

3.1.1 Monitorização biológica

A monitorização biológica é um procedimento que consiste em uma rotina de avaliação e interpretação de parâmetros biológicos e/ou ambientais com a finalidade de detectar os possíveis riscos à saúde, antes que uma doença ou intoxicação se instale (AMORIM, 2003).

A realização da monitorização biológica permite avaliar a exposição global ao agente tóxico e pode ser avaliada por medida da concentração do agente químico em amostras ambientais, como o ar (monitorização ambiental), ou através da medida de parâmetros biológicos (monitorização biológica), denominados indicadores biológicos ou biomarcadores (AMORIM, 2003; PRISTA, UVA, 2007).

A biomonitorização é uma ferramenta essencial para avaliação do risco na exposição de trabalhadores às substâncias químicas. Desta forma, é parte integrante dos exames ocupacionais na rotina de saúde preventiva, padronizados pela Norma Regulamentadora - NR 7 (Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional), que possui a finalidade de proteger e preservar a saúde dos trabalhadores em relação aos riscos ocupacionais. Esta norma, cuja última alteração foi em março de 2020, define os Indicadores Biológicos de Exposição Excessiva (IBE/EE) para alguns agentes químicos, como sendo aqueles que não têm significado clínico, mas que, quando alterados, indicam a possibilidade de exposição acima dos limites de exposição ocupacional, e os Indicadores Biológicos de Exposição com Significado Clínico (IBE/SC), os quais evidenciam disfunções orgânicas e efeitos adversos à saúde (GUIRADO, MARTINS, 2019; BRASIL, 2020).

Indicadores biológicos são, portanto, definidos como toda a substância ou estrutura que pode ser quantificada no organismo ou em seus meios biológicos, que influencia ou prediz a incidência de um acontecimento ou de uma doença. Podem ser usados para vários propósitos, dependendo da finalidade do estudo e do tipo da exposição química, como avaliar a exposição ou a quantidade absorvida ou dose interna, avaliar os efeitos das substâncias químicas e avaliar a suscetibilidade individual

(AMORIM, 2003; PRISTA, UVA, 2007; ARAOUD, 2011; DALMOLIN, *et al.*, 2020; EPA, 2022).

O biomarcador deve demonstrar a existência de exposição, indicar o efeito e estabelecer a ligação entre o xenobiótico e sua toxicidade. Deve também ser detectado precocemente, refletindo um efeito tóxico reversível e subclínico, pois isso permitirá a adoção de medidas preventivas. Ele deve ser específico, preciso, válido e sensível, sendo que essa sensibilidade se refere à sua capacidade para mostrar diferenças marcantes mesmo após baixos níveis de exposição toxicológica (SILVA, 2016; GUIRADO, MARTINS, 2019).

Os biomarcadores são classificados em três categorias: biomarcadores de exposição, de suscetibilidade e de efeito, todos úteis em diversas áreas, como medicina, saúde ambiental, toxicologia, biologia e pesquisa científica (AMORIM, 2003; SILVA, 2016; DALMOLIN, *et al.*, 2020).

Os biomarcadores de exposição podem ser definidos como uma substância exógena ou seu metabólito, ou ainda, um produto da interação entre um agente xenobiótico e um componente endógeno. Refletem a quantidade de agente químico que entrou no organismo e foi efetivamente absorvida, por isso, são identificados como dose interna. São utilizados para confirmar e avaliar a exposição de um indivíduo ou grupo a uma substância, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação interna (AMORIM, 2003; ARAOUD, 2011; SILVA, 2016).

O biomarcador de exposição mais específico é aquele que possui medição direta do produto químico no organismo, normalmente realizada em matriz biológica, como sangue ou urina, mas, como muitos produtos químicos são rapidamente metabolizados, o mais comum é a dosagem do metabólito desses agentes químicos (EPA, 2022).

Alguns exemplos de indicadores biológicos de exposição para agrotóxicos incluem a determinação de dialquifosfatos na urina para avaliar a exposição a inseticidas organofosforados e inseticidas organoclorados em leite materno para avaliar a exposição a este grupo de inseticidas (ANWAR, 1997; ARAOUD, 2011).

Com relação aos biomarcadores de susceptibilidade, nem todos os indivíduos apresentam um determinado efeito em relação a uma exposição e a severidade deste mesmo efeito pode variar de pessoa para pessoa. Portanto, eles constituem um indicador

de uma habilidade inerente ou adquirida de um organismo para responder ao desafio da exposição a uma substância xenobiótica específica, podendo tornar certos indivíduos mais sensíveis à exposição química (WHO, 1993; AMORIM, 2003; PRISTA, UVA, 2007; EPA, 2022).

Estão relacionados a fatores genéticos que podem influenciar como o organismo interage com um produto químico e a fatores biológicos, como estado nutricional, estado de saúde, estilo de vida e estágio de vida que podem afetar a suscetibilidade de um indivíduo à exposição química. Esses marcadores biológicos indicam quais fatores podem aumentar ou diminuir o risco de um indivíduo desenvolver uma resposta tóxica após a exposição a agrotóxicos. O uso desses biomarcadores, refletindo suscetibilidade geneticamente ligada ou adquirida a agrotóxicos ou seus metabólitos, oferece uma oportunidade para o reconhecimento e proteção de indivíduos sensíveis (WHO, 1993; AMORIM, 2003; SILVA, 2016; EPA, 2022).

A suscetibilidade individual desempenha um papel crítico na avaliação da exposição a agrotóxicos, pois o mesmo nível de exposição individual pode determinar o aparecimento ou não de sintomas clínicos ou mesmo de intoxicação. Esta suscetibilidade individual é causada por enzimas-chave polimórficas como esterases e transferases, assim como seus sinergismos. Os diferentes genes polimórficos têm sido associados a um aumento da ativação ou redução da desintoxicação e eliminação de agrotóxicos. Embora todos os caminhos para a desintoxicação de agrotóxicos não sejam totalmente compreendidos, o processo envolve três sistemas principais: enzimas do complexo do citocromo P450, glutatona S-transferases e sistema de esterases. Nesse sentido, a pesquisa de polimorfismos em genes que codificam enzimas importantes no processo de biotransformação tem sido empregada como indicadores de susceptibilidade (BOLOGNESI, 2003; ARAOUD, M., 2011).

O biomarcador de efeito representa o resultado de uma interação química entre a quantidade de agente químico absorvido e receptores biológicos do organismo exposto. Esses indicadores identificam fenômenos bioquímicos precoces e reversíveis, mas que podem também ser preditivos de respostas mais tardias (PRISTA, UVA, 2007; SILVA, 2016; EPA, 2022).

Enquanto os indicadores biológicos de exposição revelam a quantidade de substância presente em um organismo, permitindo realizar a estimativa do risco de efeitos adversos através do conhecimento adquirido sobre as relações dose-efeito, os indicadores de efeito quantificam a interação já existente e determinada pela dose interna (PRISTA, UVA, 2007).

Os biomarcadores de efeito em geral não são específicos para uma substância, mas, com relação a alterações associadas à ação da substância química sobre um determinado órgão, e podem contribuir para avaliar o estado e a evolução desta interação. Muitos deles são usados na prática para auxiliar no diagnóstico clínico, mas para fins preventivos um biomarcador de efeito é aquele que mede a alteração biológica precoce e reversível (WHO, 1993; AMORIM, 2003; PRISTA, UVA, 2007).

Dentre os biomarcadores de efeito, temos a determinação da atividade das enzimas colinesterase eritrocitária e colinesterase plasmática, que tem sido amplamente utilizada para monitorar a exposição aos inseticidas organofosforados e/ou carbamatos. Fortes associações foram relatadas entre a exposição a esses compostos e sintomas de toxicidade crônica, além da redução da atividade de colinesterase em populações expostas (AMORIM, 2003; ARAOUD, 2011; SILVA, 2016; CERNY, 2021).

A determinação da atividade da colinesterase é utilizada também para o diagnóstico e o tratamento das intoxicações. Entretanto, não apresenta correlação muito significativa em exposições ambientais e/ou ocupacionais leves ou moderadas a estes inseticidas. Ainda assim, é considerado o indicador biológico de escolha (AMORIM, 2003; SILVA, 2016; CERNY, 2021).

Alguns indicadores biológicos de efeito permitem a avaliação da ação de uma substância química no órgão alvo a partir da medida de uma alteração biológica associada a esta ação. Um exemplo desses indicadores biológicos são os biomarcadores de genotoxicidade, como aberrações cromossômicas (CA), troca de cromátides irmãs (SCE), micronúcleos (MN) e eletroforese em gel de célula única ou Ensaio Cometa (AMORIM, 2003).

3.1.2 Biomarcadores de genotoxicidade

O genoma de todos os organismos vivos está constantemente sob o efeito de agentes exógenos ou endógenos que modificam a integridade química do DNA, alterando seu conteúdo de informações genéticas. No entanto, nem sempre, alterações são vantajosas e os impactos no fenótipo podem incluir má formação, câncer, envelhecimento e morte. Embora essas alterações possam ocorrer de forma espontânea, muitas são induzidas por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais o homem e outros organismos podem ser expostos. Essas modificações incluem anormalidades cromossômicas e aquisição de novas variantes que são responsáveis pela instabilidade genômica e desempenham um importante papel na carcinogênese (KVITKO, *et al.*, 2012; FENECH, 2020; FRANCKE, *et al.*, 2020).

Os agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando adutos, alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA. A mutagenicidade refere-se a alterações permanentes na estrutura do material genético de célula ou de um organismo, que podem ser transmitidas e resultar em várias modificações hereditárias nos organismos. Essas mudanças podem envolver um único gene, um segmento de genes, um bloco de genes ou até mesmo todo o cromossomo ou em todo o genoma (FENECH, M., 2020)

O dano ao material genético devido à exposição aos agrotóxicos tem sido uma preocupação abordada por diversos estudos associando a incidência de aberrações cromossômicas, micronúcleos e troca de cromátides irmãs com a duração da exposição ocupacional. Uma ampla gama de métodos é atualmente usada para a detecção de efeitos biológicos precoces de agentes que danificam o DNA em ambientes ocupacionais (FERRÉ, *et al.*, 2018; NASCIMENTO, *et al.*, 2022).

A frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico tem sido, por muitos anos, aplicada como um biomarcador de efeitos iniciais de agentes genotóxicos em ambientes ocupacionais e ambientais, mas há uma necessidade de métodos rápidos e confiáveis que detectem danos ao DNA causados por agentes sob diferentes circunstâncias de exposição. Neste sentido, o ensaio de citoma e o ensaio cometa têm sido usados em estudos de biomonitoramento humano relacionados à

exposição às substâncias químicas. Estes ensaios realizados em conjunto são considerados padrão ouro na avaliação de genotoxicidade à exposição de substâncias químicas, onde o cometa avalia danos pré-reparo, ou seja, lesão de DNA, e mecanismo de reparo e o citoma avalia danos pós-reparo, ou seja, ocorrência de mutações (KVITKO, *et al.*, 2012; SILVERIO, 2016; FERRÉ, *et al.*, 2018).

3.1.2.1 Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa ou Ensaio de Eletroforese em Gel de Célula Única tem amplas aplicações em toxicologia no monitoramento da exposição humana a agentes tóxicos. É um método sensível, que avalia danos ao DNA de células individuais e possibilita quantificar quebras da fita. É considerado uma ferramenta de grande valor na investigação de danos ao DNA utilizando células sanguíneas para avaliar exposições ocupacional e ambiental, como biomarcador de efeito de substâncias químicas mutagênicas (FAUST, *et al.*, 2004; Di-PAOLO, 2006; GROVER, *et al.*, 2010; INTRANUOVO, *et al.*, 2018; NASCIMENTO, *et al.*, 2022).

Os danos ao DNA podem ser causados por fatores ambientais, processos metabólicos intracelulares, erros de recombinação e replicação do DNA. As lesões de DNA mais comuns são quebras de fita simples e dupla, perda de uma base nitrogenada, dano oxidativo e formação de adutos de DNA. Numerosos xenobióticos são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) responsáveis pelo estresse oxidativo. Excesso de ROS, e, particularmente do radical hidroxila, podem levar a danos no DNA e, portanto, contribuir para a carcinogênese. Assim, o Ensaio Cometa também é uma ferramenta importante para verificar questões relacionadas com estresse oxidativo em linfócitos humanos, o que assegura a sua utilização como biomarcador de patologias, de exposição ocupacional e de poluição ambiental (STANG; WITTE, 2009; SICIŃSKA, *et al.*, 2021; NASCIMENTO, *et al.*, 2022).

Nos últimos anos, várias metodologias para a detecção de danos no DNA foram desenvolvidas. Rydberg e Johanson (1978) foram os primeiros a quantificar diretamente os níveis de danos no DNA em células individuais, incorporando-os em lâminas de agarose e realizando a lise sob condições alcalinas suaves para permitir o

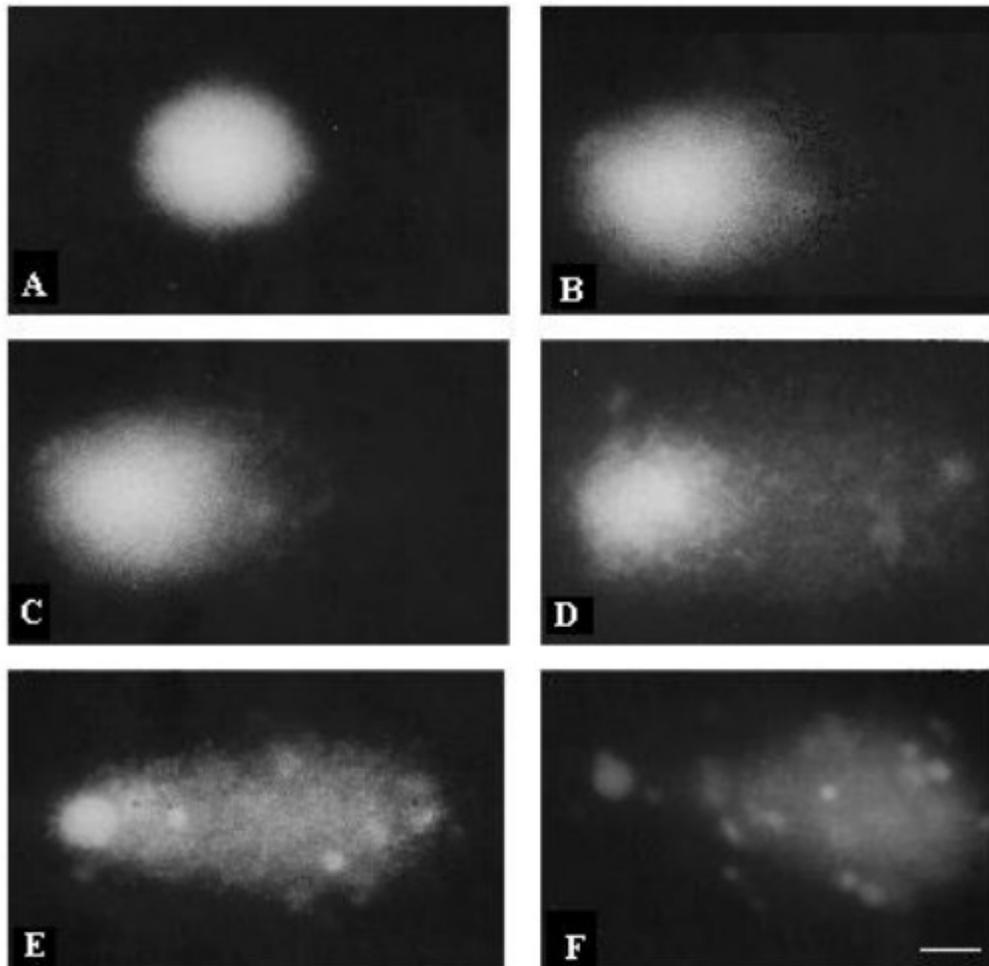
desenrolamento parcial do DNA. Após a neutralização, as células eram coradas com laranja de acridina e a extensão do dano ao DNA era medida pela proporção de verde (indicando DNA de fita dupla) usando um fotômetro. Para melhorar a sensibilidade de detecção de danos no DNA em células únicas, Ostling e Johanson (1984) desenvolveram uma técnica de eletroforese em microgel, onde as células embebidas em agarose são colocadas em uma lâmina de microscópio e lisadas por detergentes e tratamento com alto teor de sal. O DNA liberado é submetido à eletroforese sob condições neutras e corado com brometo de etídio (VALVERDE; ROJAS, 2009; NASCIMENTO, *et al.*, 2022).

Singh e colaboradores, em 1988, desenvolveram uma metodologia que usa eletroforese alcalina ($\text{pH} > 13$) para detectar danos no DNA induzidos por agentes físicos e químicos. Esta metodologia é capaz de detectar quebras de DNA de fita simples, locais alcalinos lábeis e sítios de reparo de DNA incompletos em células individuais. Posteriormente, Olive e colaboradores adaptaram a técnica neutra de Ostling e Johanson para que o ensaio Cometa pudesse incluir a lise de células por tratamento alcalino seguido de eletroforese em quaisquer condições neutras ou alcalinas suaves ($\text{pH} 12,3$) para detectar quebras de fita simples do DNA. Os métodos Singh e Olive são idênticos em princípio e semelhantes na prática, mas o método de Singh mostrou ser bem mais sensível na detecção de danos no DNA (SINGH, *et al.*, 1988; STANG; WITTE, 2009; VALVERDE; ROJAS, 2009).

O princípio da técnica consiste na incorporação de amostras celulares em gel de agarose, que são dispostas em uma fina camada sobre as lâminas. Utilizando soluções apropriadas, as membranas da célula, do núcleo e as organelas são rompidas e o material genético é submetido à eletroforese. Os filamentos de DNA íntegros raramente migram e tendem a se concentrar em um nucleóide, enquanto os fragmentos gerados por filamento ou quebras de fita dupla migram no sentido do anodo. Quanto mais intensa for a indução de quebras, menores serão os fragmentos e maior a extensão de migração. Portanto, após a eletroforese, quando visto sob uma fluorescência ao microscópio, é produzida uma imagem em forma de cometa, cuja cabeça consiste no DNA integral e a cauda consiste em fragmentos de DNA de comprimento variável que migraram do núcleo. Conforme descrito por Collins (2008), de acordo com o tamanho da cauda formada é possível classificar visualmente os cometas em cinco categorias (Figura 1). A

classe 0, corresponde a um cometa sem cauda (representa o DNA íntegro), enquanto as classes de 1 a 3 correspondem aos cometas com intensidades de cauda crescente; a classe 4 contempla os cometas em que quase todo o DNA está presente na cauda (dano máximo). A última categoria representa uma célula apoptótica (COLLINS, *et al.*, 2008).

Figura 1 - Classificação da migração do DNA de acordo com o nucleóide e cauda formados, visualizados em microscópio de fluorescência.



Legenda: A - classe zero (sem danos); B - classe I; C - classe II; D - classe III; E - classe IV - dano máximo; F – apoptose / morte celular. Fonte: Da Silva, *et al.*, 2000.

As imagens podem ser analisadas por meio de um software que identifica e delimita as áreas que constituem a cabeça e a cauda. O dano pode ser quantificado, permitindo avaliar o potencial genotóxico de substâncias ou de condições ambientais alteradas (Di-PAOLO, 2006; INTRANUOVO, *et al.*, 2018).

O uso de controles na realização do procedimento permite verificar se o teste foi satisfatório, pois muitas substâncias podem provocar danos ao DNA e assim, o teste pode funcionar como controle positivo. Para isso, é necessário que esta substância seja conhecidamente genotóxica e causar dano detectável no ensaio cometa. Entre elas estão o metilmetanosulfonato, etilmetanossulfonato, etilnitrosourea e N-nitrosodimetilamina. Essas substâncias são utilizadas em cada série do processo com o objetivo de verificar se as etapas foram realizadas corretamente, principalmente a eletroforese (HARTMANN *et al.*, 2003; INTRANUOVO, *et al.*, 2018).

Os cometas resultantes da corrida eletroforética do DNA necessitam passar por um processo de coloração, que pode ser feito alternativamente por técnicas de fluorescência, em que são usados brometo de etídio (extremamente tóxico, ação mutagênica), iodeto de propídio, SYBR Gold e SYBR Green ou por técnica convencional com sal de prata. Esses métodos apresentam diferentes vantagens e limitações. As maiores limitações da fluorescência são a necessidade de microscópio próprio para análise de material fluorescente e a impossibilidade de armazenamento das lâminas para observação posterior, porque a coloração desbota-se em poucos dias. Já sob coloração com sal de prata, a análise pode ser feita com microscópio óptico convencional e as lâminas podem ser armazenadas para análise posterior (DI-PAOLO, 2006; BRIANEZI, *et al.*, 2009; INTRANUOVO, *et al.*, 2018).

O corante brometo de etídio apresenta alguns fatores negativos, como alta toxicidade e curta durabilidade da coloração. Por esses motivos, ele passou a ser substituído por outros como a prata, SYBR Green, SYBR Gold, entre outros (DI-PAOLO, 2006).

O Ensaio Cometa não necessita de células em proliferação, podendo ser realizado com células normais, geralmente linfócitos, pois são obtidos facilmente por meio de coleta de sangue. Outros tecidos, como o fígado e os rins, também têm sido testados, pois os efeitos de genotoxicidade de contaminantes químicos ambientais podem ser muitas vezes específicos para determinados tecidos no organismo (DI-PAOLO, 2006; INTRANUOVO, *et al.*, 2018).

Entre as vantagens identificadas para a realização do Ensaio Cometa, inclui o fato de ser um método rápido e sensível, além da possibilidade de utilizar qualquer célula

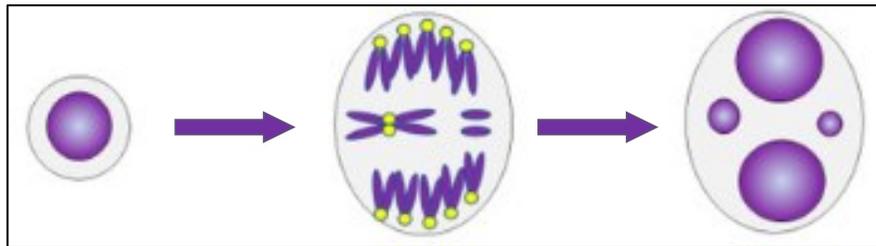
nucleada eucariótica e pequena quantidade de amostras. Esse ensaio é cada vez mais utilizado no biomonitoramento humano, devido à sua sensibilidade para a detecção de níveis baixos de danos ao DNA, à sua aplicabilidade aos diversos tecidos e células, além das vantagens já citadas anteriormente. Contudo, devido à alta sensibilidade da técnica, a manipulação das amostras deve ser realizada cuidadosamente, a fim de não promover danos ao DNA durante o preparo das lâminas (DI-PAOLO, 2006; SPEIT; VASQUEZ; HARTMANN, 2009; GARCÍA *et al.*, 2011; NASCIMENTO, *et al.*, 2020).

Azqueta *et al.* (2011), aponta a oxidação do DNA, mensurada pelo ensaio cometa, como uma nova chave para investigação de mutagênese ambiental, uma vez que diversos agentes ambientais como radiação UV, metais pesados, solventes orgânicos podem causar estresse oxidativo e são descritas várias relações positivas de diversas patologias com o dano oxidativo do DNA.

3.1.2.2 O Ensaio do Citoma

Os micronúcleos (MN) consistem numa porção citoplasmática de cromatina de forma redonda ou ovalada que se localiza perto do núcleo. Eles são formados durante o processo de divisão celular e são constituídos por fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que são perdidos durante a divisão nuclear e que, por isso, foram excluídos do núcleo principal das células filhas (Figura 2). Dessa forma, a detecção de micronúcleos representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou no processo mitótico (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003; POLARD *et al.*, 2011; FENECH, *et al.*, 2020).

Figura 2 - Formação de micronúcleos a partir de cromossomos inteiros ou acêntricos.

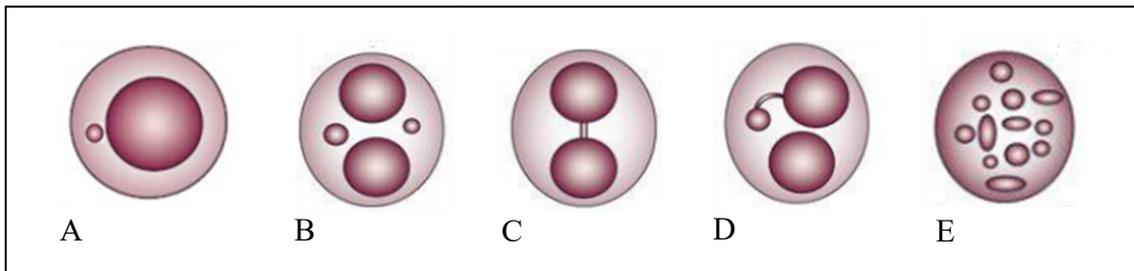


Fonte: Adaptado de Fenech, 2020.

Os micronúcleos foram relatados em eritrócitos pela primeira vez há mais de 100 anos. Após vários estudos mostrando sua origem a partir de aberrações cromossômicas em linfócitos, os micronúcleos tornaram-se reconhecidos como um dos biomarcadores mais importantes da patologia genômica associada a uma ampla gama de doenças degenerativas e de desenvolvimento, incluindo envelhecimento acelerado e inflamações. Além disso, pesquisa de micronúcleos em células é um método de extrema relevância para a Toxicologia, tendo em vista que detecta alterações cromossômicas, sendo considerados como marcadores precoces para a carcinogênese (BONASSI *et al.*, 2011, WULTSCH *et al.*, 2011; DONMEZ-ALTUNTAS, BITGEN, 2012; FENECH, *et al.*, 2020).

Uma abordagem mais abrangente para os ensaios de MN, conhecida como ensaio do citoma, foi desenvolvida visando descrever todas ou a maioria das características fenotípicas relevantes em nível citológico que estão associadas à genotoxicidade e/ou citotoxicidade e estão correlacionadas direta ou indiretamente com a formação de MN (DONMEZ-ALTUNTAS, BITGEN, 2012; FENECH, *et al.*, 2020; FRANZKE, *et al.*, 2020; CERNY, 2021). Algumas alterações possíveis de células identificadas no ensaio do citoma após exposição a agentes citotóxicos/genotóxicos estão representadas na Figura 3.

Figura 3 - Fotomicrografias de células pontuadas no ensaio do citoma.



Legenda: A) célula mononucleada contendo um micronúcleo; B) célula binucleada contendo dois micronúcleos; C) célula binucleada contendo uma ponte nucleoplasmática; D) célula binucleada contendo botão nuclear, E) célula apoptótica. Fonte: Adaptado de Fenech, M., 2006.

Com a utilização desses parâmetros, é possível medir a frequência de quebra cromossômica (MN), perda cromossômica (MN), rearranjo cromossômico, cromossomos dicêntricos (PNP), botões nucleares (NBUDs), necrose e apoptose. A célula binucleada é caracterizada pela presença de dois núcleos centrais no mesmo citoplasma e sua

ocorrência indica falha no processo da citocinese durante a reprodução celular. O botão nuclear e a ponte nucleoplasmática estão relacionados a cromossomos dicêntricos com comportamentos anormais durante a segregação. A célula cariorrética é caracterizada pela fragmentação e desintegração nuclear no estágio avançado da morte celular por apoptose. A célula picnótica possui um núcleo pequeno com cromatina condensada e intensa coloração e está relacionada a um estágio avançado da morte celular por necrose. Já a célula cariolítica apresenta perda completa do material genético, não sendo possível a visualização à microscopia de luz; está relacionada ao estágio mais avançado do processo de morte celular por necrose (FENECH, 2006; BOLOGNESI, *et al.*, 2013; TONELINE, *et al.*, 2014; FENECH, *et al.*, 2020; CERNY, 2021).

As proporções de células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas, necróticas e apoptóticas são usadas para determinar a taxa de divisão mitótica e morte celular (citotoxicidade). As proporções de células binucleadas com micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas ou botões nucleares em relação ao número total de células binucleadas fornecem uma medida de dano ao genoma e/ou instabilidade cromossômica (FENECH, 2006).

3.1.2.3 Ensaio do citoma em mucosa oral

A mucosa oral é um dos materiais biológicos mais fáceis de se obter, sendo uma importante fonte de células bucais, principalmente quando a finalidade é dosar alguns biomarcadores de dano ao DNA, como por exemplo, os micronúcleos. Elas podem ser coletadas usando uma espátula, um swab de algodão ou uma pequena escova de dentes. As células bucais que são coletadas para exame microscópico se originam de divisões mitóticas na camada basal do epitélio bucal. A maior fração das células são escamosas diferenciadas e o restante consiste em células em diferentes estágios de morte celular, incluindo células com cromatina condensada, núcleos cariorreicos ou picnóticos ou células cariolíticas nas quais o DNA nuclear foi completamente degradado. Os MN são pontuados em pelo menos 2.000 células viáveis diferenciadas (GODOY, *et al.*, 2019; FENECH, *et al.*, 2020).

O citoma observado nos ensaios de MN difere dependendo do tipo de célula e das características do ensaio utilizado (FENECH, *et al.*, 2020). A Tabela 1 descreve os biomarcadores pontuados no ensaio de citoma MN bucal.

Tabela 1 - Biomarcadores no ensaio de citoma MN bucal

Parâmetro	Ensaio de citoma bucal
Anormalidades nucleares	Micronúcleos, brotos nucleares medidos em células mononucleadas diferenciadas viáveis.
Biomarcadores de morte celular	Células de cromatina condensadas; células cariorréticas; células picnóticas; células cariolíticas.
Biomarcadores de divisão celular	Células basais; Células binucleadas

Fonte: Fenech, 2020.

É importante, ao usar o ensaio de citoma MN, também investigar a correlação dos vários parâmetros entre si. No caso de células bucais, correlações positivas entre as frequências de células basais, cromatina condensada, cariorreicas, células picnóticas e cariolíticas, mas não com MN ou botões nucleares sugerem a possibilidade de que esses tipos celulares representem o processo de degeneração nuclear que normalmente ocorre durante a diferenciação e morfogênese das células epiteliais na mucosa oral. Portanto, alguns critérios devem ser padronizados, como definição clara dos parâmetros de pontuação, melhor conhecimento das características críticas que afetam os resultados do ensaio, além da realização da leitura das lâminas por apenas um observador, minimizando um viés associado a diferentes reconhecimentos de MN por diversos pontuadores. Essa é uma limitação comum de ensaios que dependem da pontuação visual, a grande heterogeneidade dos pontuadores (BONASSI, *et al.*, 2011; TORRES-BUGARÍN, *et al.*, 2014; FENECH, *et al.*, 2020).

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

- ✓ Avaliar os efeitos genotóxicos e citotóxicos em indivíduos expostos ocupacionalmente e não ocupacionalmente aos agrotóxicos, utilizando os ensaios Cometa e Citoma.

3.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Definir e selecionar a população de estudo dividida em dois grupos de indivíduos: expostos ocupacionalmente e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos;
- ✓ Categorizar a população de acordo com a atividade ocupacional;
- ✓ Otimizar e padronizar as condições analíticas para o Ensaio Cometa;
- ✓ Avaliar os biomarcadores de genotoxicidade, utilizando os ensaios Cometa e Citoma;
- ✓ Aplicar estudos estatísticos para estabelecer possíveis associações e correlações entre os dados obtidos no estudo.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Descrição do município de Paraguaçu, Minas Gerais

O município de Paraguaçu, localizado no sul do estado de Minas Gerais (Figura 4), a 347km da capital Belo Horizonte, possui população estimada, em 2021, de 21.693 habitantes, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021).

Figura 4 - Localização do Município de Paraguaçu, no Estado de Minas Gerais.



O município é, tradicionalmente, agropastoril, com destaque para a criação de bovinos e produção de café e leite. Dentre os produtos plantados, o café é o predominante, além da presença de culturas de milho, feijão e soja. Na área urbana, a cidade conta com fábricas têxteis, como principal forma de emprego para a população (IBGE, 2022).

A região do sul de Minas Gerais possui a agricultura como atividade econômica tradicional, sendo o estado de Minas Gerais o maior estado produtor de café do Brasil, respondendo por quase 50% da produção nacional (CONAB, 2021). Como essa região é grande produtora de café, consequentemente, o uso de agrotóxicos é elevado e os trabalhadores rurais estão cotidianamente expostos a seus efeitos nocivos (SILVÉRIO, *et al.*, 2020).

3.3.2 População do estudo

A população deste estudo foi composta por 37 indivíduos, de ambos os sexos, os quais foram divididos em dois grupos.

O grupo ocupacionalmente exposto aos agrotóxicos foi constituído por trabalhadores rurais do município de Paraguaçu, Minas Gerais, do sexo masculino e com faixa etária entre 22 e 62 anos.

O grupo ambientalmente exposto aos agrotóxicos foi composto por voluntários residentes próximos às lavouras da região de Paraguaçu, do sexo feminino, com faixa etária entre 33 e 59 anos e que não possuíam histórico de exposição ocupacional a esses produtos químicos.

As coletas das amostras de sangue, urina e mucosa bucal foram realizadas pela equipe do Projeto de Extensão da Universidade de Alfenas (UNIFENAS/MG), intitulado “Plantando e Colhendo Saúde”, coordenado pela professora Dra. Alessandra Cristina Pupin Silvério. Todos os voluntários forneceram informações relacionadas a seus hábitos pessoais, sociais e no trabalho, por meio do preenchimento de um protocolo toxicológico e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Posteriormente, foram coletados 10 mL de sangue periférico por punção venosa, 50 mL de urina e um swab de células da mucosa oral de cada participante.

De acordo com a resolução 196/96, este estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (CAAE: 39339720.0.0000.5149, número do parecer: 5.473.586).

3.3.3 Ensaio Cometa

A técnica do cometa foi realizada de acordo com o protocolo de Singh e colaboradores (1988) com alterações, utilizando amostras de sangue total em EDTA.

3.3.3.1 Material e reagentes

- ✓ O padrão utilizado para provocar o dano ao DNA (controle positivo) foi metilmetanosulfonato (MMS) da Sigma Aldrich;

- ✓ Água purificada obtida em um sistema Milli-Q Gradient (Millipore,USA);
- ✓ Agarose ultra pura normal e agarose baixo ponto de fusão da Invitrogen;
- ✓ NaCl, EDTA dissódico, Tris-Cl, NaOH, dimetilsulfóxido (DMSO), Triton X-100, KCl, KH₂PO₄, Na₂PO₄ de padrão analítico (P.A.) ou grau HPLC;
- ✓ SYBR Gold (Invitrogen, EUA): corante de ácido nucléico fluorescente ultrasensível e extremamente estável, com alta afinidade para DNA de fita simples e DNA de fita dupla.
- ✓ As agaroses de ponto de fusão normal (PFN) e baixo ponto de fusão (BPF) foram preparadas pela adição de 1,5% e 0,5% p/v de agarose em tampão PBS respectivamente. A dissolução do reagente em tampão PBS, foi feita por meio do aquecimento em forno micro-ondas.
- ✓ A solução de lise foi preparada por meio de de uma dissolução altamente concentrada em sais (NaCl 2,5M, EDTA dissódico 100mM, Tris-Cl 10mM, Triton X 1%, DMSO 10%) e o pH acertado para 10.
- ✓ A solução de eletroforese funciona como um tampão alcalino, composta de NaOH 10N e EDTA dissódico 200mM, sendo que o pH deve ser maior que 13.
- ✓ A solução de neutralização foi preparada com a adição de Tris-Cl 0,4M em água Mili-Q, ajustando o pH para 7,5.
- ✓ O corante SYBR Gold foi preparado a partir do padrão comercial, diluindo-o em água.
- ✓ Todas as soluções foram acondicionadas em frascos âmbar, em temperatura de refrigeração de 2 a 8°C.
- ✓ Balança analítica marca Ohaus E02140,
- ✓ Peagâmetro da marca Digimed DM21,
- ✓ Cuba de eletroforese horizontal da marca Loccus Biotecnologia 12cm x 14cm,
- ✓ Banho maria da marca Hemoquímica
- ✓ Microscópio de fluorescência Nikon® Eclipse 50i.

3.3.3.2 Otimização da técnica do Ensaio Cometa

Uma série de experimentos foi realizada para otimização do ensaio, totalizando 60 alterações de diversos parâmetros, conforme demonstrado na Tabela 2. As alterações finais realizadas no protocolo constam na metodologia descrita.

Tabela 2 – Parâmetros testados no protocolo do ensaio cometa

Parâmetros	Protocolo original (SINGH, <i>et al.</i>, 1988)	Testes
Volume de amostra (µL)	5	15, 20, 25; 40; 50
Volume de agarose 0,5%	95	100; 200; 240; 400
Concentração do gel de agarose	0,5%	0,5%; 1%; 2%
Volume total de suspensão adicionado nas lâminas	100	100; 110; 120; 140; 200; 225; 400
Testes de marcas de Agarose	-	Invitrogen; Bioamérica
Tempo de secagem das lâminas em geladeira	20 minutos	15 minutos; 20 minutos, 30 minutos; 45 minutos; overnight
Tempo de tratamento com a Solução de Lise	60 minutos	2 horas; 3 horas; overnight
Tempo de neutralização em solução de eletroforese	20 minutos	20 minutos; 40 minutos
Concentração do corante SYBR Gold	1:10000 (0,02%)	0,25%; 0,05% 0,02%

Fonte: Elaborado pelo autor.

A primeira etapa para realização do Ensaio Cometa consiste na preparação da lâmina com agarose de ponto de fusão normal (PFN 1,5% p/v) e posterior suspensão celular da amostra com agarose de baixo ponto de fusão (BPF 0,5% p/v). A lâmina com agarose PFN foi feita pela imersão da lâmina na agarose a 60 °C. Após a secagem da lâmina com agarose PFN, a amostra preparada anteriormente é colocada na lâmina. A preparação da amostra consiste em misturar uma alíquota de sangue total a determinado volume de agarose de baixo ponto de fusão a 37 °C. Foram testadas duas marcas e concentrações diferentes de agarose, assim como cinco volumes de amostras

adicionadas nas lâminas. A concentração da agarose é uma variável muito importante a ser testada, pois concentrações maiores dificultam a migração do DNA durante a eletroforese, apresentando uma diminuição progressiva na intensidade da cauda dos cometas. A variação do volume ou densidade celular é considerada uma etapa crítica, já que poucos nucleóides encontrados inviabilizam a análise e células em excesso podem apresentar problemas, já que os cometas sobrepostos são difíceis de pontuar com precisão ou não são pontuados.

Após o preparo das lâminas com o sangue total, estas foram armazenadas em geladeira por tempos diferentes, para verificação do melhor período de armazenamento para solidificação total do material. Quanto maior o tempo, mais difícil é a retirada da lamínula sem comprometer o gel. Concluída essa etapa, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram imersas em solução de lise altamente concentrada em sais, que foi preparada em duas etapas. A solução de lise inicial resulta na dissolução do NaCl, Tris-Cl e EDTA dissódico em água, ajustando o pH para 10 com NaOH. Já a solução de lise final deve ser preparada no momento do uso, acrescentando o Triton X e DMSO. As lâminas com as amostras foram mantidas nesta solução final por 2 horas, 3 horas e overnight.

Após serem removidas da solução de lise, as lâminas foram mergulhadas em solução tampão alcalina para eletroforese, com o $\text{pH} > 13$. As lâminas foram mantidas neste tampão por 20 minutos, para promover a desnaturação do DNA. Logo após, a eletroforese foi realizada em uma cuba horizontal com a voltagem de 25V e corrente de 300 mA, por 20 minutos, para ocorrer o desenrolamento do DNA e testar danos tanto ao filamento simples quanto ao filamento duplo, proveniente de vários processos biológicos como a quebra de cadeia simples de DNA, lesões e reparos incompletos. A eletroforese foi realizada na temperatura de 4°C, sob banho de gelo e ausência de luz. O DNA, carregado negativamente, migra para o polo positivo proporcionalmente ao seu dano e a uma velocidade inversamente proporcional ao tamanho de seus fragmentos.

Posteriormente à eletroforese, foi realizada a neutralização das lâminas, que são retiradas da cuba eletroforética e colocadas em um coppling com solução de neutralização, deixando em geladeira por 20 minutos e 40 minutos, ao abrigo da luz. As lâminas foram então fixadas com etanol absoluto por 5 minutos e armazenadas em

recipiente próprio na geladeira até o momento da leitura. Para a análise das lâminas, foram adicionados 80uL de solução de corante SYBR Gold, em diferentes concentrações, sobre a lâmina e cobertas com lamínula. Todos esses passos devem ser realizados na presença de baixa luminosidade.

Para controle de qualidade da técnica, foram utilizados controles positivos e negativos. O controle positivo foi constituído por 50 µL de sangue adicionado de 13 µL de solução de sulfonato metil metano (10mg/L) e incubado a 37°C por 2 horas. O controle negativo foi sangue de indivíduo não exposto. Em cada eletroforese do estudo experimental incluiu-se uma alíquota dos controles para garantir a qualidade do ensaio.

Foram analisadas duas lâminas para cada indivíduo e foram contadas, ao todo, 150 células por indivíduo (75 células em cada lâmina). As leituras das lâminas foram realizadas em microscópio de fluorescência (Nikon® Eclipse 50i), utilizando filtro verde, com ampliação de 40x. O software de captura de dados utilizado foi o Nis Element (Nikon®). Para a leitura e análise dos dados foi utilizado o software CometScore (versão 1.5). O software permite o cálculo de alguns parâmetros, como o comprimento da cauda do cometa, intensidade de fluorescência, expressa como a porcentagem de DNA presente na cauda, momento da cauda de Olive, entre outros.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Análises Nutricionais e Toxicológicas *in vitro* e *in vivo* da UNIFAL-MG.

A identificação da metodologia mais eficiente, baseou-se na seleção do protocolo que conduziu à obtenção de lâminas mais homogêneas, nucleóides bem formados e melhor coloração na fluorescência. O método de preparo otimizado foi empregado na avaliação do dano genotóxico dos indivíduos que constituem essa pesquisa.

3.3.4 Ensaio de citoma

O ensaio do citoma em células do epitélio bucal foi realizado segundo o protocolo utilizado por Benedetti, et al. (2013), no Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos da UNIFAL-MG.

3.3.5 Atividade das enzimas colinesterases

A determinação da atividade das enzimas colinesterásicas foi realizada pelo Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos da UNIFAL-MG. Para essa análise, foi utilizado o método desenvolvido por Ellman, *et al* (1961), o qual se baseia na medida colorimétrica da velocidade de hidrólise da acetiltiocolina pelas colinesterases sanguíneas.

3.3.6 Análise Estatística

As variáveis numéricas foram avaliadas por meio de estatísticas descritivas, como a média, o desvio padrão e a mediana. O teste de Normalidade de Shapiro Wilk e de Anderson-Darling foram aplicados para verificar se as variáveis possuíam distribuição normal gaussiana. As variáveis categóricas foram avaliadas em termos de frequência e porcentagem.

Para verificar as hipóteses de associação entre as variáveis com distribuição normal, foi utilizado o teste *T*; para as demais, foram utilizados o teste de *Mann-Whitney* e o teste exato de *Fisher*. Uma associação foi considerada estatisticamente significativa quando o valor-p foi menor do que 0,05.

O software utilizado nas análises foi o Graphpad Prism® versão 9.0.0.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Características da população de estudo

As principais características e distribuição com relação à população do estudo estão representadas no Quadro 1. O grupo ocupacionalmente exposto aos agrotóxicos é constituído por 22 trabalhadores do sexo masculino, de lavouras de café da região do sul de Minas Gerais. Já o grupo ambientalmente exposto é formado por 15 mulheres que residem próximo às lavouras da mesma região.

A idade média dos indivíduos do grupo ocupacionalmente exposto foi de 45 anos, com variação entre 22 e 62 anos e a idade média do grupo ambientalmente exposto foi de 46 anos, variando de 33 a 59 anos. A maioria dos homens trabalhava com agricultura familiar de pequenas e médias propriedades (68%), enquanto as mulheres exerciam função administrativa. Nos dois grupos, a maioria dos indivíduos (86%) nunca fumou e 24% faziam uso regular de bebida alcoólica. Todos os participantes do grupo exposto estavam em contato direto com esses produtos químicos há, pelo menos, três anos, sendo que 44% deles relataram ter mais de 20 anos de exposição.

Quadro 1 - Características e estratificação da população de estudo

Variáveis	Geral - N = 37				
	Feminino (N=15)	%	Masculino (N=22)	%	
Faixa etária	22-35 anos	4	26,67%	5	22,73
	36-45 anos	3	20,00%	5	22,73
	46-55 anos	4	26,67%	7	31,81
	> 55 anos	4	26,67%	5	22,73
Consumo regular de tabaco	Nunca fumou	13	86,67	19	86,36
	Ex-fumante	1	6,67	0	0,00
	Fumante	1	6,67	3	13,64
Consumo regular de bebida alcoólica	Nunca bebeu	14	93,33	13	59,10
	Parou de beber	0	0,00	1	4,54
	Consome bebida	1	6,67	8	36,36
Profissão/função	Agricultura familiar	0	0,00	15	68,18
	Aplicador agrotóxicos	0	0,00	7	31,82
	Administrativa/outros	15	100,00	0	0,00

Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparando as variáveis escolaridade (tempo de estudo) e idade, não houve diferença significativa entre homens e mulheres, conforme descrito na Tabela 3. Com relação à instrução formal, evidenciamos uma escolaridade média de 7 anos para o grupo exposto ocupacionalmente e 8 anos para o grupo exposto ambientalmente aos agrotóxicos.

Tabela 3 - Comparação realizada pelo teste de Mann-Whitney

Variável	Homens (n=22)	Mulheres (n=15)	Valor-p
	Média ± DP	Média ± DP	
Tempo de estudo (anos)	7,00 ± 3,66	8,30 ± 5,48	0,495(NS)
Idade	45,55 ± 12,01	46,53 ± 9,33	0,993(NS)

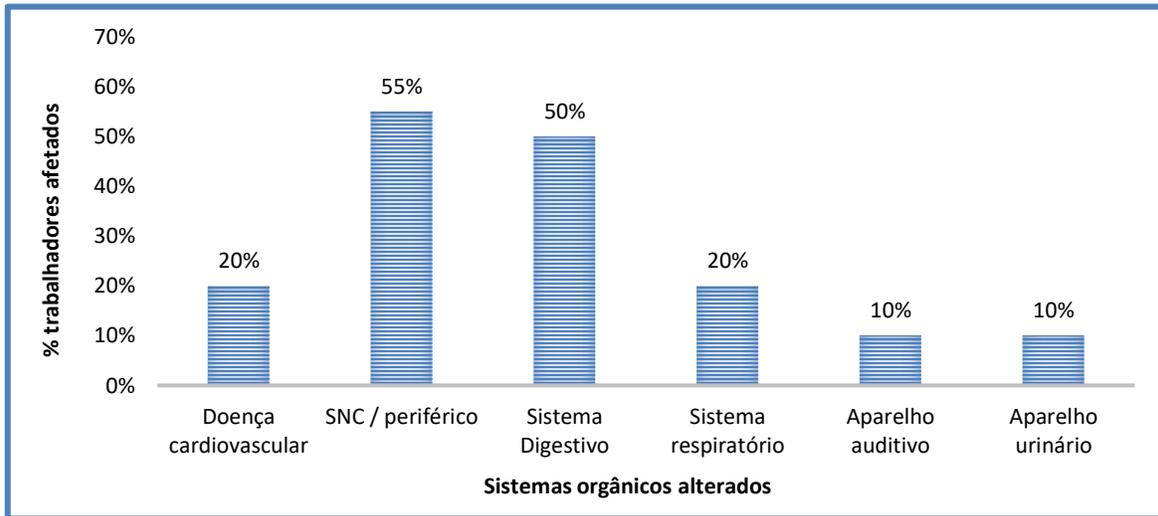
(NS) - Não significativo

É possível encontrar estudos com diferentes resultados em relação às populações estudadas e isso pode ser justificado pelas características intrínsecas dos indivíduos, pelo tipo de atividade na agricultura exercida, pelo período e tipo de aplicação, pelo local da pesquisa, entre outros. Nossos resultados estão de acordo com alguns trabalhos encontrados na literatura, como o de Cuenca e colaboradores (2019), que realizaram um estudo com a participação de 297 pessoas, composto por 130 mulheres e 167 homens e também não encontraram diferenças entre os sexos com relação à idade e nível educacional. A grande maioria dos participantes do grupo exposto eram agricultores (94%), exercendo a profissão há mais de oito anos.

De acordo com a informação prestada pelos participantes do grupo ocupacionalmente exposto, o modo de aplicação dos agrotóxicos era realizado principalmente com bomba costal (44%), seguido de trator sem cabine (33%). Diferentes formas de aplicações levam a diversas condições de exposição, sendo a utilização da bomba costal, o modo de aplicação que representa maior risco de contaminação, pois o contato com o produto químico se torna extremo, além da possibilidade de vazamentos ou respingos da calda após preparada atingir o aplicador. A aplicação utilizando trator sem cabine também aumenta esse risco pela exposição do aplicador ao produto químico por meio da inalação de partículas e vapores levadas pelo vento.

Com relação à avaliação clínica realizada nos trabalhadores rurais, por meio das respostas ao questionário, foram constatadas alterações importantes em sistemas orgânicos, conforme demonstrado na Figura 5.

Figura 5 – Alterações nos principais sistemas orgânicos de trabalhadores expostos aos agrotóxicos.



Fonte: elaborado pelo autor.

Foram observadas perturbações principalmente no sistema nervoso central (SNC) e periférico, onde 55% dos participantes relataram sintomas como dor de cabeça, fraqueza e tremores musculares, tonturas e formigamento. Alterações no sistema digestivo também foram apontadas, sendo que 50% dos trabalhadores relataram enjoos, azia/queimação, vômitos, cólicas abdominais e diarreia. Arritmia, hipertensão, dificuldade respiratória, irritação nasal e fadiga foram identificadas em 20% dos indivíduos ocupacionalmente expostos.

Esses achados corroboram com os efeitos tóxicos oriundos da exposição aos agrotóxicos, conforme resultados constatados por uma revisão sistemática realizada por Lopes e Albuquerque (2018), onde foram reunidos dados de 116 estudos que demonstraram o impacto negativo da exposição a esses xenobióticos para a saúde humana e ambiental. Dentre os sintomas mais comuns relatados pelos participantes estão dores de cabeça, náuseas e dor de estômago, disúria, gastrite/epigastralgia, cólicas abdominais, doenças respiratórias, ansiedade, mialgia, irritabilidade e depressão.

3.4.2 Ensaio Cometa

Neste estudo, a padronização da metodologia foi realizada com base na avaliação microscópica das lâminas ao final dos testes aplicados na etapa de otimização.

As melhores condições padronizadas para a realização do ensaio Cometa estão descritas na Tabela 4 e representadas na Figura 6.

Tabela 4 – Condições padronizadas para o Ensaio Cometa

Parâmetros	Condições padronizadas
Volume de amostra (μL)	20
Volume de agarose 0,5%	100
Concentração do gel de agarose	0,5%
Volume total de suspensão adicionado nas lâminas	120
Testes de marcas de Agarose	Invitrogen
Tempo de secagem das lâminas em geladeira	20 minutos
Tempo de tratamento com a Solução de Lise	2 horas
Tempo de neutralização em solução de eletroforese	20 minutos
Concentração do corante SYBR Gold	0,25%

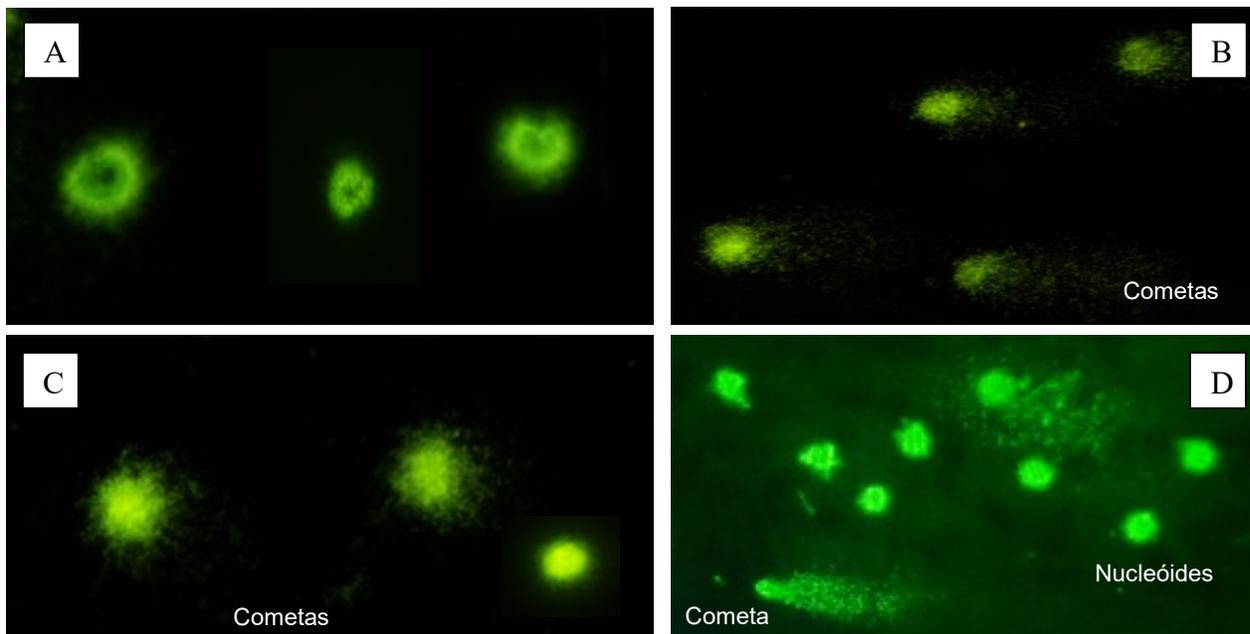
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 - Representação esquemática do ensaio cometa conforme protocolo padronizado.



A Figura 7 apresenta imagens de alguns cometas e nucleóides encontrados nas lâminas analisadas dos indivíduos do grupo estudado, onde se pode observar estruturas em vários estágios, desde a classe zero, sem danos, como os nucleóides bem formados na imagem D, passando pelas classes I, II e III (imagens A, C e D) até os cometas com caudas bem definidas e longas, como nas imagens B e D.

Figura 7 – Imagens de cometas presentes em amostras do grupo exposto



Fonte: captura de imagens realizada pelo autor.

Algumas fontes de variabilidade do ensaio foram identificadas em estudos de biomonitoramento humano, como estilo de vida e características individuais. Diferenças nos protocolos e na interpretação dos resultados contribuem para aumentar o efeito desta variabilidade biológica, dificultando a interpretação dos resultados de estudos multicêntricos de biomonitoramento com o ensaio cometa e limitando o potencial dessa abordagem (AZQUETA, *et al.*, 2020; MILIĆ, *et al.*, 2021)

Collins e colaboradores (2012) realizaram um estudo colaborativo internacional, denominado originalmente de ComNet, com o objetivo de investigar se este ensaio seria um biomarcador confiável e validado para uso em biomonitoramento humano. Baseado nesse projeto, foi criado o hCOMET COST (Cooperação Europeia em Ciência e Tecnologia), que reuniu um conjunto de dados de quase 20.000 indivíduos, coletando

dados de estudos existentes e detalhes de protocolo da maioria dos laboratórios da área, tendo como um dos objetivos, avaliar as diferentes fontes de variabilidade do ensaio (MØLLER, *et al.*, 2020; MILIĆ, *et al.*, 2021).

Os autores reuniram dados de 44 laboratórios participantes e perceberam que uma variabilidade importante são os descritores do ensaio, que possuem grande heterogeneidade entre eles. O descritor mais popular que eles encontraram foi a porcentagem de DNA na cauda (%DNA), medido por 70% dos laboratórios que contribuíram com dados válidos, seguidos pelo comprimento da cauda (37,5%) e momento da cauda (35%) (COLLINS, *et al.*, 2012; MØLLER, *et al.*, 2020; MILIĆ, *et al.*, 2021).

O maior número de estudos relatando a porcentagem de DNA como descritor favorito reflete a orientação da literatura e a recomendação de consórcios colaborativos internacionais (AZQUETA, *et al.*, 2020) e, por esses motivos, foi o descritor utilizado neste estudo.

No presente trabalho, a avaliação do dano ao DNA, calculada, portanto, pelo parâmetro de porcentagem de DNA na cauda, analisando a média \pm DP (desvio padrão), foi de $15,93 \pm 3,50$ para o grupo exposto ocupacionalmente aos agrotóxicos e de $13,02 \pm 1,79$ para o grupo exposto ambientalmente aos mesmos produtos. A comparação foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, o qual demonstrou maior dano genotóxico no grupo ocupacionalmente exposto, em relação ao grupo ambientalmente exposto ($p=0,0068$).

Remor e colaboradores (2009) encontraram também uma frequência de dano no grupo exposto aos agrotóxicos significativamente maior em relação ao grupo controle, relatando a porcentagem de DNA encontrado nos indivíduos expostos de $16,38 \pm 11,68$, semelhante a esse estudo.

Nascimento, *et al.* (2022) realizaram um estudo de metanálise onde avaliaram 42 artigos relacionados ao ensaio cometa e agrotóxicos. Eles identificaram que o efeito do dano ao DNA no grupo exposto a agrotóxicos é cerca de 4,63 vezes maior do que no grupo controle, sendo um dado alarmante, considerando que o estudo compreende uma diversidade de 2.885 indivíduos no grupo exposto e 2.543 indivíduos no grupo controle. Eles citam que essa descoberta destaca a toxicidade potencial da exposição a

agrotóxicos ativos e misturas químicas perigosas que podem se traduzir em risco para a saúde humana. Esse resultado demonstrou dano ao DNA causados por agrotóxicos, independentemente das características do indivíduo como sexo, idade, tipo de agrotóxico ou uso de EPI, que são caracterizados e quantificados em quase todos os estudos analisados.

No trabalho de revisão realizado por Arbo e colaboradores (2022) foram selecionados trinta e quatro estudos brasileiros que correlacionaram o ensaio cometa e a exposição humana a agrotóxicos, sendo um total de 2.174 trabalhadores avaliados. Uma diferença significativa de dano no DNA foi observada nos indivíduos expostos em relação aos controles, mostrando aumentos de 1,1 a 36 vezes. Da Silva e colaboradores (2008) avaliaram a exposição de um grupo de agricultores do sul do Brasil também pelo ensaio cometa e destacaram a grande diferença com relação ao dano no DNA entre o grupo exposto (frequência de dano de $20,26 \pm 11,76$) e o grupo controle ($4,42 \pm 5,85$). Na revisão realizada por Bolognesi e Holland (2016), também é descrito que a maioria dos estudos sobre exposição a agrotóxicos demonstra um aumento significativo no dano ao DNA.

Vários outros trabalhos afirmam o efeito genotóxico causado por agrotóxicos e apresentam resultados semelhantes para os parâmetros do ensaio cometa, mostrando aumentos de dano no DNA pela exposição a esses agentes químicos (COLLINS, *et al.*, 2012; ARSHAD, *et al.*, 2016; FRANCO, *et al.*, 2016; DHANANJAYAN, *et al.*, 2019; DALMOLIN, *et al.*, 2020; NASCIMENTO, *et al.* 2020; CERNY, 2021; MILIĆ, *et al.*, 2021).

Neste estudo, é importante ressaltar que, apesar do nível de dano no grupo exposto ter sido maior do que o encontrado no grupo ambientalmente exposto, não podemos concluir que o gênero diferenciado entre os grupos não tenha causado viés. No entanto, há estudos em literatura que afirmam não haver diferença significativa entre os sexos (WILHELM, CALSING, DA SILVA, 2015; FREDERICO, *et al.*, 2019; NASCIMENTO, *et al.*, 2022).

Como descrito anteriormente, os agrotóxicos mais utilizados pela nossa população de estudo foram os triazóis e o glifosato e é raro encontrar em literatura a avaliação da genotoxicidade dos triazóis em humanos. Cuenca e colaboradores (2019) avaliaram a associação entre o nível de exposição a misturas de agrotóxicos e danos

genotóxicos em agricultores e observaram que exposição a níveis elevados de tebuconazol, fungicida da classe dos triazóis, gerou altos níveis de quebras de fita de DNA, obtendo uma porcentagem de DNA caudal de $13,87 \pm 1,00$. O mesmo foi observado por Ferri, et al., (2018), com trabalhadores envolvidos na cultura de uva, onde demonstraram uma alta associação da exposição ao fungicida com dano no DNA.

Lebailly e colaboradores (2015) concluíram que é difícil atribuir efeitos genotóxicos a qualquer classe ou composto químico específico, pois normalmente os trabalhadores estão expostos a misturas complexas, no entanto, evidenciaram que produtos fungicidas podem ter um papel fundamental na indução de dano ao DNA em linfócitos. Othmène, et al. (2020) pesquisaram o efeito do tebuconazol em células cardíacas utilizando, dentre outros métodos, o ensaio cometa e confirmaram que esse fungicida induz efeitos citotóxicos e genotóxicos nessas células, aumentando a fragmentação do DNA.

Com relação ao glifosato, Pinto e colaboradores (2020) realizaram um estudo de metanálise avaliando 105 estudos com trabalhadores expostos aos agrotóxicos em diversas culturas. Eles relataram que os xenobióticos mais frequentes no estudo, sendo o glifosato, o segundo mais utilizado, apresentaram evidências genotóxicas, como quebra de DNA, micronúcleo e/ou aberrações cromossômicas. Independente da cultura onde trabalhavam, os indivíduos expostos a esses produtos tiveram significativamente maior dano ao DNA do que o grupo controle ($p=0,001$), além de apresentarem também maior taxa de micronúcleos ($p=0,0001$). Alguns trabalhos afirmam que o glifosato possui uma associação positiva com linfoma não Hodgkin e evidências suficientes para carcinogenicidade em animais experimentais, enquanto outros o consideraram pouco tóxico ou improvável de causar danos agudos ao ser humano. Os autores concluíram que estudos mais aprofundados precisam ser realizados para melhor classificação desta substância química (BOLOGNESI, HOLLAND, 2016; MOSTAFALOU, ABDOLLAHI, 2017; CUENCA, et al., 2019; PINTO, et al., 2020).

O manuseio incorreto de agrotóxicos e a ausência de equipamentos de proteção individual (EPI) são frequentemente citados nos estudos e aumentam as chances de ocorrência de intoxicações. As principais vias de absorção destes xenobióticos são pela pele e sistema respiratório e, por esses motivos, o uso de EPIs específicos (roupas, máscaras, luvas) se torna extremamente importante na prevenção de contaminação

acidental e aumento dos efeitos tóxicos nos indivíduos (REMOR, *et al.*, 2009; FRANCO, *et al.*, 2016; SILVERIO, 2016; PANIS, *et al.*, 2022). Lebailly e colaboradores (2015) desenvolveram um estudo com 42 voluntários da região sobre biomonitoramento usando o ensaio cometa e relataram que nenhum dos participantes utilizou EPI's durante a aplicação dos agrotóxicos. Arshad, *et al* (2016), em estudo desenvolvido com trabalhadores agrícolas, relatou que eles possuem pouco ou nenhum conhecimento sobre práticas de segurança, o que pode levar a um aumento significativo de dano no DNA desses trabalhadores. As consequências do manuseio incorreto de agrotóxicos e do não uso de EPI também se refletiram no número de indivíduos que apresentaram intoxicação aguda por agrotóxicos após a pulverização destes produtos, segundo pesquisa desenvolvida por Ramos e colaboradores (2021). Em uma revisão sistemática realizada por Panis, *et al* (2022), foi relatado que 80% dos manipuladores de agrotóxicos desconheciam os equipamentos de proteção individual e 92% não utilizavam nenhum tipo de EPI, tanto no preparo quanto na aplicação de agrotóxicos. Os autores afirmaram, por meio de um modelo de regressão logística utilizada no estudo, que o trabalhador rural que não utiliza equipamento de proteção individual (EPI) tem até 72% de chance de se intoxicar.

No presente trabalho, a maioria dos indivíduos utiliza os EPI's de forma incorreta (79%), tornando-se evidente a necessidade de se destacar a importância do uso destes equipamentos de proteção, oferecer uma melhor orientação e capacitação quanto ao modo de utilizá-los, conscientizar sobre as boas práticas de segurança e, se possível, disponibilizar opções mais adequadas e confortáveis, de acordo com o nível de atividade a ser realizada e o clima do local.

Franco e colaboradores (2016) afirmaram que hábitos e estilo de vida (idade, tabagismo, consumo de álcool, uso de medicamentos e atividade física) não mostraram influência no dano observado no DNA. Singh *et al.*,(2011), obtiveram resultados semelhantes no estudo que realizaram com trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos na Índia, onde não apresentaram aumento nos danos genotóxicos quando relacionados à idade, consumo de álcool e tabagismo. Nascimento, *et al.*, (2020) relataram que os valores dos danos ao DNA encontrados entre o grupo exposto e o não exposto ocupacionalmente aos agrotóxicos foram considerados baixos. Nesse estudo não foi

possível analisar estatisticamente se houve interferência do hábito de fumar e beber em relação ao dano causado no DNA devido ao baixo número de voluntários com esses hábitos.

3.4.3 Ensaio de citoma

Os resultados descritos nesta seção foram originados de estudos conduzidos pela professora Dra. Isarita Martins Sakakibara e realizados no Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL/MG).

Para cada indivíduo do grupo, foram preparadas duas lâminas e analisadas 2000 células bucais (1000 por lâmina) para avaliação da frequência de micronúcleos (MN) e de outras anormalidades nucleares. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Comparação dos resultados do ensaio de citoma entre o grupo de indivíduos expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos e o grupo controle pelo teste de Mann-Whitney.

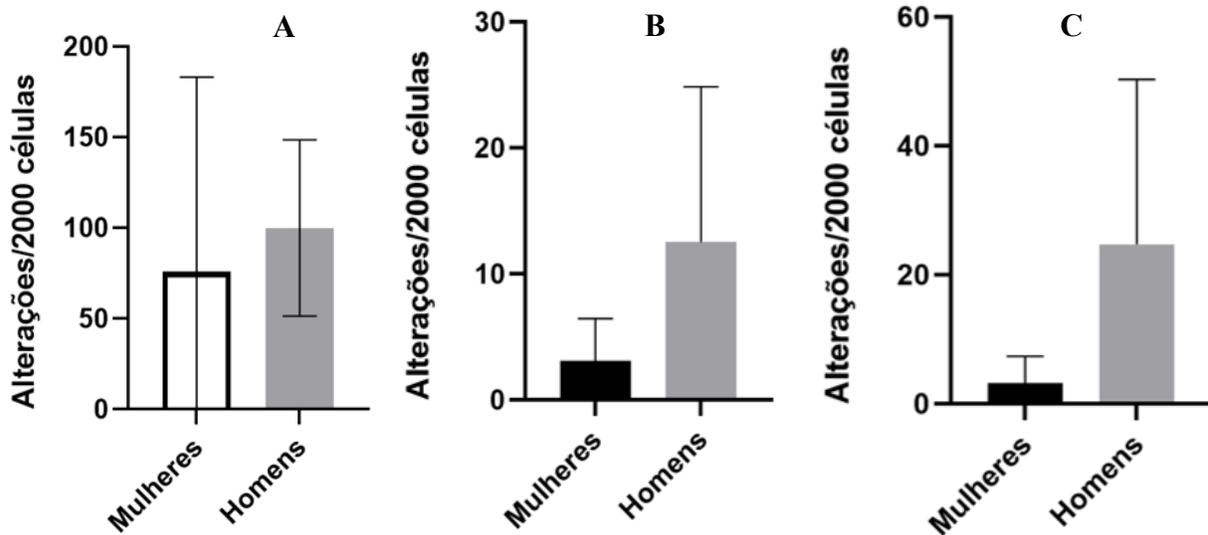
Variável	Grupo exposto	Grupo controle	Valor-p
	Média ±DP	Média ±DP	
Células Binucleadas	20,25 ± 19,46	10,03 ± 7,83	0,057(NS)
Células Cariolíticas	100,1 ± 48,57	75,73 ± 107,6	0,004(*)
Células com Cariorréxe	88,57 ± 49,59	62,97 ± 45,45	0,159(NS)
MN	12,55 ± 12,32	3,1 ± 3,37	0,004(*)
Células Picnóticas	24,77 ± 25,56	3,23 ± 4,13	0,0003(*)

(*) - Estatisticamente significativo, com $p < 0,05$

(NS) - Não significativo

Os resultados foram avaliados estatisticamente, comparando os valores dos parâmetros observados entre os grupos exposto e controle. Não houve diferença significativa entre os grupos, em relação às células binucleadas ($p=0,057$) e às células com cariorrexe ($p=0,159$), mas foi possível perceber um aumento significativo com relação à quantidade de células cariolíticas ($p=0,004$), micronúcleos ($p=0,004$) e células picnóticas ($p=0,0003$) nos indivíduos do sexo masculino, conforme Figura 8.

Figura 8 - Comparação do número de alterações celulares entre os grupos exposto (homens) e controle (mulheres) pelo teste de Mann-Whitney.



Legenda: Comparação do número de células cariolíticas (A), da frequência de MN (B) e número de células picnóticas (C).

O ensaio de citoma avalia danos que podem ser encontrados no DNA, provavelmente associados a processos oxidativos, que podem gerar efeitos mutagênicos, como formação de MN e outras anormalidades celulares. Uma exposição contínua e danos genotóxicos não reparados induzidos por agrotóxicos podem levar a um nível mais elevado de alterações citogenéticas (BOLOGNESI, 2003; SINGH, *et al.*, 2011; BENEDETTI, *et al.*, 2013, SILVERIO, 2016).

Estudos encontrados na literatura analisaram a genotoxicidade dos agrotóxicos pelo ensaio do citoma em trabalhadores expostos e também observaram um aumento de anormalidades celulares, como a presença de cariorrexe, células com núcleo em picnose e cariolíticas, sendo todas consideradas bioindicadores de morte celular. Os autores afirmam que há uma relação direta entre a exposição ocupacional a agentes genotóxicos e a ocorrência de morte celular (BENEDETTI, *et al.*, 2013; KAHL *et al.*, 2018; CERNY, 2021).

Godoy e colaboradores (2019) relataram dados semelhantes aos encontrados neste estudo. Avaliando um grupo de agricultores da região, os autores observaram um aumento significativo na média da frequência de MN (valor-p < 0,01) e de células com picnose (valor-p < 0,01), quando comparadas às médias do grupo controle. Da Silva e

colaboradores (2008) encontraram uma frequência de micronúcleos bem maior no grupo de agricultores do sul do Brasil ($7,34 \pm 4,82$) em comparação ao grupo controle ($4,33 \pm 5,42$), com valor- $p < 0,001$ (teste de Mann-Whitney), evidenciando um alto risco genotóxico relacionado à exposição decorrente do uso intensivo de agrotóxicos.

Um efeito citotóxico do fungicida à base de tebuconazol em linfócitos periféricos bovinos foi constatado por Šiviková, et al (2013), por meio dos ensaios cometa, micronúcleo e aberrações cromossômicas. Os autores concluíram que, considerando as exposições humanas e animais ao fungicida triazol, um aumento estatisticamente significativo na frequência de anormalidades celulares em linfócitos periféricos bovinos também fornece dados sobre os potenciais efeitos clastogênicos e genotóxicos do fungicida. Ghisolfl (2020) realizou um estudo sobre os efeitos do tebuconazol em plantas utilizando o ensaio de micronúcleos e observou que, mesmo em concentrações muito baixas, inclusive abaixo do limite máximo permitido de resíduos, este composto triazol é potencialmente genotóxico.

Em um estudo de biomonitoramento envolvendo trabalhadores com aplicação de formulações de glifosato, Bolognesi e colaboradores (2009) detectaram um aumento significativo na frequência de MN associada à exposição em comparação com o grupo controle, sugerindo um potencial risco genotóxico associado a formulações de glifosato. Frederico e colaboradores (2019) constataram que indivíduos expostos a poluentes têm um aumento estatisticamente significativo (valor- $p < 0,01$) na frequência de células de MN na mucosa oral em comparação com o grupo controle, mas pontes nucleoplasmáticas (NPB) e brotos nucleares (NBD) não apresentaram diferença significativa em relação aos controles. Eles citaram que alguns fatores de confusão, como idade, sexo, tabagismo, consumo de álcool e outras características do estilo de vida, foram considerados e quase nenhum deles mostrou qualquer divergência significativa na frequência de células MN.

Benedetti, et al (2013) realizou um estudo utilizando o ensaio cometa e o citoma em sangue periférico para avaliar os possíveis danos que a exposição aos agrotóxicos poderia causar. Os autores demonstraram que essa exposição induz dano no DNA, com valores de frequência de dano de $23,1 \pm 9,4$ para o grupo exposto, em relação ao controle, $13,3 \pm 6,4$ ($P < 0,001$, teste de Mann-Whitney). O mesmo foi observado com o

ensaio de citoma bucal, que detectou aumento da ocorrência de células com micronúcleos ($P < 0,001$), brotos nucleares e células binucleadas ($P < 0,01$), assim como um aumento da picnose ($P < 0,05$), células cariorreicas ($P < 0,01$) e cariolíticas ($P < 0,05$).

Bolognesi, Holland (2016) realizaram uma revisão envolvendo 49 estudos de diversos locais, como Europa, América do Sul, EUA, Ásia e Austrália. Todos estavam relacionados ao uso do ensaio do citoma em linfócitos periféricos e em células bucais, para biomonitoramento de trabalhadores de diferentes culturas. Os autores relataram aumento significativo da frequência de micronúcleos em 36 estudos, mas não observaram diferenças entre os grupos exposto e controle nos outros 13 estudos. Estes se caracterizaram pelo uso comum de equipamentos de proteção individual e por adotarem medidas de segurança adequadas que levaram a menores exposições genotóxicas para os trabalhadores. Esse estudo ressaltou a importância do uso dos EPI's e de políticas eficazes de segurança para o indivíduo, sugerindo a promoção de programas educativos para o uso seguro de agrotóxicos.

3.4.4 Atividade das enzimas colinesterases

De acordo com a informação prestada pelos participantes, os produtos mais utilizados foram o glifosato (52,78%), do grupo dos herbicidas e os compostos triazóis, do grupo dos fungicidas (42%).

Com a finalidade de avaliar a exposição ocupacional aos agrotóxicos, apenas a determinação da atividade das enzimas colinesterases (colinesterase eritrocitária e a colinesterase plasmática) é reconhecida como biomarcador com significância clínica, preconizado pela Norma Regulamentadora nº7 (NR7) e utilizada no monitoramento da saúde do trabalhador exposto a anticolinesterásicos (AMORIM, 2003; BRASIL, 2020; DALMOLIN, *et al.*, 2020; ARBO, *et al.*, 2022).

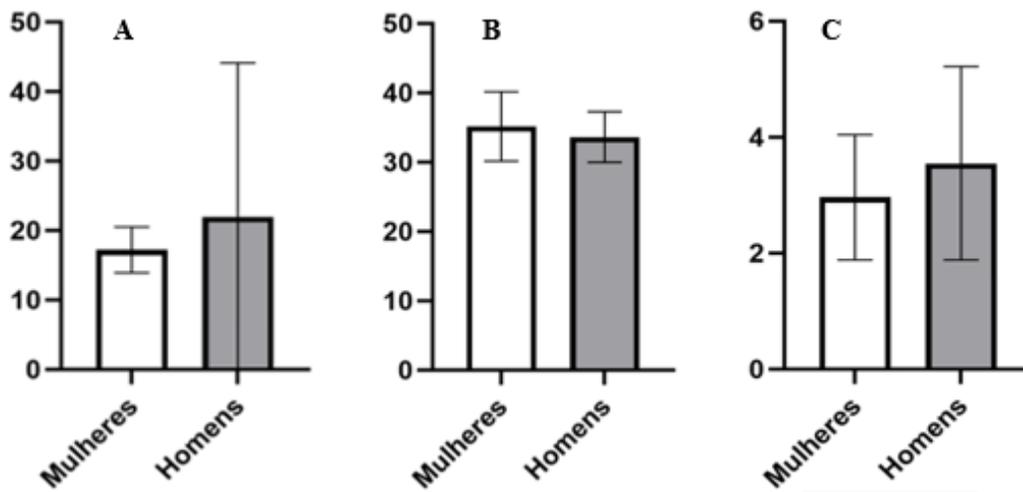
Dosagens da atividade das colinesterases dos voluntários deste estudo foram realizadas e os resultados, representados por média e desvio-padrão, estão dispostos na Tabela 6 e nos gráficos da Figura 9.

Tabela 6 - Comparação pelo teste de Mann-Whitney da atividade da Colinesterase

Variável	Grupo exposto	Grupo controle	Valor de Referência	Valor-p
	Média ± DP	Média ± DP		
Colinesterase total	21,99 ± 22,15	17,23 ± 3,29	15,5-31,0	0,937(NS)
Colinesterase eritrocitária	33,66 ± 3,66	35,19 ± 4,99	32,0-58,0	0,147(NS)
Colinesterase plasmática	3,555 ± 1,67	2,969 ± 1,08	1,3-7,8	0,405(NS)

(NS) – não significativo

Figura 9 – Comparação da atividade das enzimas colinesterases entre os grupos estudados pelo teste de Mann-Whitney.



Legenda: Comparação da atividade da colinesterase total (A); colinesterase eritrocitária (B) e colinesterase plasmática (C).

No Brasil, a NR7 recomenda a determinação da atividade das colinesterases, no final da jornada, comparando os valores obtidos de inibição enzimática aos valores obtidos no período pré-exposição (BRASIL, 2020). Nesse estudo, os resultados foram confrontados com os valores de referência já preconizados pelo laboratório da UNIFAL, uma vez que a exposição é contínua, não sendo possível obter os valores basais, individualmente.

A acetilcolinesterase eritrocitária está presente em hemácias, tecido nervoso e músculos e a sua atividade no sangue depende da meia-vida dos eritrócitos, cerca de 120 dias. Por esse motivo, ela é considerada um melhor avaliador de exposição crônica.

Já a acetilcolinesterase plasmática possui meia-vida de uma semana, sendo um bioindicador que reflete exposições mais recentes (MOREAU, SIQUEIRA, 2016; SILVÉRIO, 2016). Avaliando os dados obtidos, pode-se observar que os resultados se encontram dentro do valor de referência estabelecido e que, ao se comparar as médias entre os grupos, não houve diferença significativa em relação a colinesterase total ($p=0,937$), colinesterase eritrocitária ($p=0,147$) e colinesterase plasmática ($p=0,405$).

Valores da atividade colinesterásica dentro da normalidade foram também evidenciados em literatura, onde, apesar de diferentes metodologias utilizadas, alterações enzimáticas não significativas entre o grupo exposto a agrotóxicos e o grupo controle foram detectadas. Os autores relatam que a determinação da inibição da colinesterase pode ser útil no monitoramento de casos de intoxicação ou exposição a altos níveis de inseticidas organofosforados e carbamatos, mas é inespecífica para outros xenobióticos ou para misturas de substâncias de diversas classes. Segundo Harding e colaboradores (2017), a exposição simultânea dificulta a investigação e monitorização dos riscos para a saúde associados à utilização desses produtos, uma vez que possuem diferentes modos de ação. Apesar do aumento do uso de agrotóxicos em geral, há poucas evidências sobre outros biomarcadores para avaliação da exposição. Por isso, os autores sugerem novas metodologias, testes ou biomarcadores para avaliação da exposição a estes produtos isolados ou em associação. (HARDING, *et al.*, 2017; HERNÁNDEZ, *et al.*, 2017; HONGSIBSONG, SITTITOON, SAPBAMRER, 2017; JACOBSEN-PEREIRA, *et al.*, 2018, ARÉVALO-JARAMILLO, *et al.*, 2019; PETARLI, *et al.*, 2019; VALENCIA-QUINTANA, *et al.*, 2021).

Outros estudos, como o de Benedetti, *et al* (2013) e Shadnia *et al.* (2005), também não encontraram diferença significativa na atividade da colinesterase plasmática entre o grupo dos indivíduos não expostos e o grupo de trabalhadores, permanecendo os valores dentro da normalidade. Peres, *et al.* (2003) e Nogueira, *et al.* (2020) afirmam que a determinação da atividade das enzimas, apesar de apresentar algumas limitações, continua sendo o bioindicador de referência para a avaliação de intoxicação por inseticidas organofosforados e carbamatos nos serviços de saúde, mas sugerem a possibilidade de se avaliar outros marcadores biológicos, como biomarcadores de genotoxicidade, a fim de complementar os resultados encontrados e servir de indicativo

de danos associados à exposição. Dentre eles, se destacam o ensaio cometa e o ensaio de micronúcleo por serem rápidos e sensíveis a agrotóxicos e suas misturas (PERES, *et al.*, 2003; VALVERDE, ROJAS, 2009; GODOY, *et al.*, 2019; NOGUEIRA, *et al.*, 2020; PINTO, *et al.*, 2020; ARBO, *et al.*, 2022).

Arbo e colaboradores (2022) investigaram evidências experimentais sobre exposição ocupacional no Brasil e avaliação de danos no DNA, utilizando diferentes metodologias. Ao fim da análise de todos os trabalhos, concluiu-se que o ensaio cometa foi o biomarcador mais utilizado entre os estudos e que todos que realizaram esta técnica em amostras de sangue encontraram efeitos positivos para genotoxicidade. O segundo ensaio mais utilizado foi o do citoma, com estudos mostrando um aumento nas frequências de micronúcleos e outras anormalidades nucleares em células bucais de trabalhadores. De acordo com os autores, essa preferência se dá, provavelmente, por serem técnicas de menor custo e mais simples de serem executadas.

Neste estudo, os resultados encontrados nos ensaios cometa e citoma foram capazes de avaliar a exposição dos trabalhadores aos agrotóxicos e suas misturas, demonstrando um aumento no nível de dano no DNA e um perfil celular alterado nesta população, o que sugere uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer nos trabalhadores expostos a esses produtos químicos.

CAPÍTULO IV
METABOLÔMICA – ABORDAGEM GLOBAL

4.1 REVISÃO DA LITERATURA

A metabolômica integra as chamadas “tecnologias ômicas”, que visam a identificação de moléculas que constituem as células, tecidos e organismos, tais como, genes (DNA), RNA e proteínas. Essas pequenas moléculas representam o resultado de interações complexas entre a nossa herança genética e vários estímulos ambientais. A metabolômica é considerada dentre as abordagens “ômicas” como relativamente rápida e econômica (MASTRANGELO, *et al.*, 2015; TASIC, 2017; TAMARA, BOER, HECK, 2021).

Stephen Oliver utilizou o termo Metabolômica, pela primeira vez, no final da década de 1990 e foi definido como o conjunto completo de compostos de baixo peso molecular (<1500 Da) presentes em sistemas biológicos e suas interações (OLIVER, *et al.*, 1998). A metabolômica tem sido empregada em investigações de diversas áreas do conhecimento e engloba o perfil sistemático abrangente e simultâneo de vários níveis de metabólitos e suas mudanças sistemáticas e temporais causadas por fatores como dieta, estilo de vida, ambiente, efeitos genéticos e de medicamentos, tanto benéficos como adversos, em organismos inteiros. As concentrações dos metabólitos são influenciadas pela disponibilidade de substrato no meio extracelular, as atividades enzimáticas e a presença de cofatores dentro da célula e as atividades de transportadores de membrana (LINDON, NICHOLSON, HOLMES, 2007; CANUTO, *et al.*, 2018; ARAUJO, *et al.*, 2021).

O estudo dos perfis metabólicos de um determinado organismo e as alterações nesse mesmo perfil foi denominado 'metabonomia' por Nicholson, Lindon e Holmes (1999), e 'metabolômica' por outros autores, como Fiehn, *et al.*, 2002. Apesar de serem utilizados frequentemente como termos de mesmo significado, cada um possui um propósito específico. Os dois campos empregam processamento analítico e de dados semelhantes e têm um objetivo comum, a análise do metaboloma. No entanto, enquanto a metabolômica tem a função de identificar e quantificar todos os metabólitos presentes em uma amostra biológica específica, a metabonomica estuda como o perfil metabólico de um sistema muda em resposta a estímulos específicos, como drogas ou uma doença. Atualmente são usados como sinônimos, se referindo amplamente à análise de vários

metabólitos em um sistema biológico (NICHOLSON, LINDON, HOLMES.,1999; FIEHN, *et al.*, 2002; CUPERLOVIC´-CULF, *et al.*, 2010; ARAUJO, *et al.*, 2021).

As vias metabólicas consistem em uma série de reações enzimáticas conectadas e que produzem produtos específicos. Os metabólitos são os produtos de toda complexidade regulatória presente na célula, tecido ou organismo e, portanto, são as moléculas mais próximas da atividade bioquímica que ocorre em um organismo em resposta a estímulos fisiológicos e fisiopatológicos (REN, *et al.*, 2018; ARAUJO, *et al.*, 2021).

A caracterização do metaboloma, juntamente com a medição das alterações bioquímicas que ocorrem em nosso organismo, é uma abordagem necessária a fim de melhorar nosso conhecimento de diversos fenótipos de doenças, para revelar alterações em mecanismos de ação e eficácia dos medicamentos, além de identificar biomarcadores para diagnóstico de uma doença (ALIFERIS, JABAJI, 2011; MASTRANGELO, *et al.*, 2015; LI, *et al.*, 2020).

Todos os estudos metabolômicos resultam em conjuntos de dados multivariados complexos que requerem software de visualização e métodos quimiométricos e bioinformáticos para interpretação. O objetivo desses procedimentos é produzir impressões digitais com base bioquímica que são de diagnóstico ou outro valor de classificação. Uma segunda etapa, crucial em tais estudos, é identificar as substâncias causadoras do diagnóstico ou classificação e estes tornam-se a combinação de biomarcadores que definem o contexto biológico ou clínico (LINDON, *et al.*, 2007; REN, *et al.*, 2018; REY-STOLLE, *et al.*, 2021).

Esses estudos envolvem várias etapas, desde a concepção do experimento até a interpretação e validação dos resultados obtidos com novos experimentos. Para caracterizar e quantificar os compostos é necessária a utilização de metodologias e equipamentos específicos, de acordo com as características de cada classe. Devido à alta diversidade de propriedades físico-químicas dos metabólitos e à complexidade dos sistemas biológicos, nenhuma plataforma analítica única é capaz de fornecer a determinação de todos os metabólitos presentes em biofluidos complexos (BUJAK, *et al.*, 2015; REY-STOLLE, *et al.*, 2021; GANGOLA, *et al.*, 2022).

Com base na cobertura de metabólitos, há, na literatura, diferentes abordagens

analíticas para metabolômica que podem ser classificadas como análise de alvo ou direcionada (do inglês, *targeted metabolomics*) e análise não direcionada ou global (do inglês, *untargeted metabolomics*). O tipo de abordagem escolhida determinará o desenho experimental, a preparação da amostra e quais técnicas analíticas podem ser utilizadas para obter os resultados (BUJAK, *et al.*, 2015; TASIC, 2017; SILVA, *et al.*, 2019; LI, *et al.*, 2020; REY-STOLLE, *et al.*, 2021; GANGOLA, *et al.*, 2022).

A análise direcionada (*Targeted*) consiste na análise quantitativa de grupos de metabólitos, previamente selecionados dentro de um grupo ou classe química (por exemplo, açúcares, aminoácidos, lipídios ou ácidos orgânicos) para estudo de alteração de uma via metabólica ou identificação de perfil. Essa abordagem estuda apenas um processo biológico específico, sendo muito útil, por exemplo, para o estudo do efeito primário de uma alteração genética. Os procedimentos analíticos devem incluir a identificação e quantificação absoluta dos metabólitos selecionados na amostra (BUJAK, *et al.*, 2015; FACCIO, 2015; TASIC, 2017; LI, *et al.*, 2020; REY-STOLLE, *et al.*, 2021; ARAUJO, *et al.*, 2021).

A análise não direcionada (*Untargeted*) baseia-se em estudar o maior número de metabólitos analiticamente possível, sem ter um conhecimento prévio sobre a natureza e identidade dos compostos medidos, procurando variações que possam ser usadas para discriminar grupos de amostras. É considerada um método eficaz para determinar simultaneamente uma gama de grupos químicos diferentes e é mais adequada para descobrir metabólitos que mudam com relação à manipulação de um sistema biológico. No entanto, os métodos direcionados e não direcionados são altamente complementares e são aplicados para identificar metabólitos que mudam em abundância entre duas ou mais condições (TASIC, 2017; LI, *et al.*, 2020; ARAUJO, *et al.*, 2021; REY-STOLLE, *et al.*, 2021).

A abordagem não direcionada pode ser subdividida em impressão digital e a análise de *footprinting*. A impressão digital metabólica, que não é impulsionada por qualquer suposição preliminar, define a classificação de amostras de acordo com sua origem ou relevância metabólica, visando as mudanças no metaboloma total que estão ocorrendo em um estado específico na célula, tecido ou organismo. A pegada metabólica (*footprinting*) explora os metabólitos excretados por uma célula ou consumidos por um

organismo (metaboloma extracelular ou exometaboloma), fornecendo uma imagem cumulativa de metabolismo ao longo do tempo (VILLAS-BOAS, *et al.*, 2004; BUJAK, *et al.*, 2015; TASIC, 2017; ARAUJO, *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que a análise metabolômica, independentemente do tipo de abordagem, baseia-se na comparação entre grupos, uma vez que o confronto do metaboloma de um indivíduo doente e um indivíduo sadio por exemplo, pode fornecer informações importantes para a compreensão do fenótipo de um organismo (CANUTO, *et al.*, 2018).

Embora os estudos de metabolômica possam identificar vários candidatos a biomarcadores, apenas alguns podem se revelar clinicamente úteis. Portanto, as estratégias de desenvolvimento do estudo devem permitir um teste eficiente de muitos prováveis biomarcadores para identificar e verificar poucos que seriam adequados para posterior validação. Essa descoberta de biomarcadores geralmente é dividida em três fases diferentes: descoberta, verificação e validação (Figura 10) (CHAUVIN, BOISVERT, 2018; NAKAYASU, *et al.*, 2021).

Na fase de descoberta, um pequeno número de amostras é submetido à análise metabolômica não direcionada para identificar e quantificar o maior número possível de metabólitos, levando à identificação de dezenas a centenas de candidatos a biomarcadores que serão posteriormente avaliados nas fases de verificação e validação (CHAUVIN, BOISVERT, 2018; NAKAYASU, *et al.*, 2021).

Na fase de verificação, os candidatos a biomarcadores passam por análises metabolômicas adicionais, com a utilização de análises quantitativas, para verificar suas identidades e expressões nas mesmas amostras ou em amostras semelhantes à fase de descoberta. Muitas vezes dezenas a centenas de amostras são analisadas para confirmar as abundâncias diferenciais dos candidatos a biomarcadores. Menos metabólitos são medidos e mais amostras e indivíduos são estudados à medida que o estudo passa da descoberta à verificação para as fases de validação (CHAUVIN, BOISVERT, 2018; NAKAYASU, *et al.*, 2021).

A fase de validação analítica é realizada para confirmar a utilidade dos ensaios de biomarcadores analisando amostras de uma coorte expandida. Normalmente, apenas

alguns dos melhores candidatos a biomarcadores são testados na fase de validação analítica (CHAUVIN, BOISVERT, 2018; NAKAYASU, *et al.*, 2021).

Figura 10 – Fases dos estudos de desenvolvimento de biomarcadores.



Fonte: Adaptado de Nakayasu, *et al.*, 2021.

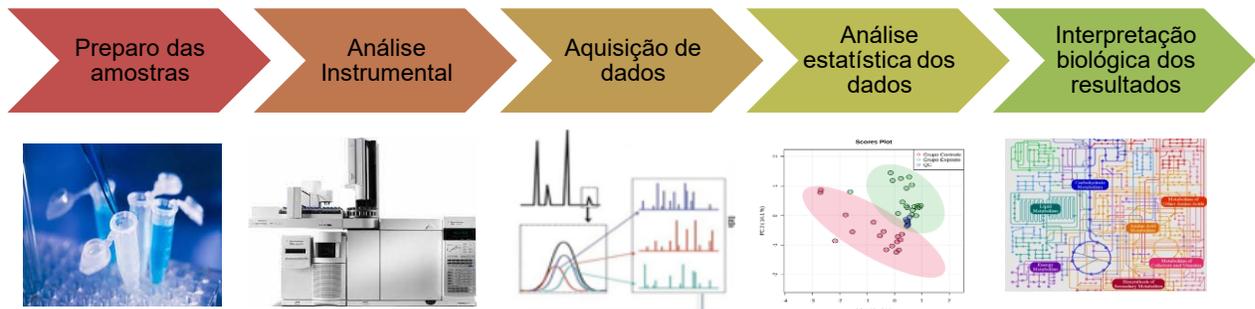
4.1.1 Fluxo de trabalho em metabolômica global

Para se obter uma medição precisa de qualquer metaboloma ou metabólitos específicos, muitos procedimentos analíticos (incluindo planejamento do estudo, preparação de amostras, análise e interpretação de dados) estão envolvidos na pesquisa metabolômica e impactam diretamente nos resultados e interpretações biológicas (HENDRIKS, *et al.*, 2011; CANUTO, *et al.*, 2018; LI, *et al.*, 2020).

O planejamento experimental é uma etapa muito importante e inclui a definição da população que fará parte do estudo com subsequente coleta de dados, como idade, sexo, hábitos de vida e histórico médico; a matriz biológica a ser analisada (sangue, tecido, urina e outros), o tamanho da amostra, armazenamento, os ciclos de congelamento/descongelamento e o tempo durante a preparação da amostra são os fatores mais comuns que devem ser levados em consideração para garantir experimentos reprodutíveis e bem-sucedidos, minimizando a variabilidade (SILVA, *et al.*, 2019; TANG, *et al.*, 2019; GANGOLA, *et al.*, 2022).

Definido o desenho do estudo, a metabolômica envolve várias etapas, como preparo de amostras, análise instrumental, aquisição e tratamento dos dados, seguido de análise dos resultados e interpretação biológica, conforme demonstrado na Figura 11.

Figura 11 – Fluxo de trabalho em metabolômica



Fonte: elaborado pelo autor.

4.1.1.1 Preparo de amostras

A preparação da amostra é uma das etapas cruciais na análise do metaboloma. As matrizes biológicas comumente utilizadas em metabolômica incluem amostras de plasma, soro, urina e tecidos. Há estudos que relatam outras amostras biológicas, como suor, condensado da respiração exalada, líquido de lavagem broncoalveolar, líquido cefalorraquidiano, escarro, entre outras, mas urina e sangue são os biofluidos mais estudados. Isso se deve a sua facilidade de coleta, riqueza em metabólitos, por permitir o estudo de alterações temporais e por ser eticamente aceitáveis (STEVENS, *et al.*, 2019; TANG, *et al.*, 2019; ARAUJO, *et al.*, 2021).

O primeiro passo após a obtenção da amostra é a interrupção rápida do metabolismo celular. Esse procedimento é conhecido como *quenching* metabólico e normalmente é realizado por meio da adição de solventes orgânicos resfriados ou congelamento imediato das amostras por meio de gelo seco ou nitrogênio líquido (CANUTO, *et al.*, 2018; ALSEEKH, *et al.*, 2021).

O solvente de extração deve ser capaz de prevenir qualquer outra alteração química das moléculas e todo o processo de extração deve garantir uma perda mínima dos metabólitos a serem extraídos. Além disso, o solvente de extração deve ser escolhido de forma que seja compatível com o procedimento analítico. Normalmente,

mais de um solvente é usado no procedimento de extração, sendo os solventes polares como metanol, misturas de metanol-água ou etanol para extrair metabólitos polares e solventes não polares como clorofórmio, acetato de etila ou hexano para extrair componentes lipofílicos (VILLAS-BOAS, *et al.*,2004).

Os métodos para extração de metabólitos incluem extração líquido-líquido (LLE), extração sólido-líquido (SLE), extração em fase sólida (SPE), extração assistida por micro-ondas, extração acelerada por solvente, precipitação de proteínas, entre outros, sendo a LLE e SPE as mais utilizadas. Durante o LLE, a escolha dos solventes depende das propriedades químicas dos metabólitos (ZHOU, *et al.*, 2012; FIEHN, 2017).

Para análise de metabólitos, é importante ter um bom método de extração que irá extrair tudo ou o máximo de metabólitos em seu estado original e de forma quantitativa. Não existe um único procedimento de extração para análise de metaboloma que irá abranger todos os metabólitos (VILLAS-BOAS, *et al.*,2004; LI, *et al.*, 2020).

É necessário incorporar brancos de reagentes e amostras de controle de qualidade (CQ) no preparo de amostras, pois isso garante avaliação contínua de contaminação e fatores operacionais em todos os aspectos de um processo analítico. O CQ é preparado com um pequeno volume de todas as amostras envolvidas, sendo um indicador da reprodutibilidade e da repetibilidade da análise. Além disso, métodos de análise multivariados, como análise de componentes principais, o PCA, podem mostrar como os CQs se agrupam no gráfico de pontuação ou como sua propagação é um sinal de variabilidade analítica. A adição de padrão interno também é sempre recomendada para minimizar os erros do processamento e da metodologia (MASTRANGELO, *et al.*, 2015; KHODADADI, POURFARZAM, 2020; REY-STOLLE, *et al.*, 2021).

4.1.1.1.1 Preparo de amostras para LC-MS

As amostras podem ser analisadas por LC-MS sem a necessidade de procedimentos complexos de preparação e derivatização de amostras e uma ampla gama de compostos com diversas propriedades químicas podem ser identificadas. Na etapa inicial, as amostras devem ser descongeladas em gelo para minimizar as taxas de reação enzimática. Os solventes de extração devem ser mantidos em baixa temperatura

(-20°C) antes de seu uso para causar desnaturação de enzimas e subsequente cessação do metabolismo. Assim, após uma simples extração líquido-líquido para remoção de proteínas, por exemplo, o sobrenadante obtido pode ser analisado por LC-MS (PYKE, *et al.*, 2015; ZHONG, *et al.*, 2021).

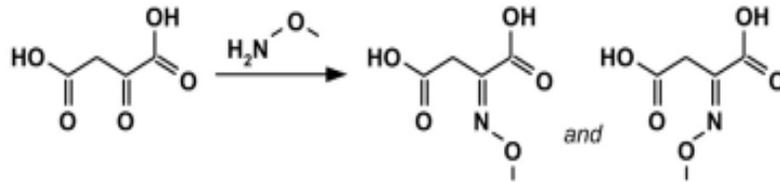
4.1.1.1.2 Preparo de amostras para GC-MS

O tratamento da amostra para análise por GC-MS engloba homogeneização e pré-processamento da amostra, remoção e extração de proteínas e derivatização química. Assim como para LC-MS, as amostras devem ser descongeladas em gelo e os solventes de extração devem ser mantidos em baixa temperatura (-20°C) antes de seu uso. A composição do solvente de extração deve ser otimizada para cada tipo de amostra. Metanol e acetonitrila são conhecidos por serem menos eficientes para extração de lipídios. No entanto, o metanol foi considerado um dos melhores solventes de extração para metabolômica e especialmente para amostras de urina. A mistura ternária isopropanol/acetonitrila/água (3:3:2 v/v/v) proposto pelo grupo de Oliver Fiehn (2002) representa outra estratégia adequada. (FIEHN, *et al.*, 2002; REY-STOLLE, *et al.*, 2021).

Com a finalidade de aumentar a volatilidade e a estabilidade térmica dos analitos, realiza-se a etapa de derivatização, normalmente envolvendo duas etapas. Esse processo inclui reações de alquilação, acilação, metoxiaminação e sililação, sendo metoxiaminação seguida de sililação; as mais comumente utilizadas. A derivatização não só confere estabilidade aos analitos, mas também aumenta sua detectabilidade. (GARCIA; BARBAS, 2011; FIEHN, 2017; REN, *et al.*, 2018; REY-STOLLE, *et al.*, 2021).

A metoxiaminação (Figura 12) consiste na reação dos metabólitos presentes na amostra biológica com metoxiamina em piridina, para proteção de grupos cetonas e aldeídos comuns em metabólitos como carboidratos. Isso também reduz a interação com a fase da coluna que pode causar picos de cauda e baixas sensibilidade e separação cromatográfica (AGILENT TECHNOLOGIES, 2013; FIEHN, 2017; KHODADADI, POURFARZAM, 2020).

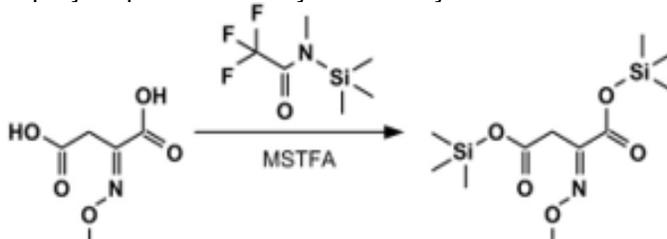
Figura 12 – metoxiaminação para proteção dos grupos cetonas e aldeídos.



Fonte: Agilent Technologies, 2013.

A segunda etapa da derivatização é a sililação, que aumenta a volatilidade do composto substituindo o hidrogênio ativo das carboxilas por um grupo alquilsilil. A sililação, representada pela equação química da Figura 13, é uma das reações de derivatização mais populares devido às suas condições de reação suaves e alta eficiência de derivatização. Ela reduz os pontos de ebulição, melhora a estabilidade térmica dos analitos e aumenta a separação cromatográfica dos metabólitos (MASTRANGELO, *et al.*, 2015; FIEHN, 2017; YANG, *et al.*, 2020).

Figura 13 – Equação química da reação de sililação.



Fonte: Agilent Technologies, 2013.

Essa reação deve ser realizada com solventes básicos, como a piridina e a dimetilformamida (C₃H₇NO), para capturar prótons e aumentar a nucleofilicidade da metoxiamina. Os agentes derivatizantes utilizados nessa etapa são o hexametildisilano (HMDS), trimetilsililimidazol (TMSI), N-metil-N-trimetilsilil (MSTFA), N,O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA), entre outros (AGILENT TECHNOLOGIES, 2013; MASTRANGELO, *et al.*, 2015; KHODADADI, POURFARZAM, 2020).

A temperatura e o tempo de reação podem afetar significativamente a eficiência da derivatização e por isso devem ser controlados. Um tempo de reação mais longo para a metoxiaminação e aquecimento adicional para sililação com N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) são necessários. O tempo recomendado para que a reação

ocorra é de 16 horas, sob proteção da luz para prevenir fotólise da piridina. O resultado é um derivado modificado mais volátil e mais estável que é facilmente detectável por GC-MS (GARCIA; BARBAS, 2011; YANG, *et al.*, 2020).

4.1.1.2 Técnicas analíticas

Devido à complexidade dos sistemas biológicos e a diversidade físico-química de todos os metabólitos, não há uma plataforma analítica universal para determinação do metaboloma em sua totalidade. Alternativamente, podem-se empregar múltiplos protocolos e associação de mais de uma técnica analítica a fim de ampliar a cobertura metabólica. Inúmeras plataformas são comumente usadas em estudos metabolômicos direcionados e não direcionados, sendo as principais, a Ressonância Magnética Nuclear (*NMR*, do inglês, *nuclear magnetic resonance*) e a espectrometria de massas (*MS*, do inglês, *mass spectrometry*) acoplada a diferentes técnicas de separação, como a cromatografia líquida (*LC*), a cromatografia gasosa (*GC*) ou a eletroforese capilar (*CE*). *NMR* determina a ressonância magnética dos núcleos das moléculas e é adequado para a detecção de todos os compostos que contêm o átomo hidrogênio. A *MS* mede moléculas ionizadas com base em sua razão massa-carga (m/z) (BUJAK, *et al.*, 2015; TASIC, 2017; LI, *et al.*, 2020; REY-STOLLE, *et al.*, 2021).

Entre as técnicas mais usadas numa plataforma analítica de metabolômica estão a cromatografia líquida (*LC*) e a cromatografia gasosa (*GC*) acopladas à espectrometria de massas. Cada uma dessas técnicas possui uma seletividade específica para determinados compostos, fornecendo diferentes informações sobre a composição das amostras e conferindo maior sensibilidade, especificidade e resolução cromatográfica. Geralmente essa etapa de separação é utilizada em metabolômica para reduzir a alta complexidade da amostra biológica e permitir a análise de diferentes conjuntos de moléculas em diferentes tempos (ABDELNUR, 2011; THEODORIDIS, *et al.*, 2011; PYKE, *et al.*, 2015; CANUTO, *et al.*, 2018; ARAUJO, *et al.*, 2021; HRISTOVA, J.; SVINAROV, D., 2022).

Com o desenvolvimento em espectrometria de massas (*MS*) utilizando diferentes modos de ionização e forma de analisá-los, tornou-se possível medir rapidamente

milhares de metabólitos simultaneamente utilizando quantidades mínimas de amostra. Essa é a técnica de análise mais usada na metabolômica, uma vez que proporciona análises rápidas, com alta sensibilidade e seletividade e tem impulsionado a análise de vias metabólicas de diferentes organismos (VILLAS-BOAS, *et al.*, 2004; ABDELNUR, 2011; BUJAK, *et al.*, 2015; CANUTO, *et al.*, 2018; LI, *et al.*, 2020; HRISTOVA, SVINAROV, 2022).

A espectrometria de massas é usada para identificar e/ou quantificar uma ampla gama de analitos usando a razão massa-carga (m/z) de íons gerados a partir de uma amostra. Todas as técnicas de MS requerem uma etapa inicial de ionização e, em seguida, cada molécula gera diferentes padrões de pico que definem a impressão digital da molécula original (WISHART, *et al.*, 2018; ARAUJO, *et al.*, 2021; TAMARA, BOER, HECK, 2021).

Um espectrômetro de massas é tipicamente composto de três partes principais: fonte de íons, analisador de massas e detector, além de possuir também um sistema de aquisição de dados (VILLAS-BOAS, *et al.*, 2004).

Na fonte de íons do espectrômetro de massas, os íons são produzidos, a partir de átomos ou moléculas neutras (M), por vários mecanismos. Algumas opções de fonte de ionização incluem a ionização por eletrospray (ESI -do inglês *Electrospray Ionization*), ionização química à pressão atmosférica (APCI - do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), ionização química (CI do inglês *Chemical Ionization*) e fotoionização à pressão atmosférica (APPI - do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*), dentre outras (LANÇAS, 2009; REN, *et al.*, 2018).

Os íons devem ser introduzidos em uma fase gasosa para serem separados pelo analisador de massas dentro do sistema de vácuo, não importa qual seja o estado inicial da amostra, gás, líquido ou sólido (ZHOU, *et al.*, 2012; HRISTOVA, SVINAROV, 2022).

Vários tipos de analisadores de massas estão disponíveis comercialmente. Estes apresentam diferentes performances de acordo com seu modo de operação: quadrupolo (Q), ion-trap, orbitrap, tempo de voo (ToF) e ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR) são alguns deles. São dois tipos principais: tipo feixe (setores magnéticos, quadrupolo, ToF) e tipo aprisionamento (ion-trap, orbitrap). Desses,

quadrupolo e ToF são os mais empregados nas investigações metabolômicas (ZHOU, *et al.*, 2012; HRISTOVA, SVINAROV, 2022).

As vantagens mais importantes do MS são alta sensibilidade e alto rendimento em combinação com a possibilidade de confirmação da identidade dos componentes presentes em amostras biológicas complexas, bem como a detecção e, na maioria dos casos, a identificação de compostos desconhecidos e inesperados. Além disso, a combinação de técnicas de separação (por exemplo, cromatografia) com MS expande bastante a capacidade da análise química de amostras biológicas altamente complexas. O espectro exibe as massas da molécula ionizada e seus fragmentos, e essas massas são simplesmente as somas das massas dos átomos componentes (VILLAS-BOAS, *et al.*, 2004; ABDELNUR, 2011; BUJAK, *et al.*, 2015; CANUTO, *et al.*, 2018; LI, *et al.*, 2020; TAMARA, BOER, HECK, 2021).

4.1.1.2.1 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)

LC-MS é amplamente aplicado na pesquisa metabolômica devido a uma disponibilidade generalizada e desenvolvimento contínuo de instrumentação. LC-MS é uma técnica adequada para análise de compostos não voláteis, termicamente instáveis e com ampla faixa de polaridade. Portanto, LC-MS é comumente usada em análise de processos metabólicos de vários biofluidos (seja urina, sangue ou extratos de tecido). Esta técnica não requer a etapa de derivatização, o que torna o pré-tratamento da amostra mais simples e com menor gasto de tempo em comparação com a técnica GC-MS. A seletividade do sistema LC é estritamente dependente da química da fase estacionária na coluna cromatográfica (REN, *et al.*, 2018; SILVA, *et al.*, 2019).

Uma vez que a separação por gradiente é destinada a compostos de polaridade média ou baixa, ela não fornece retenção de metabólitos hidrofílicos, como aminoácidos ou carboidratos. Para superar essa limitação, novas colunas foram desenvolvidas, como a cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) ou colunas de troca iônica fraca. Além disso, as dimensões da coluna (geralmente 4,6 mm x 150 mm) ou tamanhos de partícula (geralmente 5 µm) afetam a sensibilidade e poder de separação desta técnica. Para melhorar a resolução cromatográfica, a cromatografia líquida de ultra alto

desempenho (UHPLC) com uso de coluna com dimensão de 2,1 mm, empacotada com partículas de 2 μm , vem sendo aplicada com sucesso em estudos metabolômicos (BUJAK, *et al.*, 2015; REN, *et al.*, 2018; SILVA, *et al.*, 2019; HRISTOVA, SVINAROV, 2022).

Geralmente, em metabolômica baseada em LC-MS, a separação dos metabólitos pode ser obtida com o uso de coluna de fase reversa e ionização por eletrospray (ESI), tanto nos modos positivo, quanto negativo, para fornecer melhor cobertura do metaboloma em fluidos biológicos. Outras técnicas de ionização comumente usadas são a ionização química à pressão atmosférica (do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) e Fotoionização à Pressão Atmosférica (do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI). Essas técnicas não requerem uma câmara de vácuo e são realizadas a uma pressão próxima à atmosférica, antes que uma amostra seja introduzida no analisador de massas. Esses são métodos de 'ionização suave' nos quais as moléculas de interesse não são destruídas e os produtos de ionização são geralmente chamados de moléculas protonadas ou desprotonadas (M^+H ou $\text{M}^- \text{H}$) (ZHOU, *et al.*, 2012; REN, *et al.*, 2018; HRISTOVA, SVINAROV, 2022).

4.1.1.2.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

Cromatografia gasosa (GC) acoplada a MS tem sido extensivamente usada na análise do metaboloma devido a sua alta eficiência de separação, que pode resolver misturas biológicas muito complexas. É um método de custo relativamente baixo para análise de metabólitos e sistemas modernos são fáceis de operar. Pode ser usado para analisar uma ampla gama de compostos voláteis e, por meio de derivatização química, também é possível analisar muitos metabólitos semivoláteis (BUJAK, *et al.*, 2015; REN, *et al.*, 2018; REY-STOLLE, *et al.*, 2021).

As amostras de uma separação por GC já estão em fase gasosa e são introduzidas diretamente no sistema de alto vácuo do espectrômetro de massas (SILVA, *et al.*, 2019; HRISTOVA, SVINAROV, 2022)

As técnicas mais utilizadas nos sistemas GC-MS para uso clínico são a ionização por impacto de elétrons (EI) e a ionização química (CI). EI é considerada uma técnica de

ionização forte na qual elétrons de alta voltagem bombardeiam as moléculas de interesse induzindo a produção simultânea de íons e a fragmentação das moléculas. Assim, um espectro de íons de cada analito é produzido, com a respectiva abundância. O processo é uniforme e reproduzível; o espectro de fragmentos de íons é único para o composto específico e isso torna a ionização EI muito apropriada para ensaios de toxicologia clínica. A identificação confiável de componentes desconhecidos de uma amostra é alcançada comparando os espectros experimentais desses componentes com bibliotecas espectrais comercialmente disponíveis e é ainda aprimorada pela capacidade de deconvoluir picos cromatográficos sobrepostos usando uma deconvolução espectral de massas automatizada e sistema de identificação. Métodos de ionização química envolvem um gás reagente em vez de bombardeio direto das moléculas de interesse. Os íons resultantes do gás reagente transferem prótons para a molécula neutra, produzindo assim íons moleculares sem fragmentação significativa. Portanto, CI é considerada um método de “ionização suave”, adequado para quantificação e determinação de massa molecular (VILLAS-BOAS, *et al.*, 2004; BUJAK, *et al.*, 2015; REY-STOLLE, *et al.*, 2021; HRISTOVA, SVINAROV, 2022)

As vantagens mais representativas desta técnica cromatográfica são a sua excelente eficiência, resolução cromatográfica e alta repetibilidade, tanto no tempo de retenção quanto na resposta. No entanto, a limitação do GC-MS é que os analitos devem ser voláteis para serem separados em uma coluna de cromatografia gasosa. Alguns metabólitos não são suficientemente voláteis para serem analisados diretamente em um sistema GC. A derivatização dos metabólitos é, portanto, necessário e esta etapa adiciona tempo à análise, bem como faz com que o manuseio de amostras seja mais complexo (VILLAS-BOAS, *et al.*, 2004; BUJAK, *et al.*, 2015; REY-STOLLE, *et al.*, 2021).

As aplicações da metabolômica tem se expandido amplamente nos últimos anos, inclusive nas áreas de análises toxicológicas de materiais biológicos assim como nas análises ambientais, com o estudo do desenvolvimento de biomarcadores e avaliação de risco de exposição tóxica, respostas metabólicas a estressores ambientais e monitoramento de doenças. É evidente que, apesar de ser uma área relativamente nova, a metabolômica possui grande impacto futuro, principalmente, no entendimento global

de um sistema biológico (ABDELNUR, 2011; BUJAK *et al.*, 2015; HRISTOVA, SVINAROV, 2022).

Os dados metabolômicos são multivariados, portanto, a discriminação e classificação de amostras e a detecção de biomarcadores são baseadas principalmente em análises multivariadas. Existem vários softwares/sites comerciais e de acesso aberto disponíveis para processamento e análise de dados de MS, como deconvolução e alinhamento de picos, identificação de metabólitos e análise de vias metabólicas. No entanto, não há um software/site padronizado para processamento e análise de dados de MS (ALIFERIS, JABAJI, 2011; REN, *et al.*, 2018).

A aplicação de métodos estatísticos permite a associação do mecanismo de ação dos compostos em estudo com as mudanças causadas no metaboloma do organismo. Portanto, compostos que causam alterações metabólicas idênticas no organismo modelo, espera-se que tenha o mesmo mecanismo de ação (ALIFERIS, JABAJI, 2011; REN, *et al.*, 2018).

4.1.1.3 Processamento de dados

Com o desenvolvimento de técnicas analíticas, ferramentas avançadas de bioinformática são necessárias para processar, analisar e interpretar dados metabolômicos de amostras biológicas complexas (CAVALCANTI, 2019; TANG, *et al.*, 2019).

As estratégias de análise de dados são, geralmente, classificadas em dois grupos: estratégias de análise de dados para estudos metabolômicos direcionados e não direcionados. A razão para tal diferenciação se deve aos diferentes tipos de dados gerados nessas duas abordagens, que requerem tratamento adequado. Como citado anteriormente, os estudos direcionados focam a pesquisa em um conjunto de metabólitos conhecidos, enquanto os estudos não direcionados permitem uma avaliação mais abrangente dos perfis metabolômicos. As metodologias direcionadas permitem perfis metabólicos em larga escala, incluindo centenas de compostos. No entanto, o número de compostos analisados em estudos não direcionados é ainda maior. Isso ocorre porque é preciso processar conjuntos de dados inteiros, incluindo milhares de

sinais de metabólitos, e dentre estes, selecionar, por exemplo, candidatos a biomarcadores (GORROCHATEGUI, *et al.*, 2016; LI, *et al.*, 2018).

Ao injetar as amostras em um sistema LC-MS ou GC-MS, as moléculas são separadas na coluna cromatográfica; no final da coluna, o MS varre em uma determinada taxa de varredura, produzindo um sinal, que depende das moléculas que estão sendo detectadas. Em metodologias não direcionadas, este processo gera um conjunto tridimensional de dados e picos cromatográficos, cada um com tempo de retenção específico (RT), razão massa/carga (m/z) e intensidade. Esses dados, complexos e ricos em informações, requerem processamento extensivo para interpretar os resultados da metabolômica adequadamente, distinguir variação biológica e alterações metabólicas de interferências analíticas, avaliar a classificação da amostra, além da descoberta de possíveis biomarcadores (HENDRIKS, *et al.*, 2011; LI, *et al.*, 2018; DOMINGO-ALMENARA, SIUZDAK, 2020).

Após a aquisição dos dados, uma matriz bidimensional de intensidades é construída, na qual cada linha corresponde à amostra e cada coluna representa uma característica variável/metabólica (*molecular feature*), como por exemplo, m/z e tempo de retenção. É importante notar que os fatores instrumentais (por exemplo, degradação da coluna cromatográfica) e biológicos (como pH, teor de proteína) podem afetar o conjunto de dados metabolômicos, induzindo flutuações nos deslocamentos químicos/tempos de retenção, intensidade e ruído de fundo. Portanto, antes da análise estatística, a matriz precisa ser tratada para melhorar a qualidade do sinal e reduzir possíveis vieses (FACCIO, 2015; CANUTO *et al.*, 2018).

As etapas de tratamento são: transformação dos dados brutos em conjunto de dados, agrupamento e alinhamento dos picos, normalização dos dados, transformação dos dados para alcançar a estabilidade da variância e escalonamento. Alguns softwares utilizados nesse processo são: XCMS®, AMDIS®, Mass Professional Profile®, MetAlign® e outros. Dentre estes, o XCMS é uma plataforma para processamento de dados gratuita e amplamente utilizada, baseada na linguagem de programação R disponível no *Bioconductor* (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/xcms.html>). O XCMS executa a primeira detecção de pico, depois combina os picos nas amostras para calcular os desvios do tempo de retenção e a intensidade relativa para

comparação e alinhamento de íons e, finalmente, executa a imputação de valores ausentes (MASTRANGELO, *et al.*, 2015; CANUTO *et al.*, 2018; DOMINGO-ALMENARA, SIUZDAK, 2020; REY-STOLLE, *et al.*, 2021).

Concluída a geração dos dados brutos, o primeiro passo é a extração dos *molecular features* a partir dos dados brutos gerados pela plataforma analítica usada (ex.: tempos de retenção, m/z e abundância de cada *feature* detectado) e criação do conjunto de dados. Nesses dados “brutos”, os sinais de diferentes metabólitos geralmente se sobrepõem e o processo chamado de deconvolução é o mais utilizado para separá-los, aplicando um algoritmo que identifica íons co-eluídos que façam parte de uma única característica molecular e promovendo a separação (HENDRIKS *et al.*, 2011; MASTRANGELO, *et al.*, 2015, ARAUJO, *et al.*, 2021).

Durante a separação cromatográfica, podem surgir desvios no tempo de retenção devido a variações de temperatura, pressão e fase móvel, mudanças na fase estacionária da coluna (saturação/degradação) e nas condições experimentais. Portanto, após a deconvolução, picos do mesmo íon detectados em diferentes amostras precisam ser alinhados e agrupados, ou seja, sua área precisa estar na mesma linha em uma matriz de dados para que possam ser comparados quantitativamente em diferentes amostras, permitindo a pesquisa de similaridade espectral para sinais deconvoluídos associados a potenciais compostos em bibliotecas espectrais. Ao agrupar os picos, o algoritmo gera recursos, definidos como um único ou um conjunto de picos entre amostras com um único tempo de retenção e m/z (WANT, MASSON, 2010; MASTRANGELO, *et al.*, 2015; DOMINGO-ALMENARA, SIUZDAK, 2020; REY-STOLLE, *et al.*, 2021).

Os picos detectados devem então ser integrados para permitir a comparação das abundâncias relativas de metabólitos, a fim de elucidar as diferenças entre os grupos amostrais. Ambos altura do pico e área de pico podem ser usados e podem ser dependentes de software (DOMINGO-ALMENARA, SIUZDAK, 2020).

Depois que os picos são detectados e alinhados, as estatísticas podem ser usadas para encontrar recursos que mostrem mudanças estatisticamente significativas entre os grupos. No entanto, a existência de zeros ou valores não detectados causarão dificuldades para a análise. A suposição dessa abordagem é que a maioria dos valores

perdidos são causados por metabólitos de baixa abundância (ou seja, abaixo do limite de detecção). Valores ausentes reduzem o poder de testes e análises estatísticas e podem levar a resultados tendenciosos. Isso é muito importante quando forem aplicadas análises multivariadas, pois os valores omissos influenciarão os resultados. Para resolver este problema são utilizadas estratégias de imputação de valor perdido. Entre essas estratégias, uma abordagem comumente aceita é conhecido como picos de preenchimento, onde os picos “ausentes” são pesquisados novamente nos dados brutos. Outra estratégia é substituir todos os valores ausentes e zero por um pequeno valor (a metade dos valores positivos mínimos nos dados originais) considerando ser esse o limite de detecção (WANT, MASSON, 2010; FERREIRA, 2015; DOMINGO-ALMENARA, SIUZDAK, 2020).

As últimas etapas do processamento de dados são normalização de dados, transformação e escalonamento. A normalização é importante no caso de longas sequências, a fim de reduzir o erro sistemático, como variações técnicas ou analíticas, alterações na composição da amostra ou da coluna, entre outros. Na normalização, divide-se o valor de cada uma das variáveis de uma amostra por um fator de normalização, com isso, todas as amostras estarão em uma escala predefinida. Não é uma etapa obrigatória, mas é uma estratégia viável para minimizar erro nos dados (FERREIRA, 2015; MASTRANGELO, *et al.*, 2015; ARAUJO, *et al.*, 2021).

Após a normalização, uma transformação logarítmica pode ser aplicada para corrigir a heterocedasticidade, reduzindo assim o impacto de *outliers* e convertendo os dados em uma distribuição mais normal (tipo gaussiana) (HENDRIKS *et al.*, 2011; FERREIRA, 2015; SILVA, *et al.*, 2019).

A técnica de escalonamento indica a importância que o composto tem no ajuste do modelo, dividindo cada um deles por um fator de escala diferente. As classes de fatores de escala podem ser identificadas como unidade de variância (UV), autoescalamento, escalamento de Pareto e outros. A escala UV usa o desvio padrão como um fator de escala e iguala a importância de todos os metabólitos. O autoescalamento, é junção da centragem na média com escalamento UV, por isso os dados são centrados na média e divididos pelo desvio padrão. No escalamento de Pareto, os valores das variáveis são centrados na média e divididos pela raiz quadrada

do desvio padrão. Em metabolômica, o escalamento de Pareto é mais apropriado porque ele reduz a importância de valores altos, assim metabólitos com pequenas variações entre grupos de estudo são privilegiados, o que favorece sua identificação (FERREIRA, 2015; MASTRANGELO, *et al.*, 2015; SILVA, *et al.*, 2019; ARAUJO, *et al.*, 2021).

Esses métodos de escalonamento podem ser aplicados em combinação com a centralização média para desviar o centro de gravidade e destacar a diferença, não as semelhanças, entre os dados. A centralização média subtrai a média de cada variável, fazendo com que cada amostra exiba somente as diferenças que possuem com relação à média de todos os dados originais (MASTRANGELO, *et al.*, 2015; ARAUJO, *et al.*, 2021).

4.1.1.4 Análise estatística

A análise estatística permite a classificação de amostras, estabelecendo correlação entre variáveis, destacando variáveis significativas e avaliando a qualidade de todo o experimento. Inclui análises univariadas e multivariadas, em que os resultados são geralmente combinados para aumentar a confiança em descobertas biológicas. Dependendo dos objetivos de pesquisa, diferentes métodos podem ser empregados (MASTRANGELO, *et al.*, 2015; ANTONELLI, *et al.*, 2019).

4.1.1.4.1 Análise univariada de dados

Os métodos de análise de dados em metabolômica são principalmente baseados em análise multivariada, mas análises univariadas também são usadas para descobrir diferenças significativas entre os picos (entidades moleculares) separadamente ou medir correlações entre grupos de amostras. Embora essa análise estatística seja de fácil utilização e interpretação, ela não leva em consideração a presença de interações entre as diferentes características metabólicas. Assim, o uso combinado de análise de dados multivariada e univariada é bem recomendado para maximizar a extração de informações relevantes de conjuntos de dados metabolômicos (ANTONELLI, *et al.*, 2019; SILVA, *et al.*, 2019).

Os dados estatísticos podem ser classificados como paramétricos, baseados na suposição de que possuem uma distribuição gaussiana ou normal (como teste *t* de *Student* e ANOVA) e não paramétricos, que não fazem suposições sobre a distribuição da população (por exemplo, testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney). A análise univariada pode ser realizada com vários programas, incluindo Excel (Microsoft), MATLAB, R, IBM SPSS Statistics e outros (ANTONELLI, *et al.*, 2019; SILVA, *et al.*, 2019).

4.1.1.4.2 Análises de dados multivariados

A análise multivariada é muito importante em estudos metabolômicos, devido a capacidade de inferir, a partir de uma matriz de dados complexa, um conjunto de metabólitos responsáveis pela diferenciação dos grupos. Ela consegue reduzir e resumir a enorme quantidade de variáveis em poucas variáveis importantes, que explicam a correlação simultânea entre elas (FACCIO, 2015; ARAUJO, *et al.*, 2021).

Os métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões são classificados em métodos não supervisionados: Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* - PCA) e Análise de agrupamentos por Métodos Hierárquicos - HCA; e supervisionados: Análise Discriminante pelo Método de Quadrados Mínimos Parciais (*Principal Least Squares-Discriminants Analysis* - PLS-DA) e Projeções Ortogonais para Análise Discriminante de Estruturas Latentes (*Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis* - OPLS-DA) e outros. O primeiro é utilizado para fornecer uma visão geral do estudo, permitindo a detecção de tendências, agrupamento e possíveis *outliers*; o segundo classifica a observação e destaca potenciais marcadores (MASTRANGELO, *et al.*, 2015; SILVA, *et al.*, 2019; GANGOLA, *et al.*, 2022).

A análise multivariada de dados pode ser executada usando diferentes pacotes de software. Entre eles, temos o MetaboAnalyst® - um conjunto de ferramentas online, gratuito, que pode ser usado tanto no pré-processamento, quanto análise estatística multi e univariada e interpretação de metadados; SIMCA-P® - software pago desenvolvido pela Umetrics® e Matlab® (MASTRANGELO, *et al.*, 2015).

4.1.1.4.2.1 Métodos de Reconhecimento de Padrões Não Supervisionados

Métodos não supervisionados são usados para analisar os dados sem nenhuma informação anterior sobre grupos ou classes de amostra e, portanto, são uma boa maneira de revelar grupos ou agrupar os dados. São métodos simples, nos quais o reconhecimento de padrões consiste no exame visual dos resultados experimentais (WANT, MASSON, 2010; FERREIRA, 2015)

Nessa categoria, o método mais importante é a PCA (Principal Component Analysis) que tem a finalidade de reduzir a dimensão do número de metabólitos sendo analisados, assumindo que há uma correlação substancial entre metabólitos em um determinado conjunto de dados. Para estudos exploratórios, em que as diferenças metabolômicas entre os grupos experimentais podem ser desconhecidas ou imprevisíveis, a PCA fornece uma primeira visão informativa da estrutura do conjunto de dados e das relações entre os grupos. É a primeira abordagem aplicada, permitindo uma rápida identificação de semelhanças e diferenças entre amostras e a identificação de *outliers*. A PCA trabalha com os metabólitos originais e encontra combinações lineares destes que são ortogonais, ou seja, não são correlacionados entre si, e que explicam a maior variação no conjunto de dados de metabólitos (FACCIO, 2015; FERREIRA, 2015; GOULART, 2018; ANTONELLI, *et al.*, 2019; SILVA, *et al.*, 2019).

Uma boa maneira de visualizar os dados de PCA é por meio de gráfico de escores (score plotting) em que as amostras (observações) são plotadas em relação a duas ou três componentes principais e assim, as relações entre as amostras podem ser mais facilmente visualizadas (FACCIO, 2015).

Portanto, a PCA é muito útil na identificação de outliers, tendências e observações de agrupamentos nos dados. Também tem sido empregada na avaliação da qualidade dos dados, por meio da análise de agrupamentos do controle de qualidade (QC). A visualização de um forte agrupamento dos QC indica estabilidade e reprodutibilidade das análises, características essenciais para garantia da qualidade dos dados obtidos (FERREIRA, 2015).

Os métodos HCA (análise de agrupamentos por Métodos Hierárquicos) são usados para formar subconjuntos de amostras em níveis ordenados com base em

semelhanças de variáveis (como distâncias ou correlações) e podem ser realizados em modo aglomerativo (as amostras são agregadas em clusters) ou modo divisivo (conjunto de dados completo é dividido em clusters) (ARAUJO, *et al.*, 2021).

4.1.1.4.2.2 Métodos de Reconhecimento de Padrões Supervisionados

Em estudos metabolômicos, os grupos estudados são previamente conhecidos (controle e teste, por exemplo), e assim, para melhorar a separação desses grupos, análises multivariadas supervisionadas são utilizadas, como análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA). Essas análises visam separar os grupos, por meio de uma relação linear entre uma matriz de variáveis preditoras (matriz de dados experimentais) e uma matriz de variáveis de resposta (grupo controle e teste) (FACCIO, 2015; FERREIRA, 2015; GOULART, 2018).

PLS-DA é um método de classificação baseado em uma técnica de regressão chamada PLS, muitas vezes considerada como uma extensão de regressão de PCA. O PLS modela a associação entre a tabela de dados X e uma matriz de respostas Y, contendo informações de amostra (respostas podem ser categóricas ou contínuas, como idade, crescimento, composição, parâmetros químicos). No PLS-DA, a matriz Y define associação de classe. Assim, o PLS-DA tenta construir um modelo que separa os diferentes grupos de amostras com base em suas Variáveis X (características do metabólito). Esse modelo calcula a probabilidade de uma substância pertencer a uma determinada classe com base nos valores estimados da classe. Em comparação com o modelo de PCA, no modelo de PLS-DA, as componentes principais são rotacionadas para maximizar a separação entres as classes conhecidas (WANT, MASSON, 2010; WORLEY, POWERS, CURR, 2013; FACCIO, 2015; FERREIRA, 2015; GOULART, 2018).

Após o cálculo da probabilidade de cada analito pertencer a uma classe ou outra, procede-se à construção do modelo PLS-DA. Para isso, é importante definir o número de variáveis que descrevem a covariância nas amostras das matrizes e que tenham correlação máxima com a classe conhecida. Nesta etapa, recomenda-se a utilização de

testes de validação (como o de validação cruzada) que auxiliem na identificação do número ideal de variáveis necessário para descrever toda a variância dos dados e evitar problemas de subajuste e sobreajuste. Após a construção do modelo, deve-se realizar sua inspeção visual a fim de identificar os agrupamentos em um gráfico de escores (HENDRIKS *et al.*, 2011; FERREIRA, 2015; ARAUJO, *et al.*, 2021).

Para reduzir o problema de sobreajuste e falsas descobertas em estudos metabolômicos, a validação dos resultados de análises multivariadas é de grande importância, garantindo a qualidade e o desempenho dos modelos gerados. Um dos métodos de validação mais comuns é a validação cruzada (*cross validation*). A validação cruzada consiste em dividir aleatoriamente o conjunto de dados em “n” blocos de igual tamanho e, em seguida, treinar o modelo “n” vezes, aleatoriamente. Os parâmetros de qualidade de validação cruzada R^2 e Q^2 são usados para fornecer informações sobre a qualidade do ajuste (ou seja, quão bem o modelo explica o conjunto de dados) e a capacidade preditiva (ou seja, prevê a variância e fornece informações sobre a previsibilidade do modelo), respectivamente. Assim, um R^2 em torno de 1 indica uma descrição perfeita dos dados pelo modelo, enquanto um Q^2 em torno de 1 indica uma previsibilidade perfeita. Geralmente, um $Q^2 > 0,4$ é considerado bom e, em um modelo ideal, R^2 e Q^2 devem ser semelhantes. Grandes variações entre R^2 e Q^2 indicam sobreajuste do modelo (HENDRIKS *et al.*, 2011; FERREIRA, 2015; GOULART, 2018; SILVA, *et al.*, 2019; ARAUJO, *et al.*, 2021).

Outra forma de validar os resultados da análise multivariada é usando um conjunto independente de amostras (conjunto de validação). Se a mesma previsibilidade aparecer em um estudo independente, os modelos de análises multivariadas podem ser considerados confiáveis. Na verdade, esta é a melhor forma de avaliar a robustez e capacidade preditiva de qualquer modelo, mas esta abordagem nem sempre é possível devido ao baixo número de amostras. Como alternativa, para determinar a significância estatística de um modelo, os testes de permutação são outra ótima ferramenta. Eles avaliam se a classificação específica dos indivíduos nos dois grupos desenhados é significativamente melhor do que qualquer outra classificação aleatória em dois grupos arbitrários. Neste método, os dois rótulos de classe estão sujeitos a vários rearranjos aleatórios dos rótulos nos pontos de dados observados. O teste de permutação é

repetido muitas vezes, e os modelos permutados e verdadeiros são então comparados com esta distribuição de todos os modelos possíveis (WANT, MASSON, 2010; FERREIRA, 2015; ARAUJO, *et al.*, 2021).

O modelo de OPLS-DA incorpora um filtro de correção de sinal ortogonal no modelo de PLS-DA, que separa a variação de matriz de dados preditiva da não-correlacionada com a resposta. O OPLS-DA torna a interpretação do modelo mais simples, facilitando a interpretação das variáveis discriminantes e mantendo a capacidade preditiva do PLS-DA (WANT, MASSON, 2010; WORLEY, POWERS, CURR, 2013; FACCIO, 2015).

4.1.1.4.3 Identificação dos metabólitos discriminantes e interpretação biológica

Traduzir variáveis em identidades de metabólitos é uma das principais dificuldades na abordagem metabolômica, mas é essencial para realizar uma interpretação biológica adequada. Metabólitos bem caracterizados podem ser identificados por meio de pesquisas de banco de dados, como HMDB®, HumanCyc, KEGG, Metlin® e NIST®, verificando quais vias foram alteradas para a interpretação biológica dos resultados obtidos. Embora incompletas, essas bases de dados contêm informações sobre milhares de metabólitos endógenos e de drogas. A confirmação da identidade pode vir também da comparação com espectros obtidos por espectrometria de massas em *tandem* ou por espectros de padrões analíticos (FACCIO, 2015; CANUTO *et al.*, 2018; ARAUJO, *et al.*, 2021).

A interpretação bioquímica dos resultados é a etapa final que permite obter o quadro geral de todas as alterações metabólicas que caracterizam uma condição específica. Geralmente é realizado por extensas pesquisas bibliográficas, análise de vias e estudos de correlação. A pesquisa bibliográfica é sempre necessária para coletar o conhecimento existente sobre metabólitos, suas interações e associações. A análise de vias pode ser realizada por KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ou HMDB. Estas são ferramentas úteis que permitem agrupar os metabólitos significativos dentro de uma via biológica comum. Dessa forma, os metabólitos identificados são colocados no contexto biológico, ou seja, são integrados a uma via ou rede metabólica,

a fim de que sua variação em relação ao grupo controle seja identificada. Quando a associação metabólito-via metabólica é alcançada, pode-se responder à questão biológica inicialmente formulada, visando a compreensão biológica e interpretação significativa dos dados (TANG, *et al.*, 2019; SILVA, *et al.*, 2019; GANGOLA, *et al.*, 2022).

Dependendo do resultado obtido, um novo desenho experimental com base nos resultados observados no experimento pode ser realizado. Pode-se, por exemplo, após um estudo metabolômico global, realizar estudos de análise alvo para melhor compreender os efeitos dos metabólitos de interesse, ou para confirmar o resultado obtido (CANUTO, *et al.*, 2018; ARAUJO, *et al.*, 2021).

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo geral

- ✓ Estudar o perfil metabólico de indivíduos expostos ocupacionalmente e não ocupacionalmente aos agrotóxicos para identificação de possíveis novos biomarcadores, por meio da análise de amostras de sangue e urina, utilizando plataformas analíticas e estatísticas aplicadas à metabolômica.

4.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Definir e selecionar a população de estudo dividida em dois grupos de indivíduos: expostos ocupacionalmente (Grupo 1) e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos (Grupo 2);
- ✓ Categorizar a população de acordo com a atividade ocupacional;
- ✓ Otimizar método de preparo de amostras de plasma para análise metabolômica global (untargeted), utilizando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS);
- ✓ Identificar o perfil metabólico dos dois grupos de estudo por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) e LC/MS utilizando amostras de sangue e urina;
- ✓ Comparar o perfil metabólico da população de estudo visando identificar metabólitos capazes de discriminar os dois grupos de estudo.
- ✓ Investigar a associação dos metabólitos responsáveis pela discriminação entre os grupos em estudo com os mecanismos de ação e vias metabólicas associadas aos agrotóxicos;
- ✓ Aplicar estudos estatísticos para agrupamento e identificação de possíveis novos biomarcadores.

4.3 MATERIAL E MÉTODO

4.3.1 População do estudo

A população foi composta por 40 indivíduos do sexo masculino, com faixa etária entre 20 e 62 anos, a qual foi dividida em dois grupos.

O grupo exposto foi composto por 20 trabalhadores rurais do município de Paraguaçu, Minas Gerais, todos voluntários, do sexo masculino e com faixa etária entre 22 e 62 anos, os quais estão ocupacionalmente expostos a agrotóxicos. São os mesmos indivíduos do grupo exposto estudado no capítulo sobre análise de biomarcadores de genotoxicidade.

O grupo controle é formado por voluntários, sadios, selecionados aleatoriamente, do sexo masculino e com faixa etária entre 20 e 62 anos, residentes em Belo Horizonte e região. Os critérios de exclusão adotados foram não ser fumante, não fazer uso de bebida alcoólica e não possuir histórico de exposição ocupacional a agrotóxicos.

As coletas das amostras de sangue e urina do grupo controle foram realizadas no Hospital das Clínicas da UFMG e na Faculdade de Farmácia da mesma instituição, em Belo Horizonte. Todos os voluntários forneceram informações relacionadas a seus hábitos pessoais, sociais e no trabalho, por meio do preenchimento de um protocolo toxicológico e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Posteriormente, foram coletados 10 mL de sangue periférico por punção venosa e 50 mL de urina.

Como citado anteriormente, este estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (CAAE: 39339720.0.0000.5149, número do parecer: 5.473.586).

4.3.2 Análise por UPLC-QToF-MS

4.3.2.1 Material e reagentes

- ✓ Água ultrapura (Sistema MiliQ-Millipore®);
- ✓ Acetonitrila grau LC-MS Sigma-Aldrich®;
- ✓ Metanol grau LC-MS Sigma-Aldrich®;
- ✓ Ácido metanoico (ácido fórmico) grau LC-MS Sigma-Aldrich®;
- ✓ Micropipetas automáticas de volume variável: 10 a 100 µL, 20 a 200 µL, 100 a 1000µL;
- ✓ Microtubos para centrifugação com capacidade para 2 mL;
- ✓ Ponteiras de volumes variados;
- ✓ Béqueres 50, 100 e 200 mL;
- ✓ Provetas 100 e 500 mL; Balão volumétrico 100, 500 e 1000 mL;
- ✓ *Vial* com tampa e septo, capacidade para 1,5 mL.
- ✓ Cromatógrafo de ultra eficiência LC-20A Shimadzu® acoplado a espectrômetro de massas QToF T-Rex Impact II Bruker®;
- ✓ Microcentrífuga refrigerada Beckman Coulter ®,
- ✓ Agitador de tubo (vórtex) MS 3 digital - Ika®.

4.3.2.2 Preparo de amostras de plasma por UPLC-QToF-MS

Dois protocolos de preparo de amostras de plasma para análise metabolômica não alvo por UPLC-QToF-MS foram utilizados como referência para padronização do método: Zhong (2021) e Bruker (2018). As variáveis a serem otimizadas foram: solvente extrator, descanso a -20°C por duas horas, evaporação por sistema a vácuo *Speedvac* e ressuspensão com solução aquosa de ácido metanóico 0,1%. Após a definição, foi realizado um planejamento fatorial completo (2³) para investigar o impacto das variáveis na eficiência da análise metabolômica (NETO, *et al.*, 2007). A matriz experimental para otimização é mostrada na Tabela 7.

Tabela 7 - Matriz experimental para otimização das condições de preparo de amostras de plasma para análise metabolômica global por UPLC-QToF-MS.

Experimentos (n=2)	Solvente extrator	Tempo de descanso	Evaporação por sistema a vácuo
1	Clorofórmio:metanol	Sem descanso	Sem evaporação
2	Metanol frio	Sem descanso	Sem evaporação
3	Clorofórmio:metanol	Descanso de 2 horas a -20°C	Sem evaporação
4	Metanol frio	Descanso de 2 horas a -20°C	Sem evaporação
5	Clorofórmio:metanol	Sem descanso	Com evaporação
6	Metanol frio	Sem descanso	Com evaporação
7	Clorofórmio:metanol	Descanso de 2 horas a -20°C	Com evaporação
8	Metanol frio	Descanso de 2 horas a -20°C	Com evaporação

Fonte: Elaborado pelo autor.

Alíquotas de 100 µL de plasma foram extraídas utilizando-se 300 µL de metanol ou 300 µL da mistura clorofórmio: metanol (2:1). As amostras foram agitadas em vórtex por 30 segundos e os testes foram realizados conforme Tabela 7. Foram realizados também preparos de brancos de amostra, onde são pipetados todos os reagentes, exceto o plasma.

Após agitação em vórtex, as amostras dos experimentos 1 e 2 foram centrifugadas a 14000g, por 10 minutos a 4°C e 5 µL do sobrenadante foram injetados no equipamento. AS amostras dos experimentos 3 e 4 foram deixadas descansando em freezer a -20°C por 2 horas, para posterior centrifugação e injeção do sobrenadante no LC-MS. Em relação aos experimentos 5 e 6, não houve a etapa de descanso; as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante, evaporado em sistema a vácuo *Speedvac* a 30°C por aproximadamente 2 horas. Após secagem completa, o resíduo foi ressuspensão com ácido metanóico 0,1% e 5 µL foram injetados no equipamento. Já nos experimentos 7 e 8, todas as etapas foram realizadas. Após agitação em vórtex, as amostras descansaram por 2 horas a -20°C, foram centrifugadas e evaporadas no sistema à vácuo a 30°C, sendo ressuspensas com ácido metanóico 0,1% e injetadas no UPLC-QToF-MS.

4.3.2.3 Preparo de amostras de urina por UPLC-QToF-MS

As amostras foram preparadas conforme protocolo descrito em Bruker Daltonik GMBH (2018). As amostras foram homogeneizadas em vórtex a 1600 rpm por 30 segundos. Em seguida, 100 μ L da urina foram diluídos em 125 μ L de metanol em microtubos tipo *ependorf*, e novamente agitadas por 30 segundos. Foram então centrifugadas a 1500g, a 4°C, por 10 minutos. Logo após, 200 μ L do sobrenadante foram transferidos para *vials* devidamente identificados e diluídos em 300 μ L de solução aquosa de ácido metanóico 0,1%. Os *vials* foram tampados e encaminhados para análise. Amostras para controle de qualidade (QC) foram preparadas por meio da mistura de 20 μ L de cada uma das amostras e analisadas de forma intercalada a cada 5 amostras, para avaliar a estabilidade da aquisição de dados.

4.3.2.4 Condições analíticas para plasma e urina por UPLC-QToF-MS

As análises por UPLC-QToF-MS foram realizadas no laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas.

Para a separação cromatográfica, foi utilizada coluna de fase reversa C₁₈ (100 milímetros de comprimento, 2,1 milímetro de diâmetro interno e partícula de 1,8 micrômetros) a 40°C com eluição gradiente. A fase móvel consistiu na mistura das soluções A) água com 0,1% de ácido metanóico e B) acetonitrila com 0,1% de ácido metanoico, com a programação gradiente mostrada na Tabela 8. O volume de amostras injetado foi de 5 μ L.

Tabela 8 – Programação da eluição gradiente utilizada na separação cromatográfica.

Tempo (minutos)	Fluxo (mL/minuto)	% A	% B
0	0,400	98,0	2,0
3	0,400	98,0	2,0
8	0,400	90	10,0
14	0,400	50,0	50,0
14,50	0,400	0	100
16	0,400	0	100
16,50	0,400	98,0	2,0
20	0,400	98,0	2,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo, com ionização por eletrospray (ESI), utilizando energias de colisão de 20 e 50 eV (cada uma 50% do tempo). Foram monitorados íons na faixa de 20 a 1000 m/z, com uma taxa de aquisição de 4Hz.

A fonte de ionização foi ajustada para 4500 V e as condições da fonte foram ajustadas para: gás nebulizador (N₂) a 5,0 bar; gás de secagem (N₂) a 9,0 L/ Min, temperatura seca a 200°C e tensão capilar em 4,5 KV. Antes da análise, uma solução de formiato de sódio foi usada como calibrador externo para calibração de massa exata.

Os dados foram adquiridos pelos softwares Hystar Application[®] versão 3.2 e OtofControl[®] (Bruker Daltonics Corporation[®], Alemanha).

4.3.3 Análise por GC-MS

4.3.3.1 Material e reagentes

- ✓ *Insert* de 150 µL para *vial*;
- ✓ Gás hélio;
- ✓ *Vial* com capacidade de 2 mL; Lacre crimp de alumínio;
- ✓ Água ultrapura (Sistema Mili-Q-Millipore);
- ✓ Acetonitrila grau LC-MS Sigma-Aldrich[®];
- ✓ Metanol grau LC-MS Sigma-Aldrich[®];
- ✓ Hexano Sigma-Aldrich[®];
- ✓ Isopropanol grau LC-MS Sigma-Aldrich[®];
- ✓ Micropipetas automáticas de volume variável: 10 a 100 µL, 20 a 200 µL, 100 a 1000µL;
- ✓ Microtubos para centrifugação com capacidade para 2 mL
- ✓ BSTFA Sigma-Aldrich[®];
- ✓ Urease Sigma-Aldrich[®];
- ✓ Metoxiamina Sigma-Aldrich[®];
- ✓ Piridina Sigma-Aldrich[®];
- ✓ C18 metil éster Sigma-Aldrich[®];
- ✓ *Speedvac* Eppendorf[®];
- ✓ Banho-maria HM 1003 - Hemoquímica[®];

- ✓ Termômetro para banho-maria Pyromed®.
- ✓ Cromatógrafo a Gás (Agilent 7890A), acoplado ao espectrômetro de massas com analisador Quadrupolo (5975C);
- ✓ Coluna capilar DB-5 de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme;
- ✓ Banho de ultrassom modelo Sonitop 404 A - Soni-Tech®;
- ✓ Agitador de tubo (vórtex) MS 3 digital - Ika®;
- ✓ Balança analítica modelo E02140 - Ohaus Explore®;
- ✓ Microcentrífuga refrigerada Beckman Coulter®.

4.3.3.2 Preparo de amostras de urina por GC-MS

Seguindo o protocolo otimizado por Mendes (2021), alíquotas de 100 µL de urina de cada indivíduo foram submetidas a pré-tratamento com 30 unidades de urease e incubadas em banho-maria por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, 400µL do solvente acetonitrila:isopropanol:água 3:3:2 (v/v/v) foram adicionados a 100 µL de urina, seguida de agitação em vórtex por 10 segundos e centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos e a 4°C. Os extratos foram secos até resíduo em *Speedvac* a 30°C. O resíduo obtido foi submetido a uma segunda extração com 400 µL de acetonitrila:água 50:50 (v/v) à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 14000 rpm a 4°C por 2 minutos e 200 µL do sobrenadante foram transferidos para microtubo e evaporados em *Speedvac* a 30°C. O resíduo foi então submetido à derivatização por metoxiaminação e sililação. A metoxiaminação foi realizada adicionando 10 µL de cloridrato de metoxiamina em piridina a cada amostra e incubada à temperatura ambiente por 16 horas. Para reação de sililação, a solução de 90 µL de BSTFA com 1% de TMCS foi adicionada, as amostras foram agitadas por 5 minutos e, posteriormente, incubadas à 70°C durante 1 hora. Concluída a derivatização, 100 µL de C₁₈ éster de metila em heptano (10 mg/L) foi adicionado a cada microtubo, as amostras foram agitadas e transferidas para *vials* com *insert* e imediatamente fechados com lacres metálicos. O volume de 5 µL de cada amostra foi injetado GC-MS.

Branco de amostra também foram preparados, contendo todos os reagentes utilizados no preparo, exceto a urina. Amostras para controle de qualidade (QC) foram preparadas por meio da mistura de 20µL de cada uma das amostras dos voluntários e analisadas de forma intercalada a cada 5 amostras, para assegurar a estabilidade analítica e avaliar a qualidade dos dados obtidos.

4.3.3.3 Condições analíticas para urina por GC-MS

A análise foi realizada com um instrumento de cromatografia gasosa 7890A acoplado a um espectrômetro de massas inerte com detector de eixo triplo 5975C da Agilent Technologies. Os parâmetros utilizados seguiram o protocolo proposto por Fiehn *et al.* (2016). A temperatura do injetor foi ajustada em 250°C em modo *split* (1:10), usando hélio como gás carreador com um fluxo de 1,1 mL/min. A coluna capilar utilizada foi uma DB5-MS com 30m de comprimento, 0,25 mm i.d. e 0,25 m (Agilent Technologies®) com programação de temperatura ajustada em 60°C por 1 minuto, depois aumentada em 10°C/min até atingir 325°C e mantida por 10 minutos, antes de resfriar.

Os parâmetros do espectrômetro de massas utilizados foram: linha de transferência a 280°C, fonte de filamento a 230°C, quadropolo a 150°C, energia de ionização de elétrons de 70eV, faixa de massas de 50-600 m/z. Os dados foram adquiridos utilizando o software Agilent MSD ChemStation.

Todas as amostras foram analisadas randomicamente, em ambas as técnicas (LC-MS e GC-MS), para evitar incertezas e artefatos relacionados à ordem da injeção e impedir o efeito de mudanças graduais da sensibilidade do instrumento em lotes inteiros.

4.3.4 Tratamento dos dados

Os dados brutos obtidos por GC-MS foram convertidos para o formato de arquivo “.cdf” através do *Chemstation Data Analysis*; e os dados obtidos por UPLC-MS foram convertidos para o formato mzML por meio do software *Proteowizard*® (<http://proteowizard.sourceforge.net/download.html>).

O software estatístico R® versão 4.2.1 e o pacote XCMS Bioconductor® versão 3.12 (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/xcms.html>) foram usados para

o tratamento e geração da matriz de dados, onde foram identificados, separados e, de acordo com os tempos de retenção, alinhados e agrupados.

Os parâmetros utilizados para identificar os *molecular features* (entidades metabólicas) obtidos por GC-MS foram o algoritmo *matchedFilter*, aplicando largura de pico a meia altura (*fwh*)=30, limite inferior da razão sinal/ruído (*snthresh*)=6,0. Foram agrupados então pelo algoritmo *density* (*bw*=10 e *mzwid*=0,05). O alinhamento dos tempos de retenção se deu pelo algoritmo *peakgroups* (*Family*=*gaussian*) e no reagrupamento dos *molecular features* utilizou-se novamente o algoritmo *density* (*bw*=5 e *mzwid*=0,05).

Com relação ao pré-tratamento dos *molecular features* identificados por LC-MS para urina, utilizou-se o método *centwave* e os seguintes parâmetros: *snthresh*=5.0, largura de pico cromatográfico (min., máx) – *peakwidth* de 3 a 30 segundos, erro de massa =10 ppm, *mzwid*=0.01, *bw*=5 e *minfrac*=0.3. Para as análises de plasma, os parâmetros com valores diferentes dos utilizados para urina foram *snthresh*= 10.0 e *minfrac*=0.2. Para o alinhamento dos tempos de retenção e reagrupamento, os mesmos parâmetros para GC-MS foram utilizados.

Após esse processamento, os picos não encontrados em todas as amostras foram preenchidos pelo algoritmo *fillPeaks*, com a finalidade de eliminar os valores faltantes (*missing values*).

Oteve-se então, arquivos no formato (.csv) contendo todos os *molecular features* identificados, agrupados e alinhados em cada análise. Os dados relacionados à urina foram normalizados pela concentração de creatinina urinária correspondente e os resultados das amostras de plasma foram normalizados pela mediana das intensidades. A transformação logarítmica foi aplicada para todos os dados, assim como o escalonamento por centralização média. Esse processamento foi realizado no *software* *MetaboAnalyst*® versão 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

A identificação putativa dos metabólitos reconhecidos por UPLC-QToF-MS foi realizada pela busca dos *m/z*'s em bases de dados públicas, como - *Human Metabolome Database* (HMDB®) e *Metlin*®, além da plataforma *CEU Mass Mediator*, onde se realiza uma busca de metabólitos em diferentes bancos de dados simultaneamente (*Kegg*, *HMDB*®, *LipidMaps*®, *Metlin*®).

4.3.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos por UPLC-MS e GC-MS foram submetidos à análise estatística multivariada, por meio de métodos quimiométricos não supervisionados como PCA e supervisionados como PLS-DA e OPLS-DA com predição de QCs. Todas essas análises foram executadas no MetaboAnalyst® 5.0. A partir dos modelos de PLS-DA e OPLS-DA, foram identificados os *molecular features* discriminantes entre os grupos utilizando a classificação de *Variable Importance Projection* (VIP) e Volcano plot.

Foram aplicadas também estatísticas descritivas para avaliar as variáveis numéricas, como a média, o desvio padrão e a mediana. Os testes de Shapiro Wilk e de Anderson-Darling foram utilizados para verificar se as variáveis possuíam distribuição normal gaussiana. As variáveis categóricas foram avaliadas em termos de frequência e porcentagem.

Para verificar as hipóteses de associação entre as variáveis foram utilizados o teste de *Mann-Whitney* e o teste exato de *Fisher*. Uma associação foi considerada estatisticamente significativa quando o valor-p foi menor do que 0,05.

O software utilizado nas análises foi o Graphpad Prism® versão 9.0.0.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Características da população de estudo

O grupo exposto foi constituído por 20 trabalhadores de lavouras de café da região do sul de Minas Gerais; já o grupo controle foi formado por 20 homens da região de Belo Horizonte. A Tabela 9 apresenta as principais características e distribuição com relação à população do estudo.

A idade média dos indivíduos do grupo controle foi de 39 anos, com variação entre 20 e 62 anos, e a idade média do grupo exposto foi de 45 anos, variando de 22 a 62 anos. A maioria dos voluntários do grupo exposto (70%) trabalhava com agricultura familiar de pequenas e médias propriedades, enquanto 85% do grupo controle exerciam função administrativa ou autônoma. Os participantes do grupo exposto estiveram em contato direto com agrotóxicos por, pelo menos, três anos, sendo que 44% deles relataram mais de 20 anos de exposição.

Tabela 9 - Comparação das variáveis entre os grupos exposto e controle

Variáveis	Expostos (n _e =20)	Controle (n _c =20)	Valor-p
Faixa etária²	n (%)	n (%)	
20 a 30	2(10,0)	8(40,0)	0,118
31 a 40	6(30,0)	3(15,0)	
41 a 55	9(45,0)	5(25,0)	
>55	3(15,0)	4(20,0)	
Tempo de estudo (anos)¹	5(4-8)	16(12-20)	0,223
Função de trabalho²			
Administrativa	0(0)	15(75)	<0,001*
Agricultura familiar	14(70)	0(0)	
Aplicador	6(30)	0(0)	
Estudante	0(0)	3(15)	
Outro	0(0)	2(10)	

Legenda: ¹teste de Mann-Whitney; ²teste exato de Fisher; *valor-p<0,05;

As comparações realizadas entre os grupos exposto e controle para as variáveis escolaridade (tempo de estudo), faixa etária e função de trabalho demonstraram que apenas para a variável função de trabalho houve associação significativa (p<0,001), indicando que há uma maior prevalência de indivíduos com função administrativa entre os indivíduos do grupo controle, enquanto entre os expostos, a prevalência foi da função agricultura familiar e aplicador.

4.4.2 Otimização do preparo de amostras biológicas de plasma por UPLC-MS

Na metabolômica, busca-se detectar a maior quantidade de metabólitos possíveis em uma só análise, que deve ser reprodutível para produzir resultados confiáveis. Neste estudo, o objetivo foi obter um procedimento de preparo de amostras que apresentasse a melhor cobertura metabólica em termos de número de metabólitos detectáveis (*molecular features*) e intensidade dos picos. Dessa forma, foi utilizada a aferição de notas de 0 a 5 para avaliação dos parâmetros mencionados. As notas foram obtidas para todos os experimentos realizados em duplicata. Esse procedimento é encontrado em alguns trabalhos de otimização de métodos cromatográficos para metabolômica e facilita a seleção das melhores condições a serem aplicadas (FACCIO, 2015; DEDA, *et al.*, 2017; MENDES, 2021).

Com base no número de *molecular features* identificados em cada duplicata dos experimentos, calculou-se a nota utilizando-se a equação abaixo:

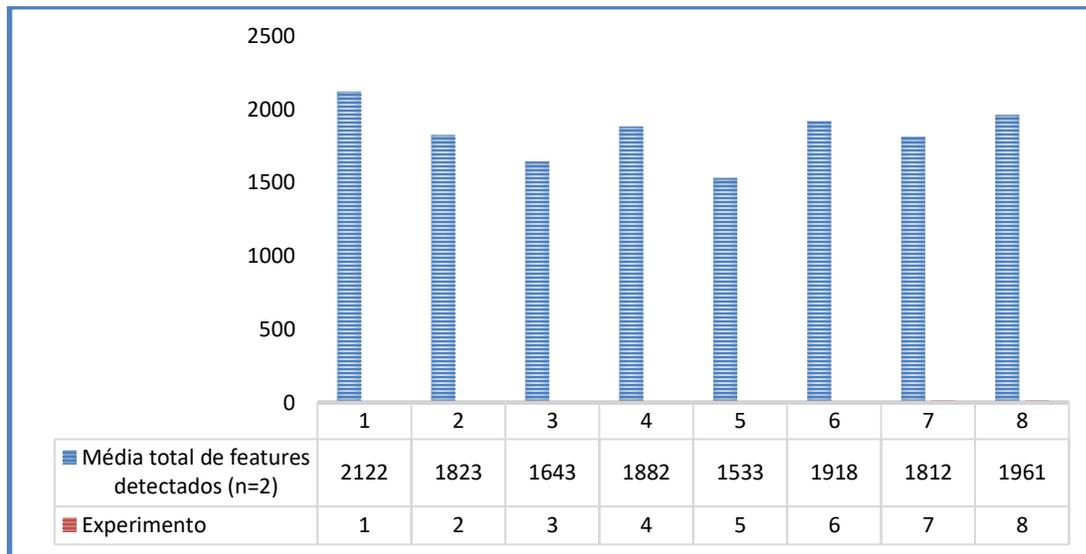
$$N_{mol} = 5 \times (n/n_{m\acute{a}ximo})$$

Onde:

- ✓ N = nota aferida com base no número total de *molecular features* identificados;
- ✓ n = número total de *molecular features* identificados na duplicata;
- ✓ n_{máximo} = número total de *molecular features* máximo obtido.

Todos os protocolos de extração forneceram um grande número de metabólitos, mas a quantidade de picos obtida foi maior ao se utilizar a mistura clorofórmio: metanol (2:1) sem descanso e sem evaporação (experimento 1), conforme demonstrado na Figura 14:

Figura 14 - Número médio (n=2) de *features* detectados nos experimentos de otimização para o preparo de amostras de plasma para metabolômica por LC-MS.



Fonte: elaborado pelo autor.

Observa-se uma grande cobertura metabólica também nos experimentos 8 e 6, os quais foram utilizados apenas metanol frio como solvente extrator, acrescidos de uma etapa de evaporação em Speedvac a 30°C com posterior ressuspensão com ácido fórmico 0,1%. Nos experimentos 2 e 4, utilizou-se também o metanol, sendo o experimento 4 seguido de descanso a -20°C por duas horas, sem evaporação. Os experimentos 3 e 5 utilizaram o mesmo solvente extrator, clorofórmio: metanol (2:1), passando o primeiro apenas pela etapa de descanso a -20°C e o segundo, somente pela evaporação à vácuo. O experimento 7 passou por todas as etapas, tendo a mistura clorofórmio: metanol (2:1) como solvente extrator. Esses achados indicam que as etapas de descanso e evaporação com posterior ressuspensão não resultaram em uma maior eficiência da análise, o que é evidenciado pelo menor número de *features* detectados, conforme demonstrado na figura 14.

Com relação ao solvente extrator, a mistura clorofórmio: metanol (2:1) foi a que apresentou maior número de picos. As amostras biológicas são complexas e apresentam uma grande diversidade de metabólitos em quantidade, estabilidade e propriedades físico-químicas variadas. Em amostras como o sangue, urina e fezes, os metabólitos polares representam cerca de 40% do metaboloma detectado por LC-MS, metabólitos

polares médios cerca de 50% e não polares cerca de 10% (ROCA, *et al.*, 2021; EYLEM, *et al.*, 2022). Por isso, uma mistura com diferentes polaridades pode ser capaz de extrair um maior número de compostos, tanto neutros quanto polares, quando comparada ao uso de um único solvente extrator. A diferença de polaridades influencia diretamente na eficiência na extração. Brum e colaboradores (2009) realizaram um estudo de comparação de métodos de extração de frações lipídicas, utilizando quatro diferentes tipos de solventes. Os autores perceberam que a mistura binária clorofórmio: metanol forneceu uma quantidade significativamente maior de lipídeos extraída e obteve maior reprodutibilidade entre as extrações. Gusso e colaboradores (2012) realizaram um estudo semelhante e identificaram um maior rendimento do teor lipídico nas amostras quando utilizaram a metodologia com solvente extrator binário (clorofórmio: metanol), afirmando que o uso de um único solvente não é recomendável para a extração de analitos em amostras biológicas.

Em geral, misturas de solventes com polaridades diferentes têm sido empregadas com sucesso em metabolômica global, como foi padronizado neste estudo. Entretanto, cabe destacar que não existe um protocolo de extração ideal e universal, capaz de cobrir todos os metabólitos de qualquer metaboloma. Portanto, a seleção do protocolo deve ser norteada pela matriz biológica e pela abordagem metabolômica pretendida, como encontrado em literatura (GUSO, *et al.*, 2012; FIEHN, 2017; ROCA, *et al.*, 2021; EYLEM, *et al.*, 2022).

A avaliação das intensidades dos picos também foi realizada para definição da nota do protocolo de preparo de amostras. Para isso, foram selecionados três ions de m/z de alta intensidade, os quais foram identificados em todos os experimentos realizados. O coeficiente de variação (CV) da intensidade foi calculado para cada experimento, baseado nos resultados das intensidades. A %CV permite avaliar a repetibilidade de uma análise, sendo de grande relevância para atestar a confiança dos resultados obtidos. De acordo com Dudzik e colaboradores (2018), valores da %CV inferiores a 30% são considerados adequados para análises metabolômicas. Outros estudos metabolômicos utilizam esse mesmo critério para verificar a qualidade dos dados obtidos nos experimentos (FACCIO, 2015; CANUTO, *et al.*, 2018; YAN, *et al.*, 2020; MENDES, 2021; EYLEM, *et al.*, 2022). As %CV's de todos os experimentos

variaram de 2,73 a 18,66, sendo considerados satisfatórios. As médias das intensidades foram normalizadas pela menor intensidade registrada em todos os experimentos e posteriormente essas médias normalizadas foram divididas pela média da melhor condição nesse quesito (FACCIO, 2015; MENDES, 2021). Esses cálculos foram executados para cada m/z, seguido do cálculo da nota por meio da seguinte equação:

$$N \text{ intensidade} = 5 \times (I/I \text{ máximo})$$

Onde:

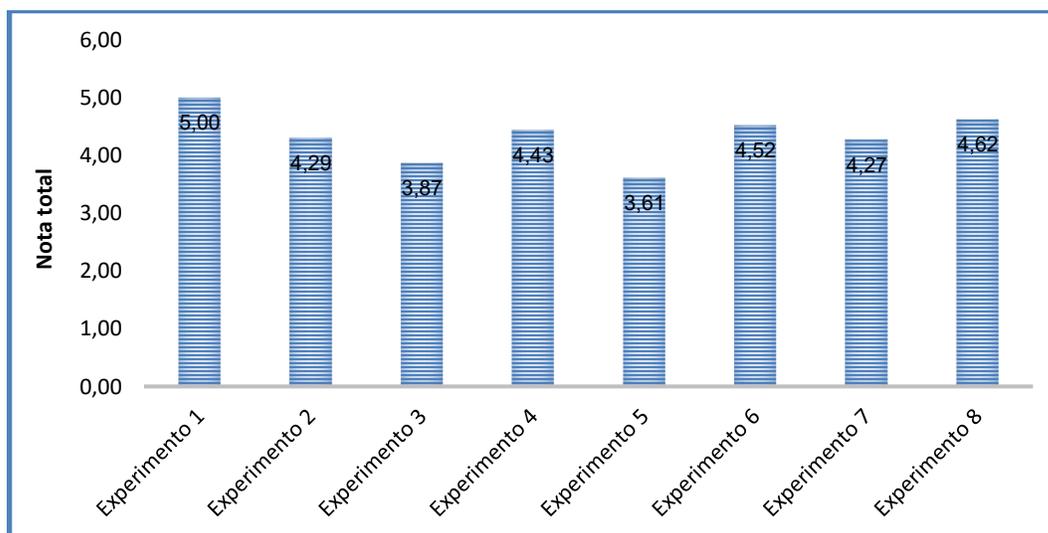
- ✓ I = média das intensidades normalizadas pela menor intensidade;
- ✓ Imáximo = média máxima das intensidades normalizadas

A seleção do melhor protocolo de preparo de amostras foi então definida pela soma das notas das duas equações citadas anteriormente, o número de *molecular features* e as intensidades, conforme equação abaixo. A nota total pode variar de 1 a 5.

$$\text{Notatotal} = \text{Notamolec.fe} + 1,5 \text{ Notaintensidade}$$

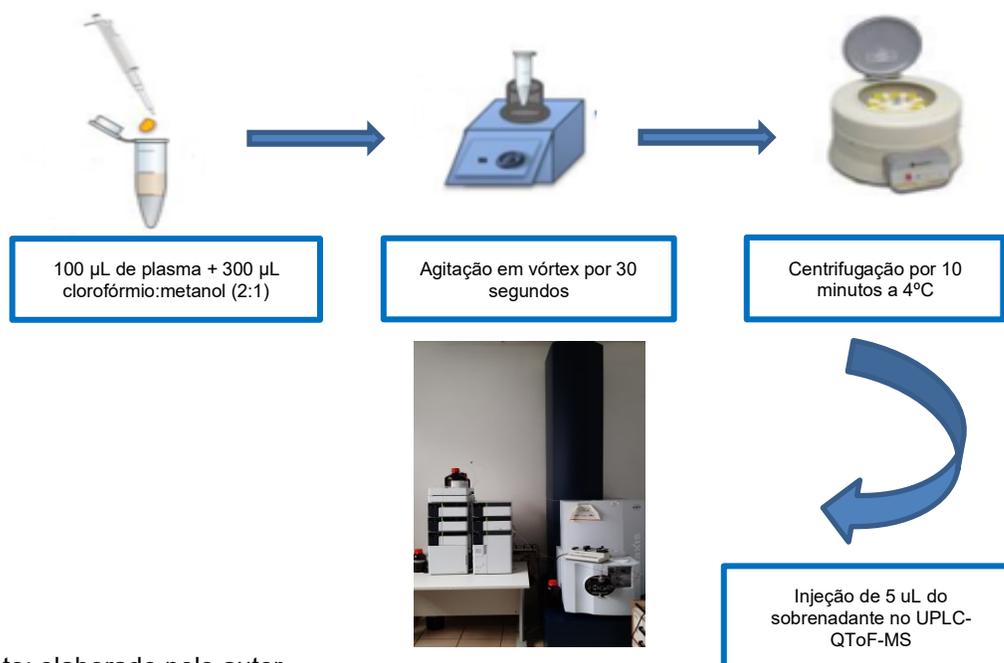
A atribuição de pesos aos parâmetros de maior importância é recomendada para dar maior relevância a estes e assegurar maior eficiência e confiança no resultado final. Assim, as notas finais são mostradas na Figura 15.

Figura 15 – Nota total de cada experimento de amostras de plasma, calculada por meio da soma das notas aferidas na avaliação do número de *molecular features* e suas intensidades



Com a análise dos resultados, o protocolo utilizado no experimento 1 foi o que obteve maior pontuação, com nota 5, e foi o escolhido para realização do preparo de amostras de plasma para o estudo de metabolômica por UPLC-QToF-MS, conforme Figura 16:

Figura 16 - Esquema representativo do preparo de amostras de plasma por UPLC-QToF-MS



Fonte: elaborado pelo autor.

Para metabolômica global por LC-MS, um preparo de amostras mínimo e não-seletivo deve ser, em geral, o método de escolha. A menor complexidade na preparação da amostra é uma vantagem dessa técnica, uma vez que não há necessidade de derivatização, como ocorre com a técnica de GC-MS. A precipitação de proteínas e remoção de sais através da adição de solventes orgânicos são as técnicas mais empregadas (CANUTO, *et al.*, 2018; GIKA, *et al.*, 2019; ARAÚJO, *et al.*, 2021). Sendo assim, o protocolo otimizado neste estudo possui um preparo simples que confere ao experimento maior eficiência, além de uma maior rapidez no preparo das amostras.

Para avaliar a estabilidade analítica durante a aquisição de dados, amostras de controle de qualidade (QC), preparadas a partir da mistura de igual volume (20 µL) de cada amostra analisada no estudo, também foram analisadas durante toda a sequência por ambas as técnicas empregadas. Essas amostras foram injetadas no início e final da análise e também intercaladas a cada 5 amostras.

4.4.3 Análise metabolômica de plasma por UPLC-QToF-MS

Devido à complexidade do perfil químico e aos numerosos resultados analíticos gerados pela metabolômica global, o processamento dos dados se faz necessário para garantir o bom alinhamento dos picos, excluir dados irrelevantes, minimizar o viés das diferenças de concentração de metabólitos de diferentes classes químicas, entre outros. O processamento depende da técnica analítica empregada e, em geral, inclui etapas de criação do conjunto de dados, agrupamento e alinhamento dos picos, normalização dos dados, transformação e escalonamento (FERREIRA, 2015; PILON, *et al.*, 2020; ARAUJO, *et al.*, 2021). Neste estudo, os softwares empregados no processamento foram XCMS *Bioconductor*®, R® e *Metaboanalyst*®.

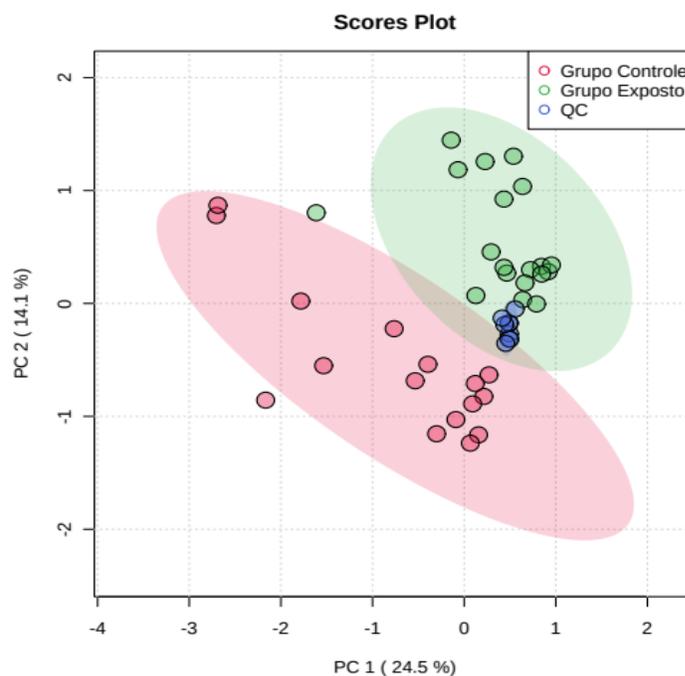
Os resultados de plasma obtidos por UPLC-MS foram normalizados pela mediana das intensidades, a fim de reduzir o erro sistemático, deixando todas as amostras em uma escala predefinida (MASTRANGELO, *et al.*, 2015). A transformação logarítmica foi realizada em seguida para linearizar os dados por meio da aplicação de mesma base logarítmica, reduzindo assim a heterogeneidade da variação na atividade biológica. O escalonamento por centralização média também foi aplicado na sequência, o qual

consiste num método onde a média do sinal da intensidade de um íon é subtraída de cada sinal das amostras, fazendo com que cada amostra exiba somente as diferenças que possuem com relação à média de todos os dados originais (FERREIRA, 2015; MASTRANGELO, *et al.*, 2015; PILON, *et al.*, 2020).

Cabe ressaltar que, para atingir a cobertura máxima de metabólitos por LC-MS, é importante utilizar ionização por *electrospray* nos modos positivo (que abrange uma maior variedade de compostos) e negativo (estende a cobertura de informações). Apesar da abordagem desses modos de ionização possibilitar a identificação de um maior número de metabolitos, os dados obtidos nesse estudo foram somente no modo positivo devido a impossibilidade operacional no equipamento utilizado. No entanto, essa limitação não foi prejudicial na identificação e interpretação dos dados.

Após as etapas de processamento, métodos estatísticos multivariados foram aplicados à matriz de dados, utilizando o Metaboanalyst[®]. Em metabolômica, esses métodos visam a classificação e discriminação de metabólitos responsáveis por diferenciar os grupos de amostras. Os dados foram avaliados, inicialmente, pelo método de reconhecimento de padrões não supervisionado, a Análise por Componentes Principais (PCA) com predição de controle de qualidade (QC). A análise por PCA visa encontrar similaridades e diferenças entre as amostras, verificar a presença de tendências ou de amostras anômalas (*outliers*), além de evidenciar a variabilidade dos dados adquiridos, sendo uma boa maneira de se verificar a estabilidade analítica durante as análises. O gráfico 1 mostra uma boa separação das amostras dos indivíduos expostos ocupacionalmente e não ocupacionalmente aos agrotóxicos, refletindo diferenças em seus perfis metabólicos.

Gráfico 1 – Modelo de análise por Componentes Principais (PCA) para amostras de plasma de trabalhadores expostos ocupacionalmente e não ocupacionalmente aos agrotóxicos e amostras de controle de qualidade (QCs).



Fonte: elaborado pelo autor.

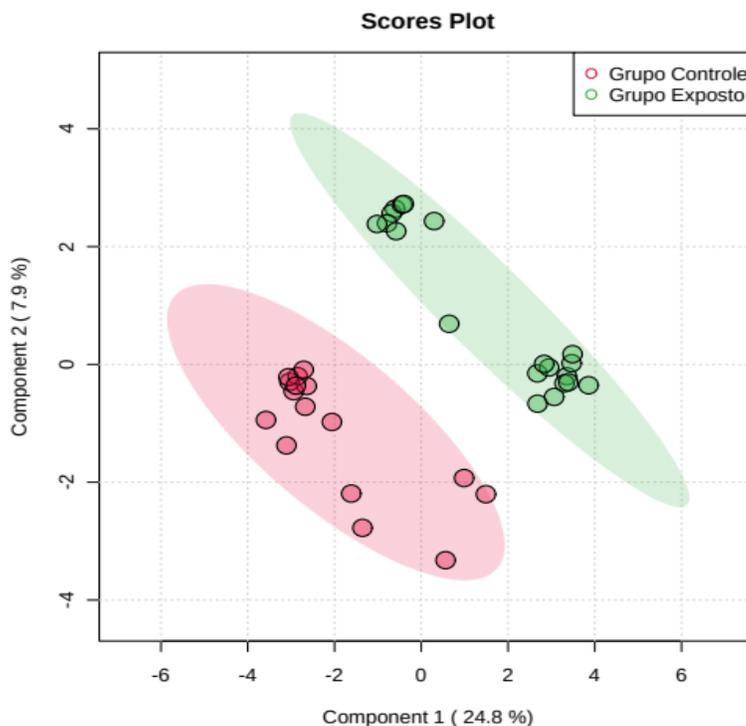
O resultado da análise por PCA demonstrou um forte agrupamento das amostras de QC, o que indica estabilidade analítica, qualidade e confiabilidade dos dados obtidos. Os QC's possuem informações de todas as amostras biológicas (tanto do grupo controle, como do grupo exposto), por isso, a observação de desvios dos resultados reflete em variações analíticas provenientes do preparo de amostras ou da etapa de análise instrumental. Estudos utilizando metabolômica têm adotado essa estratégia para avaliar a estabilidade e desempenho do sistema analítico. Essas amostras normalmente são injetadas no início das análises, para equilibrar e condicionar o sistema a fim de se obter condições reproduzíveis, no final das análises e também em intervalos regulares entre as amostras, para monitorar a estabilidade e a reprodutibilidade do processo analítico (FACCIO, 2015; DUDZIK, et al., 2018; MENDES, 2021).

É importante destacar que amostras atípicas (*outliers*) identificadas pelo modelo de PCA devem ser analisadas e excluídas. Elas podem ser resultado dos erros de medição decorrentes do preparo de amostras, de problemas instrumentais ou na execução do experimento. Se essas amostras não forem removidas, podem causar erros

nas etapas subsequentes, conforme descrito em outros trabalhos encontrados na literatura (FERREIRA, 2015; CHAVES, 2021). Neste estudo, as amostras retiradas apresentaram problemas durante o processo analítico, como aumento de pressão no momento da corrida cromatográfica, extração inadequada, obtendo baixa intensidade dos picos e, no caso da urina, valores de creatinina extremamente baixos.

Após a análise de PCA, os resultados foram avaliados pelo método multivariado supervisionado de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). Este é um método de regressão capaz de aperfeiçoar e modelar as diferenças entre os metabólitos responsáveis pela separação dos grupos (GOULART, 2018). Para a análise, os dados foram novamente normalizados, sem incluir os resultados das amostras de QC e o modelo PLS-DA foi construído no Metaboanalyst[®]. O gráfico de pontuação (Gráfico 2) mostra uma separação efetiva entre as amostras de plasma do grupo controle em relação ao grupo exposto.

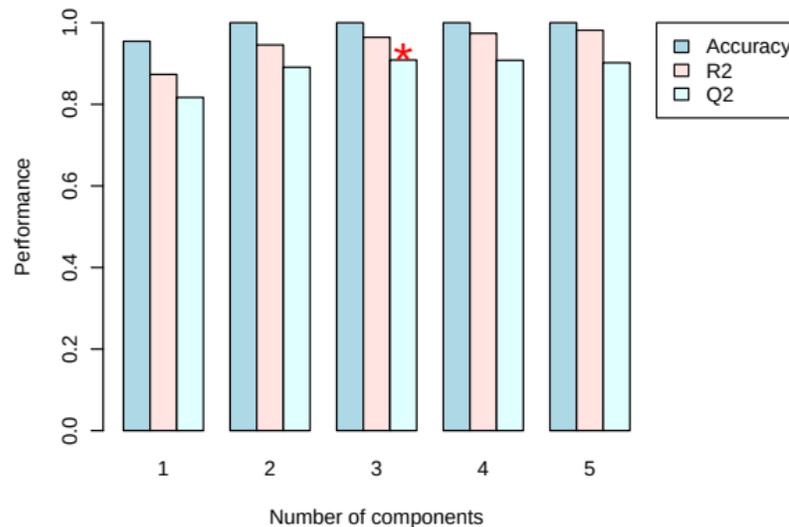
Gráfico 2 - Modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) indicando efetiva discriminação entre o grupo de indivíduos ocupacionalmente expostos e o grupo dos voluntários não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos.



Fonte: elaborado pelo autor.

Com a finalidade de atestar a validade do modelo construído, o teste de validação cruzada foi utilizado (Gráfico 3). O modelo gerado tem como parâmetros o R^2 , que mede a adequação do modelo para o conjunto de dados e o Q^2 , o qual avalia a capacidade de previsibilidade do modelo. Valores usuais para experimentos biológicos são $Q^2 > 0,4$ e $R^2 > 0,7$ (GODZIEN, *et al.*, 2013; PILON, *et al.*, 2020; ARAUJO, *et al.*, 2021). Os resultados da validação cruzada para amostras de plasma por UPLC-MS, para 5 componentes principais, foram $R^2= 0,98$, $Q^2= 0,92$, o que mostra um ajuste adequado dos dados ao modelo, sendo considerado um modelo altamente preditivo.

Gráfico 3 – Classificação do modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) pela validação cruzada.

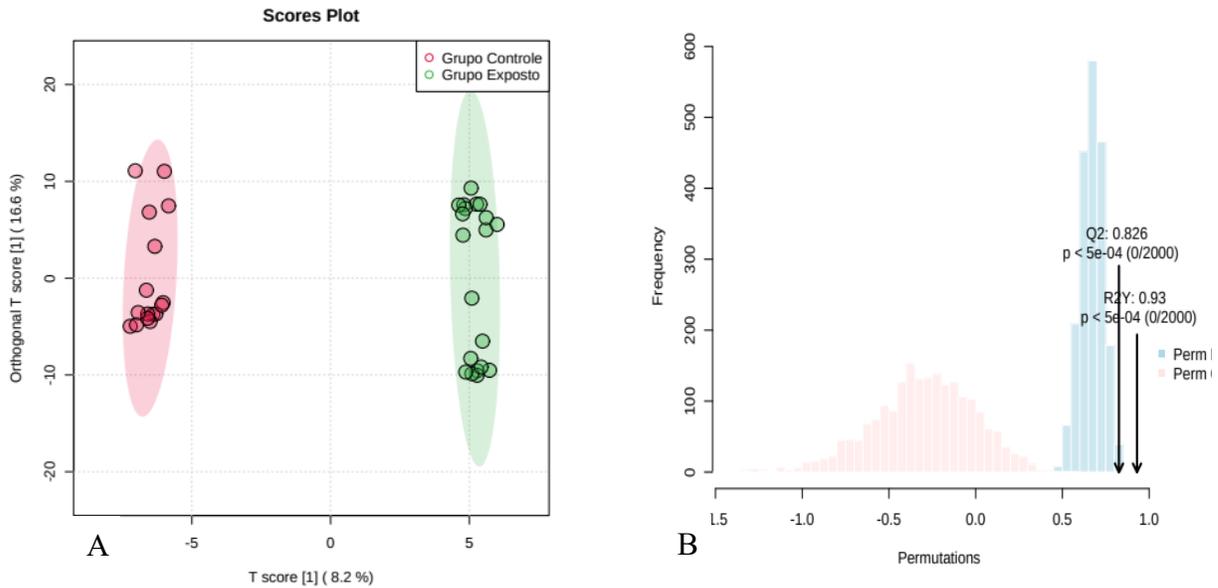


Legenda: parâmetros de qualidade obtidos a partir da validação do modelo PLS-DA: $R^2= 0,98$ (variação explicada pelo modelo) e $Q^2= 0,92$ (previsibilidade do modelo).

Fonte: elaborado pelo autor.

Para maximizar a separação entre os grupos e encontrar metabólitos discriminantes, o método de classificação supervisionado Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA) também foi utilizado. Este método é considerado uma variante do PLS-DA e utiliza um filtro capaz de eliminar variações indesejadas nos dados, como aquelas não relacionadas às alterações bioquímicas. O gráfico de pontuação obtido é mostrado no gráfico 4.

Gráfico 4 - Modelo de Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA) para amostras de plasma de trabalhadores expostos ocupacionalmente e não ocupacionalmente aos agrotóxicos (A) e gráfico de validação do modelo OPLS-DA por permutações (B).



Legenda: A: modelo OPLS-DA para amostras de plasma dos indivíduos do grupo exposto e controle, analisadas por UPLC-MS. B: validação do modelo OPLS-DA pelo teste de permutações (n = 2000).

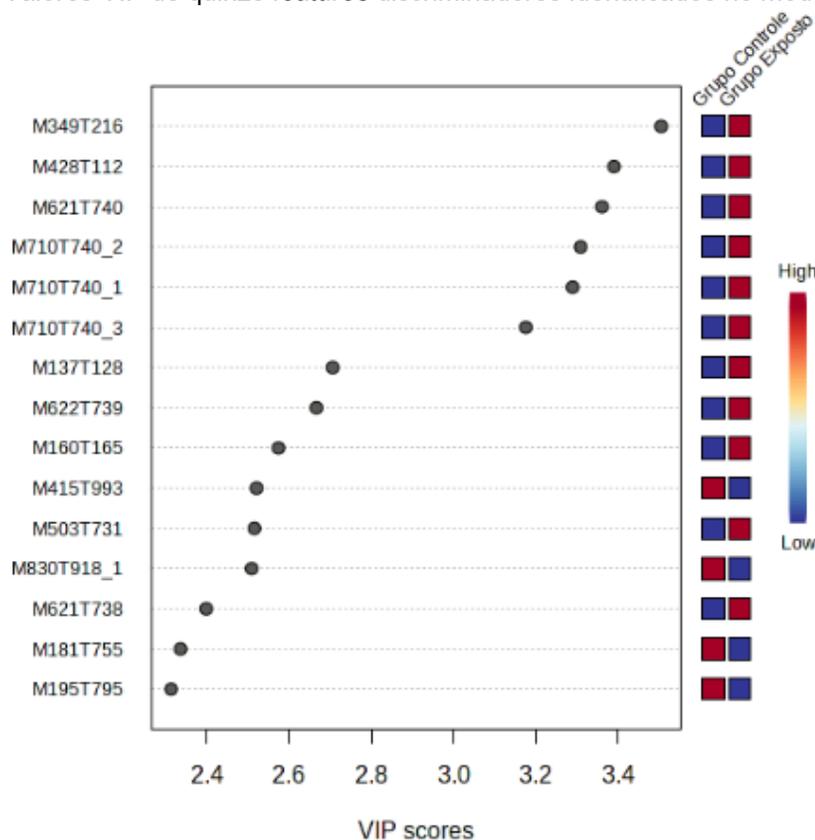
Fonte: elaborado pelo autor

A aplicação combinada de PCA e PLS-DA ou OPLS-DA a conjuntos de dados metabolômicos produz informações importantes sobre alterações de metabólitos que definem as separações entre os grupos. Essas alterações podem representar um padrão específico, denominado assinatura metabólica, que é capaz de refletir a exposição dos indivíduos a produtos químicos (WORLEY, POWERS, 2016; CH, *et al.*, 2019; MENDES, 2021). Uma revisão realizada por Bonvallot e colaboradores (2014) mostrou que a exposição a misturas de agrotóxicos pode induzir modificações metabólicas potencialmente ligadas a distúrbios fisiopatológicos e essas descobertas têm justificado e reforçado o uso da metabolômica na avaliação de exposição a xenobióticos.

4.4.3.1 Identificação das entidades moleculares discriminadoras resultantes da análise metabolômica de plasma por UPLC-QToF-MS

Os valores VIP (do inglês, *Variable Importance in Projection*) indicam a importância de cada metabólito para todo o modelo. Os *features* com valores de VIP maiores ou iguais a 1,5 foram selecionados e classificados como os responsáveis pela separação e discriminação dos dois grupos. Os 15 *molecular features* mais influentes e que discriminaram os perfis dos indivíduos expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos estão representados no Gráfico 5. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas do metabólito correspondente em cada grupo em estudo.

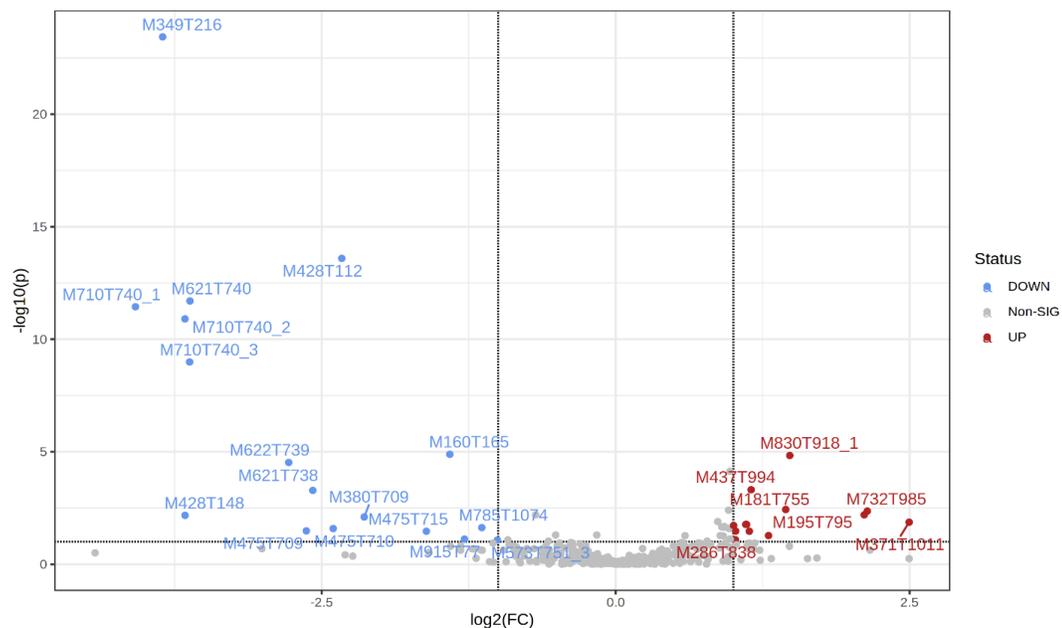
Gráfico 5 - Valores VIP de quinze *features* discriminadores identificados no modelo de OPLS-DA.



Legenda: VIP (Importância da variável na projeção) dos *molecular features* identificados por UPLC-Q-ToF-MS, para as amostras de plasma nas mesmas condições analíticas.

Outra análise realizada foi o *Volcano Plot*. Ele utiliza o *fold change*, que tem a finalidade de comparar os valores absolutos de alterações entre as médias de amostras dos grupos controle e exposto e o teste de *Mann Whitney*, que permite identificar a variabilidade de cada metabólito pelo valor-p que determina a diferença estatística entre as variáveis. Essa análise realiza os cálculos em escala logarítmica para *fold change* (Log_2) e *Mann Whitney* ($-\log_{10}$), como descrito por ANTUNES, et al. (2019). No presente estudo, foram considerados metabólitos diferenciais aqueles que o valor de *fold change* se apresentou acima do *threshold* de 2, valor-p menor que 0,05 e $\text{FDR} < 0,01$. Sendo assim, foram encontrados 14 *molecular features* com resultados mais baixos e 11 mais elevados, ao se comparar o grupo controle em relação ao grupo exposto. Os resultados estão representados no gráfico 6.

Gráfico 6 – *Volcano Plot* aplicado aos dados das amostras de plasma de indivíduos expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos.



Legenda: Cada ponto no gráfico representa um *molecular feature*. Os pontos vermelhos indicam aumento destes e os pontos azuis, diminuição dos mesmos. Os pontos cinzas representam a não distinção entre os grupos.

Após a seleção dos *molecular features* significativamente alterados e que mais contribuíram para a discriminação entre os grupos, realizou-se a possível identificação desses metabólitos.

Essa é uma etapa complexa e necessária para o estudo das vias metabólicas envolvidas na exposição aos agrotóxicos. Dificilmente um metabólito produz um único pico cromatográfico, mesmo quando instrumentos de alta resolução são utilizados para a aquisição dos dados. Além disso, existem diversos metabólitos ainda não conhecidos que podem apresentar valor de m/z semelhantes ao de alguma substância já identificada. Esses fatores tornam o processo de identificação dos metabólitos extremamente difícil e trabalhoso (CHONG; WISHART; XIA, 2019; PILON, *et al.*, 2020; CHAVES, 2021).

A identificação foi realizada por meio da busca da relação m/z nos bancos de dados HMDB[®], Metlin[®] e Lipidmaps[®], considerando um erro de massa de até 5 ppm e os adutos $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ e $[M+Na]^+$. Dos 25 *molecular features* selecionados, 4 não foram possíveis de serem identificados por não reconhecimento dos respectivos m/z pelos bancos de dados utilizados. O resultado dessa avaliação e a possível identificação foram compilados na Tabela 10, onde são apresentados também os valores VIP, o valor- p , o *fold change* e a classificação química dos metabólitos.

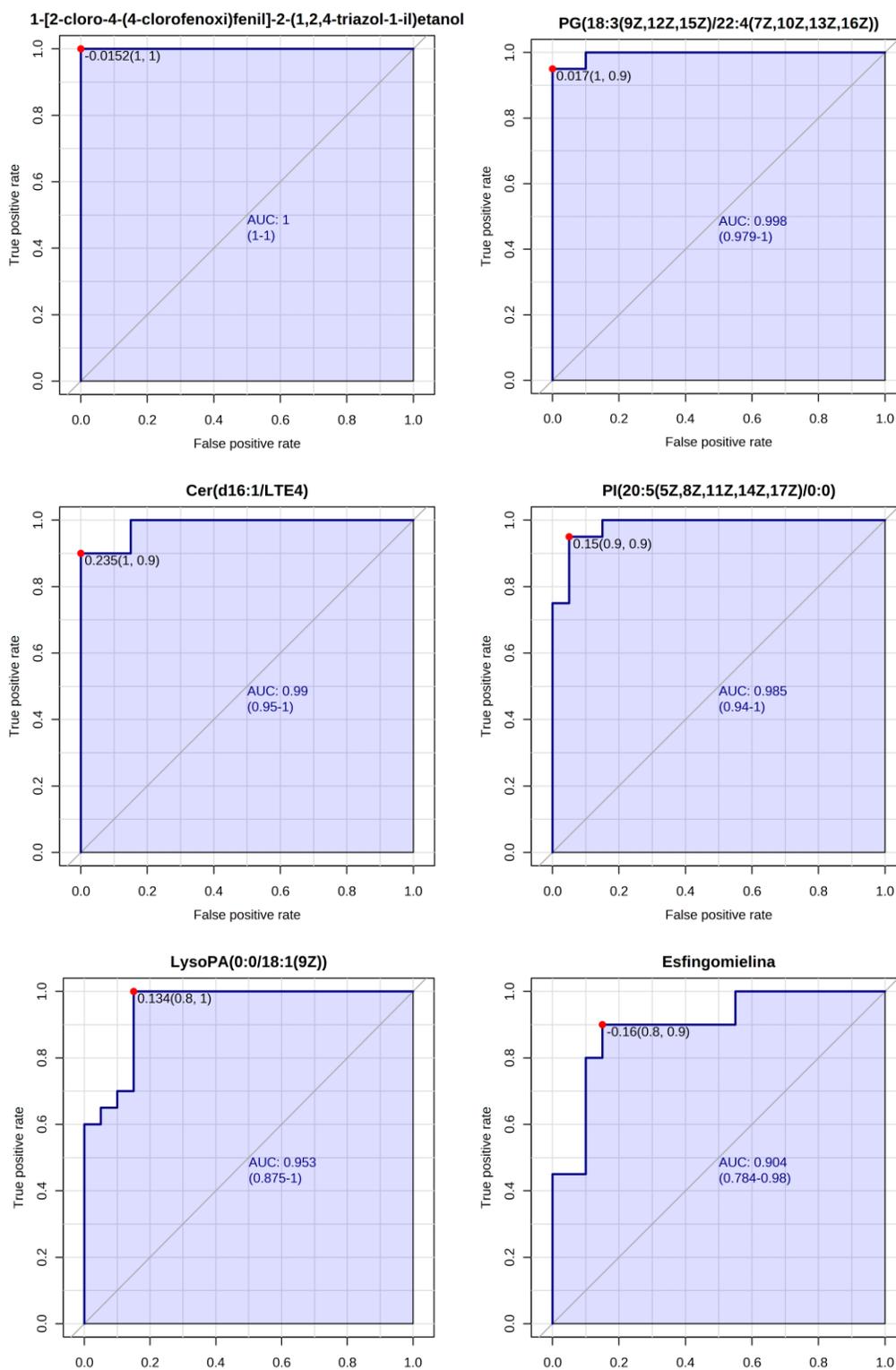
Tabela 10 - Metabólitos discriminadores putativamente identificados na análise metabolômica pela técnica UPLC-MS, no plasma de trabalhadores expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos.

Metabólitos	m/z	Pontuação VIP	Fold change (log2)	Valor-p	Classificação química
1-[2-cloro-4-(4-clorofenoxi)fenil]-2-(1,2,4-triazol-1-yl)etanol	349.038	3.50	-3.8528	0.000	Triazol
ácido 13-bromo(...)hidroxitridecatienoico	389.076	3.39	-2.3291	0.000	Prenol Lipídios
PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)	618.280	3.36	-3.620	0.000	Glicerofosfoinositol
Difosfatidilglicerol	709.794	3.31	-4.0838	0.000	Fosfatidilglicerol
Cer(d16:1/LTE4)	692.479	3.17	-3.6229	0.000	Ceramidas
Glutamato	147.053	2.57	-1.4101	0.000	Aminoácidos, peptídios e análogos
PG(18:3(9Z,12Z,15Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	821.071	2.50	1.4805	0.000	Glicerofosfolipídios
Paraxantina	180.064	2.33	1.4462	0.003	Purina e derivados
5-aminofalazina-1,4-diol	194.083	2.31	2.1139	0.006	Benzodiazina
LysoPA(0:0/18:1(9Z))	436.258	2.15	1.1522	0.000	Glicerofosfolipídios
Esfingomielina	730.598	2.01	2.14	0.004	Esfingolipídios
Ácido 1,22-Docosanedioico	370.308	2.00	2.4958	0.013	Ácidos Graxos
3-(Metiltio)propanoil-CoA	869.689	1.95	1.003	0.018	Glicerofosfolipídios
5-O-b-D-glucopiranosida	903.255	1.94	1.1131	0.016	Carboidratos
13,14-Diidro PGE1	356.256	1.93	-2.138	0.007	Lipídios
Val Gly Asp	289.127	1.90	1.1063	0.016	Aminoácidos, peptídios e análogos
Fosfatidiletanolamina (18:3)	475.269	1.79	-2.402	0.034	Fosfatidiletanolamina
Fosfatidilcolina (20:0/14:0)	762.092	1.78	-1.1386	0.023	Fosfatidilcolina
Sulfato de norepinefrina	249.030	1.77	1.13	0.033	Arylsulfato
Fosfatidilcolina (14:1)	465.285	1.75	-2.6305	0.025	Fosfatidilcolina
Tirosina	180.073	1.64	1.1367	0.034	Aminoácidos, peptídios e análogos

Nota: os valores negativos de *Fold Change* correspondem aos compostos aumentados no grupo exposto, enquanto os valores positivos, são os metabólitos diminuídos neste mesmo grupo.

Para avaliar o desempenho desses compostos como potenciais biomarcadores na avaliação da toxicidade induzida por agrotóxicos, foi utilizada a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), uma representação gráfica que ilustra a performance de um composto relacionado ao seu poder discriminatório. É um teste bastante utilizado na área médica para apontar se uma condição específica está presente ou não. Segundo HOO e colaboradores (2017), uma área sob a curva (AUC) de 0,5 indica que uma substância não tem habilidade discriminante, enquanto uma AUC de 1,0 representa um teste com discriminação perfeita. Valores de AUC > 0,85 são considerados aceitáveis para aplicações clínicas. Com base nesses resultados, 16 candidatos a biomarcadores apresentaram desempenho satisfatório, com exceção de 5-O-b-D-glucopiranosida, 13,14-Diidro PGE1, Val-Gly-Asp, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina. Os resultados da curva ROC de alguns possíveis biomarcadores são mostrados na Figura 17.

Figura 17 - Curvas ROC de alguns dos metabólitos plasmáticos discriminantes identificados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.



Fonte: elaborado pelo autor. Nota: AUC: área sob a curva ROC, com intervalo de confiança de 95%.

De acordo com os resultados acima, o composto mais discriminante entre os grupos foi o 1-[2-cloro-4-(4-clorofenoxi)fenil]-2-(1,2,4-triazol-1-yl)etanol (AUC = 1), um metabólito do difenoconazol, fungicida da classe dos triazóis, bastante utilizado pelos trabalhadores envolvidos neste estudo, segundo relato dos mesmos.

Os triazóis são altamente eficazes e muito utilizados na agricultura. Eles atuam não apenas nas enzimas-alvo da família CYP51 (lanosterol-14 α -desmetilase), necessárias para a biossíntese do ergosterol, mas também na superóxido dismutase e peroxidase, α -amilase e β -amilase e outras enzimas da família do citocromo P450. De acordo com a literatura, a exposição a fungicidas triazóis pode desencadear desregulação endócrina, devido à inibição da atividade da aromatase, estresse oxidativo, apoptose celular e reações inflamatórias. Um produto derivado da desmetilação realizada pela CYP51 em humanos é o colesterol, necessário para a síntese de ácidos biliares, mineralocorticoides, glicocorticoides e esteroides sexuais. (TENG, *et al.*, 2018; SANCHEZ, *et al.*, 2020; MACHADO, *et al.*, 2021).

Jiang e colaboradores (2022) e Teng, *et al.* (2018) utilizaram transcriptômica e metabolômica por LC-MS/MS para verificar a toxicidade do difenoconazol em *zebra-fish*. A análise de vias metabólicas, após a exposição a esse agrotóxico, detectou alterações no metabolismo de aminoácidos, incluindo glutamato, metabolismo lipídico, metabolismo energético, metabolismo de nucleotídeos, dentre outros. Ambos os autores afirmaram que os fungicidas desregularam o metabolismo lipídico em níveis bioquímicos, transcriptômicos e metabolômicos e concluíram que as duas técnicas, quando utilizadas em conjunto, podem ser úteis para verificar os efeitos toxicológicos do difenoconazol e para avaliar os riscos dos xenobióticos em organismos aquáticos.

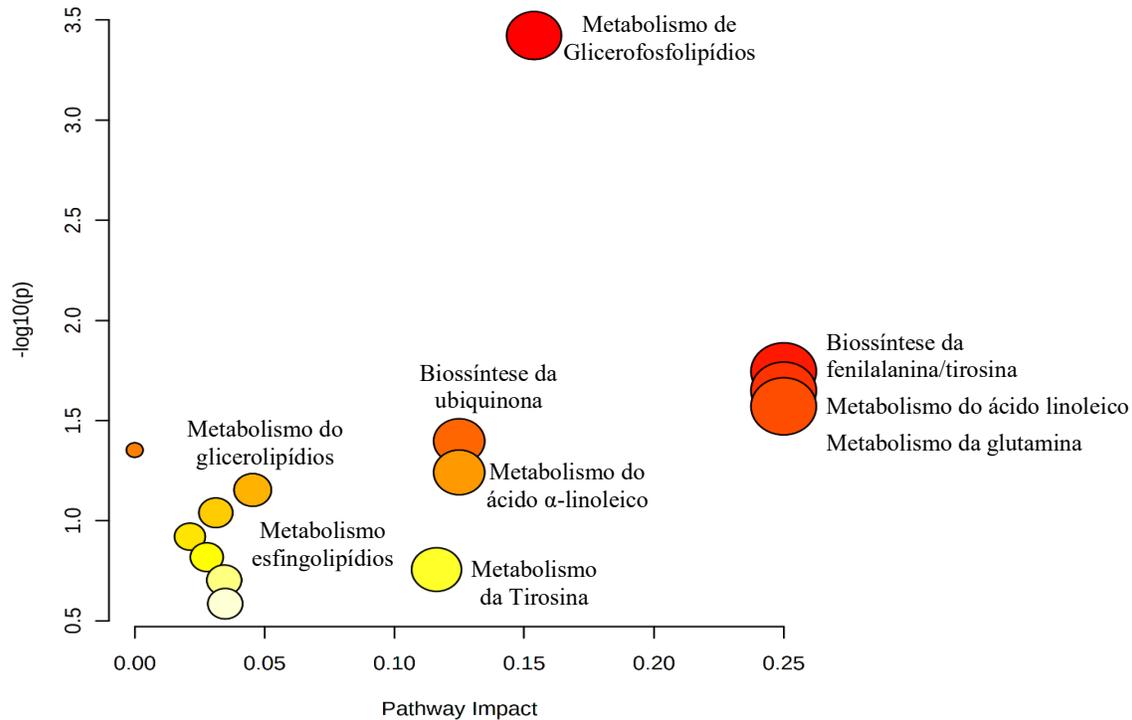
Uma avaliação interessante foi realizada por Van Meter e colaboradores (2018) sobre a influência da exposição a misturas de agrotóxicos no perfil metabolômico de rãs. Eles testaram três herbicidas, um inseticida e um fungicida triazólico, expondo os anfíbios a um único composto e a misturas destes. Eles observaram que os metabólitos e vias impactadas foram diferentes entre os tratamentos, indicando que os modos de ação dos xenobióticos podem mudar dependendo das interações químicas com os outros toxicantes. Entretanto, os autores relatam que, independentemente do modo de ação, alguns metabólitos comumente alterados por essas misturas foram aminoácidos, ácidos

nucleicos e lipídios, os quais são críticos para a síntese de proteínas, estrutura e replicação do DNA e como resposta ao estresse oxidativo. Resultados semelhantes foram observados em nosso estudo.

4.4.3.2 Análise das vias metabólicas afetadas pela exposição aos agrotóxicos a partir dos resultados da metabolômica de plasma por UPLC-QToF-MS

Após a identificação dos metabólitos discriminantes, buscou-se compreender as vias metabólicas envolvidas na resposta biológica gerada pela exposição aos agrotóxicos. Para isso, todas as variáveis responsáveis pela discriminação dos grupos exposto e controle, de acordo com o valor da pontuação VIP ($VIP > 1,5$; $\text{valor-p} < 0,05$), foram selecionadas e então submetidas à análise de via metabólicas, que foi conduzida utilizando o software MetaboAnalyst®. Os resultados estão representados no gráfico 7, o qual mostra todas as vias correspondentes de acordo com os valores de impacto da via e os valores-p da análise de enriquecimento de via. O tamanho do círculo representa o fator de influência e a cor, identifica a importância da via para a compreensão da resposta biológica. Portanto, os círculos maiores e vermelhos são considerados as vias mais importantes, ou seja, as mais influenciadas.

Gráfico 7 - Representação das vias metabólicas envolvidas na resposta biológica associada à exposição aos agrotóxicos.



Como mostrado no gráfico 7, as principais alterações foram encontradas nas vias metabólicas discriminadas abaixo:

A. Metabolismo dos glicerofosfolipídios e do ácido linoleico

Os lipídios são compostos orgânicos formados por cadeias de hidrocarbonetos que podem ser divididos em oito categorias, de acordo com a classificação proposta por LIPIDMAPS (<http://www.lipidmaps.org>). São elas: ácidos graxos, glicerolipídios, glicerofosfolipídios, esfingolipídios, lipídios esteróis, prenollipídios, sacarolipídios e policetídeos. Estudos em literatura relatam que esse grupo químico desempenha um papel importante nos sistemas vivos devido às suas funções biológicas e efeitos na saúde humana, como armazenamento de energia, estrutura da membrana celular, comunicação celular, regulação de processos biológicos e relação com doenças cardiovasculares e outras doenças crônicas. (PÉREZ-NAVARRO, *et al.*, 2019; NGUYEN, *et al.*, 2022).

Neste estudo, alterações nas classes de glicerolipídios, esfingolipídios e ácidos graxos foram identificadas e corroboradas por estudos encontrados em literatura.

Wang, et al. (2017) e Weng, et al. (2021), estudaram a toxicidade da exposição ao triazol epoxiconazol em *zebra-fish* e ambos relataram que os triazóis podem induzir um desequilíbrio da homeostase oxidativa, causando distúrbios no metabolismo energético, metabolismo lipídico e metabolismo de aminoácidos. Yang e colegas (2020) exploraram a associação entre a exposição materna a 37 agrotóxicos de classes diferentes e a duração da gestação em ratos. Pela análise metabolômica, os autores perceberam que a via mais afetada foi a do metabolismo de glicerolipídios e concluíram que essas alterações positivas estão relacionadas à exposição aos agrotóxicos.

Nguyen e colaboradores (2022) avaliaram a neurotoxicidade dos fungicidas estrobilurina, azoxistrobina e trifloxistrobina em células de neuroblastoma humano. Eles afirmaram que a concentração de alguns lipídios foi aumentada frente à exposição das células a esses toxicantes, quando comparadas ao grupo controle, como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, triglicerídeos, PI(14:1_16:0), ceramidas, carnitinas, dentre outros. Os autores complementam que esses compostos são componentes essenciais em células neuronais e mitocondriais e a expressão alterada desses lipídios pode estar relacionada à disfunção mitocondrial. Resultados semelhantes foram revelados pela metabolômica do presente estudo, como níveis aumentados de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol e fosfatidiletanolamina.

A diversidade estrutural desses glicerofosfolipídios desempenha um papel fundamental na fluidez e estabilidade das membranas. Estudos relatam que, devido ao aumento da demanda por constituintes da membrana, há elevação da síntese de fosfatidilcolina em células cancerígenas e tumores sólidos. Já sua redução foi observada em condições patológicas no fígado em humanos, incluindo insuficiência hepática. Com relação ao fosfatidilglicerol, concentrações elevadas dessa substância foram detectadas na síndrome coronariana aguda e podem estar ligadas à patogênese de doenças cardiovasculares. Quanto a fosfatidiletanolamina, pesquisas alegam que esses compostos podem estar relacionados a doenças vasculares e aumento da incidência de câncer, além de desempenhar um papel importante em outras doenças (JAVOID, et al., 2021; CHRISTIE, 2022; ROY, et al., 2022).

Wang, et al., (2021) realizaram análises integradas de lipidômica e metabolômica não direcionadas para verificar os efeitos dos agrotóxicos imidacloprida e acetamiprida em células neuronais. A análise de vias demonstrou que os metabolismos de glicerofosfolipídios e esfingolipídios foram as mais afetadas. Segundo os autores, mudanças na concentração de glicerofosfolipídios indicam transformações da composição e permeabilidade da membrana celular e que o aumento de fosfatidilcolina encontrada pode ter ocorrido por ruptura da composição do citoesqueleto e dos glicerofosfolipídios, causada pela entrada dos xenobióticos nas células, resultando em alterações na composição e no conteúdo das fosfatidilcolinas. Por outro lado, a exposição ao imidacloprida suprimiu a síntese de ácidos graxos.

Sanchez, *et al.* (2020) estudaram a neurotoxicidade dos triazóis, propiconazol e tebuconazol, na disfunção mitocondrial e na alteração do metabolismo lipídico em células humanas. De acordo com os autores, a neurotoxicidade pode ocorrer por diversos mecanismos, como estresse oxidativo e formação de radicais livres, comprometimento mitocondrial e apoptose. No estudo dirigido por eles, foi comprovado que os triazóis atuam nesses mecanismos e, como resposta biológica, alterações lipídicas são apontadas. Eles encontraram níveis alterados de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, além de identificarem novos lipídios que podem ser expressivos nas doenças neurodegenerativas.

Outra via metabólica alterada identificada neste estudo foi o metabolismo do ácido 9-12-octadecadienoico (ácido linoleico) e ácido 9-12-15-octadecatrienoico (ácido α -linolênico). Estes lipídios, denominados de ácidos graxos poliinsaturados, desempenham um papel importante na manutenção da membrana, transdução de sinal e propriedades antiinflamatórias, além de participarem da síntese da hemoglobina e da divisão celular. São responsáveis por modular a transmissão nos sistemas colinérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos e estão envolvidos no suporte neurotrófico e estresse oxidativo por meio da modulação da expressão de genes responsáveis por essas ações (MARTIN, *et al.*, 2006; MBIYDZENYUY, *et al.*, 2018).

O metabólito mais importante do ácido linoleico nos tecidos animais é o ácido araquidônico e várias famílias de eicosanóides são derivadas desse ácido, incluindo prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (CHRISTIE, 2022). Neste estudo, a

metabolômica do plasma mostrou aumento da prostaglandina E1 (PGE1) nos indivíduos ocupacionalmente expostos.

As prostaglandinas são prostanóides sintetizados a partir do ácido araquidônico por enzimas cicloxigenases (COX-1 e COX-2) e possuem funções homeostáticas essenciais na fisiologia renal, são potentes vasodilatadores, inibidores da agregação plaquetária, mas também estão implicados em muitas condições patológicas, como inflamação, doença cardiovascular e à iniciação da carcinogênese, representando o elo entre a inflamação e o câncer. Em condições normais, os níveis de prostanóides nas células são baixos, mas durante uma perturbação, a concentração destes podem ser alteradas (CHRISTIE, 2022; MENDES, *et al.*, 2022).

No estudo realizado por Yan e colaboradores (2021), o perfil metabólico sérico de indivíduos expostos a agrotóxicos foi avaliado por LC-MS. Dentre os resultados descritos pelos autores, foram observadas modificações em vias relacionadas à inflamação, incluindo metabolismo do ácido araquidônico e das prostaglandinas, que foram associadas à exposição aos xenobióticos. De acordo com os autores, o estresse oxidativo pode aumentar a produção de ácido araquidônico, um intermediário inflamatório que pode ser convertido em prostaglandinas. Pabst, *et al.*, (2017) realizaram lipidômica em pacientes com leucemia mieloide aguda e relataram alterações em um grande número de lipídios plasmáticos, dentre eles, os prostanóides. Os autores evidenciaram que os precursores do ácido araquidônico e seus metabólitos estão relacionados positivamente à gravidade e ao prognóstico da doença.

Tyurina e colaboradores (2015) realizaram uma análise por LC/MS de cardiolipinas no plasma de ratos expostos a inseticida. Dentre os resultados encontrados pelos autores, níveis aumentados de ácido araquidônico e ácido linoleico foram detectados e correlacionados com neuroinflamação e estresse oxidativo, causando neurodegeneração nos animais. Eles citam que esses achados podem contribuir para uma melhor compreensão da patogênese da doença de Parkinson e levar ao desenvolvimento de novos biomarcadores de disfunção mitocondrial.

Um outro estudo foi desenvolvido por Birch e colaboradores (2022), onde investigaram os efeitos de desregulação endócrina de agrotóxicos no influxo de cálcio em espermatozoides humanos. Eles verificaram que esses toxicantes podem interferir

na função do esperma humano por meio de efeitos no canal de Ca^{2+} induzidos, por exemplo, por aumento de PGE_1 , causando deficiências na capacitação, motilidade espermática e quimiotaxia em direção ao óvulo. Segundo os autores, os achados encontrados foram capazes de relacionar os efeitos da exposição a agrotóxicos com a fertilidade humana.

O metabolismo dos esfingolipídios foi outra via destacada como importante na exposição aos agrotóxicos, neste estudo. A esfingomielina apresentou menor concentração no plasma dos trabalhadores em relação ao grupo controle e a ceramida, níveis mais concentrados.

Os esfingolipídios estão fisiologicamente relacionados à regulação do crescimento celular, diferenciação e apoptose. Entre os tipos de esfingolipídios, as ceramidas são componentes estruturais da membrana e mensageiros secundários na sinalização celular (KURZ *et al.*, 2019; SANCHEZ, *et al.*, 2020).

Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por Weng, *et al.* (2021) ao estudarem a toxicidade da exposição ao triazol epoxiconazol em *zebra-fish*. Os autores acreditam que a ativação das enzimas responsáveis pela conversão da esfingomielina em ceramida (esfingomielinases), causada pela exposição, explica a diminuição do esfingolipídio.

Pabst, *et al.*, 2017 e Robinson, *et al.*, (2021) estudaram a relação entre espécies reativas de oxigênio (ROS) e o metaboloma em células de Leucemia Mieloide Aguda. Os autores detectaram níveis mais baixos de esfingolipídios no plasma desses indivíduos e, após uma análise global dos achados, concluíram que as ROS são importantes na regulação da síntese e/ou degradação de esfingolipídios.

Conforme evidenciado em literatura, o grupo dos lipídios estão envolvidos em vários processos biológicos como estresse oxidativo, inflamação, obesidade e desregulação endócrina. Muitos xenobióticos exercem seus efeitos tóxicos por meio de distúrbios nesses processos biológicos, portanto, a investigação de alterações no metabolismo lipídico torna-se uma estratégia importante para elucidar mecanismos de ação tóxica, além da possibilidade de se identificar novos biomarcadores de exposição a essas substâncias químicas (OGRETMEN, 2018; KURZ *et al.*, 2019; MATO *et al.*, 2019).

B. Biossíntese de fenilalanina/tirosina e Metabolismo da glutamina

Os aminoácidos são os blocos de construção do nosso organismo na forma de proteínas e complexos de proteínas e muitos metabólitos importantes, como neurotransmissores, purinas e pirimidinas, entre outros, são produtos do metabolismo celular de aminoácidos (GAO, et al., 2022). Neste estudo, alguns aminoácidos apresentaram-se alterados no grupo exposto em relação ao grupo controle. Por exemplo, a tirosina apresentou níveis reduzidos, enquanto o glutamato, níveis aumentados.

A alteração em relação à tirosina tem importância, pois esta é responsável por inúmeras funções no organismo, sendo precursora de vários neurotransmissores, como dopamina, noradrenalina, adrenalina e hormônios tireoidianos. Esse aminoácido é sintetizado a partir da hidroxilação da fenilalanina pela enzima fenilalanina hidroxilase. De acordo com estudos relatados em literatura, a biossíntese deficiente da tirosina, pode levar ao acúmulo de fenilalanina nos fluidos corporais e também à redução da produção de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina). Essas alterações de concentrações podem estar relacionadas à ocorrência de sintomas neurodegenerativos e neuropsicológicos, como mudanças na atividade motora, déficit de atenção e hiperatividade (DA SILVA, 2020; GAO, et al., 2022). Desta forma, a sua diminuição poderia promover estes efeitos na população exposta aos agrotóxicos.

Gao, et al., (2022) estudaram as alterações fisiológicas e bioquímicas causadas em larvas expostas ao inseticida Spinetoram por análises transcriptômicas e metabolômicas. Dentre as alterações encontradas no metabolismo dos aminoácidos, os autores citam diminuição da tirosina no grupo estudado, o que gerou, conseqüentemente, diminuição de dopamina, causando doença de Parkinson nos insetos expostos. Rodrigues e colaboradores (2022) também detectaram níveis de tirosina reduzidos pela exposição a agrotóxicos em células neuronais e correlacionaram alterações nos níveis de aminoácidos com condições neurodegenerativas em pacientes com Alzheimer.

Ch, *et al* (2019) analisaram o perfil metabólico de saliva e de urina de agricultores do sexo masculino expostos a agrotóxicos. Eles encontraram resultados semelhantes ao nosso estudo, como alterações nos níveis de aminoácidos e afirmaram que o estresse

oxidativo, devido à exposição a xenobióticos, causa distúrbios no metabolismo de aminoácidos e energia.

Yan, *et al* (2020) verificaram a hipótese de que a exposição a inseticidas neonicotinóides causa distúrbios do metabolismo de aminoácidos, acúmulo de lipídios e estresse oxidativo em camundongos. Pela avaliação da metabolômica não alvo, observaram aumentos significativos em alguns aminoácidos, como por exemplo, a fenilalanina, sugerindo que a biossíntese da tirosina foi perturbada. Além disso, eles alegam que o aumento de aminoácidos de cadeia ramificada e fenilalanina também induz o acúmulo de lipídios, o que foi consistente com o aumento de compostos lipídicos identificados por eles nos animais expostos aos neonicotinóides. Essa exposição aumentou também os níveis de glutamato, que está associado ao aumento das necessidades de energia. Esses resultados estão em consonância com os encontrados neste estudo.

Com relação à glutamina, esse aminoácido está envolvido na síntese de ácidos nucleicos, nucleotídeos, proteínas, entre outros. Seu metabolismo envolve duas enzimas, a glutamina sintase, relacionada à síntese da glutamina e a glutaminase, que atua na conversão desta em glutamato, sendo este último, um importante aminoácido no metabolismo celular que pode ser convertido em ácido gama-aminobutírico (GABA), glicose, ureia, síntese de outros aminoácidos ou glutatona. Estudos afirmam que a captação de glutamato regulada negativamente pode contribuir para o acúmulo de glutamato na fenda sináptica, provocando um processo neurodegenerativo, chamado excitotoxicidade (CRUZAT, PETRY, TIRAPEGUI, 2009; RODRIGUES, *et al.*, 2022).

Alterações induzidas pela exposição a agrotóxicos no metaboloma cerebral foram estudadas por Rodrigues, *et al* (2022). Nessa revisão, eles relatam que foram observados desvios no nível dos metabólitos relacionados a várias vias metabólicas, dentre elas, o metabolismo energético, disfunção mitocondrial, metabolismo lipídico e de aminoácidos. Houve aumento nos níveis de glutamina e glutamato no cérebro, afetando a via que é considerada a principal reguladora dos níveis de glutamato. Wang, *et al.* (2017) e Bonvallot, *et al.*, 2018 também encontraram resultados semelhantes a estes, em *zebra-fish* exposto à epoxiconazol e em um grupo de ratas grávidas expostas a mistura de agrotóxicos, respectivamente.

Cattani e colaboradores (2017) investigaram os efeitos da exposição ao glifosato sobre alguns parâmetros neuroquímicos e comportamentais em ratos. Os resultados mostraram que a exposição a esse agrotóxico causou estresse oxidativo, além de afetar a neurotransmissão colinérgica e glutaminérgica no hipocampo dos animais. Os autores concluem que a neurotoxicidade induzida pelo glifosato após exposição envolve o fenômeno de excitotoxicidade do glutamato, devido ao aumento da liberação de glutamato na fenda sináptica, menor captação deste por interação do glifosato com receptores, levando ao aumento do fluxo iônico de Ca^{2+} para as células do hipocampo. Esses eventos culminam em estresse oxidativo, disfunção astrocítica e comportamento depressivo.

C. Biossíntese da ubiquinona

A ubiquinona ou coenzima Q é um lipídio ubíquo que está relacionado ao transporte de elétrons e à fosforilação oxidativa. A biossíntese desse composto é um processo multienzimático envolvendo vários precursores e, em mamíferos, o grupo ligado à ubiquinona é derivado do aminoácido essencial fenilalanina, que é convertido em tirosina e, posteriormente, 4-hidroxibenzoato (PAYET, *et al.*, 2016; STEFELY, PAGLIARINI, 2017; VUJIĆ, *et al.*, 2021). Neste estudo, a alteração metabólica desta via foi evidenciada pela diminuição de tirosina no plasma dos trabalhadores.

Payet e colaboradores (2016) avaliaram as etapas iniciais na via de biossíntese da ubiquinona em leveduras. Os autores combinaram técnicas como marcação isotópica, suplementação de análogo químico e genética para identificar enzimas associadas à via metabólica da tirosina e afirmaram que o aumento de tirosina em cultura de células, elevou o nível de ubiquinona, concluindo que este aminoácido é utilizado como precursor da coenzima Q e que suas concentrações são diretamente proporcionais.

Um estudo desenvolvido por Vujić, *et al.* (2021) verificou vias de assinatura de toxicidade em células endoteliais de cérebro humano expostas ao herbicida Paraquat. A análise das vias metabólicas, destacou o metabolismo da ubiquinona, como a via com maior significância. Segundo os autores, os resultados obtidos sugeriram que o herbicida estudado modula mecanismos como estresse oxidativo e vias relacionadas à hipóxia em

células endoteliais. Mencionam ainda que o Paraquat é um indutor de estresse oxidativo que inibe os complexos da cadeia respiratória nas mitocôndrias, especialmente o complexo I, que está diretamente relacionado ao metabolismo da ubiquinona.

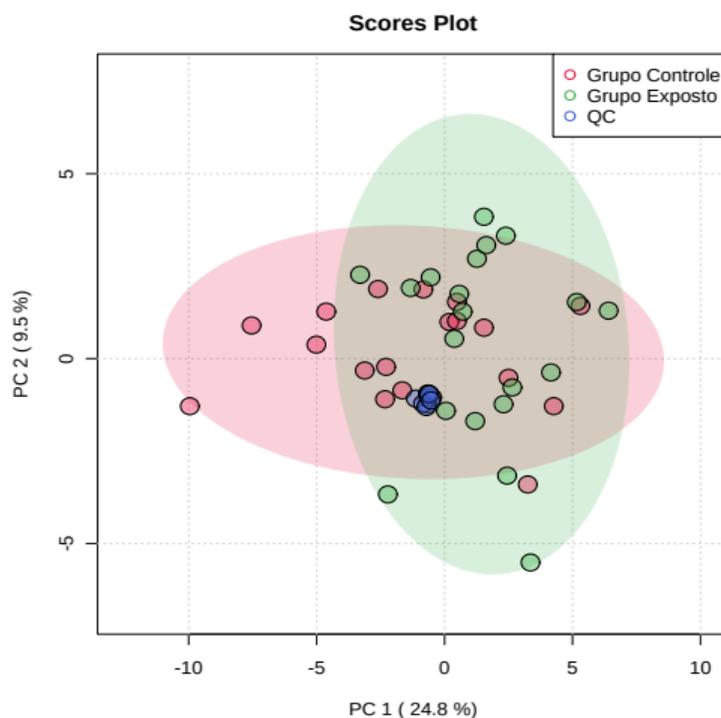
Park, et al. (2022) estudaram a alteração metabolômica intracelular do inseticida carbofurano, utilizando a metabolômica não direcionada por LC-MS. Eles observaram alterações no metabolismo de aminoácidos, de nucleosídeos (purina e pirimidina) e biossíntese de ubiquinona. As vias metabólicas relacionadas à produção de 4-hidroxibenzoato e biossíntese de ubiquinona mostraram diferenças significativas entre os dois grupos estudados e concluíram que essas alterações provavelmente estão relacionadas à resposta ao estresse oxidativo induzida pelo carbofurano. Considerando os resultados do estudo, os autores evidenciaram a importância da metabolômica não direcionada como uma boa estratégia para identificar alterações intracelulares após a exposição a xenobióticos.

A análise metabolômica do plasma da população deste estudo demonstrou que vários metabólitos foram significativamente modulados pela exposição aos agrotóxicos. As alterações metabólicas observadas estão condizentes com os estudos encontrados em literatura e podem estar associadas ao comprometimento da função da membrana, estresse oxidativo, inflamação, disfunção mitocondrial e desregulação endócrina.

4.4.4 Análise metabolômica de urina por UPLC-QToF-MS

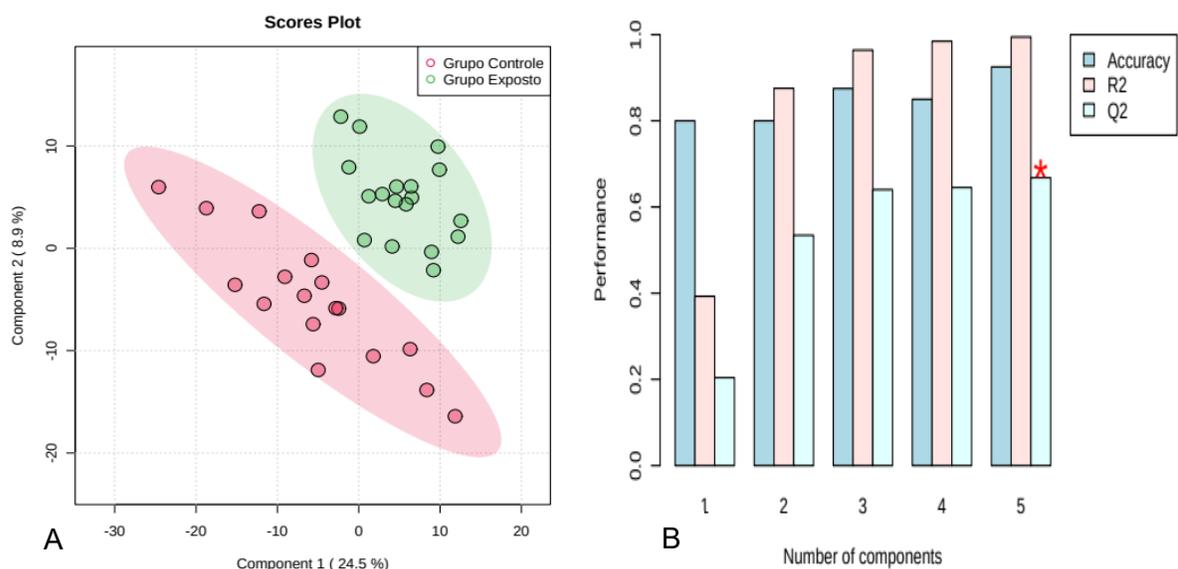
As amostras de urina foram preparadas conforme metodologia de preparo de amostras previamente descrita e foram analisadas nas mesmas condições analíticas, de forma randomizada, com amostras de QC intercaladas a cada 5 amostras de urina. Após etapa de processamento (deconvolução, agrupamento e alinhamento), os dados foram normalizados pela creatinina urinária, procedimento recomendado para corrigir o efeito de diluições variáveis em amostras pontuais (KHODADADI, POURFARZAM, 2020). Em sequência, foram submetidos às técnicas de análises multivariadas. Inicialmente, a análise de componentes principais (PCA) foi aplicada a todas as amostras, incluindo os QCs, para avaliar uma possível separação entre os grupos de indivíduos expostos ocupacionalmente e não ocupacionalmente aos agrotóxicos. O modelo desenvolvido está representado no Gráfico 8 e nos mostra uma fraca separação entre os grupos, mas um rigoroso agrupamento dos QCs, revelando estabilidade analítica e boa qualidade dos dados adquiridos.

Gráfico 8 – Modelo de PCA das amostras de urina de trabalhadores expostos ocupacionalmente e não ocupacionalmente aos agrotóxicos e amostras de controle de qualidade (QCs).



Posteriormente, os dados foram analisados pelo método multivariado supervisionado PLS-DA. Os resultados das amostras de QC foram retirados e nova normalização foi realizada. O gráfico 9 mostra que houve uma melhor separação entre os grupos.

Gráfico 9 – Modelo PLS-DA construído para as amostras de urina dos indivíduos expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos

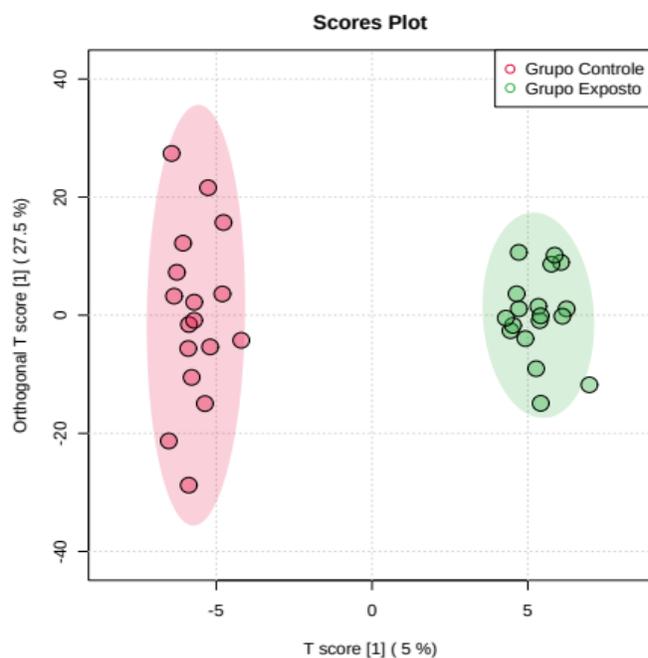


Legenda: **A**= Modelo PLS-DA desenvolvido para amostras de urina dos voluntários desse estudo, analisadas por LC-MS, **B**= Validação do modelo PLS-DA pelo teste de validação cruzada, com parâmetros de qualidade obtidos $R^2 = 0,99$ (variação explicada pelo modelo) e $Q^2 = 0,68$ (previsibilidade do modelo).

O modelo PLS-DA construído apresentou um bom desempenho, com variação explicada pelo modelo (R^2) de 0,99 e capacidade preditiva (Q^2) de 0,68, para 5 componentes principais. Como citado anteriormente, $R^2 > 0,7$ e $Q^2 > 0,4$ são aceitáveis para experimentos biológicos (GODZIEN, *et al.*, 2013).

Em seguida, o modelo de OPLS-DA foi aplicado e o resultado é apresentado no gráfico 10. Por este modelo, os gráficos construídos conferem melhor visualização da separação entre as amostras, mas neste estudo, poucos metabólitos discriminantes com valores significativos foram encontrados (correlação e covariância $> 0,8$). Por isso, optou-se por utilizar os valores VIP obtidos na análise por PLS-DA.

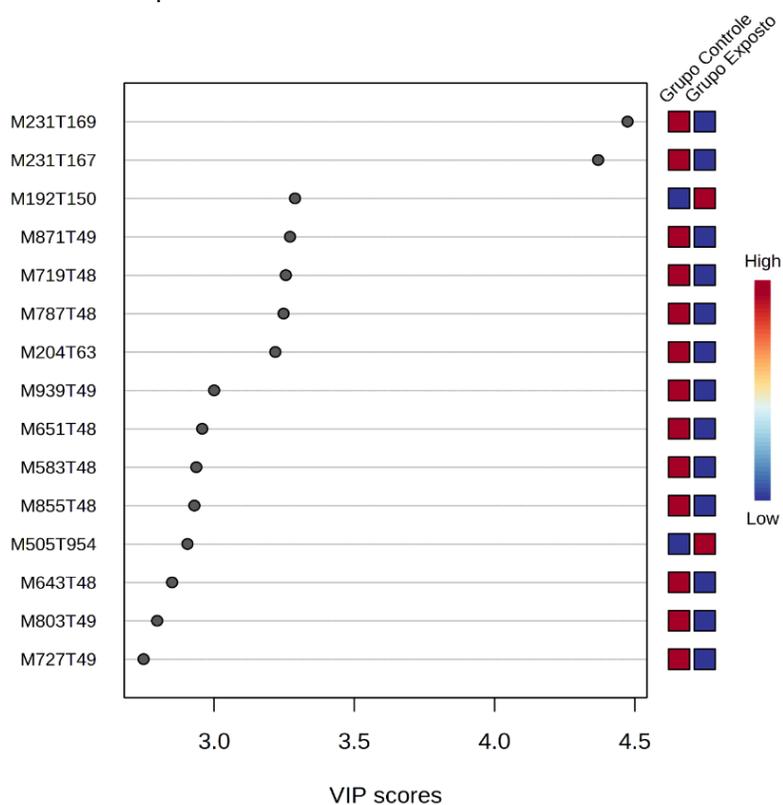
Gráfico 10 - Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA) para amostras de urina dos indivíduos participantes do estudo.



4.4.4.1 Identificação das entidades moleculares discriminadoras resultantes da análise metabolômica de urina por UPLC-QToF-MS

Os critérios utilizados para análise das amostras de urina por LC-MS foram os mesmos aplicados às amostras de plasma ($VIP > 1,5$; $fold\ change > 2,0$; $valor-p < 0,05$, $FDR < 0,01$).

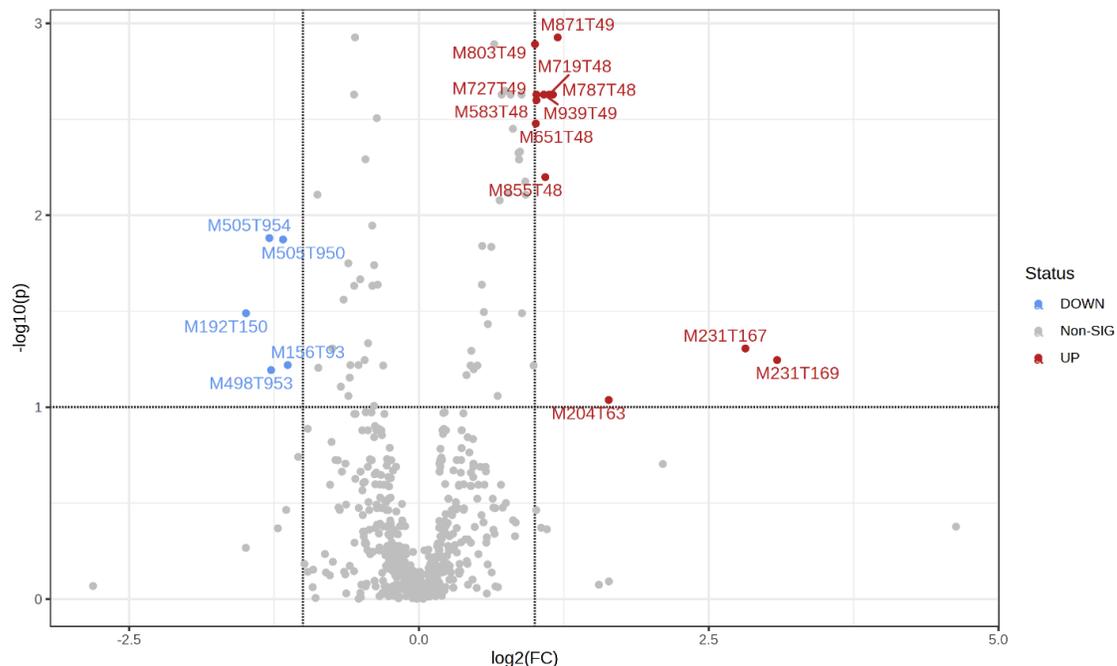
Os *molecular features* que atenderam a esses critérios foram selecionados e os 15 mais importantes na discriminação dos grupos estão representados no Gráfico 11. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas do metabólito correspondente em cada grupo em estudo.

Gráfico 11 - Valores VIP de quinze *features* discriminadores identificados no modelo de PLS-DA.

Legenda: VIP (Importância da variável na projeção) dos *molecular features* identificados por UPLC-QToF-MS, para amostras de urina processadas nas mesmas condições analíticas.

Com base na análise realizada pelo *Volcano plot*, foram encontrados 05 *molecular features* com resultados mais baixos e 12 mais elevados ao se comparar o grupo controle em relação ao exposto, conforme demonstrado no gráfico 12.

Gráfico 12 – *Volcano Plot* aplicado aos dados das amostras de urina de indivíduos expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos.



Legenda: Cada ponto no gráfico representa um *molecular feature*. Os pontos vermelhos indicam aumento destes e os pontos azuis, diminuição dos mesmos. Os pontos cinzas representam a não distinção entre os grupos.

A identidade destes metabólitos foi então buscada nas bases de dados HMDB[®], Metlin[®] e Lipidmaps[®], considerando um erro de massa de até 5 ppm. Dois *features* não foram identificados pelos bancos de dados. A Tabela 11 mostra os dados compilados dessa avaliação e da possível identificação das substâncias.

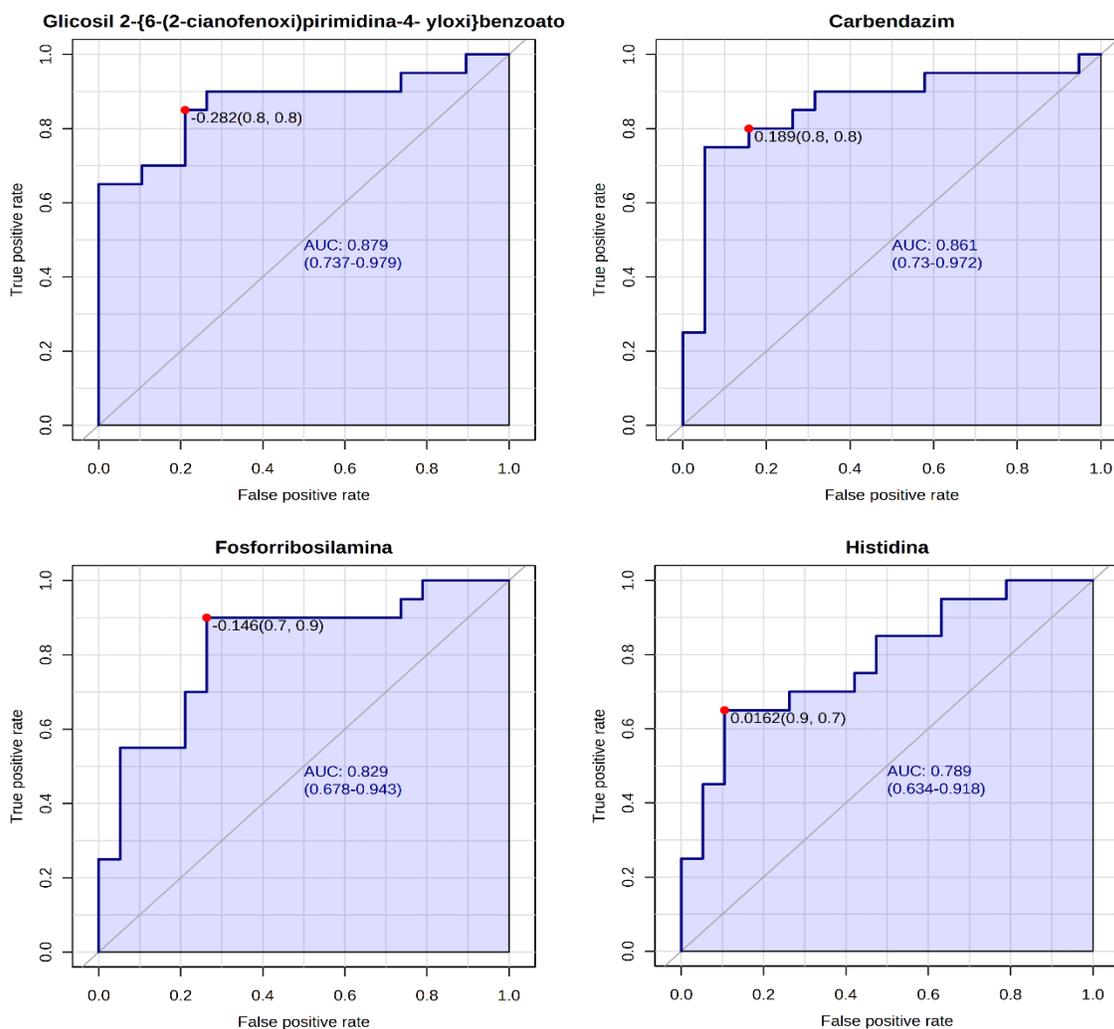
Tabela 11 - Metabólitos discriminadores putativamente identificados na análise metabolômica das amostras de urina de trabalhadores expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos, por UPLC-MS.

Composto	m/z	Pontuação VIP	Fold change (log2)	valor-p	Classificação química
Fosforribosilamina	229.035	4.4742	2.8165	0.006	Pentose fosfato
Carbendazim	191,187	3.2886	-1.4924	0.003	Benzimidazol
Triacilglicerol	852.757	3.2706	1.1967	0.000	Glicerolípídios
1-Palmityl-2-palmitoleoyl-glicero-3-fosfocolina	717.567	3.2557	1.1233	0.000	Glicerolípídios
PE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	783.483	3.2477	1.1553	0.000	Glicerolípideos
N-Acetilgalactosamina	221.208	3.2183	1.637	0.045	Carboidratos
TG(10:0/10:0/10:0)	919.767	3.0001	1.0771	0.001	Glicerolípídios
SM(d18:1/12:0)	646.504	2.9576	1.0084	0.002	Esfingolipídios
Ácido UDP-D-galacturônico	581.034	2.9366	1.0137	0.002	Nucleotídio pirimidina
TG(15:0/18:0/O-18:0)	834.804	29.296	1.0899	0.002	Glicerolípídios
Glicosil 2-{6-(2-cianofenoxi)pirimidina-4-yloxi}benzoato	495.127	2.9051	-1.291	0.002	Benzenoide
Difosfoinositol tetrafosfato	819.794	2.797	1.0012	0.000	Fosfato inositol
PE(18:3(6Z,9Z,12Z)/P-18:0)	725.535	2.7486	1.0137	0.001	Glicerolípídios
Ácido micofenólico glicuronídeo	496.158	2.4476	-1.276	0.032	Carboidratos
L-Histidina	155.069	2.139	-1.1325	0.014	Aminoácidos, peptideos e análogos

Uma análise exploratória também foi realizada na matriz de dados obtida para plasma e urina por UPLC-MS, em busca de compostos relacionados aos agrotóxicos utilizados neste estudo. As seguintes substâncias foram detectadas: glifosato (m/z 169.097), piroclostrobinina (m/z 386.924), epoxiconazol (m/z 329.323), tebuconazol (m/z 307.189) e compostos da classe dos triazóis, como por exemplo, 1,2,3-triazole (m/z 238.066) e 1,2,4-triazole (m/z 146.037). Esses achados são importantes para confirmar a confiabilidade dos resultados obtidos.

Com a finalidade de verificar o desempenho dos metabólitos selecionados como possíveis biomarcadores, a curva ROC foi utilizada. O resultado de alguns compostos é mostrado na Figura 18.

Figura 18 - Curvas ROC de alguns analitos urinários discriminantes identificados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.



Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: AUC: área sob a curva ROC, com intervalo de confiança de 95%.

Baseado nesses resultados, apenas os compostos glicosil 2-{6-(2-cianofenoxi)pirimidina-4-yloxi}benzoato e carbendazim apresentaram $AUC > 0,85$. O primeiro composto é um metabólito da azoxistrobina, fungicida também descrito na relação de substâncias utilizadas pelo nosso grupo exposto. Já o carbendazim, apesar

de não estar na lista de produtos aplicados, apresentou níveis elevados nos trabalhadores.

A azoxistrobina e outras substâncias da classe das estrobilurinas inibem a respiração mitocondrial bloqueando o transporte de elétrons. Elas se conectam ao local de ligação do quinol do complexo citocromo b-c1, onde a ubiquinona (coenzima Q10) normalmente se ligaria ao transportar elétrons para essa proteína. Vários estudos em animais relataram que esse composto tem o potencial de toxicidade e neurotoxicidade no desenvolvimento, pode estar associado ao autismo, envelhecimento cerebral, neurodegeneração, apoptose e estresse oxidativo (FENG, *et al.*, 2020; Hu, *et al.*, 2022).

Mesnage e colaboradores (2021) investigaram perturbações metabólicas em ratos por UPLC-MS, causadas por uma mistura de seis agrotóxicos, dentre eles a azoxistrobina, para obter informações sobre os mecanismos de toxicidade que poderiam atuar como marcadores bioquímicos precoces de efeitos nocivos crônicos. Os autores encontraram níveis aumentados de alguns aminoácidos no grupo exposto à mistura dos xenobióticos, além de níveis diminuídos de glicerolipídios, resultados que estão de acordo com os nossos achados. Eles concluíram que houve um estresse oxidativo resultante da exposição à mistura de agrotóxicos. Além disso, afirmam que as abordagens transcriptômicas e metabolômicas para procedimentos de avaliação de risco podem resultar em maior sensibilidade, precisão e previsibilidade dos resultados, com implicações positivas para a saúde pública.

Bauer, *et al.* (2018), realizaram uma triagem por UPLC-QTOF-MS, para identificação e caracterização de metabólitos dos agrotóxicos tiacloprida, azoxistrobina e difenoconazol em cultura de plantas e alimentos. Eles abordaram as vias de degradação destes xenobióticos durante um estudo cinético, além da degradação dos compostos originais. Dentre os resultados obtidos, um dos metabólitos detectados foi o glicosil 2-{6-(2-cianofenoxi)pirimidina-4-yloxi}benzoato. Os autores mencionaram que os metabólitos encontrados no estudo, geralmente não são detectados em análises de rotina, pois normalmente estas incluem apenas metabólitos e os compostos ativos já predefinidos. Eles declararam que o método desenvolvido forneceu novas e importantes informações sobre a presença e distribuição de compostos relacionados ao metabolismo dos xenobióticos.

Outro composto que apresentou performance discriminante foi o carbendazim, um fungicida de amplo espectro, que possui atividade sistêmica de inibição da formação de microtúbulos mitóticos durante a mitose, afetando o crescimento e a divisão dos esporos. Segundo dados da literatura, esse composto é conhecido por manifestar embriotoxicidade, apoptose de células germinativas, teratogênese e infertilidade em diferentes espécies de mamíferos. É considerado agente mutagênico, carcinogênico e tóxico para o desenvolvimento e reprodução (SINGH, *et al.*, 2016; TURRELLA, 2020).

Chen e colaboradores (2021) utilizaram a análise metabolômica por UPLC-MS para compreender os efeitos do carbendazim no metabolismo cerebral das abelhas. Os autores encontraram, entre os compostos regulados positivamente, o carbendazim como um dos mais abundantes. Além disso, detectaram glicerolipídios com níveis diminuídos nas abelhas expostas ao xenobiótico. Segundo os autores, as vias metabólicas afetadas incluíram alterações no metabolismo de aminoácidos, metabolismo lipídico, metabolismo energético e biossíntese da ubiquinona. Estes resultados estão de acordo com os encontrados em nosso estudo, onde o carbendazim foi detectado com níveis elevados e os glicerofosfolipídios com concentrações diminuídas nas amostras do grupo exposto, além de apresentar alterações em vias metabólicas semelhantes.

Yang, et al. (2021) estudaram os riscos da exposição de clorotalonil, carbendazim, procloraz e suas misturas em *zebra-fish* embrionários e larvais com base na análise metabolômica por LC-MS. Os autores detectaram 26 metabólitos alterados, que foram associados principalmente às vias de glicólise, aminoácidos e metabolismo lipídico. Segundo eles, os aminoácidos e a glicose desempenham papéis importantes no desenvolvimento embrionário do *zebra-fish*, portanto a análise metabolômica forneceu algumas informações importantes para a compreensão do pressuposto mecanismo dos três fungicidas estudados em organismos aquáticos.

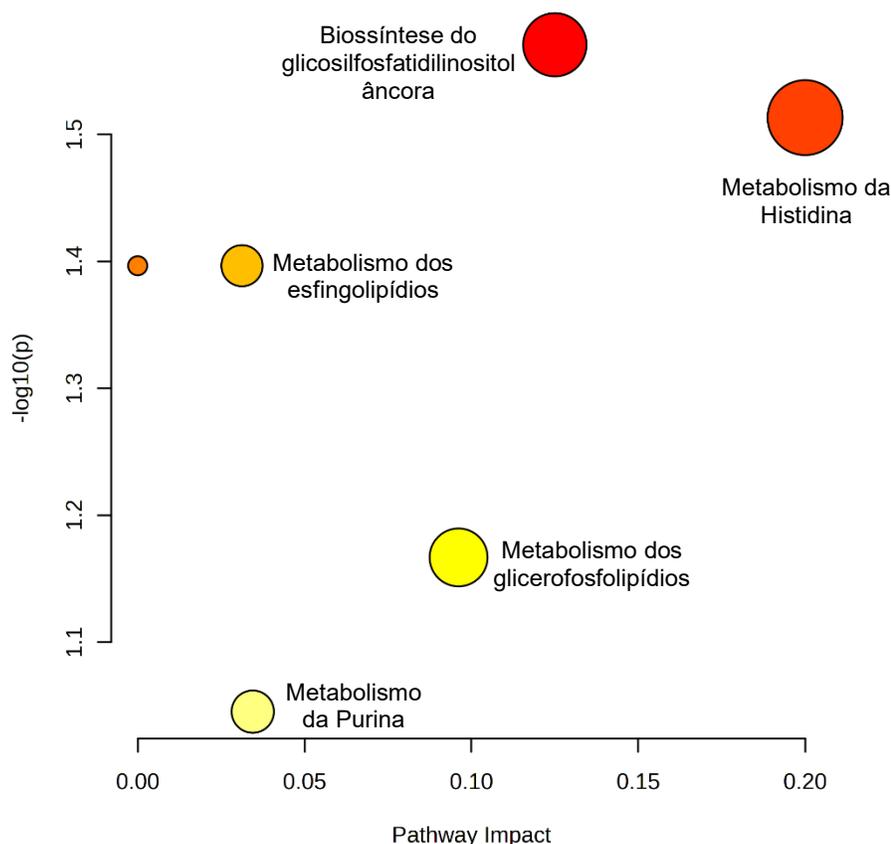
Apesar do desempenho insatisfatório dos outros metabólitos como possíveis compostos discriminantes, evidenciado pela análise pela curva ROC, eles são também importantes para compreender os distúrbios metabólicos induzidos pela exposição aos xenobióticos.

4.4.4.2 Análise das vias metabólicas afetadas pela exposição aos agrotóxicos a partir dos resultados da metabolômica de urina por UPLC-QToF-MS

Na busca pela compreensão das vias metabólicas envolvidas na resposta biológica gerada pela exposição aos agrotóxicos, as variáveis identificadas e responsáveis pela discriminação dos grupos exposto e controle foram selecionadas e então submetidas à análise de via metabólicas, pelo software MetaboAnalyst®.

Todas as vias correspondentes de acordo com os valores de impacto e os valores-p da análise de enriquecimento de via estão representadas no gráfico 13. Os círculos maiores e vermelhos são considerados as vias mais influenciadas.

Gráfico 13 - Representação das vias metabólicas envolvidas na resposta biológica associada à exposição aos agrotóxicos.



De acordo com o mostrado no gráfico 13, as principais alterações foram encontradas nas vias metabólicas discriminadas abaixo:

A. Biossíntese do glicosilfosfatidilinositol-âncora

Glicosilfosfatidilinosítois (GPI) são estruturas de glicofosfolípidos que atuam como âncoras de membrana de muitas proteínas da superfície celular e são essenciais para a viabilidade celular. A âncora GPI é composta por um grupo inositol e glicosamina, manose e um grupo fosfoetanolamina, que é o ponto onde ocorre a ligação da âncora com a proteína. Proteínas e glicoproteínas ancoradas por GPI desempenham um papel essencial em muitos processos biológicos, como reconhecimento, ativação e interação celular, reação enzimática da superfície celular, embriogênese, fertilização, infecção bacteriana e viral (SWARTS, GUO, 2012; BEIHAMMER, *et al.*, 2018; WU, *et al.*, 2020)

Segundo a literatura, os glicosilfosfatidilinosítois podem ser clivados por fosfolipases específicas e a proteína pode ser liberada. Quando a biossíntese do GPI é defeituosa, essas enzimas podem não funcionar corretamente. Estudos sobre a regulação da síntese de fosfolípidios tem se concentrado na regulação de genes estruturais em resposta aos precursores lipídicos, inositol e colina. Variantes em genes específicos são responsáveis por defeitos na biossíntese de glicosilfosfatidilinosítois e estão associados a diversas manifestações clínicas, incluindo atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, convulsões e diversas anomalias congênitas (GARDOCKI, JANI, LOPES, 2005; WU, *et al.*, 2020).

No presente estudo, realizado em urina de indivíduos expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos, os glicerolipídios, de uma forma geral, apresentaram níveis mais baixos no grupo exposto, em relação ao grupo controle, mas a biossíntese do glicosilfosfatidilinosítois foi alterada, principalmente, pela redução das fosfoetanolaminas.

Szewczyk e colaboradores (2020) utilizaram estudos metabolômicos para compreender a influência dos xenobióticos no organismo fúngico pela exposição ao herbicida atrazina. Eles observaram que houve um aumento da perturbação da membrana, causando maior fluidez na mesma, provavelmente, pela diminuição das

fosfoetanolaminas. Além disso, os autores citam que fosfolipídios contendo inositol, servem como precursores para a síntese de fosfoinositídeos e polifosfatos de inositol e estão envolvidos no processo de ancoragem de proteínas da membrana plasmática. Eles acreditam que um nível reduzido de inositol indica menor viabilidade celular. Com a análise de todos os resultados obtidos, eles revelaram que a presença de atrazina na cultura fúngica induziu estresse oxidativo, perturbações do metabolismo de aminoácidos e lipídios e causou um aumento na fluidez da membrana.

Bernat, et al. (2018) verificaram a resposta de uma cepa fúngica ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético, com relação ao metaboloma, à fluidez da membrana e ao estresse oxidativo. Os autores observaram que, na presença do composto tóxico, houve aumentos de até 3 vezes na permeabilidade da membrana, quando comparado ao grupo controle, indicando influência significativa do composto neste local e explicaram que a membrana pode ser um potencial alvo para a ação desse xenobiótico, devido a sua lipofilicidade. Com esse estudo, os autores demonstraram que o herbicida alterou as concentrações gerais de aminoácidos, os perfis de ácidos graxos e lipídios, além de perturbar a homeostase da membrana das células fúngicas.

Com relação às vias metabólicas dos esfingolipídios e glicerolipídios, classes já contextualizadas no item 4.4.3.2, foram apontadas como alteradas negativamente nas amostras de urina dos indivíduos expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos.

B. Metabolismo da Histidina

A histidina é um aminoácido que possui diversos papéis na função celular. Está envolvida na biossíntese de bases purinérgicas, desempenha papel estrutural e catalítico em muitas enzimas e possui importantes funções anti-inflamatórias, antioxidantes e anti-secretoras no organismo. A histidina, pela ação da enzima histidina descarboxilase, é convertida em histamina, um potente mediador de numerosas reações fisiológicas. A histamina é considerada um neurotransmissor com diferentes funções em vários distúrbios do sistema nervoso central, incluindo insônia, doença de Parkinson, esquizofrenia, doença de Alzheimer e isquemia cerebral (BROSNAN, BROSNAN, 2020; ACUÑA, *et al.*, 2021).

Liu, *et al.* (2021), estudaram distúrbios metabólicos em camundongos que foram expostos a resíduos dos agrotóxicos comuns na dieta (clorfenapir e acetamiprida), utilizando a metabolômica global. Eles observaram, que o grupo exposto apresentou, dentre outras alterações, teores diminuídos de histamina, resultando no acúmulo de histidina no organismo. Com a análise de todos os resultados, eles concluíram que, a exposição a xenobióticos, mesmo em baixas concentrações, causaram alterações significativas no perfil metabólico dos indivíduos e que os resíduos de agrotóxicos na dieta causam influências subestimadas à saúde do organismo.

No estudo realizado por Yan e colaboradores (2021), o perfil metabólico de indivíduos expostos a agrotóxicos foi avaliado por LC-MS. Eles encontraram distúrbios nas vias metabólicas relacionadas ao estresse oxidativo, inflamação, metabolismo de lipídios e ácidos graxos, metabolismo energético mitocondrial e precursores de neurotransmissores. Dentre os resultados descritos, foram observadas modificações no metabolismo da histidina e os autores associaram essas alterações à inflamação e ao estresse oxidativo. Eles afirmam que os xenobióticos podem exercer influências também às vias relacionadas à inflamação.

C. Metabolismo das purinas

Dentre as vias metabólicas influenciadas pela exposição aos agrotóxicos, o metabolismo das purinas também foi apontado, onde níveis mais baixos de fosforribosilamina foram encontrados nos indivíduos do grupo exposto.

As purinas são bases nitrogenadas que, além de serem utilizadas na síntese de DNA e RNA, são componentes importantes de várias biomoléculas, como o ATP, GTP, AMPc, NADH e Coenzima A. Segundo a literatura, a biossíntese de purina requer dez transformações enzimáticas para gerar monofosfato de inosina e a primeira etapa envolve a fosforribosilamina, formada a partir da conversão do 5-fosforibosil pirofosfato pela amido-fosforibosil-transferase. A fosforribosilamina é um derivado de carboidrato pertencente à classe de compostos orgânicos conhecidos como pentoses fosfato. A desregulação da biossíntese da purina tem sido associada a câncer, gota, neuropatologias e distúrbios imunológicos (MALKOWSKI, *et al.*, 2020; PAREEK,

PEDLEY, BENKOVIC, 2021). Segundo McCune, *et al.* (2018), o monofosfato de inosina gerado na síntese das purinas contribui para a produção de vários intermediários, como AMP, GMP, adenosina e inosina. A diminuição da sua produção leva a uma inibição, por *feedback* negativo, de 5-fosforibosil pirofosfato e impede a ativação, por exemplo, de células T, reduzindo a ação do sistema imunológico.

Zhang e colaboradores (2022) desenvolveram um método metabolômico não direcionado para investigar o mecanismo de toxicidade enantiosseletiva do inseticida dinotefurano em abelhas. Eles observaram que a via mais perturbada foi a do metabolismo das purinas, associada ao fornecimento de energia, e aprofundaram o estudo dos efeitos desse toxicante em metabólitos relacionados à purina. Eles encontraram 17 compostos regulados positivamente e 11 regulados negativamente no grupo tratado com dinotefurano. Dentre os metabólitos com níveis reduzidos, estão o monofosfato de guanosina e monofosfato de inosina, indicando alterações nas primeiras etapas da síntese da purina. Analisando todos os resultados obtidos no estudo, foi indicado que a maior toxicidade do agrotóxico está relacionada ao distúrbio da via metabólica das purinas e ao seu papel inibitório no metabolismo energético, concluindo que esse xenobiótico pode colocar em risco a existência de abelhas ao interromper o metabolismo energético.

Kislitskaya, *et al.*, (2015) analisaram distúrbios de enzimas antioxidantes e metabolismo de purinas na ejaculação de homens expostos a agrotóxicos e poluentes atmosféricos. Os autores alegam que essa exposição causa distúrbios no equilíbrio da peroxidação lipídica e da atividade antioxidante, ativando formação de radicais livres nas células germinativas masculinas, o que leva ao aumento dos níveis de estresse oxidativo e à diminuição do metabolismo das purinas. Eles concluem que essas alterações podem interferir na diferenciação morfológica e no movimento dos espermatozoides.

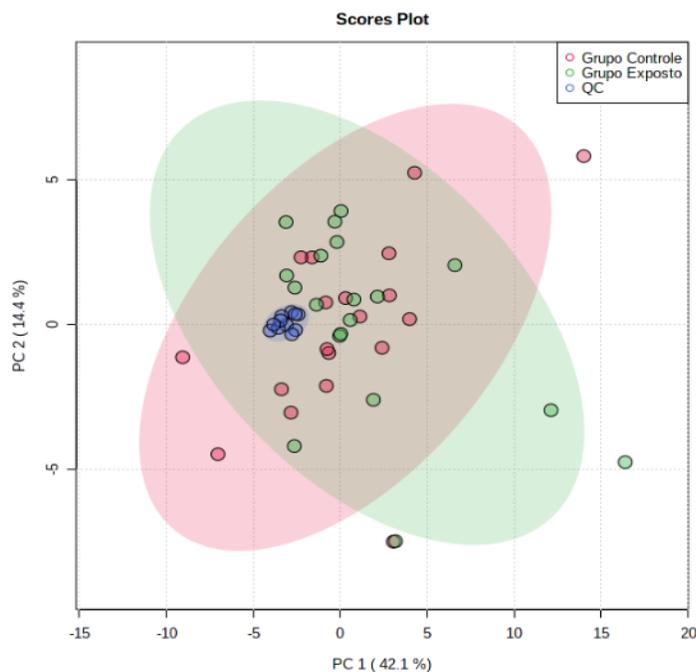
De um modo geral, verificando todos os resultados da análise de vias deste estudo, podemos inferir que a exposição aos agrotóxicos produz toxicidade por meio de múltiplos mecanismos, principalmente por estresse oxidativo, reações inflamatórias, alterações de membranas, disfunção mitocondrial. Pode-se observar também que as vias afetadas estão diretamente relacionadas aos efeitos tóxicos relatados pelos

participantes dessa pesquisa (descritos no item 3.4.1), como doenças respiratórias, endócrinas, ansiedade, fadiga, irritabilidade, depressão, dentre outros.

4.4.5 Análise metabolômica de urina por GC-MS

As amostras de urina foram preparadas conforme método descrito no item 4.3.3.2, e analisadas nas mesmas condições analíticas, aleatoriamente, com amostras de QC intercaladas a cada 5 amostras. Após o pré-processamento dos dados, a análise de PCA foi realizada, com predição das amostras de controle de qualidade (QC). O modelo desenvolvido é mostrado no gráfico 14.

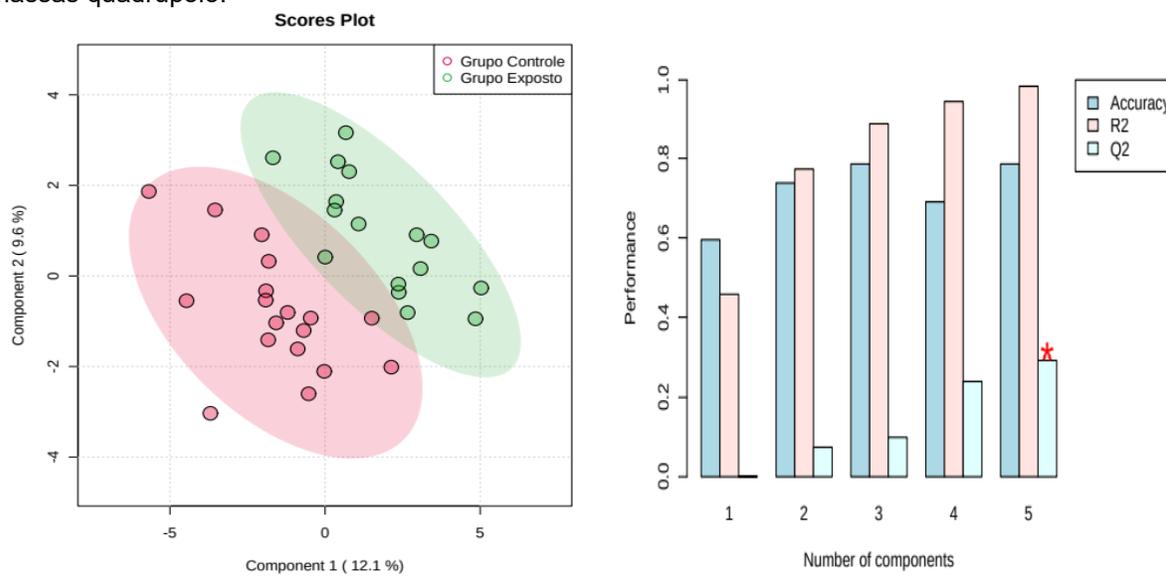
Gráfico 14 – Modelo da Análise por Componentes Principais para as amostras de urina, analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas



Nota-se que não houve uma boa separação entre os grupos por esse modelo não supervisionado. Já as amostras de controle de qualidade (QC) estão bem agrupadas no *plot*, indicando conformidade no procedimento analítico. Os dados foram novamente processados, sem os resultados das amostras de QC e a análise pelo método

supervisionado - PLS-DA - foi realizada. O resultado do processamento dos dados está demonstrado no gráfico 15.

Gráfico 15 - Modelo PLS-DA construído para as amostras de urina dos indivíduos expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos, analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas quadrupolo.



Nota: **A**: modelo PLS-DA para amostras de urina dos indivíduos, analisadas por GC-MS. **B**: validação do modelo PLS-DA pelo teste de validação cruzada, obtendo os parâmetros. $R^2=0,98$ e $Q^2=0,29$.

Pode-se observar que não houve uma separação clara em função dos grupos e o parâmetro de previsibilidade do modelo foi insatisfatório ($Q^2=0,29$).

De acordo com a literatura, valores aceitáveis para experimentos biológicos são $Q^2 > 0,4$ e $R^2 > 0,7$ (GODZIEN, *et al.*, 2013). Portanto, os resultados da validação cruzada para amostras de urina por GC-MS, mostraram um ajuste inadequado dos dados ao modelo.

4.4.5.1 Identificação das entidades moleculares discriminadoras resultantes da análise metabolômica de urina por GC-MS

Em função dos resultados citados no item anterior, após análise quimiométrica com resultados de validação abaixo dos valores aceitáveis, é possível inferir que o modelo utilizado não conseguiu prever os grupos e discriminar os metabólitos. Por esses motivos, não foi possível utilizar os resultados obtidos na investigação de potenciais compostos alterados associados à exposição aos agrotóxicos.

Novais, (2017) também encontrou resultados semelhantes, relatando que o modelo de classificação gerado em seu estudo foi construído de forma satisfatória ($R^2 = 0,87$), mas com predição muito inferior à aceitável ($Q^2=0,08$). Nenhum metabólito se mostrou com concentrações diferentes entre os grupos. O autor observou deformidade em alguns picos cromatográficos, indicando que alterações na metodologia deveriam ser realizadas para melhor separação dos picos e ainda relatou que os parâmetros utilizados no pré-processamento (software XCMS[®]) foram inadequados para o tratamento de dados de GC-MS.

O software XCMS[®] possui diversos algoritmos para extrair os *molecular features* das análises durante o pré-processamento. No presente estudo, foram testados vários diferentes parâmetros desse software, como o aumento e diminuição da relação sinal/ruído (snthresh), largura do pico (bw), o algoritmo *peakgroups*, entre outros, mas os resultados não se mostraram satisfatórios ao serem submetidos à análise quimiométrica. Há sugestões em literatura sobre a utilização de diferentes parâmetros e/ou softwares para um melhor tratamento de dados gerados por GC-MS (QIU, REED, 2014; NOVAIS, 2017).

O preparo de amostras utilizado neste estudo também pode ter influenciado nos resultados obtidos. Ele possui várias etapas críticas, sendo duas destinadas à precipitação de proteínas e remoção de lipídeos não voláteis, seguidas de derivatização por metoxiaminação e silylação. Acredita-se que esse preparo possa ter causado a eliminação e/ou degradação de metabólitos importantes ou a derivatização inadequada deles. Dessa forma, sugere-se a realização de novos estudos de otimização de preparo

de amostras, além de validação de parâmetros a serem utilizados no pré-processamento de amostras de urina por GC-MS.

Em suma, neste estudo, verificamos os perfis metabólicos em amostras de plasma e urina de indivíduos expostos e não expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos. É importante destacar que, comparado ao plasma, o perfil metabólico da urina representa o resultado da filtração plasmática glomerular, reabsorção e excreção tubular, portanto as concentrações dos metabólitos podem ser diferentes. Cabe ressaltar também que este estudo apresenta limitações, dentre estas, o pequeno tamanho da amostra ($n = 40$), o que pode ter sido uma fonte de variação aleatória nos resultados dos 2 grupos analisados. Além disso, a identificação dos metabólitos foi putativa, de acordo com o nível 2 reconhecido pela *Metabolomics Standards Initiative* (MSI).

CAPÍTULO V
CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

A avaliação da genotoxicidade e o estudo do perfil metabólico em plasma e urina dos indivíduos com exposição ocupacional e não ocupacional aos agrotóxicos foram realizados neste trabalho.

A padronização do ensaio cometa foi realizada de forma adequada e criteriosa, a qual forneceu resultados precisos, confiáveis e fidedignos acerca de danos genéticos provocados pela exposição aos agrotóxicos.

Na avaliação das amostras de trabalhadores expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos, os resultados dos testes de genotoxicidade apresentaram uma maior frequência de alterações celulares e dano no DNA, quando comparados ao grupo ambientalmente exposto aos mesmos compostos químicos, demonstrando que os ensaios cometa e citoma foram ferramentas analíticas eficientes na identificação dessas anormalidades em amostras biológicas. Esses resultados, em conjunto, apontam que a exposição aos agrotóxicos tem potencial para ocasionar instabilidade genômica, o que sugere uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer nos trabalhadores expostos.

O estudo metabolômico realizado pela técnica de UPLC-MS revelou distúrbios metabólicos em plasma e urina de trabalhadores expostos ocupacionalmente a agrotóxicos. As alterações identificadas envolveram diversas vias metabólicas, com destaque para o metabolismo de aminoácidos e de várias classes de lipídios, tais como, esfingolipídios, glicerolipídios, derivados do ácido araquidônico, entre outros. A análise multivariada realizada por métodos de reconhecimento de padrões levou à identificação de metabólitos importantes para discriminação entre o grupo exposto e não exposto ocupacionalmente aos agrotóxicos, sendo 21 metabólitos plasmáticos e 15 urinários. Com a análise da área sob a curva (AUC), calculada por meio da curva ROC, foram revelados os compostos com maior potencial para biomarcadores.

Os resultados encontrados pela análise por GC-MS, das amostras de urina, não foram capazes de identificar metabólitos discriminadores, dessa forma, não revelaram potenciais biomarcadores. Novos estudos para otimização do preparo de amostras e

validação analítica dos parâmetros a serem utilizados no pré-processamento de amostras de urina por GC-MS devem ser realizados.

De acordo com os resultados gerados neste estudo, pode-se inferir que a abordagem integrada, com a utilização da metabolômica e avaliação dos biomarcadores de genotoxicidade, forneceu informações importantes sobre respostas biológicas complexas. Vários metabólitos foram significativamente alterados pela exposição aos agrotóxicos e essa exposição produz toxicidade por meio de múltiplos mecanismos, principalmente, estresse oxidativo, reações inflamatórias, desregulação endócrina e disfunção mitocondrial.

A análise metabolômica contribuiu para a indicação de candidatos a biomarcadores que sejam capazes de monitorar uma exposição e prever os danos à saúde do trabalhador, precocemente. No entanto, para utilização clínica, os possíveis biomarcadores precisam ser validados, utilizando um maior número de indivíduos por grupo e seguindo protocolos mais rígidos. Até o momento, não há trabalhos publicados sobre o estudo de metabólitos identificados pela abordagem metabolômica global em plasma e urina de seres humanos expostos aos agrotóxicos. Por esse motivo, os resultados deste estudo podem ser de grande relevância para a compreensão dos mecanismos de ação tóxica desses agentes químicos e para nortear estudos sobre biomarcadores de efeito precoce, podendo ser utilizados, posteriormente, em programas de monitoramento da saúde de trabalhadores.

REFERÊNCIAS

- ABDELNUR, P.V. *Metabolômica e Espectrometria de Massas*. Circular Técnica - **Embrapa Agroenergia**. Brasília, 2011.
- ACUÑA, I., RUIZ, A., CERDÓ, T., CANTARERO, S., et al. Rapid and simultaneous determination of histidine metabolism intermediates in human and mouse microbiota and biomatrices. **BioFactors**, v.48, 2021.
- AGILENT Technologies. **Fiehn GC / MS Metabolomics RTL Library** - User guide, 2013.
- AHMAD, A., AHMAD, M. Deciphering the toxic effects of organochlorine pesticide, dicofol on human RBCs and lymphocytes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 143; pg.127–134, 2017.
- ALIFERIS, K.A.; JABAJI, S. Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 100, 105–117, 2011.
- ALSEEKH, S., AHARONI, A., BROTMAN, Y. *et al.* Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. **Nat Methods** 18, 747–756, 2021.
- AMORIM, L.C.A. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. **Rev. bras. epidemiol.** 6 (2), 2003.
- ANTONELLI, J., CLAGGETT, B. L., HENGLIN, M., KIM, A., OVSAK, G., KIM, N., et al. Statistical workflow for feature selection in human metabolomics data. **Metabolites**, 9(7), 143, 2019.
- ANTUNES, A.C.N. **Análise metabolômica não direcionada de polpa de morango cv. Camarosa cultivado sob condições de déficit hídrico e excesso salino**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pelotas, 2019.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA**. Plano Plurianual 2017-2020 – Ciclo 2017/2018. Brasília, dezembro de 2019.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Novo marco regulatório de agrotóxicos**. Brasília, 2019. Disponível em <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/novo-marco-regulatorio>. Acesso em 21/07/2022.
- ANWAR, W.A. Biomarkers of Human Exposure to Pesticides. **Environmental Health Perspective**, Vol. 105, pp. 801-806, 1997.

ARAOUD, M. Biological Markers of Human Exposure to Pesticides, Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment, **Dr. Margarita Stoytcheva** (Ed.), ISBN: 978- 953, 2011.

ARAÚJO, A.M.; CARVALHO, F.; GUEDES de PINHO, P.; CARVALHO, M. Toxicometabolomics: Small Molecules to Answer Big Toxicological Questions. **Metabolites**, 11, 692, 2021.

ARBO, M.D., GARCIA, S.C., SARPA, M., JUNIOR, F. M.R.S., NASCIMENTO, S.N. et al. Brazilian workers occupationally exposed to different toxic agents: A systematic review on DNA damage. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.879–880, 2022.

ARÉVALO-JARAMILLO, P., IDROBO, A., SALCEDO, L. et al. Biochemical and genotoxic effects in women exposed to pesticides in Southern Ecuador. **Environ Sci Pollut Res** 26, 24911–24921,2019.

ARSHAD, M., SIDDIQA, M., RASHID, S., HASHMI, I., AWAN, M. A. Biomonitoring of toxic effects of pesticides in occupationally exposed individuals. **Safety and health at work**, v. 7, n. 2, p. 156-160, 2016.

AZQUETA, A., LADEIRA, C., GIOVANNELLI, L., BOUTET-ROBINET, E., BONASSI,S., et al. Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective, **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, V. 783, 2020.

AZQUETA, A.; GUTZKOW, K.B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A.R. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation Research**. v.18, p. 41-45, 2011.

BAUER, A., LUETJOHANN, J., HANSCHEN, F.S., SCHREINER, M., KUBALLA, J., et al. Identification and characterization of pesticide metabolites in *Brassica* species by liquid chromatography travelling wave ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TWIMS-QTOF-MS). **Food Chemistry**, v.244, pages 292-303,2018.

BEIHAMMER G, MARESCH D, ALTMANN F E STRASSER R. Glicosilfosfatidilinositol-Anchor Synthesis in Plants: A Glycobiology Perspective. **Plant Sci**, 2020.

BENEDETTI, D., DA SILVA, F.R., KVIKCO, K., FERNANDES, S.P., SILVA, J. Genotoxicity induced by occupational exposure to pesticides. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 752, 28, 2013.

BERNAT P, NYKIEL-SZYMAŃSKA J, STOLAREK P, SŁABA M, SZEWCZYK R, RÓŻALSKA S. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced oxidative stress: Metabolome and membrane modifications in *Umbelopsis isabellina*, a herbicide degrader. **PLoS ONE** 13(6), 2018.

BERTOTTI, J.L.F. **Produtor rural e o limite jurisprudencial da (des)consideração enquanto consumidor de agrotóxicos frente o princípio da informação e sustentabilidade.** Universidade do Vale do Itajaí -SC, julho de 2020.

BIRCH, M.R., JOHANSEN, M., SKAKKEBÆK, N., ANDERSSON, A.M., REHFELD, A. In vitro investigation of endocrine disrupting effects of pesticides on Ca²⁺-signaling in human sperm cells through actions on the sperm-specific and steroid-activated CatSper Ca²⁺-channel. **Environment International**, v. 167, 2022.

BOLOGNESI C, CREUS, A, OSTROSKY-WEGMAN, P., MARCOS, R. Micronuclei and pesticide exposure. **Mutagenesis** 26: 19-26; 2011.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. National Cancer Research Institute, Genova, Italy. **Mutation Research**, 543, 251–272; 2003.

BOLOGNESI, C., BONELLI, L., COMPALATI, A., FERLA, V., STAGNARO, L., et al. “Normal values” for the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome parameters: Repeatability and reproducibility in a healthy reference population. **Science of The Total Environment**, V. 652, Pages 513-522, 2019.

BOLOGNESI, C., CARRASQUILLA, G., VOLPI, S., SOLOMON, K. R., MARSHALL, E. J. P. Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five Colombian regions: association to occupational exposure to glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 72, n. 15-16, p. 986-997, 2009.

BOLOGNESI, C., HOLLAND, N. The use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 183-203, 2016.

BONASSI, S., EL-ZEIN, R., BOLOGNESI, C., FENECH, M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis**, 26(1), 93-100, 2011.

BONVALLOT, N., DAVID, A., CHALMEL, F., CHEVRIER, C., CORDIER, S., et al. Metabolomics as a powerful tool to decipher the biological effects of environmental contaminants in humans. **Current Opinion in Toxicology**, v. 8, pages 48-56, 2018.

BONVALLOT, N., FRANCO, M.T., CHEVRIER, C., CANLET, C, M., DEBRAUWER, L., et al. Potential input from metabolomics for exploring and understanding the links between environment and health. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, 17:21–44, 2014

BOOTSKEAW, S., KONGTIP, P., NANKONGNAB, N., CHANTANAKUL, S., SUJIRARAT, D., MAHABOONPEETI, et al. Urinary glyphosate biomonitoring of sprayers

in vegetable farm in Thailand. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, 1–18, 2020.

Braga, A. R. C., Rosso, V.V., Harayashiki, C.A.Y., Jimenez, P.C., Castro, I.B. Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food** - vol 1, pg. 312–314, June, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Diretrizes nacionais para a vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, 2017.

Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos. Acessado em 26/07/2022.

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

BRASIL. Secretaria Especial de Previdência e Trabalho. **Norma Regulamentadora 7 (NR7) - Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional. Aprovada e atualizada pela Portaria Nº 6.734, de 09 de março de 2020**. Disponível em <https://www.gov.br/trabalho-e-previdencia/pt-br/composicao/orgaos-especificos/secretaria-de-trabalho/inspecao/seguranca-e-saude-no-trabalho/normas-regulamentadoras/nr-07-atualizada-2022>. Acessado em 23/06/2022.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J. L. V. C.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 45, p. 325 – 334, 2009.

BROSNAN, M.E., BROSNAN, J.T. Histidine Metabolism and Function. **The Journal of Nutrition**, v. 150, pages 2570S–2575S, 2020.

BRUKER DALTONIK GMBH. T-ReX LC-QTOF Solution Tutorial - **Metabolite Identification Using Spectral Libraries in MetaboScape**, 2018.

BRUM, A.A.S., ARRUDA, L.F., REGITANO-D´ARCE, M.A.B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 4, 849-854, 2009.

BUJAK, R., STRUCK-LEWICKA, W., MARKUSZEWSKI, M.J., KALISZAN, R. Metabolomics for laboratory diagnostics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, pg. 108-120, 2015.

CANUTO, G.A.B., COSTA, J.L., CRUZ, P.L.R., SOUZA, A.R.L., FACCIO, A.T., et al. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Quim. Nova**, Vol. 41, No. 1, 75-91, 2018.

CARNEIRO, F. F. (Org.). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, 2015.

CATTANI, D., CESCO NETTO, P.A., TAVARES, M.K., PARISOTTO, E.B., OLIVEIRA, P.A., RIEG, C.E.H., et al. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, v. 387, pages 67-80, 2017.

CAVALCANTE, I.L.P. **Agrotóxicos: contexto, aplicabilidade e toxicidade dos ingredientes ativos mais utilizados no Brasil**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2022.

CAVALCANTI, C.G.C. **Metabolômica de leveduras fermentadoras de xilose na identificação de alvos metabólicos para aumento da produção de etanol 2G**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Goiás, 2019.

CERNY, M.E.V. **Análise de parâmetros bioquímicos e de dano de DNA em uma população de agricultores do estado de Santa Catarina exposta a pesticidas**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2021.

CH, RATNASEKHAR, SINGH, A.K., PATHAK, M.K., SINGH, A., KESAVACHANDRAN, C.N., BIHARI, V., et al. Saliva and urine metabolic profiling reveals altered amino acid and energy metabolism in male farmers exposed to pesticides in Madhya Pradesh State, India. **Chemosphere**, v. 226, pages 636-644, 2019.

CHAUVIN, A.; BOISVERT, F.M. Clinical Proteomics in Colorectal Cancer, a Promising Tool for Improving Personalised Medicine. **Proteomes**, 6, 49, 2018.

CHAVES, R.R.M. **Leucoplasias orais com e sem transformação maligna são metabolicamente diferentes**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2021.

CHEN, H., WANG, K., JI, W., XU, H., LIU, Y, WANG,S., WANG, Z., et al. Metabolomic analysis of honey bees (*Apis mellifera*) response to carbendazim based on UPLC-MS. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.179, 2021.

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 68, n. 86, p. 1–128, 2019.

CHRISTIE, W. W. Prostanoids: Prostaglandins, Prostacyclins and Thromboxanes. **The Lipidweb**, 2022. Disponível em: <https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb.html/lipids/fa-eic/eicprost/index.htm>. Acesso em 26/11/2022.

COLLINS, A.R., ANDERSON, D., COSKUN, E., DHAWAN, A., DUSINSKA, M., et al. Launch of the ComNet (comet network) project on the comet assay in human population studies during the International Comet Assay Workshop meeting in Kusadasi, Turkey. **Mutagenesis**, 27, pp. 385-866, 2012.

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAVIÃO, I.; GIOVANNELLI, L., et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p.1-9, 2008.

CONAB. Companhia nacional de abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de café. **CONAB**, Brasília, 2021.

CORONAS, M.V.; HORN, R.C.; DUCATTI, A.; ROCHA, J.A.V.; VARGAS, V.M.F. Mutagenic activity of airborne particulate matter in petrochemical industrial area. **Mutagenesis Research**, v. 650, p. 196–201, 2008.

CRUZAT, V.F., PETRY, E.R., TIRAPÉGUI, P.J. Glutamine: Biochemical, Metabolic, Molecular Aspects and Supplementation. **Rev Bras Med Esporte** – Vol. 15, 5, 2009.

CUENCA, J. B., TIRADO, N., BARRAL, J., ALI, I., LEVI, M., STENIUS, U., et al. Increased levels of genotoxic damage in a Bolivian agricultural population exposed to mixtures of pesticides. **Science of the Total Environment**, 695, 2019.

CUPERLOVIC´-CULF, M., BARNETT, D.A., CULF, A.S., CHUTE, I. Cell culture metabolomics: applications and future directions. **Drug Discovery Today**. Volume 15, August 2010.

DA SILVA, A. **Síntese e caracterização de derivados da L-fenilalanina e L-tirosina alinhada à “Química Verde” e avaliação da toxicidade**. Universidade Federal de Mato Grosso, 2020.

DA SILVA, J, *et al.* An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p. 241-245. 2000.

DA SILVA, J. MORAES, C.R., HEUSER, V.D., ANDRADE, V.M., SILVA, F.R., KVIKTO, K., et al. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. **Mutagenesis**, v.23, 2008.

DALMOLIN, S.P., DREON, D. B., THIESEN, F.V., DALLEGRAVE, E. Biomarkers of occupational exposure to pesticides: Systematic review of insecticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 75, 2020.

DEDA, O., et al. Sample preparation optimization in fecal metabolic profiling. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1047, p. 115–123, 2017.

DHANANJAYAN, V., RAVICHANDRAN, B., PANJAKUMAR, K., KALAISELVI, K., KAUSIC, R. Assessment of genotoxicity and cholinesterase activity among women workers occupationally exposed to pesticides in tea garden. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.841, pages 1-7, 2019.

DI-PAOLO, C. **Aplicação do Ensaio Cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, Centropomus parallelus expostos à B-naftoflavona**. Universidade de São Paulo, 2006.

DOMINGO-ALMENARA, X., SIUZDAK, G. Computational Methods and Data Analysis for Metabolomics, *Methods in Molecular Biology*, vol. 2104, **Springer Nature**, 2020.

DUARTE, G. H. B. **Metabolômica por LC-ESI-QTOF-MS em plasma de camundongos nod/scid sob tratamento quimioterápico: potenciais biomarcadores de leucemia**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2016.

DUDKA, I., KOSSOWSKA, B., SENHADRI, H., LATAJKA, R., HAJEK, J., *et al.* Metabonomic analysis of serum of workers occupationally exposed to arsenic, cadmium and lead for biomarker research: a preliminary study. **Environment international**, 68, 71-81, 2014.

DUDZIK, D., BARBAS-BERNARDOS, C., GARCIA, A., BARBAS, C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 149–173, 2018.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, Pages 88-95, 1961.

EPA – Environmental Protection Agency – United States. **Defining Pesticide Biomarkers**, 2022. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/defining-pesticide-biomarkers>.

EYLEM, C.C., NEMUTLU, E., DOGAN, A., ACIK, V., MATYAR, S., GEZERCAN, Y., *et al.* High-Throughput Single-Step plasma sample extraction optimization strategies with experimental design for LC-MS and GC-MS integrated metabolomics and lipidomics analysis. **Microchemical Journal**, v.179, 2022.

FACCIO, A.T. **Abordagem metabolômica no estudo da exposição gestacional à poluição atmosférica**. Dissertação. Universidade de São Paulo, 2015.

FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMULLER, S.; KEVEKORDES, S.; MERSCHSUNDERMANN, V. Use of primary blood cells for the assessment of exposure

to occupational genotoxicants in human biomonitoring studies. **Toxicology**, v. 198, p. 41- 350, 2004.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, 600, pg 58–66, 2006.

FENECH, M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. **Genes**, 11, 1203, 2020.

FENECH, M., KNASMUELLER, S., BOLOGNESI, C., HOLLAND, N., BONASSI, S., KIRSCH-VOLDERS, M. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Volume 786, 108342, 2020.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat. Res.**, 147, 29–36, 1985.

FENG, Y., HUANG, Y., ZHAN, H., BHATT, P., CHEN, S. An Overview of Strobilurin Fungicide Degradation: Current Status and Future Perspective. **Front. Microbiol., Sec. Microbiotechnology**, 2020.

FERRÉ, D. M., QUERO, M., HYNES, V., SALDEÑA, E., et al. Buccal micronucleus cytome assay in workers of fruit farms which have applied pesticides around fifteen years. **Revista internacional de contaminación ambiental**, 34(1), 23-33, 2018.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas: 2015.

FERRI, G. M., CAVONE, D., DAMBROSIO, M., INTRANUOVO, G., SCHIAVULLI, N., ET al. Lymphocytes DNA damages and exposure to chlorpyrifos, deltamethrin, penconazole, copper oxichloride. **Biomarkers**, 1–32, 2018.

FIEHN, O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: the combination of targeted and untargeted profiling. **Curr Protoc Mol Biol**. 114: 30.4.1–30.4.32, 2017.

FIEHN, O. Metabolomics—The link between genotypes and phenotypes. **Plant Mol. Biol.** v.48, 155–171, 2002.

FILHO, A.P.S.; AGUIAR, M.M.; BARBOSA, N. O. Agrotóxicos: dos impactos a saúde individual e coletiva. **Anais colóquio estadual de pesquisa multidisciplinar**, v. 1, n. 1, p.1-7, 2017.

FORCELLINI, C. A. Fungicidas inibidores da síntese de esteróis. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.2, p.335-355, 1994.

FRAC – **Comitê de ação à resistência a fungicidas**, 2022. Disponível em: <https://www.frac-br.org/modo-de-acao>.

FRANCO, F.C., ALVES, A.A., GODOY, F.R. *et al.* Evaluating genotoxic risks in Brazilian public health agents occupationally exposed to pesticides: a multi-biomarker approach. **Environ Sci Pollut Res** 23, 19723–19734, 2016.

FRANZKE, B., SCHWINGSHACKL, L., KARL-HEINZ, W. Chromosomal damage measured by the cytokinesis block micronucleus cytome assay in diabetes and obesity - A systematic review and meta-analysis. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Volume 786, 108343, 2020.

FREDERICO, C., VITALE, V., LA PORTA, N. *et al.* Buccal micronucleus assay in human populations from Sicily (Italy) exposed to petrochemical industry pollutants. **Environ Sci Pollut Res** 26, 7048–7054, 2019.

FRIEDRICH, K.; GURGEL, A.M.; BEDOR, C, GALINDO; N. SARPA, M., *et al.* Agronegócio e pandemia no Brasil. **Relatório Abrasco**, 2021. Disponível em <https://www.abrasco.org.br/site/wp-content/uploads/2021/05/Agronegocio - Abrasco-IPEN.pdf>. Acesso em 08/12/2021.

GANGOLA, S., BHATT, P., KUMAR, A.J., *et al.* Biotechnological tools to elucidate the mechanism of pesticide degradation in the environment, **Chemosphere**, V. 296, pg. 133916, 2022.

GANIE, S.U., JAVAID, D., HAJAM, Y.A., RESHI, M.S. Mechanisms and treatment strategies of organophosphate pesticide induced neurotoxicity in humans: A critical appraisal, **Toxicology**, V. 472, 2022.

GAO, Z., BATOOL, R., XIE, W., HUANG, X., WANG, Z. Transcriptome and Metabolome Analysis Reveals the Importance of Amino-Acid Metabolism in *Spodoptera Frugiperd* Exposed to Spinetoram. **Insects**; 13(9): 852, 2022.

GARCIA A, BARBAS C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. **Methods Mol Biol**. 708:191-204, 2011.

GARDOCKI, M.E., JANI, N., LOPES, J. Phosphatidylinositol biosynthesis: Biochemistry and regulation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v.1735, pages 89-100, 2005.

GHISOLFI, M. **Avaliação do potencial genotóxico de produtos comerciais contendo carbendazim ou tebuconazol utilizando teste de micronúcleo em Tradescantia Pallida**. Dissertação de mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2020.

GIKA, H., VIRGILIOU, C., THEODORIDIS, G., PLUMB, R.S., WILSON, I.D. Untargeted LC/MS-based metabolic phenotyping (metabonomics/metabolomics): The state of the art. **Journal of Chromatography B**. V. 1117, pg 136-147, 2019.

GODOY, B.R.B., CONTE, A.M., GOVONI, B., BOEIRA, J.M. Evaluation of micronuclei and other nuclear alterations in oral mucosa exfoliated cells of individuals directly and indirectly exposed to pesticides. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 5, n. 11, p.23889-23906, 2019.

GODZIEN, J. et al. From numbers to a biological sense: how the strategy chosen for metabolomics data treatment may affect final results. A practical example based on urine fingerprints obtained by LC-MS. **Electrophoresis**, v. 34, p. 1–30, 2013.

GONTIJO, A.M.M.C., TICE, R.R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra. p. 173-200, 2003

GORROCHATEGUI, E., JAUMOT, J., LACORTE, S., TAULER, R. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, V.82, Pg 425-442, 2016.

GOULART, V.A.M. **Metabolômica aplicada na pesquisa de biomarcadores para acidente vascular encefálico isquêmico, infarto do miocárdio e esquizofrenia**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

GRISÓLIA, K.C. **Agrotóxicos-mutações, reprodução e câncer**. Brasília: Editora UnB, 2005.

GROVER, P.; REKHADEVI, P.V.; DANADEVI, K.; VUYYURI, S.B.; MAHBOOB, M.; RAHMAN, M.F. Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 213, p. 99-106, 2010.

GUIRADO, G.M.P., MARTINS, L.S. A importância dos biomarcadores e a listagem destes no Brasil e em outros países. **Revista Saúde em Foco** – Edição nº11, 2019.

GUNASEKARANA, V., RAJ, G.V., CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **J Clin Diagn Res.**, 9(3). Epub, 2015.

GUSSO, A.P., MATTANNA, P., PELLEGRINI, L.G., CASSANEGO, D.B., et al. Comparação de diferentes métodos analíticos para quantificação de lipídios em creme de ricota. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, nº 389, 67: 51-55, 2012.

HARDING AH, FOX D, CHEN Y, PEARCE N, FISHWICK D, FROST G. Prospective Investigation of Pesticide Applicators' Health (PIPAH) study: a cohort study of professional pesticide users in Great Britain. **BMJ Open**, 7(10), 2017.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C. *et al.* Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**. v.18, n.1, p.45-51, 2003.

HASSAAN, M.A., NEMR, A.E. Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 46, pg. 207-220, 2020.

HENDRIKS, M. W. B. *et al.* Data-processing strategies for metabolomics studies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1685–1698, 2011.

HERNÁNDEZ, A.F., GIL, F., LACASAÑA, M. Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. **Arch Toxicol**, 91, 3211–3223, 2017.

HONGSIBSONG, S., SITTITON, N., SAPBAMRER, R. Association of health symptoms with low-level exposure to organophosphates. **Journal of Occupational Health, Japan**, 2017.

HOO, Z. H.; CANDLISH, J.; TEARE, D. What is an ROC curve? **Emerg Med J**, v. 34, n. 6, p. 357–359, 2017.

HRISTOVA, J., SVINAROV, D. Enhancing precision medicine through clinical mass spectrometry platform. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 36, Nº 1, pg.107–117, 2022.

HU, J, LESSEUR, C, MIAO, Y, MANSERVISI, F., *et al.* Low-dose exposure of glyphosate-based herbicides disrupt the urine metabolome and its interaction with gut microbiota. **Sci Rep.**;11(1):3265, 2021.

HU, W., LIU, C.W., JIMÉNEZ, J.A., MCCOY, E.S., HSIAO, Y.C., *et al.* Detection of Azoxystrobin Fungicide and Metabolite Azoxystrobin-Acid in Pregnant Women and Children, Estimation of Daily Intake, and Evaluation of Placental and Lactational Transfer in Mice. **Environmental Health Perspectives**, v.130, n.2, 2022.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2021.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Exposição aos agrotóxicos no trabalho e no ambiente**. Rio de Janeiro, 2019.

INTRANUOVO, G., SCHIAVULLI, N., CAVONE, D., BIRTOLO, F., COCCOB, P., *et al.* Assessment of DNA damages in lymphocytes of agricultural workers exposed to pesticides by comet assay in a cross-sectional study. **Biomarkers**, 2018.

JACOBSEN-PEREIRA, C.H., DOS SANTOS, C.R., MARASLIS, F.T., PIMENTEL, L., FEIJÓ, A.J.L., *et al.* Markers of genotoxicity and oxidative stress in farmers exposed to pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.148, pages 177-183, 2018.

JALAL, M., NCHIOUA, Z., CHOUHAM, S., EZ-ZAHER, L. Triazole fungicides induce hepatic lesions and metabolic disorders in rats. **Biological and Pharmaceutical Sciences**, 10(2), 040–047, 2020.

JAVAID, S.; FAROOQ, T.; REHMAN, Z.; AFZAL, A.; ASHRAF, W.; RASOOL, M.F., et al. Dynamics of Choline-Containing Phospholipids in Traumatic Brain Injury and Associated Comorbidities. **Int. J. Mol. Sci.** 22, 2021.

JIANG, J., ZHANG, C., WANG, L., WANG, X., HE, H., WU, S., ZHAO, X. Insights into the combined effects of environmental concentration of difenoconazole and tebuconazole on zebrafish early life stage. **Science of The Total Environment**, V.830, 2022.

JOBIM, P.F.C.; NUNES, L.N.; GIUGLIANI, R.; CRUZ, I.B.M. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, pg. 277-288, 2010.

KAHL, B., VIVIAN, F., SILVA, L., et al. Occupational Exposure to Pesticides in Tobacco Fields: The Integrated Evaluation of Nutritional Intake and Susceptibility on Genomic and Epigenetic Instability. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 01-13, 2018.

KALYABINA, V.P., ESIMBEKOVA, E.N., KOPYLOVA, K.V., KRATASYUK, V.A. Pesticides: formulators, distribution pathways and effects on human health – a review. **Toxicology Reports**, v. 8, pages 1179-1192, 2021.

KAPKA-SKRZYPCZAK, L.; CYRANKA, M.; SKRZYPCZAK, M.; KRUSZEWSKI, M. Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure –state of the art. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.18, p. 294-303, 2011.

KHODADADI, M., POURFARZAM, M. A review of strategies for untargeted urinary metabolomic analysis using gas chromatography–mass spectrometry. **Metabolomics** 16, 66, 2020.

KILIÇ, Z.S., AYDIN, S., ÜNDEĞER U., BAŞARAN, B.N. In vitro genotoxicity assessment of dinitroaniline herbicides pendimethalin and trifluralin. **Food and Chemical Toxicology**, v.113, pages 90-98, 2018

KISLITSKAYA, V. N., KENZHIN, Z. D., KULTANOV, B. Z.H, DOSMAGAMBETOVA, R. S., TURMUHAMBETOVA, A. A. Disturbance of Antioxidant Enzymes and Purine Metabolism in the Ejaculate of Men Living in Disadvantaged Areas of Kyzylorda Region. **Macedonian journal of medical sciences**, 3(3), 489–492, 2015.

KOCAMAN AY, BUCAK S. Genotoxic and cytotoxic effects of flumetralin in human peripheral blood lymphocytes in vitro. **Toxicology and Industrial Health**. 32(12):1927-1934, 2016.

KURZ, J. et al. Ceramides as Novel Disease **Biomarkers** **Trends in Molecular Medicine**, Elsevier Ltd, 2019.

KVITKO, K., BANDINELLI, E., HENRIQUES, J.A.P., HEUSER, V.D., ROHR, P., et al. Susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides, to tannery chemicals and to coal dust during mining. **Genetics and Molecular Biology**, 35, 4, 1060-1068, 2012.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**. V.5. 27-46, 2013.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"? **Scientia Chromatographica**, v.2, pg 35-61, 2009.

LEBAILLY, P., MIREY, G., HERIN, F. et al. DNA damage in B and T lymphocytes of farmers during one pesticide spraying season. **Int Arch Occup Environ Health**, 88, 963–972, 2015.

LEWIS, K.A., TZILIVAKIS, J., WARNER, D. AND GREEN, A. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, 22(4), 1050-1064, 2016.

LI, S., TIAN, Y., JIANG, P., LIN, Y., LIU, X., YANG, H. Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2020.

LI, Z., LU, Y., GUO, Y., CAO, H., WANG, Q., SHUI, W. Comprehensive evaluation of untargeted metabolomics data processing software in feature detection, quantification and discriminating marker selection, **Analytica Chimica Acta**, V. 1029, Pg 50-57, 2018.

LIMBERGER, C. **Mecanismos neurotóxicos da exposição ao glifosato**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2022.

LINDON, J.C., NICHOLSON, J.K., HOLMES, E. **The Handbook of Metabonomics and Metabolomics**. Elsevier, 2007.

LINI, R. S., OLIVEIRA, N. G., NERY, B. G., AGUERA, R. G., DA SILVA, L. F. F., *et al.* Occupational exposure to pesticides from fungicide class on a vineyard farm population. **Research, Society and Development**, 10(3), 2021.

LIU, J., ZHAO, F., WANG, T., XU, J., QIAN, Y. Host Metabolic Disorders Induced by Alterations in Intestinal Flora under Dietary Pesticide Exposure. **J. Agric. Food Chem.**, 69, 22, 6303–6317, 2021.

- LOPES, C.V.A., ALBUQUERQUE, G.S.C. Agrochemicals and their impacts on human and environmental health: a systematic review. **Revista Saúde debate**, 42 (117), 2018.
- MACHADO, S.C., SOUZA, B.M., MARCIANO, L.P.A., PEREIRA, A.F.S., et al. Endpoints as human biomarkers in exposure assessment of triazoles fungicides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Volume 87,2021.
- MALAKOOTIAN, M., SHAHESMAEILI, A., FARAJI, M., AMIRI, H., MARTINEZ, S.S. Advanced oxidation processes for the removal of organophosphorus pesticides in aqueous matrices: A systematic review and meta-analysis, **Process Safety and Environmental Protection**, V.134, pages 292-307, 2020.
- MALKOWSKI, S. N., ATILHO, R. M., GREENLEE, E. B., WEINBERG, C. E. A rare bacterial RNA motif is implicated in the regulation of the *purF* gene whose encoded enzyme synthesizes phosphoribosylamine. **RNA (New York, N.Y.)**, 26(12), 1838–1846, 2020.
- MARQUES, L. Modo e mecanismo de ação dos fungicidas triazóis e triazolintione. **Elevagro**, 2017. Disponível em: <https://elevagro.com/materiais-didaticos/modo-e-mecanismo-de-acao-dos-fungicidas-triazois-e-triazolintione/#>. Acesso em 21/06/2022.
- MARQUES, P.V., CAIXETA, B.T. A importância da avaliação das dosagens das colinesterases em casos de intoxicações por organofosforados. **Psicologia e Saúde em Debate**. V.2, 2016.
- MARTIN, C.A., ALMEIDA, V.V., RUIZ, M.R., VISENTAINER, J.E.L. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. **Rev. Nutr.** 19 (6), 2006.
- MASTRANGELO, A., FERRARINI, A., REY-STOLLE, F., GARCÍA, A., BARBAS, C. From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. **Analytica Chimica Acta**, 900, pg. 21-35, 2015.
- MATO, J. M. et al. Biomarkers and subtypes of deranged lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 24, p. 3009–3020, 2019.
- MATOŠEVIĆ, A., BOSAK, A. Carbamate group as structural motif in drugs: a review of carbamate derivatives used as therapeutic agents" **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, vol.71, no.4, pp.285-299, 2020.
- MBIYDZENYUY, N. E., NINSIIMA, H. I., VALLADARES, M. B., PIEME, C. A. Zinc and linoleic acid pre-treatment attenuates biochemical and histological changes in the midbrain of rats with rotenone-induced Parkinsonism. **BMC neuroscience**, 19(1), 29, 2018.

MCCUNE, J. S., STORER, B., THOMAS, S., MCKIERNAN, J., et al. Inosine Monophosphate Dehydrogenase Pharmacogenetics in Hematopoietic Cell Transplantation Patients. **Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, 24(9), 1802–1807, 2018.

MEDEIROS, J.F., ACAYABA, R.D., MONTAGNER, C.C. A química na avaliação do impacto à saúde humana diante da exposição aos agrotóxicos. **Quim. Nova**, Vol. 44, No. 5, 584-598, 2021.

MENDES, M.P.R. **Estudo do perfil metabólico de indivíduos expostos ao benzeno usando a abordagem metabolômica global para avaliação de potenciais biomarcadores**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2021.

MENDES, M.P.R.; PAIVA, M.J.N.; COSTA-AMARAL, I.C.; CARVALHO, L.V.B., et al. Metabolomic Study of Urine from Workers Exposed to Low Concentrations of Benzene by UHPLC-ESI-QToF-MS Reveals Potential Biomarkers Associated with Oxidative Stress and Genotoxicity. **Metabolites**, 12, 978, 2022.

MESNAGE, R, TEIXEIRA, M, MANDRIOLI, D, FALCIONI, L, DUCARMON, QR, et al. Use of Shotgun Metagenomics and Metabolomics to Evaluate the Impact of Glyphosate or Roundup MON 52276 on the Gut Microbiota and Serum Metabolome of Sprague-Dawley Rats. **Environ Health Perspect**, 129(1):17005, 2021.

MESNAGE, R., TEIXEIRA, M., MANDRIOLI, D., FALCIONI, L., IBRAGIM, M., DUCARMON, Q. R., ZWITTINK, R. D., et al. Multi-omics phenotyping of the gut-liver axis reveals metabolic perturbations from a low-dose pesticide mixture in rats. **Communications biology**, 4(1), 471, 2021.

MIGLANI, R.; BISHT, S.S. World of earthworms with pesticides and insecticides. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 12, n. 2, p. 71-82, 2019.

MILIĆ, M., CEPPI, M., BRUZZONE, M., AZQUETA, A., BONASSI, S., et al. The hCOMET project: International database comparison of results with the comet assay in human biomonitoring. Baseline frequency of DNA damage and effect of main confounders. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, V. 787, 2021.

MOREAU, R. L. DE M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. de. **Toxicologia Analítica**. 2. ed. Rio de Janeiro, 2016.

MOREIRA, L. M. Ciências Genômicas: fundamentos e aplicações. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 2015.

MOSTAFALOU, S., ABDOLLAHI, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Archives of toxicology**, v. 91, n. 2, p. 549-599, 2017.

MOURA, P.C.S. **Efeitos fisiológicos da aplicação de triazol e estrobilurina em soja.** Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, 2013.

MUÑOZ, B, ALBORES, A. The role of molecular biology in the biomonitoring of human exposure to chemicals. **Int J Mol Sci.**12(11):4511-25, 2010.

MUSTAPHA, M.U., HALIMOON, N., JOHAR, W.L.W., SHUKOR, M.Y.A. An Overview on Biodegradation of Carbamate Pesticides by Soil Bacteria. **Pertanika J. Sci. & Technol.** 27 (2): 547 – 563, 2019.

NAKAYASU, E.S., GRITSENKO, M., PIEHOWSKI, P.D., GAO, Y., et al. Tutorial: best practices and considerations for mass-spectrometry-based protein biomarker discovery and validation. **Nature Protocols**, vol 16, 3737–3760, 2021.

NASCIMENTO, F.A., SILVA, D.M.E., NUNES, H.F., PARISE, M.R. Evaluation of DNA damage and toxicological methodology development: a bibliometric study. **Hum Exp Toxicol** 39:870–880, 2020.

NASCIMENTO, F.D., SILVA, D.M., PEDROSO, T.M.A., *et al.* Farmers exposed to pesticides have almost five times more DNA damage: a meta-analysis study. **Environ Sci Pollut Res.**, 29, 805–816, 2022.

NETO, B.B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos.** Editora da Unicamp, 3^a ed., Campinas, SP, 2007.

NGUYEN, K., SANCHEZ, C.L., BRAMMER-ROBBINS, E., PENA-DELGADO, C., KROYTER, N., et al. Neurotoxicity assessment of Qol strobilurin fungicides azoxystrobin and trifloxystrobin in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: Insights from lipidomics and mitochondrial bioenergetics. **NeuroToxicology**, v.91, pages 290-304, 2022.

NICHOLSON, J.K.; LINDON, J.C.; HOLMES, E. 'Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotics**, 29, 1181–1189, 1999.

NICOLOPOULOU-STAMATI, P., MAIPAS, S., KOTAMPASI, C., STAMATIS, P., HENS, L. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. **Front. Public Health**, 2016.

NOGUEIRA, F.A.M., SZWARCOWALD, C.L., DAMACENA, G.N. Exposure to pesticides and agricultural workers' health: what does literature reveal? **Rev. Bras. Saúde Ocup.** 45, 2020.

NOVAIS, F.J. **Caracterização do metaboloma sérico de bovinos Nelore e sua potencial associação à eficiência alimentar.** Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2017.

OGRETMEN, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nature Reviews. Cancer*, v. 18, n. 1, p. 33–50, 2018.

OLIVEIRA, M.; BURIOLA, A. Gravidade das intoxicações por inseticidas inibidores das colinesterases no noroeste do estado do Paraná, Brasil. *Rev Gaúcha Enferm.*; 30(4):648-55, 2009.

OILVEIRA-BORGES, E. C.; ABREU, J.F.; BARROSO, L.C. A mortalidade por câncer na região metropolitana de Belo Horizonte: uma análise exploratória. *Espaço & Geografia*, v.18, n.3, pg. 677-706, 2015.

OLIVER, S. G. et al. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in biotechnology*. 16(9), 373-378, 1998.

OMS - Organização Mundial de Saúde. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification**. Geneva, 2019.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, 1996.

OSTLING, O. AND JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298, 1984.

OTHMÈNE, Y.B., MONCEAUX, K., KAROUI, A., SALEM, I.B., BELHADEF, A. et al. Tebuconazole induces ROS-dependent cardiac cell toxicity by activating DNA damage and mitochondrial apoptotic pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. V.204, 2020.

PABST, T. et al. The plasma lipidome in acute myeloid leukemia at diagnosis in relation to clinical disease features. *BBA Clinical*, v. 7, p. 105–114, 2017.

PANIS C, KAWASSAKI, A.C.B., CRESTANI, A.P.J., PASCOTTO, C.R., BORTOLOTI, D.S. et al. Evidence on Human Exposure to Pesticides and the Occurrence of Health Hazards in the Brazilian Population: A Systematic Review. *Front Public Health*. 2022.

PAREEK, V., PEDLEY, A. M., BENKOVIC, S. J. Human de novo purine biosynthesis. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 56(1), 1–16, .2021.

PARK, H., SEO, S. I., LIM, J. H., SONG, J., SEO, J. H., KIM, P. I. Screening of Carbofuran-Degrading Bacteria *Chryseobacterium* sp. BSC2-3 and Unveiling the Change in Metabolome during Carbofuran Degradation. *Metabolites*, 12(3), 219, 2022.

PATTI, G.J., YANES, O., SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*. vol 13, pg.263-269, 2012.

PAUMGARTTEN, F. J. Pesticides and public health in Brazil. **Current Opinion in Toxicology**, 22, 7-11, 2020.

PAYET, L.A., LEROUX, M., WILLISON, J.C., KIHARA, A., PELOSI, L., et al. Mechanistic Details of Early Steps in Coenzyme Q Biosynthesis Pathway in Yeast. **Cell Chemical Biology**, v.23, pages 1241-1250, 2016.

PEDROSO, T.M.A. **Análise da genotoxicidade e da frequência de toxoplasmose em indivíduos diagnosticados com esquizofrenia**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

PERES, F., COSTA, J.M., DUBOIS, S.G. In: Frederico Peres; Josino Costa Moreira. (Org.). **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. 1ed. Rio de Janeiro: Editora da Fiocruz, v.1, p. 21-41, 2003.

PERES, F.; OLIVEIRA-SILVA, J.J.; DELLA-ROSA, H.V.; LUCCA, S.R. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Ciênc. saúde coletiva**, v.10, pg. 27-37, 2005.

PÉREZ-NAVARRO, J., DA ROS, A., MASUERO, D., IZQUIERDO-CAÑAS, P.M., HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I., et al. LC-MS/MS analysis of free fatty acid composition and other lipids in skins and seeds of *Vitis vinifera* grape cultivars. **Food Research International**, v.125, 2019.

PILON, A.C., SELEGATO, D.M., FERNANDES, R.P., BUENO, P.C.P., PINHO, D.R., et al. Plant metabolomics: methods and challenges. **Revista Quím. Nova**, 43 (3), 2020.

PINTO, B.G.S., SOARES, T.K.M., LINHARES, M.A., GHISI, N.C. Occupational exposure to pesticides: Genetic danger to farmworkers and manufacturing workers – A meta-analytical review. **Science of The Total Environment**, V. 748, 2020.

PORTO, M.J., SOUZA, J.P., COSTA, E.I.F.S., OLIVEIRA, C.R.V., et al. Toxicological evaluation: changes in biomarkers triggered by exposure of rural workers to pesticides. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, 2021.

PRISTA, J., UVA, A.S. A utilização de indicadores biológicos em Saúde Ocupacional. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**. Lisboa, 2007.

PYKE, J.S., CALLAHAN, D.L., KANOJIA, K., BOWNE, J., SAHANI, S., et al. A tandem liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) method for profiling small molecules in complex samples. **Metabolomics**, v.11, 1552-1562, 2015.

QI YAN, P., WALKER, K.C., FURLONG, D.I., DEL ROSARIO, M.A., et al. High-Resolution Metabolomic Assessment of Pesticide Exposure in Central Valley, California. **Chem. Res. Toxicol.**, 34, 1337–1347, 2021.

QIU, Y., REED, D. Gas Chromatography in Metabolomics Study. In: Advances in Gas Chromatography. **Intech Open Science**, 2014.

RAMAUTAR, R. Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry for Metabolomics–From Metabolite Analysis to Metabolic Profiling. In Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry for Metabolomics; Ramautar, R., Ed.; **Royal Society of Chemistry**: London, UK; pp. 1–20, 2018.

RAMOS, A.A.; LIMA, C.F.; PEREIRA, M.L.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WILSON. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay C. **Toxicology Letters**, v. 177, p. 66-73, 2008.

RAMOS, J.S.A.R., PEDROSO, T.M.A., GODOY, F.R., BATISTA, R.E., et al. Multi-biomarker responses to pesticides in an agricultural population from Central Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 754, 2021.

REMOR, A.P., TOTTI, C.C., MOREIRA, D.A., DUTRA, G.P., et al. Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity, **Environment International**, V. 35, Pages 273-278, 2009.

REN, J.L., ZHANG, A.H., KONGA, L., WANG, X.J. Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites. **RSC Adv**. V.8, pg. 22335-22350, 2018.

REY-STOLLE, F., DUDZIK, D., GONZALEZ-RIANO, C., FERNÁNDEZ-GARCÍA, M., et al. Low and high resolution gas chromatography-mass spectrometry for untargeted metabolomics: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, 2021.

ROBINSON, A. J. et al. Reactive Oxygen Species Rewires Metabolic Activity in Acute Myeloid Leukemia. **Frontiers in Oncology**, v. 11, n. March, p. 1–10, 2021.

ROCA, M., ALCORIZA, M.I., GARCIA-CAÑEVERAS, J.C., LAHOZ, A. Reviewing the metabolome coverage provided by LC-MS: Focus on sample preparation and chromatography-A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, V.1147, Pages 38-55, 2021.

RODRIGUES, J.A., NARASIMHAMURTHY, R.K., JOSHI, M.B. *et al.* Pesticides Exposure-Induced Changes in Brain Metabolome: Implications in the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders. **Neurotox Res**, 40, 1539–1552, 2022.

ROMA-TORRES, J.; TEIXEIRA, J.P.; SILVA, S.; LAFFON, B., et al. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. **Mutation Research**, v. 604, p.19–27, 2006.

ROY, P., TOMASSONI, D., NITTARI, G., TRAINI, E., AMENTA, F. Effects of choline containing phospholipids on the neurovascular unit: A review. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 16, 2022.

RYDBERG, B., JOHANSON, K.J. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells, in: P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg, C.F. Fox (Eds.), DNA Repair Mechanisms, **Academic Press**, New York, pp. 465–468, 1978

SALVADORI, D.M.F., RIBEIRO, L.R., FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas. **Mutagenese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 201-223, 2003.

SANCHEZ, C.L., SOUDERS, C.L., PENA-DELGADO, C.J., NGUYEN, K.T., et al. Neurotoxicity assessment of triazole fungicides on mitochondrial oxidative respiration and lipids in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells. **NeuroToxicology**, v.80, pages 76-86, 2020.

SANTOS, A.M.L.S. **O papel do estudo metabolômico na doença pulmonar obstrutiva crônica**. Dissertação de mestrado. Universidade de Coimbra, 2019.

SARABIA, D.T.; SANTOS, M.S.M.; MUELLER, L.P.; BATISTOTE, M.; JÚNIOR, R.P.S. O panorama da utilização de agrotóxicos no Brasil. **Revista Educação Ambiental em Ação**. Número 76 - setembro, 2021.

SHADNIA, S., AZIZI, E., HOSSEINI, R., KHOEI, S., FOULADDEL, S., PAJOUHAND, A., et al. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. **Hum. Exp. Toxicol.**,v.24, pp.439-445, 2005.

SICIŃSKA, P., MOKRA, K., WOZNIAK, K., MICHAŁOWICZ, J., BUKOWSKA, B. Genotoxic risk assessment and mechanism of DNA damage induced by phthalates and their metabolites in human peripheral blood mononuclear cells. **Nature Research**, v. 11, 2021.

SILVA, A.C.A. **Biomarcadores de Contaminação Ambiental**. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2016.

SILVA, C.; PERESTRELO, R.; SILVA, P.; TOMÁS, H.; CÂMARA, J.S. Breast Cancer Metabolomics: From Analytical Platforms to Multivariate Data Analysis. A Review. **Metabolites**. V.9, pg 102, 2019.

SILVA, E.J. **Avaliação dos efeitos genotóxicos de agrotóxicos: risco ocupacional e alimentar**. Pernambuco, 2012.

SILVA, F.H.K.P., ANTUNES, L.F.S., VAZ, A.F.S., SILVA, M.S.R.A. Pesticides in Brazil: an understanding of the current scenario of use and the properties of the soil that act on the dynamics and retention of these molecules. **Research, Society and Development**, v. 11, n.9, 2022

SILVA, F.R. **Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associada à suscetibilidade genética**. Porto Alegre - RS, 2011.

SILVA, H. P. **Os riscos dos agrotóxicos na saúde e no ambiente: estudo de caso na zona rural de Ipanguaçu/RN**. Ipanguaçu – RN, 2017.

SILVA, J. M., SILVA, E.N., FARIA, H.P., PINHEIRO, T.M.M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saúde Coletiva**, vol. 10 (4) pg. 891-903, 2005.

SILVA, L.L.M., GARRIDO, R.G. Organophosphorus and organochlorines: medical toxicology and environmental reflexe. **Research, Society and development**, v.10, 2021.

SILVÉRIO, A.C.P. **Aplicação de bioindicadores e avaliação clínica em trabalhadores rurais expostos aos praguicidas organofosforados visando subsidiar a implantação de uma rede de atenção primária à saúde**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Alfenas, 2016.

SILVÉRIO, A.C.P.; MARTINS, I.; NOGUEIRA, D.A., et al. Avaliação da atenção primária à saúde de trabalhadores rurais expostos a praguicidas. **Rev Saude Publica**. 54:9, 2020.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, L.E. A simple technique for quantitation follows levels of DNA damage in individual cells, **Exp. Cell Res**. 175,184–191,1988.

SINGH, S. et al. DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 31, p. 278 – 285, 2011.

SINGH, S., SINGH, N., KUMAR, V., et al. Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. **Environ Chem Lett**, 14, 317–329, 2016.

ŠVIKOVÁ, K., DIANOVSKÝ, J., HOLEČKOVÁ, B., GALDÍKOVÁ, M., KOLESÁROVÁ, V. Assessment of cytogenetic damage in bovine peripheral lymphocytes exposed to in vitro tebuconazole-based fungicide. **Chemosphere**, v. 92, n. 5, p. 555-562, 2013.

SOLOMON, K.R., STEPHESON, G.R., CORRÊA, C.L., ZAMBRON, F.A.D. **Praguicidas e o Meio Ambiente**. 1. ed. São Paulo, 2010.

SPEIT G, VASQUEZ M, HARTMANN A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutat Res**. 681(1):3-12, 2009

STANG, A; WITTE, I. Performance of the comet assay in a high-throughput version. **Mutat Res**, v. 675, n. 1-2, p. 5-10, 2009.

STEFELY, J. A., PAGLIARINI, D. J. Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis. **Trends in biochemical sciences**, 42(10), 824–843, 2017.

STEVENS, V. L. *et al.* Pre-Analytical Factors that Affect Metabolite Stability in Human Urine, Plasma, and Serum: A Review. **Metabolites**, v. 9, n. 8, p. 156, 2019.

SUR, S., SATHIAVELU, M. A concise overview on pesticide detection and degradation strategies. **Environmental Pollutants and Bioavailability**, 34:1, 112-126, 2022.

SWANSON NL, LEU A, ABRAHAMSON J, WALLET B. Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America. **J Org Syst.** v.9, pg.6–37, 2014.

SWARTS, B.M., GUO, Z. Chemical synthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**, 67, 137–219, 2012.

SZEWCZYK, R., RÓŻALSKA, S., MIRONENKA, J., BERNAT, P. Atrazine biodegradation by mycoinsecticide *Metarhizium robertsii*: Insights into its amino acids and lipids profile. **Journal of Environmental Management**, v. 262, 2020.

TALCOTT, P. Toxicologic problems Chapter 21. **Equine internal medicine** (4th ed.), pp. 1460-1512, 2018.

TAMARA, S., BOER, M.A.D., HECK, A.J.R. High-Resolution Native Mass Spectrometry. **Chemical Reviews**, 2021.

TANG, Y., LI, Z., LAZAR, Z.F., TANG, C., ZHAO, J. Metabolomics workflow for lung cancer: Discovery of biomarkers. **Clínica Chimica Acta**, V. 495, pg 436-445, 2019.

TASIC, L. **Metabolômica e metabonômica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**. Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP – 2017.

TAVARES, P.C.B. **Análise metabolômica sérica de potenciais biomarcadores na hanseníase**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, 2020.

TENG, M., ZHU, W., WANG, D., QI, S., WANG, Y., YAN, J., *et al.* Metabolomics and transcriptomics reveal the toxicity of difenoconazole to the early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v.194, pages 112-120, 2018.

THEODORIDIS, G.; GIKA, H.G.; WILSON, I.D. Mass spectrometry-based holistic analytical approaches for metabolite profiling in systems biology studies. **Mass Spectrometry Reviews**, 2011.

TONELINE, M.T., FILHO, J.B., RODRIGUEIRO, D.A., NOVO, N.F. Frequency of micronuclei and other nuclear abnormalities in diabetic patients. **Rev. Fac. Ciênc. Méd.** Sorocaba, v. 16, n. 2, p. 80 - 85, 2014.

TORRES-BUGARÍN, O., ZAVALA-CERNA, M. G., NAVA, A., FLORES-GARCÍA, A., RAMOS-IBARRA, M. L. Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. **Disease Markers**, 2014.

TUDI, M.; LI, H.; WANG, L.; LYU, J.; et al. Exposure Routes and Health Risks Associated with Pesticide Application. **Toxics**, 10, pg. 335, 2022.

TURRELLA, T.C., **Avaliação da remoção de pesticidas em vinho branco por membranas de microfiltração**. Dissertação de mestrado. Universidade de Caxias do Sul, 2020.

TYURINA, Y.Y., POLIMOVA, A.M., MACIEL, E., TYURIN, V.A., KAPRALOVA, V.I., et al. LC/MS analysis of cardiolipins in substantia nigra and plasma of rotenone-treated rats: Implication for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Free Radical Research**, 49:5, 681-691, 2015.

VALENCIA-QUINTANA R, LÓPEZ-DURÁN RM, MILIĆ M, BONASSI S, et al. Assessment of Cytogenetic Damage and Cholinesterases' Activity in Workers Occupationally Exposed to Pesticides in Zamora-Jacona, Michoacan, Mexico. **Int J Environ Res Public Health**, Jun 10;18(12):6269, 2021.

VALVERDE, M; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutat Res**. v. 681, n. 1, p. 93-109, 2009.

VAN METER, R. J., GLINSKI, D. A., PURUCKER, S. T., HENDERSON, W. M. Influence of exposure to pesticide mixtures on the metabolomic profile in post-metamorphic green frogs (*Lithobates clamitans*). **The Science of the total environment**, 624, 1348–1359, 2018.

VASCONCELOS, Y. **Agrotóxicos na berlinda**. Pesquisa FAPESP, 271, 18-27, 2018.
VILAS-BÔAS, S.G.; ROESSNER, U.; HANSEN, M.A.E.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Metabolome Analysis an introduction. **Wiley-interscience**. EUA, 2007.

VILLAS-BOAS, S. G., MAS, S., AKESSON, M., SMEDSGAARD, J., NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. Center for Microbial Biotechnology, University of Denmark. **Wiley Periodicals**, Inc. 24, 613– 646, Denmark, 2004.

VLAANDEREN, J., MOORE, L. E., SMITH, M. T., LAN, Q., ZHANG, L., et al. Application of OMICS technologies in occupational and environmental health research; current status and projections. **Occupational and environmental medicine**, 67(2), 136-143, 2010.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**:- A Vida em Nível Molecular. Artmed Editora, 2014.

VUJIĆ, T., SCHVARTZ, D., ILIUK, A., SANCHEZ, J. C. Ubiquinone Metabolism and Transcription HIF-1 Targets Pathway Are Toxicity Signature Pathways Present in

Extracellular Vesicles of Paraquat-Exposed Human Brain Microvascular Endothelial Cells. **International journal of molecular sciences**, 22(10), 2021.

WANG, A.; ROBERTSON, J.L.; HOLLADAY, S.D.; TENNANT, A.H., et al. Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: Improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols. **Mutation Research**. v. 634, p. 51–59, 2007.

WANG, K., SUN, Z., YANG, L. *et al.* Respiratory Toxicity of Azoxystrobin, Pyraclostrobin and Coumoxystrobin on *Chlorella vulgaris*. **Bull Environ Contam Toxicol** 104, 799–803, 2020.

WANG, X., QIU, J., XU, Y., LIAO, G., JIA, Q., PAN, Y., et al. Integrated non-targeted lipidomics and metabolomics analyses for fluctuations of neonicotinoids imidacloprid and acetamiprid on Neuro-2a cells. **Environmental Pollution**, v. 284, 2021.

WANG, Y., TENG, M., WANG, D., YAN, J., MIAO, J., et al. Enantioselective bioaccumulation following exposure of adult zebrafish (*Danio rerio*) to epoxiconazole and its effects on metabolomic profile as well as genes expression. **Environmental Pollution**, v. 229, pages 264-271, 2017.

WENG, Y., HUANG, Z., WU, A., YU, Q., et al. Embryonic toxicity of epoxiconazole exposure to the early life stage of zebrafish. **Science of The Total Environment**, v.778, 2021:

WICKLUND, S., SJÖSTRÖM, L., MELLEROWICZ, E.J., EDLUND, U., SHOCKCOR, J.P., et al. Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. **Anal. Chem.**, 80, 115–122, 2008.

WILHELM, C.M., CALSING, A.K., DA SILVA, L.B. Assessment of DNA damage in floriculturists in southern Brazil. **Environ Sci Pollut Res**, 22, 8182–8189, 2015.

WISHART, D.S.; FEUNANG, Y.D.; MARCU, A.; GUO, A.C.; LIANG, K.; *et al.* HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Res**. V.46, D608–D617, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles Environmental Health Criteria**. No. 155. Geneva, Switzerland, 1993.

WORLEY B, POWERS R. PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability. **Curr Metabolomics**.4(2):97-103, 2016.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Curr. Metabolomics**, v.1, 92–107, 2013.

WU, T., YIN, F., GUANG, S., et al. The Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis pathway in human diseases. **Orphanet J Rare Dis** 15, 129, 2020.

WULTSCH, G., MIŠÍK, M., NERSESYAN, A., KNASMUELLER, S. Genotoxic effects of occupational exposure measured in lymphocytes of waste-incinerator workers. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 720(1-2), 3-7, 2011.

YAN, Q., PAUL, K. C., WALKER, D. I., FURLONG, M. A., DEL ROSARIO, I., et al. High-Resolution Metabolomic Assessment of Pesticide Exposure in Central Valley, California. **Chemical research in toxicology**, 34(5), 1337–1347, 2021.

YAN, S., MENG, Z., TIAN, S.T., TENG, M., YAN, J., et al. Neonicotinoid insecticides exposure cause amino acid metabolism disorders, lipid accumulation and oxidative stress in ICR mice. **Chemosphere**. V. 246, 2020.

YANG, G., WANG, Y., LI, J., WANG, D., BAO, Z., WANG, Q., JIN, Y. Health risks of chlorothalonil, carbendazim, prochloraz, their binary and ternary mixtures on embryonic and larval zebrafish based on metabolomics analysis. **Journal of hazardous materials**, 404, 2021.

YANG, X., ZHANG, M., LU, T., CHEN, S., SUN, X., GUAN, Y., et al. Metabolomics study and meta-analysis on the association between maternal pesticide exposome and birth outcomes. **Environmental Research**, v.182, 2020.

YANG, Y., LIN, M., TANG, J., MA, S., YU, Y. Derivatization gas chromatography negative chemical ionization mass spectrometry for the analysis of trace organic pollutants and their metabolites in human biological samples. **Anal Bioanal Chem**. V25, pg 6679-6690, 2020.

Yi-QIANGI, L., YU-LIN', W U; YUAN-GAOL, C.; ZHI-MING', K. Genotoxicity evaluation and a primary risk assessment of organic pollutants in the drinking water sources of Nanjing, China. **Journal of Environmental Sciences** Vol. 18, n° 5, pp. 983-988, 2006.
YUASA, Y. Epigenetics in Molecular Epidemiology of Cancer: A New Scope. **Advances in Genetics**, Vol. 71, 2010

ZHANG, Y., CHEN, D., XU, Y., MA, L., DU, M., LI, P., et al. Stereoselective toxicity mechanism of neonicotinoid dinotefuran in honeybees: New perspective from a spatial metabolomics study. **Science of The Total Environment**, v.809, 2022.

ZHONG, Z., HUANG, Y., HUANG, Q., ZHENG, S., HUANG, Z., DENG, W., Li, T. Serum metabolic profiling analysis of gout patients based on UPLC-Q-TOF/MS. **Clinica Chimica Acta**, v. 515, pg 52-60, 2021.

ZHOU, B., XIAO, J.F., TULIW, L., RESSOM, H.W. LC-MS-based metabolomics. **Mol. Bio Syst.**, v. 8, 470–481, 2012.

ANEXOS

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO DE PESQUISA

Estudo da genotoxicidade e do perfil metabólico de trabalhadores expostos aos agrotóxicos para identificação de potenciais biomarcadores no biomonitoramento da exposição ocupacional

Prezado (a) Senhor (a),

Você está sendo convidado(a), como voluntário, para participar de uma pesquisa que tem por objetivo avaliar a exposição humana aos agrotóxicos para identificação de possíveis novos biomarcadores por meio da análise de amostras de sangue utilizando plataformas analíticas e estatísticas aplicadas à metabolômica. Estas análises podem auxiliar nas ações de vigilância e na adoção de medidas de controle do risco, visando a proteção e prevenção da saúde do trabalhador. Sua participação compreenderá responder um questionário, de aproximadamente 15 minutos, sobre o seu estado de saúde, hábitos e manuseio de praguicidas, além da coleta de 10,0 mL do seu sangue e 50 mL de urina, em recipientes estéreis, apropriados e devidamente etiquetados para realização dos exames. Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por profissional experiente. Você tem o direito e total liberdade de não responder qualquer pergunta do questionário que julgue violar sua privacidade ou causar qualquer tipo de constrangimento ou desconforto. As amostras serão armazenadas no Biorrepositório da Faculdade de Farmácia e seu nome, os dados fornecidos e os resultados dos exames serão mantidos em segredo. Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará qualquer penalização ou prejuízo ao tratamento a que está sendo submetido nesta instituição. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias que deverão ser assinadas pelo pesquisador e participante, sendo que uma via será arquivada pelo pesquisador responsável, na Faculdade de Farmácia da UFMG e a outra será entregue a você. Para esclarecer qualquer dúvida sobre a sua participação neste estudo poderá ser apresentada à Profa. Maria José Nunes de Paiva ou à doutoranda Daniela Magalhães Nolasco (Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG). O Comitê de Ética da UFMG poderá também ser acionado em caso de dúvidas quanto aos procedimentos éticos da pesquisa.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Responsáveis pelo projeto

Profa. Maria José Nunes de Paiva Tel. 3409-6888 _____

Daniela Magalhães Nolasco Tel (31) 99156-2168 _____

Nome: _____

Documento de identidade: _____

Assinatura: _____ Data: __/__/__

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Campus Pampulha

CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG – Brasil - Email: coep@prpq.ufmg.br - Telefax: 31 3409-4592

ANEXO B - FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS

(Quando a questão não se aplicar anotar o número 99)

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

1. Data:		2. Nº:	
3. Nome do município de residência:		3.1 ()	(1) Zona Rural (2) Zona urbana
4. Endereço: (Rua, Av. etc.):			Nº:
5. Bairro:	6. Ponto de Referência:		7. Telefone:
8. Nome do município onde trabalha:		9. Local de Trabalho:	

II. DADOS DO PACIENTE

10. Nome do Paciente:		11. Sexo: ()		(1)M	(2)F
12. Gestante: ()				(1)Sim	(2)Não
13. Data de Nascimento:		14. Idade:		15. Anos de estudo*:	
16. Tabagismo: ()		16.1 ()Atual	16.2 ()Anterior	(1)Sim	(2)Não
17. Etilismo: ()		17.1 ()Atual	17.2 ()Anterior	(1)Sim	(2)Não
18. Ingestão de café: ()		18.1 Quantidade: ml/dia		(1)Sim	(2)Não

* A correspondência é feita de tal modo que cada série concluída com aprovação corresponde a 1 ano de estudo.

III. DADOS OCUPACIONAIS

19. Relação de Trabalho: ()					(1)Proprietário	(2)Assalariado	(3)Meeiro/Arrendatário	(4)Volante
					(5)Outro:			
20. Função: ()					(1)Administrativa	(2)Téc. Agrícola/Agrônomo	(3)Aplicador na Pecuária	
					(4)Puxa Mangueira	(5)Aplicador/Preparador de Calda	(6)Outros: (Agricultura Familiar)	
21. Contato com Praguicidas: ()					(1)Sim		(2)Não	
22. Há quanto tempo tem contato com praguicidas(venenos)?					anos			
23. Frequência do contato com praguicidas: (Anotar valor da multiplicação ano/meses/dias): ()								
Quantos meses por ano?			Quantos dias por mês?		Quantas horas por dia?			
24. Quando foi a última vez que teve contato (em dias) com um praguicida?								
25. Com qual produto teve contato pela última vez?								
26. Como aplica os produtos? ()					(1)Bomba costal (mochila)	(2)Mangueira	(3)Trator sem cabide	
					(4)Trator com cabine fechada	(5)Outros (especificar):		
27. Praguicidas de maior utilização (até três)		27.1 Nome comercial:						
		27.2 Princípio Ativo ou Classe Toxicológica:						
		27.3 Cultura/Lavoura:						
28. Principal Via de Exposição:()					(1)Cutânea	(2)Digestiva	(3)Respiratória	(4)Outra:

29. Já ficou doente por causa do veneno? ()	(1)Sim	(2)Não	
30. Quantas vezes você ficou doente por causa do veneno?()	(1)Uma única vez	(2)Mais de uma vez	
31. Alguma vez teve que ser internado? ()	(1)Sim	(2)Não	
32. Quantas vezes?()	(1)Uma única vez	(2)Mais de uma vez	
33. Há quanto tempo isto aconteceu?()	(1)Há menos de 10 anos	(2)Há mais de 10 anos	
34. Tipo de Contato:()	(1)Direto	(2)Indireto	(3)Sem contato
35. Utiliza Equipamentos de Proteção Individual:			
35.1 () Roupas impermeáveis apropriadas	35.4 () Máscaras	(1) Completo (2) Incompleto (3) Não	
35.2 () Bota apropriada	35.5 () Óculos de proteção		
35.3 () Luvas	35.6 () Protetor auricular		

IV. DADOS CLÍNICOS

36. Apresenta Doença Cardiovascular: ()	36.1 () Hipertensão arterial (pressão alta)		
36.2 () Hipotensão arterial (Pressão baixa)	36.3 () Arritmia (batedeira)	(1)Sim	(2)Não
37. Apresenta algum sinal/sintoma referente ao Sistema Nervoso Central Periférico? ()			
37.1 () Dor de cabeça	37.2 () Fraqueza muscular	37.3 () Tremedeira	
37.4 () Tremor muscular?...Palpebral?	37.5 () Visão Turva/Vista embaçada		
37.6 () Agitação/Irritabilidade	37.7 () Vertigens/Tonturas	37.8 () Formigamento em MMSS	
37.9 () Incoordenação Motora (Se não compreende pergunta, faça o teste Índex-nariz.)		(1)Sim	(2)Não
38. Do Aparelho Digestório? ()	38.1 () Cólicas/Dor de barriga	38.2 () Dor de estômago	
38.3 () Azia/Queimação	38.4 () Náuseas/Enjoo	38.5 () Vômito	38.6 () Diarreia
		(1)Sim	(2)Não
39. Do Aparelho Respiratório? ()	39.1 () Falta de ar	39.2 () Irritação Nasal (coceira/ardência)	
39.3 () Catarro ou escarro	39.4 () Tosse	(1)Sim	(2)Não
40. Do Aparelho Auditivo: ()	40.1 () Diminuição da audição	40.2 () Zumbido	
		(1)Sim	(2)Não
41. De Pele e Mucosa? O Sr (a) tem alguma coceira relacionada ao uso do agrotóxico? ()			
41.1 () A coceira veio depois de algum tempo que o sr(a) começou a trabalhar com o produto?(DC Sensibilizante)			
41.2 () Ou ela aparece logo que usa/prepara o produto? (DC Irritativa)			
41.3 () O Sr (a) tem irritação ocular (coceira, vermelhidão...), por causa do produto?		(1)Sim	(2)Não
42. Do Aparelho Urinário: ()	42.1 () Diminuição da urina (pouco)	42.2 () Urina escura/com sangue	
42.3 () Outro:		(1)Sim	(2)Não
43. Exposição Raio X ()	43.1 Data da última exposição:	(1)Sim	(2)Não

IX. DADOS ANTROPOMÉTRICOS

Peso	
Altura	
53. IMC	
54. CA	

X. CONDUTA

55. Você (ou sua esposa) teve ou tem dificuldade engravidar? ()	(1)Sim	(2)Não
56. Você (ou sua esposa) sofreu algum abortamento espontâneo? ()	(1)Sim	(2)Não
57. Tem filhos? ()	(1)Sim	(2)Não
58. Você tem algum filho com mal formação (congenita)? ()	(1)Sim	(2)Não
59. Você toma algum medicamento de uso contínuo? () Qual:	(1)Sim	(2)Não
60. Nos últimos dois meses você utilizou algum remédio para tratar micose? Qual:	(1)Sim	(2)Não

XI. PERGUNTAS FINAIS

61. Apresenta sangramento gengival? 61.1 - Frequência: () diária () semanal () mensal	(1)Sim	(2)Não
62. Apresenta dor nos ossos? 62.1 - Frequência: () diária () semanal () mensal	(1)Sim	(2)Não
63. Você teve Covid-19? 63.1 - Se sim, qual a gravidade: () sem gravidade () internação enfermaria () internação UTI 63.2 - Intubação: () sim () não Quanto tempo:	(1)Sim	(2)Não
64. Apresenta alguma comorbidade relacionada ao aumento da gravidade do Covid-19? () Hipertensão () diabetes mellitus () obesidade () doença pulmonar () anemia () alterações de coagulação () câncer () imunodeprimido		
64.1. Tomou algum medicamento para tratar a Covid-19? Quais?		
64.2. Apresenta algum tipo de sequela da Covid-19? Quais?		
65. Observações:		