

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade De Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Mirna Maciel d'Auriol Souza

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE EFEITO E METABOLÔMICA COM
MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL NA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA
DE CAMUNDONGOS C57BL/6 À MISTURA DE AGROTÓXICOS: glifosato,
imidacloprido e tebuconazol**

Belo Horizonte

2024

Mirna Maciel d'Auriol Souza

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE EFEITO E METABOLÔMICA COM
MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL NA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA
DE CAMUNDONGOS C57BL/6 À MISTURA DE AGROTÓXICOS: glifosato,
imidacloprido e tebuconazol**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de doutora em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Dr.^a Leiliane Coelho André
Coorientadora: Dr.^a Angélica Thomaz Vieira

Belo Horizonte
2024

S729a Souza, Mirna Maciel d'Auriol.
Avaliação de biomarcadores de efeito e metabolômica com modulação da microbiota intestinal na exposição subcrônica de camundongos C57BL/6 à mistura de agrotóxicos [recurso eletrônico] : glifosato, imidacloprido e tebuconazol / Mirna Maciel d'Auriol Souza. – 2024.

1 recurso eletrônico (212 f.) : pdf

Orientadora: Leiliane Coelho André.
Coorientadora: Angélica Thomaz Vieira.

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. Disruptores endócrinos – Teses. 2. Agrotóxicos – Teses. 3. Metabolômica – Teses. 4. Microbiota – Teses. I. André, Leiliane Coelho. II. Vieira, Angélica Thomáz. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:615.9



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

"Avaliação de biomarcadores de efeito e metabólica com modulação da microbiota intestinal na exposição subcrônica de camundongos C57bl/6 à mistura de agrotóxicos: glifosato, imidacloprido e tebuconazol"

MIRNA MACIEL D'AURIOL SOUZA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinte e nove de maio de dois mil e vinte e quatro**, 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:

Profa. **Leiliane Coelho Andre** - Orientadora

UFMG

Profa. **Angelica Thomaz Vieira** - Coorientadora

UFMG

Profa. **Isarita Martins Sakakibara**

Unifal

Prof. **Flaviano dos Santos Martins**

UFMG

Profa. **Karina Braga Gomes Borges**

UFMG

Profa. **Ana Paula Lucas Mota**

UFMG

Profa. **Carmen Ildes R. Fróes Asmus**

UFRJ

Belo Horizonte, 29 de maio de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Isarita Martins Sakakibara, Usuário Externo**, em 05/06/2024, às 09:35, 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 **Karina Braga Gomes Borges, Professora do Magistério Superior**, em 05/06/2024, às 10:43, 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 **Carmen Ildes Rodrigues Fróes Asmus, Usuária Externa**, em 05/06/2024, às 12:46, 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 **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 05/06/2024, às 12:47, 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) de unidade**, em 05/06/2024, às 13:06, 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 **Ana Paula Lucas Mota, Professora do Magistério Superior**, em 05/06/2024, às 13:16, 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 **Angelica Thomaz Vieira, Professora do Magistério Superior**, em 05/06/2024, às 13:56, 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 **3248633** e o código CRC **6E7A8ED3**.

Dedico esta tese aos camundongos.

Sem eles, não haveria esta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, vida do universo.

Aos meus pais, pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, Douglas e Sérgio, e cunhadas, Priscila e Raquel, pelo apoio de sempre.

À Elisa, minha sobrinha, que sempre me proporciona conversas profundas sobre a vida.

À minha orientadora Leiliane, pela oportunidade.

À minha coorientadora Angélica, pela confiança.

À Sumaia, minha companheira de laboratório, que me ajudou em muitos momentos, pela amizade e apoio, tenho muito a agradecer.

À prof. Maria José, pelo companheirismo.

Aos colegas do LMI: Viviani, Clênio, Victor, Érika e Isabela. Sem vocês, este trabalho não seria possível.

À Paola e à professora Jacqueline Alvarez, pela colaboração nas análises de estresse oxidativo.

Ao professor Geovanni Cassali, pela colaboração na análise histopatológica.

À Vanessa Faria, pela análise da ração na Funed.

À professora Brenda Porto, pela enorme ajuda com as análises metabolômicas.

Aos meus amigos da Faculdade de Farmácia: Vanessa, Ludmila, Anna Cláudia, Camila, Tainá, Larissa, Daniela, Norberto, Vanderli, Eduardo, Élide e Anderson.

À minha amiga Kátia, por todos os anos de amizade.

Ao programa de pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, à Faculdade de Farmácia e à UFMG.

Ao departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, em especial ao chefe professor Vicente Toledo.

À Bioclin e ao programa Educar, pelo o fornecimento dos kits de análises gratuitos.

Às agências de fomento.

“As raízes do estudo são amargas, mas seus frutos são doces.”

Aristóteles

RESUMO

Os agrotóxicos são considerados desreguladores endócrinos e, por um período de exposição crônica, podem desencadear doenças metabólicas, como obesidade e diabetes mellitus. A exposição a estes compostos geralmente é por via oral com a ingestão de alimentos. O primeiro contato com o organismo é pelo trato gastrointestinal e, conseqüentemente, a microbiota intestinal que, quando afetada, ocorre a chamada disbiose. O objetivo deste trabalho foi avaliar a exposição subcrônica de uma mistura de agrotóxicos (imidacloprido, tebuconazol e glifosato) em baixas doses por meio do estudo de genotoxicidade e metabolômica *untargeted* e o impacto na microbiota com a modulação pelo probiótico *Bifidobacterium longum* 5^{1A}. Para isso, foram utilizados 4 grupos de animais: Controle (CTRL); Agrotóxicos (AGT); Probiótico (PROB) e Mistura e Probiótico (AGT+PROB). Os parâmetros avaliados foram: peso corporal; peso relativo dos órgãos (fígado, baço, rins e tecido adiposo periuterino); glicemia jejum; sensibilidade à insulina; colesterol total e triglicérides séricos; estresse oxidativo (peroxidação lipídica e atividade da superóxido dismutase); avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO), avaliação histopatológica (baço, intestino grosso e rins); microbiota intestinal; produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC, acetato e butirato); teste de micronúcleos e análise de estudo da metabolômica com abordagem *untargeted*. A exposição aos agrotóxicos em baixas doses não alterou peso corporal, peso relativo dos órgãos e histopatologia, mas causou aumento do colesterol total, diminuição dos triglicérides séricos e resistência à insulina, sem alterar a glicemia jejum dos animais; diminuiu a atividade da MPO no baço; e apresentou efeito genotóxico, aumentando a frequência de micronúcleos (MN) no sangue periférico dos animais. A modulação da microbiota intestinal por *B. longum* 5^{1A}, apesar da mistura ter prejudicado crescimento e metabolismo de AGCC das bactérias por diminuição da produção de acetato e butirato, conseguiu auxiliar os animais expostos a reduzir a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, o estresse oxidativo, em via independente à produção de AGCC. A análise metabolômica *untargeted* por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas identificou que a mistura de agrotóxicos produziu toxicidade por múltiplos mecanismos, mas principalmente por estresse oxidativo, afetando o metabolismo energético dos animais expostos por alterar o ciclo de ácido tricarbóxico, metabolismo da galactose, via do glioxilato e biossíntese de ácidos carbóxicos, confirmando as alterações no colesterol total, triglicérides e resistência à insulina. O probiótico *B. longum* 5^{1A} conseguiu reverter os danos causados pelo estresse oxidativo da mistura de agrotóxicos, visualizado na análise metabolômica pela redução dos metabólitos glutamina, ácido málico, ácido glicônico e ácido 2-hidroxi-butírico. Assim, sugere-se que a modulação por *B. longum* 5^{1A} otimizou o metabolismo de carboidratos/energético dos animais, equilibrando as reações anabólicas e catabólicas e controlando a via das pentoses fosfato e NADPH, aliviando o estresse oxidativo. Os dados deste estudo sugerem que a mistura de agrotóxicos de imidacloprido, tebuconazol e glifosato, em baixas doses e por período subcrônico, é desreguladora endócrina, atuando sobre a microbiota intestinal e levando à disbiose, e causando estresse oxidativo, que acarreta em alterações no colesterol total, dos triglicérides séricos e na resistência à insulina. Estes resultados também sugerem que a microbiota intestinal pode ser utilizada como biomarcador de suscetibilidade à exposição ambiental a agrotóxicos em baixas doses.

PALAVRAS-CHAVE: Desregulação endócrina; agrotóxicos; imidacloprido; tebuconazol; glifosato; metabolômica, microbiota.

ABSTRACT

Pesticides are considered endocrine disruptors and, with chronic exposure, can trigger metabolic diseases such as obesity and diabetes mellitus. Exposure to these compounds is usually oral through the ingestion of food. The first contact with the body is through the gastrointestinal tract and, consequently, the gut microbiota, which, when affected, leads to dysbiosis. The aim of this study was to evaluate the subchronic exposure to a mixture of pesticides (imidacloprid, tebuconazole, and glyphosate) at low doses through genotoxicity and untargeted metabolomics studies and the impact on the microbiota with modulation by the probiotic *Bifidobacterium longum* 5^{1A}. For this, four groups of animals were used: Control (CTRL); Mixture (AGT); Probiotic (PROB); and Mixture and Probiotic (AGT+PROB). The parameters evaluated were: body weight; relative weight of organs (liver, spleen, kidneys, and periuterine adipose tissue); fasting glucose; insulin sensitivity; total cholesterol and serum triglycerides; oxidative stress (lipid peroxidation and superoxide dismutase activity); myeloperoxidase (MPO) activity evaluation; histopathological evaluation (spleen, large intestine, and kidneys); gut microbiota; short-chain fatty acid (SCFA) production (acetate and butyrate); micronucleus test; and untargeted metabolomics analysis. Exposure to pesticides at low doses did not alter body weight, relative weight of organs, or histopathology but caused an increase in total cholesterol, a decrease in serum triglycerides and insulin sensitivity, without altering fasting glucose in the animals; decreased MPO activity in the spleen; and showed a genotoxic effect, increasing the frequency of micronuclei (MN) in the peripheral blood of the animals. The modulation of the gut microbiota with *B. longum* 5^{1A}, despite the mixture having harmed SCFA production of the bacteria by decreasing acetate and butyrate production, helped exposed animals reduce lipid peroxidation and, consequently, oxidative stress, via an independent pathway of SCFA production. Untargeted metabolomics analysis by gas chromatography-mass spectrometry identified that the pesticide mixture produced toxicity through multiple mechanisms, but mainly through oxidative stress, affecting the energy metabolism of exposed animals by altering the tricarboxylic acid cycle, galactose metabolism, glyoxylate pathway, and carboxylic acid biosynthesis, confirming alterations in total cholesterol, triglycerides, and insulin sensitivity. The probiotic *B. longum* 5^{1A} managed to reverse the damage caused by oxidative stress from the pesticide mixture, as seen in the metabolomics analysis by the reduction of metabolites such as glutamine, malic acid, gluconic acid, and 2-hydroxybutyric acid. Thus, it is suggested that modulation by *B. longum* 5^{1A} optimized the carbohydrate/energy metabolism of the animals, balancing anabolic and catabolic reactions and controlling the pentose phosphate and NADPH pathways, alleviating oxidative stress. The data from this study suggest the mixture of imidacloprid, tebuconazole, and glyphosate pesticides, at low doses and for a subchronic period, is an endocrine disruptor, affecting the gut microbiota and causing dysbiosis, and causing oxidative stress, which leads to alterations in total cholesterol, serum triglycerides, and insulin sensitivity. These results also suggest the gut microbiota can be used as a biomarker of susceptibility to environmental exposure to pesticides at low doses.

KEYWORDS: Endocrine disruption; pesticides; imidacloprid; tebuconazole; glyphosate; metabolomics; microbiota.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – As principais características dos desreguladores endócrinos (DEs).	41
Figura 2 – Mecanismo de ação do estresse oxidativo causado pelo agrotóxico tebuconazol. .	49
Figura 3 – Formação dos hidroperóxidos lipídicos.	54
Figura 4 – Esquema de formação de micronúcleos.	57
Figura 5 – Diagrama simplificado de quebra de polissacarídeos e as principais vias de fermentação de carboidratos pela microbiota intestinal no intestino grosso.	63
Figura 6 – Mecanismos de desintoxicação de contaminantes ambientais alimentares por cepas probióticas.	66
Figura 7 – Uma correlação entre as principais estratégias-ômicas utilizadas em estudos de biologia de sistemas.	68
Figura 8 – Fluxo de trabalho da metabolômico Untargeted (global - roxo) e Targeted (alvo - azul).	72
Figura 9 – Interação entre as vias metabólicas não lineares.	82
Figura 10 – Estrutura química dos monossacarídeos Tagatose (cetose 6C), Galactose (aldose 6C); Frutose (cetose 6C), Lisose (aldose 5C) e Lactose (Galactose + Glicose).	86
Figura 11 – Fluxograma dos tratamentos dos camundongos C57bl/6 fêmeas.	94
Figura 12 – Esquema da análise da microbiota cultivável.	101
Figura 13 – Esquema para diluição seriada para dosagem de proteína total pelo método de Lowry.	105
Figura 14 – Avaliação do peso corporal dos camundongos expostos e não expostos a mistura de agrotóxicos. (acompanhamento semanal do ganho/ perda de massa corporal, em porcentagem).	117
Figura 15 – Avaliação da sensibilidade à insulina dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos. Glicemia através dos tempos 0, 15, 30 e 60. AUC: área sob a curva.	120
Figura 16 – Avaliação da atividade da MPO no baço e intestino grosso dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos. A: baço; B: intestino grosso.	123

Figura 17 – Análise histopatológica dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.	127
Figura 18 – Avaliação da microbiota cultivável dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.	129
Figura 19 – Análise dos ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo intestinal dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.	131
Figura 20 – Avaliação do estresse oxidativo no fígado dos animais expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.	135
Figura 21 – Avaliação da frequência de micronúcleos em sangue periférico de camundongos expostos à mistura de agrotóxicos.	136
Figura 22 – Normalização pela Soma, transformação logarítmica e auto escalonamento realizado nos dados dos animais expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.	140
Figura 23 – Modelo de análise de componentes principais (PCA) dos animais expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos e as amostras do controle de qualidade (QCs).	141
Figura 24 – Modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) indicando efetiva discriminação entre os grupos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.	142
Figura 25 – Classificação do modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) pela validação cruzada.	142
Figura 26 – Valores da pontuação de Variáveis Importantes da Projeção (VIP) de onze metabólitos identificados no modelo da Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) dos animais expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.	143
Figura 27 – Análise estatística (não-paramétrica) do ácido láctico, ureia, glicose e ácido 2-cetoisocaproico dos animais expostos e não-expostos à mistura de agrotóxicos.	146
Figura 28 – Análise estatística (não-paramétrica) dos metabólitos do ciclo do glioxilato: ácido glicólico, ácido glicérico e ácido oxálico nos animais expostos e não-expostos à mistura de agrotóxicos.	147
Figura 29 – Análise estatística (não-paramétrica) dos metabólitos do ciclo do glioxilato: ácido glicólico, ácido glicérico e ácido oxálico nos animais expostos e não-expostos à mistura de agrotóxicos.	151
Figura 30 – Avaliação do peso corporal dos animais por acompanhamento semanal do ganho/perda de massa corporal, em porcentagem, de todos os grupos que foram expostos e tratados.	152

Figura 31 – Avaliação pareada da Glicose Jejum (6h), comparação entre 3 e 6 semanas de tratamento para o grupo tratado com o Probiótico.....	153
Figura 32 – Avaliação da sensibilidade à insulina dos camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico.	154
Figura 33 – Avaliação da microbiota cultivável nos camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico.	157
Figura 34 – Análise dos AGCCs do conteúdo intestinal nos camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico.....	158
Figura 35 – Avaliação do Estresse oxidativo nos camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico.	159
Figura 36 – Avaliação da frequência de micronúcleos em sangue periférico de camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico.....	161
Figura 37 – Ensaio de Micronúcleos em sangue periférico de camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico.....	163
Figura 38 – Modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) indicando a discriminação dos quatro grupos (CTR, AGT, PROB e AGT+PROB).	165
Figura 39 – Classificação do modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) pela validação cruzada dos quatro grupos (CTR, AGT, PROB e AGT+PROB).....	165
Figura 40 – Análise estatística (não-paramétrica) tagatose nos quatro grupos (CTR, AGT, PROB e AGT+PROB).	166
Figura 41 – Modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) indicando efetiva discriminação entre os grupos tratados e não tratados com B. longum 51A.....	167
Figura 42 – Classificação do modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) pela validação cruzada entre os grupos tratados e não tratados com B. longum 51A.....	168
Figura 43 – Valores da pontuação VIP de 22 metabólitos identificados no modelo de PLS-DA entre os grupos tratados e não tratados com B. longum 51A.....	168
Figura 44 – Modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) indicando efetiva discriminação entre os grupos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com o probiótico B. longum 51A.....	172

Figura 45 – Classificação do modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) pela validação cruzada dos grupos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com o probiótico B. longum 51A.	173
Figura 46 – Valores da pontuação VIP de 20 metabólitos identificados no modelo de PLS-DA dos grupos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com o probiótico B. longum 51A.	173
Figura 47 – Visão geral da análise das vias metabólicas alteradas pela exposição à mistura de agrotóxicos e tratamento com o probiótico B. longum 51A.	175
Figura 48 – Análise estatística (não-paramétrica) do ácido glicônico em camundongos não-expostos e expostos à mistura de agrotóxicos, não-tratados e tratados com o probiótico B. longum 51A.	177
Figura 49 – Análise estatística (não-paramétrica) dos aminoácidos em camundongos não-expostos e expostos à mistura de agrotóxicos, não-tratados e tratados com o probiótico B. longum 51A.	178
Figura 50 – Análise estatística (não-paramétrica) do ácido cítrico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico e ácido málico em camundongos não-expostos e expostos à mistura de agrotóxicos, não-tratados e tratados com o probiótico B. longum 51A.	179
Figura 51 – Análise estatística (não-paramétrica) do ácido 2-hidroxi-butírico em camundongos não-expostos e expostos à mistura de agrotóxicos, não-tratados e tratados com o probiótico B. longum 51A.	180
Figura 52 – Análise estatística (não-paramétrica) dos ácidos graxos palmítico, oleico, linoleico e esteárico e do glicerol em camundongos não-expostos e expostos à mistura de agrotóxicos, não-tratados e tratados com o probiótico B. longum 51A.	181
Figura 53 – Análise estatística (não-paramétrica) dos ácidos glicérico, glicólico e oxálico em camundongos não-expostos e expostos à mistura de agrotóxicos, não-tratados e tratados com o probiótico B. longum 51A.	182
Figura 54 – Resumo gráfico das conclusões do estudo da exposição subcrônica de camundongos C57bl/6 a mistura de agrotóxicos glifosato, imidacloprido e tebuconazol	184

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos principais inseticidas sintéticos orgânicos, baseada na natureza de suas estruturas químicas, de acordo com Comitê de Ação de Resistência a Inseticidas (IRAC 2016).....	33
Tabela 2 – Principais vias metabólicas alteradas por exposição a agrotóxicos (continua).	80
Tabela 3 – Principais representantes de cada classe de agrotóxicos detectados nos relatórios PARA 2013-2015 e PARA 2017-2018 (parcial), números de culturas permitidas (arroz, feijão, tomate, cebola, batata, cenoura, alface, banana, laranja, maçã, mandioca) e ranking geral de detecção em cada relatório.	91
Tabela 4 – Doses de escolha para o tratamento dos camundongos a partir das doses de DL50, NOAEL, para estudos em camundongos, e IDA preconizados pela ANVISA, para os agrotóxicos Imidacloprido, Tebuconazol e Glifosato.	92
Tabela 5 – Protocolo de exposição à mistura de agrotóxicos e tratamento com o probiótico..	94
Tabela 6 – Preparo das diluições utilizadas no cultivo das fezes para análise da microbiota cultivável, por técnica de microgotas (10 µL), em cada meio de cultura, a partir da diluição inicial de 1:10 em solução salina 0,9% estéril.....	100
Tabela 7 – Volumes das soluções utilizadas para o preparo da curva de calibração matrizada (por adição de padrão) para análise de ácido graxos de cadeia curta em fezes/ conteúdo intestinal por CLAE-UV.	102
Tabela 8 – Condições cromatográficas do CLAE-UV para análise de ácidos graxos de cadeia curta em fezes/ conteúdo intestinal.	103
Tabela 9 – Volumes das soluções utilizadas para o preparo da curva de calibração para análise de proteína total pelo método de Lowry, por espectrometria.....	105
Tabela 10 – Volumes das soluções utilizadas para o preparo da curva de calibração para análise de malondialdeído pelo método de TBARS, por espectrometria.....	106
Tabela 11 – Volumes das soluções utilizadas para o preparo da curva de calibração para análise da atividade de Superóxido dismutase (SOD) pela oxidação do pirogalol, por espectrometria.	107
Tabela 12 – Comparação da Composição das rações Comercial Presence Labina Peletizada Para Ratos, Camundongos e Roedores e fórmula padrão AIN 93.	115
Tabela 13 – Análise do Peso Relativo (%) dos órgãos Fígado, Baço, Rim e Gordura periuterina dos camundongos expostos e não expostos a mistura de agrotóxicos.	117

Tabela 14 – Avaliação da Glicose jejum (3 semanas e 6 semanas) dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.	119
Tabela 15 – Valores de Colesterol Total e Triglicérides séricos em camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.	121
Tabela 16 – Metabólitos discriminadores na análise metabolômica pela técnica CG-EM, no soro de camundongos expostos à mistura de agrotóxicos.	144
Tabela 17 – Aminoácidos, seus precursores e abundância (tendência) no soro de camundongos expostos à mistura de agrotóxicos via análise metabolômica. ND: não detectado; ↑ aumento; ↓ diminuição.	149
Tabela 18 – Valores de Colesterol Total e Triglicérides séricos nos camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico.	155
Tabela 19 – Metabólitos discriminadores na análise metabolômica pela técnica CG-EM, no soro do grupo tratados com <i>B. longum</i> 5 ^{1A} comparados com os animais não tratados. .	169
Tabela 20 – Metabólitos discriminadores na análise metabolômica pela técnica CG-EM, no soro de camundongos expostos à mistura de agrotóxicos) comparado com os tratados com o probiótico <i>B. longum</i> 5 ^{1A}	174

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AB – Ácidos biliares
- AChE – Acetilcolinesterase
- AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta
- AGT – Agrotóxicos
- AGT+PROB – Agrotóxico e Probiótico
- AhR – Receptor de arilhidrocarboneto
- AMDIS – do inglês, *Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System*
- AMP – monofosfato de adenosina
- AMPA – Ácido aminometilfosfônico
- ANI93 – Fórmula padronizada de ração para roedores
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCI – do inglês, *Atmospheric pressure chemical ionization*
- APPI – do inglês, *Atmospheric pressure photoionization*
- AR – Receptor de androgênicos
- ATP – Adenosina Trifosfato
- AUC – Área sob a curva
- BAL – Bactérias ácido lácticas
- BBE – ágar Bacteroides Bile Esculina adicionado de 0,1% v/v de gentamicina
- BE – Ágar Bile Esculina
- BGs – β -glucuronidases
- BSTFA – bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
- CAT – Catalase
- CAZ – enzimas polissacarídeo-liases
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CG – Cromatografia Gasosa
- CI – do inglês, *chemical ionization*
- CL – Cromatografia Líquida
- CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência
- CoA – CoenzimaA
- CoASH – tio-éster da coenzimaA
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CTE – Cadeia de transporte de elétrons
CTRL – controle
CYP450 – citocromo P 450
DDT – agrotóxico 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-cloro-fenil) etano
DE – Desregulações endócrinas
DL – Dose Letal
DM2 – Diabetes *mellitus* 2
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DP – Desvio padrão
DPR – desvio padrão relativo
EDSP – Programa de Triagem de Desreguladores Endócrinos (, do inglês *Endocrine Disruptor Screening Program*)
EFSA – do inglês, *European Food Safety Authority*
EI – do inglês, *Electron Impact*
EM – espectrometria de massas
EMBRAPA – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária
EPA – do inglês *Environmental Protection Agency*, Agência de Proteção Ambiental
ERO – Espécie reativa de oxigênio
ERRg – Receptor G relacionado ao estrogênio
ER α – Receptor nucleares de estrogênio α
ER β – Receptor nucleares de estrogênio β
ESI – do inglês, *Electrospray Ionization*
EURACHEM – Rede de organizações de química na Europa
F.A.M.E. mix – do inglês, *Fatty Acid Methyl Esters*)
FAO – do inglês *Food and Agriculture Organization*; Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA – do inglês, *Food and Drug Administration*
FISPQ – Ficha de informações sobre segurança de produto químico
FOX – reagente de oxidação ferrosa/laranja de xilenol
FRAC – Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas
G6PD – glicose-6-fosfato desidrogenase
GABA – ácido gama-aminobutírico
GGT – Gama glutamil transpeptidase
GOT – Transaminase Glutâmica Oxaloacética

GPR – Receptor acoplado à proteína G
Gpr43 ou FFAR2 – Receptor acoplado à proteína G
GPT – transaminase glutâmico pirúvica
GPx – Glutathione peroxidase
GR – glutathione reductase
GSH – Glutathione
GST – glutathione-S-transferase
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HDL – do inglês High Density Lipoproteins
HE – Hematoxilina–Eosina
HMB-CoA – do inglês, *β-Hydroxy β-methylglutaryl-CoA*)
HMDB – do inglês, *Human Metabolome Database*
HOCl – Ácido hipocloroso
HP – Histopatologia
HPAs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC – do inglês, *High-performance liquid chromatography*
HT – Hormônio da tireoide
IA – Ingrediente ativo
IARC– do inglês, *International Agency for Research on Cancer*)
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB – Instituto de ciências biológicas
IDA – Ingestão diária aceitável
IL – interleucina
IOM/FUNED – Instituto Octávio Magalhães, Fundação Ezequiel Dias
IPCS – do inglês, *International Programme on Chemical Safety*
KEGG – do inglês, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
LABIN – Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional
LDL – do inglês Low Density Lipoproteins
LMR – Limites Máximos de Resíduos
m/z – relação massa/ carga
MALDI – do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA – malondialdeído

MN – Micronúcleo

MPO – Mieloperoxidase

MPP – Mass Profiler Professional

MRS – ágar De Man, Rogosa e Sharpe

MSTFA – N-trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida

nA-ChRs – Receptores nicotínicos de acetilcolina pós-sinápticos

NADH – do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

NADPH – do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

NIST – do inglês, *National Institute of Standards and Technology*

NOAEL – do inglês, *No Observed Adverse Effect Level*

NR – Receptores nucleares

O.D. – Densidade óptica

OECD – do inglês *Organisation for Economic Co-operation and Development*

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPLS-DA – do inglês *Orthogonal partial least squares-discriminant analysis*

PARA – Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos

PBS – tampão fosfato

PCA – do inglês *Principle Component Analysis*

PCE – do inglês, *polychromatic erythrocytes*

PEP – fosfoenolpiruvato

PL – Projeto de lei

PLS-DA – do inglês *Partial Least-Squares Discriminant Analysis*

POF – Pesquisa orçamento familiar

PPAR – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

PPP – Produtos Protetores de Plantas

PRESS – do inglês *predicted residual error sum of squares*

PROB – Probiótico

PVDF – acetato de celulose

PXR – Receptor X do pregnano

Q2 – fração da variância de y/Y

QC – Controle de Qualidade

QqQ – triplo quadrupolo

QTOF – Quadrupolo com tempo de voo

R2 – fração da variância X ou y/Y

RMN – espectroscopia de ressonância magnética nuclear
RT – Tempo de retenção
RXR – Receptor X do retinoide
SISAGUA – Sistema de monitoramento das águas
SNC – Sistema Nervoso Central
SNVS – Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SOD – Superóxido dismutase
TAB – Tecido adiposo branco
TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA – do inglês *tricarboxylic acid*; ciclo do ácido cítrico; ciclo de Krebs
TCD4+ – Linfócito T CD4+
TG – Triglicérides
TGI – Trato gastrointestinal
TIC – do inglês, *Total Ion Chromatogram*
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TOF – Tempo de voo
TR – Receptor tireoidianos
TTP – Trifenilfosfina
UFC – Unidades formadoras de colônias
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UV – Ultravioleta
VIP – do inglês, *Variable Importance on the Projection*
VLDL – do inglês Very Low Density Lipoproteins
 α KG – alfa-cetogluturato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 Agrotóxicos	30
2.1.1 Introdução.....	30
2.1.2 Desreguladores Endócrinos.....	39
2.1.3 Aspectos toxicológicos dos agrotóxicos Imidacloprido, Tebuconazol e Glifosato .	45
2.1.4 Avaliação da exposição aos agrotóxicos.....	51
2.2 Microbiota Intestinal	59
2.2.1 Modulação da microbiota.....	64
2.3 Análise Metabolômica	68
2.3.1 Fluxo de trabalho.....	71
2.3.2 Preparo de Amostra.....	72
2.3.2 Técnicas analíticas.....	73
2.3.4 Processamento dos dados e Análise Estatística.....	75
2.3.5 Identificação e Interpretação Biológica.....	79
2.3.6 Principais vias metabólicas alteradas pelos agrotóxicos.....	80
3 OBJETIVO GERAL	88
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	88
4 MATERIAIS E MÉTODOS	89
4.1 Animais	89
4.2 Escolha dos Agrotóxicos	89
4.3 Estudo subcrônico e escolha das doses.....	91
4.4 Mistura de Agrotóxicos (AGT) – Preparo	92
4.5 Probiótico <i>Bifidobacterium longum</i> 5^{1A} - Preparo e tratamento.....	92
4.6 Desenho Experimental.....	93
4.7 Eutanásia	95
4.8 Estudo dos parâmetros bioquímicos e histopatológicos	96
4.8.1 Acompanhamento do Peso Corporal e cálculo do Peso Relativo	96
4.8.2 Avaliação da Glicose Jejum e da Sensibilidade à Insulina	96
4.8.3 Avaliação de Colesterol Total e Triglicérides.....	97
4.8.4 Avaliação da atividade da Mieloperoxidase.....	98
4.8.5 Avaliação Histopatológica	99
4.8.6 Análises Estatísticas	99

4.9 Avaliação da Microbiota Intestinal	100
4.9.1 Avaliação da microbiota fecal cultivável.....	100
4.9.2 Avaliação dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC) em Conteúdo Intestinal/ Fezes.....	101
4.10 Avaliação dos biomarcadores de efeito	103
4.10.2 Avaliação do Estresse Oxidativo.....	103
4.10.2 Ensaio de Micronúcleo.....	107
4.10.3 Análises Estatísticas.....	108
4.11 Análise Metabolômica	108
4.11.1 Preparo das amostras.....	109
4.11.2 Condições analíticas do CG-EM.....	110
4.11.3 Pré-processamento dos dados.....	111
4.11.4 Processamento dos dados.....	112
4.11.5 Análise Uni e Multivariada.....	112
4.11.6 Interpretação biológica.....	113
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
5.1 Análise da ração	114
5.2 Avaliação da exposição à mistura de agrotóxicos	116
5.2.1 Estudo dos parâmetros bioquímicos e histopatológicos dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.....	116
5.2.2 Avaliação da Microbiota dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.....	127
5.2.3 Biomarcadores de efeito nos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.....	134
5.2.4 Análise Metabolômica no soro dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.....	138
5.3 Avaliação da modulação da microbiota intestinal	152
5.3.1 Estudo dos parâmetros bioquímicos e histopatológicos dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos, tratados e não-tratados com o probiótico <i>B.</i> <i>longum</i> 5 ^{1A}	152
5.3.2 Avaliação da Microbiota dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos, tratados e não-tratados com o probiótico <i>B.longum</i> 5 ^{1A}	155
5.3.3 Biomarcadores de efeito nos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos, tratados e não-tratados com o probiótico <i>B. longum</i> 5 ^{1A}	159
6 CONCLUSÕES	183
REFERÊNCIAS	186

ANEXOS	214
---------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que um terço da produção agrícola mundial seja cultivada utilizando agrotóxicos, sendo gastos, mundialmente, 38 bilhões de dólares com estas substâncias a cada ano. Para justificar, utiliza-se a premissa de que a população humana está em rápido crescimento e que é necessário aumentar a produção de alimentos. Desta forma, a pressão constante sobre o uso intensivo destas substâncias químicas se mantém. No entanto, assim como a produção agrícola foi “otimizada” pelo emprego de agrotóxicos, o uso excessivo destes produtos e a poluição também aumentaram levando a um grande risco à saúde (Carvalho, 2017; Lopes; Albuquerque, 2018; Zhang, 2018; Miglani; Bisht, 2019).

Agrotóxicos (AGT) são utilizados há décadas, em atividades como agropecuária, madeireiras, silvicultura, dedetização urbana, campanhas de saúde pública, para controlar pragas (insetos, fungos, ervas daninhas) que ameaçam a agricultura e a saúde humana ou animal. À medida que o uso de vários tipos (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides etc.) foi disseminado e o conhecimento de sua persistência no ambiente descoberto, fato relatado pela primeira vez por Rachel Carson em seu livro *Primavera Silenciosa*, a preocupação sobre as implicações da exposição humana tornou-se crescente. A exposição humana a agrotóxicos pode acontecer por exposição direta (ocupacional) ou indireta, por contaminação ambiental, onde ocorre a infiltração dessas substâncias no solo e/ou recalcitrância aos tratamentos da água, e ainda resíduos das aplicações nas lavouras (Akhtar *et al.*, 2009, Marchi *et al.*, 2015, Carvalho *et al.*, 2017; Hayton *et al.*, 2017).

A corrente utilização de mais de um agrotóxico na prática agrícola, que pode ser resultante da aplicação de diferentes tipos de Produtos Protetores de Plantas (PPP, do inglês *Plant Protection Products*), como herbicidas, inseticidas e fungicidas, ou por formulações contendo mais de um agrotóxico com diferentes modos de ação no organismo alvo (estratégia adotada no manejo integrado de pragas e nas boas práticas agrícolas), tornou-se mais uma preocupação para a utilização destas substâncias. Dentre os agrotóxicos mais comercializados e com seus resíduos mais detectados em alimentos de origem vegetal, no Brasil e no mundo, estão o glifosato, o imidacloprido e o tebuconazol (Guo *et al.*, 2018; Iturburu *et al.*, 2019; ANVISA, 2023; Dong *et al.*, 2024).

O risco potencial a longo prazo para os seres humanos e para o meio ambiente está relacionado ao fato de os agrotóxicos exercerem efeitos tóxicos à saúde por perturbar a homeostase de organismos não-alvos, causando, por exemplo, inflamação, estresse oxidativo e distúrbios intestinais, e, conseqüentemente, doenças metabólicas, como diabetes mellitus 2 (DM2) e obesidade, e câncer (Feng *et al.*, 2018; Maia *et al.*, 2020; Tekeli *et al.*, 2021). Além disso, são desreguladores endócrinos (Sun *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2018; Mzid *et al.*, 2018; Berrouagye *et al.*, 2019; Ndonwi *et al.*, 2019; Fernandez-Vizcaíno *et al.*, 2020; Kale *et al.*, 2020; Ndonwi *et al.*, 2020; Othmere *et al.*, 2020; Ruuskanen *et al.*, 2020; Gomes *et al.*, 2021; Kwon *et al.*, 2021; Prasad *et al.*, 2022; Chandran *et al.*, 2023).

Em concentrações muito baixas, hormônios regulam o metabolismo do sistema endócrino de gorduras, carboidratos e proteínas e garante que essas fontes de energia consigam suprir as necessidades do organismo em todos os momentos. Os hormônios, nesse caso, são responsáveis pelo armazenamento do excesso do “combustível” na abundância e de sua mobilização em momentos de necessidade, por meio da manutenção de níveis constantes de glicose no sangue (Darbre, 2017). Partindo deste princípio, desreguladores endócrinos (DE) são definidos como substâncias que interferem com a produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo, prejudicando a homeostase e desregulação os processos de desenvolvimento, podendo, ainda, causar efeitos adversos na progênie, ou (sub) populações (IPCS/ WHO, 2002; Aquino *et al.*, 2013; Erguc *et al.*, 2021; EPA, 2021).

Vários estudos indicam que agrotóxicos também podem causar estresse oxidativo e efeitos genotóxicos resultantes da exposição, também em baixas doses (Pérez-Iglesias *et al.*, 2014; Bagri *et al.*, 2016; Iturburu *et al.*, 2016; Stivaktakis *et al.*, 2016; Castro *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2018; Alvim *et al.*, 2019; Cuenca *et al.*, 2019; Morais *et al.*, 2019; Andrioli *et al.*, 2023; Dong *et al.*, 2024).. Compostos genotóxicos são aqueles capazes de alterar a integridade do genoma, que pode ser evidenciado por meio do ensaio de micronúcleo. Micronúcleo é um pequeno núcleo extra localizado no citoplasma celular, separado do núcleo principal, e é uma anomalia celular de cromossomos que falharam em migrar para os pólos durante a anáfase. Pode ser causado por dano em cromossomo, ou serem fragmentos (clastogênico) ou cromossomos inteiros (aneugênico) que permaneceram na célula durante a fase mitótica, não sendo incorporados aos núcleos filhos por não serem capazes de interagir com o eixo formado na citocinese (Dertinger *et al.*, 2011; Valente *et al.*, 2016; Mossa *et al.*, 2018; Chaufan *et al.*, 2019).

Com a exposição da população a resíduos destas substâncias químicas por meio de suas dietas, o primeiro contato destas substâncias, por via oral, é o trato gastrointestinal (TGI) e, conseqüentemente, a microbiota. O microbioma intestinal é um sistema biológico complexo e dinâmico, composto por comunidades comensais, simbióticas e patogênicas, em sua maioria bactérias (Evariste *et al.*, 2019; Smith *et al.*, 2020). A fermentação microbiana de carboidratos não digeridos, fibras e outros compostos dietéticos produz ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), entre outros metabólitos, que podem atuar como “hormônios” e influenciar diferentes processos metabólicos do hospedeiro. Por isso, a microbiota intestinal é considerada, por alguns pesquisadores, como um novo órgão endócrino (Velmurugan *et al.*, 2017). Atualmente há indicação do uso de probióticos, microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, para melhor a qualidade de vida de indivíduos portadores de vários tipos de doenças metabólicas (Young *et al.*, 2017). Além disso, biotransformações catalisadas pelo microbioma intestinal podem proteger o hospedeiro de vários contaminantes ambientais (Haiser; Turnbaugh, 2013; Zimmermann *et al.*, 2019).

Apesar de estudos científicos serem desenvolvidos e seus resultados relatarem os efeitos tóxicos como desregulação endócrina, dentre outros, as evidências não são claras nas populações expostas. Como a exposição a baixas doses é insidiosa, é preciso um longo tempo de exposição para que alterações fisiológicas sejam visíveis. Assim, a utilização de recursos, como as ciências -ômicas, é de grande valia nestes tipos de estudos (Lukowicz *et al.*, 2019). Dentre elas, a análise metabolômica confere informações sobre a interação do organismo com o ambiente (padrões metabólicos), identificando os metabólitos relacionados a processos biológicos (normais ou adversos). Pode ter uma abordagem global (*Untargeted*), que está baseada na análise qualitativa do maior número de metabólitos possível, pertencentes a diversas classes químicas, contidas no sistema biológico em estudo; ou uma abordagem alvo (*Targeted*) definida como uma análise quantitativa de metabólitos pré-selecionados de determinada classe química ou que estejam associados a rotas metabólicas específicas (Fiehn, 2016). Na Toxicologia Ambiental, a metabolômica é usada na identificação de novos biomarcadores de contaminantes químicos e pode esclarecer os mecanismos de toxicidade destes agentes, por permitir estudar vias metabólicas alteradas (Roux *et al.*, 2011).

Em geral, os efeitos à saúde decorrente da exposição aos agrotóxicos não surgem em um curto período de tempo, fazendo com que haja uma janela epidemiológica que torna difícil a determinação do nexo causal. A complexidade do sistema endócrino em vertebrados,

juntamente com o elevado número de novas moléculas sintéticas que surgem a cada dia, incluindo agrotóxicos, tornam a tarefa de determinar o risco de desregulação endócrina para cada molécula mais difícil.

Visto a ausência de modelos experimentais que possam mimetizar ou auxiliar o problema real dos efeitos causados pela exposição crônica de agrotóxicos amplamente utilizados, o presente estudo visou padronizar e avaliar os efeitos genotóxicos e sobre o metabolismo de camundongos C57bl/6 expostos a uma mistura de agrotóxicos com doses baixas por um período de tempo considerado subcrônico. Para isso, foram escolhidos três agrotóxicos para serem administrados em mistura, de classes e mecanismos de ação diferentes (um fungicida, um inseticida e um herbicida). Estas substâncias foram selecionadas por estarem entre os agrotóxicos mais detectados nos alimentos consumidos pela população do Brasil. A escolha foi baseada em dados de pesquisas realizadas por instituições governamentais (IBGE, ANVISA e MAPA), sendo as informações contidas nas Monografias de Agrotóxicos e nos Relatórios POF (2008-2009) e PARA (relatórios 2013-2015 e parcial 2017-2018).

Além disso, considerando-se que a microbiota intestinal poderia ser afetada pela exposição aos contaminantes, este estudo também visou avaliar os efeitos associados ao tratamento com o probiótico *Bifidobacterium longum* 5^{IA}. A pergunta a ser respondida seria se a sua plasticidade na presença de contaminantes poderia ajudar na eliminação e no controle dos possíveis efeitos causados por estes contaminantes ambientais nos animais que receberem a mistura dos três agrotóxicos. São escassos os estudos científicos que utilizam misturas em baixas doses de agrotóxicos que analisam a composição da microbiota.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Como resultado dos crescimentos urbano e industrial e das atividades agrícolas, contaminantes produzidos pelos processos dessas atividades antropogênicas vem aumentando drasticamente. Produtos químicos, entre eles os agrotóxicos, estão sendo desenvolvidos sem qualquer consideração pelo risco potencial de longo prazo para os seres humanos e o meio ambiente e muitas dessas substâncias são ameaças graves por, além de contaminar solo, ar, água e alimentos, serem facilmente transferidos a sistemas biológicos, exercendo efeitos negativos à saúde causando, por exemplo, inflamação, estresse oxidativo e distúrbios intestinais, e, conseqüentemente, doenças metabólicas, como DM2 e obesidade (Feng *et al.*, 2018; Maia *et al.*, 2020; Tekeli *et al.*, 2021).

No início da terceira fase da revolução industrial, por volta de 1940, os modelos de desenvolvimento humano não levavam em consideração o meio ambiente. As primeiras gerações a sofrerem com os efeitos adversos de contaminantes ambientais foram as nascidas entre 1950 e 1960, ainda no desenvolvimento uterino, principalmente devido ao acúmulo dessas substâncias tóxicas no tecido adiposo materno. Apesar dos efeitos tóxicos de contaminantes ambientais refletirem em animais silvestres mais rápido, o que os torna indicadores precoces de poluição, os efeitos dessas substâncias nos organismos humanos e, conseqüentemente, a preocupação com o tema, somente foram avaliados quando os indivíduos nascidos neste período de 1950 e 1960 adquiriram maturidade plena, por volta da década de 70 (Ghiselle; Jardim, 2007; Tekeli *et al.*, 2021).

O primeiro grande contaminante ambiental a chamar a atenção mundial foi o DDT, ou 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-cloro-fenil) etano, um agrotóxico organoclorado, sintetizado em 1938 por Paul Miller, o cientista ganhador do prêmio Nobel em 1948 pela descoberta do “pesticida milagroso”. O milagre tornou-se veneno, quando foi denunciado no livro “Primavera Silenciosa”, de Rachel Carson, em 1962. Nesse livro, a ambientalista alarmou que certas substâncias químicas artificiais que estavam se difundindo pelo planeta também estavam contaminando a fauna silvestre e seres humanos. Entretanto, poucos deram atenção ao relato na época, pois, por exemplo, os agrotóxicos eram considerados garantia de alta safra de alimentos, livrando as lavouras das pragas que tanto atormentavam os agricultores. Assim, durante décadas, ar, solo e águas receberam toneladas de resíduos tóxicos, ameaçando a fecundidade,

capacidade cognitiva/ emocional e sobrevivência não somente humanas, mas de todas as espécies do planeta (Santamarta, 2001; Guimarães, 2019).

Em 2002, Theo Colborn, Dianne Dumanoski e Pete Myers escreveram o livro “Nosso futuro roubado”, onde reuniram, pela primeira vez, importantes evidências baseadas em estudos de campo, experimentos de laboratórios e estatísticas sobre o impacto da contaminação ambiental sobre populações animais e humanas. O “Dossiê Abrasco – um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde”, de 2015, também reuniu informações sobre o assunto, focando no Brasil. Estas publicações revelaram evidências de defeitos congênitos, anomalias sexuais, falhas na reprodução, entre outras, todas originadas em substâncias químicas que substituem hormônios naturais, transformando os processos normais de reprodução e desenvolvimento, associando diversos agrotóxicos com o termo desreguladores endócrinos (Santamarta, 2001; Carneiro, 2015; Benvenga, 2020).

2.1 Agrotóxicos

2.1.1 Introdução

Estima-se que um terço da produção agrícola mundial seja cultivada utilizando agrotóxicos. Com a população humana em rápido crescimento, a necessidade de aumentar a produção de alimentos mantém a pressão constante sobre o uso intensivo destas substâncias químicas e de fertilizantes. São gastos mundialmente em torno de 38 bilhões de dólares com agrotóxicos a cada ano. No entanto, assim como a produção agrícola foi “otimizada” pelo emprego de agrotóxicos, o uso abusivo destes produtos e a poluição também aumentaram (Zhang, 2011; Carvalho, 2017; Zhang, 2018; Miglani; Bisht, 2019; Dalmolin *et al.*, 2020).

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization*) define agrotóxicos como:

qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas a prevenir, destruir ou controlar qualquer praga, incluindo vetores de doenças humanas ou animais, espécies indesejadas de plantas ou animais que causam danos durante ou de outra forma interferindo na produção, processamento, armazenamento, transporte ou comercialização de alimentos, *commodities* agrícolas, madeira e produtos de madeira

ou alimentos para animais; ou substâncias que podem ser administradas em animais para o controle de insetos, aracnídeos ou outras pragas em seus corpos.

Há inúmeras atividades, como a produção industrial, a agropecuária, o setor madeireiro, a silvicultura, o manejo florestal, a preservação de estradas e a saúde pública, que necessitam utilizar estes produtos (ANVISA, 2023).

Os agrotóxicos aplicados no campo agrícola deveriam, teoricamente, ser apenas tóxicos para os organismos-alvo, biodegradáveis e ecológicos até certo ponto, entretanto, infelizmente, a maioria das substâncias químicas utilizadas para este fim não têm nenhuma destas características, sendo inespecíficos e matando organismos não-alvos que são essenciais para os vários ecossistemas (Miglani; Bisht, 2019).

Segundo Hassaan e Nemr (2020), a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que um milhão de pessoas sejam intoxicadas de forma aguda por contato com agrotóxicos todos os anos. Destes números, 70% correspondem a trabalhadores (exposição ocupacional) e a taxa de mortalidade anual varia entre 0,4 e 1,9%. Além disso, mesmo que alguns agrotóxicos sejam classificados como medianamente ou pouco tóxicos, baseados em sua toxicidade aguda, exposições a doses baixas de agrotóxicos por meses, anos ou décadas estão associadas a várias síndromes metabólicas que ocorrem em indivíduos expostos a médio e longo prazo e esta exposição crônica também relaciona-se com o desenvolvimento de inúmeros tumores, distúrbios do sistema nervoso, más-formações congênitas e distúrbios endócrinos (Carneiro, 2015; Hassaan; Nemr, 2020).

No Brasil, o uso de agrotóxicos começou a crescer exponencialmente a partir da década de 90, saltando de 58.000 toneladas/ ano para 643.000 toneladas/ ano em 2015. Observa-se que em 1991, o consumo do país era 7x menor do que o consumo dos Estados Unidos, mas em 2015, era basicamente igual, próximo de 10% do consumo mundial. Em 2017, dez ingredientes ativos foram responsáveis por 70% das vendas, e o glifosato já se destacava em primeiro lugar, consumindo, em 2019, 217.592,24 toneladas deste herbicida. Dos cultivos, o trigo, milho e cana-de-açúcar corresponderam por cerca de três quartos do total de agrotóxicos consumidos no Brasil, sendo os estados Mato Grosso, São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná os recordistas na utilização, somando 58% do total (De Moraes, 2019; Nunes *et al.*, 2021).

Embora existam inúmeros tipos de agrotóxicos totais (ingredientes ativos – IAs), o maior montante está associado a apenas três classes: 47,5% de herbicidas, 29,5% de inseticidas, 17,5% de fungicidas, restando apenas 5,5% para os outros tipos de agrotóxicos. Apesar desta classificação clássica, existem diversas formas de se classificar os agrotóxicos (Hassaan; Nemr, 2020).

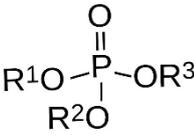
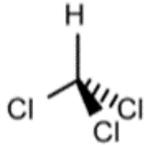
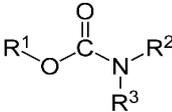
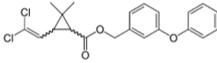
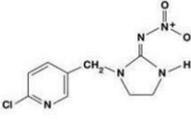
A classificação, recomendada por Drum em 1980, utiliza três abordagens comuns aos agrotóxicos: modo de ação e organismo-alvo; estrutura química; e o modo de entrada no organismo (sistêmico ou de contato). A mais comum é a classificação quanto ao modo de ação e organismo-alvo: inseticidas, herbicidas, fungicidas, raticidas, moluscicidas, nematicidas, reguladores de crescimento de plantas e muitos outros. (Drum, 1980; Miglani; Bisht, 2019; Hassaan; Nemr, 2020).

Dentro de cada categoria de modo de ação e organismo-alvo, os agrotóxicos também podem ser subdivididos, utilizando como base sua estrutura química, em: compostos organoclorados, organofosforados, piretroides, derivados da ureia, benzimidazóis, fenoxiácidos, dinitroanilinas, triazinas e triazóis, tio e ditiocarbamatos, fenóis e derivados, estrobilurina, entre outros. É a forma mais adequada de classificação, pois fornece evidências da eficácia e das propriedades químicas e físicas de cada agrotóxico. É importante ressaltar que cada grupo é projetado especificamente para atacar pragas relacionadas, mas eles também causam efeitos tóxicos indesejáveis em organismos não-alvo (Aktar *et al.*, 2009; Miglani; Bisht, 2019; Hassaan; Nemr, 2020).

Inseticidas são agrotóxicos utilizados para controlar uma grande variedade de insetos e outros artrópodes. Podem ser naturais (extraídos de plantas ou óleos minerais) ou sintéticos (orgânicos ou inorgânicos), sendo subdivididos de acordo com sua estrutura química. Esta classe é considerada a mais letal dentre os agrotóxicos e representa alto risco para organismos não-alvo. Um resumo com a classificação dos principais inseticidas do mercado mundial está descrito na tabela 1 (Miglani; Bisht, 2019).

Compostos utilizados para destruir ervas daninhas e outras vegetações indesejadas por inibição de vias metabólicas das plantas ou dos processos fisiológicos, pela interação com proteínas, agindo em vias específicas ou inibindo a fotossíntese, resultando na morte da planta ou interrupção do crescimento, são chamados herbicidas. A principal forma de classificação é quanto à forma de aplicação: ao solo ou às folhas (Marchi *et al.*, 2008; Cortese *et al.*, 2022).

Tabela 1 – Classificação dos principais inseticidas sintéticos orgânicos, baseada na natureza de suas estruturas químicas, de acordo com Comitê de Ação de Resistência a Inseticidas (IRAC 2016).

Principais Grupos	Ação	Estrutura química	Exemplos
Organofosforados	Inibe a Acetilcolinesterase (AChE) no sistema nervoso de organismos alvo. São derivados do ácido fosfórico. Em humanos, agem no SNC, sendo que os principais sintomas de intoxicação são: tontura, náusea, dor de cabeça, câibras, convulsões, perda de reações, coma e até morte.		Clorpirifós, Diclorvos, Triazofós, Profenofós, Paration, Forato.
Organoclorados	Liga-se no sítio do ácido gama-aminobutírico (GABA), inibindo o fluxo de cloro no sistema nervoso de organismos alvo. São estáveis e persistentes no meio ambiente. Em humanos, acumulam-se no tecido adiposo e causam alterações no SNC.		Clordano, Endossulfan.
Carbamatos	Inibe a Acetilcolinesterase (AChE) no sistema nervoso de organismos alvo. A toxicidade dos compostos carbamato varia de acordo com a estrutura molecular, mas em geral têm duração menor que a dos organofosforados e organoclorados.		Aldicarb, Carbaryl, Carbofurano.
Piretroides	Em organismos alvo, atua no sistema nervoso causando alterações na permeabilidade da membrana nervosa aos íons sódio e potássio, causando uma hiperexcitação neural. São derivados da piretrina, um inseticida natural, tendo baixa toxicidade em aves e mamíferos e alta toxicidade em peixes e artrópodes. São encontrados em vários produtos comerciais de uso doméstico.		Beta-ciflutrina, cialotrina, lambda- cialotrina, gama- cialotrina, cipermetrina, alfa- cipermetrina, beta- cipermetrina, piretrinas (piretro).
Neonicotinoides	Atua seletivamente no sistema nervoso central (SNC) do inseto como agonistas dos receptores nicotínicos de acetilcolina pós-sinápticos (nAChRs). São quimicamente relacionados a nicotina, um inseticida natural, sendo tóxicos para vertebrados e extremamente prejudiciais aos polinizadores.		Acetamiprido, Clotianidina, Imidacloprido, Tiacloprido, Tiametoxam.

Fonte: Adaptado de Miglani; Bisht (2019).

Herbicidas aplicados ao solo se movem das raízes para as folhas, sendo transportados pelo xilema. Estes herbicidas podem ser: inibidores de pigmentos, afetando a biossíntese de carotenoides e, conseqüentemente, de clorofila; inibidores do crescimento da planta,

interrompendo o crescimento e desenvolvimento das plântulas, interferindo na germinação das partes aéreas e raízes e também na divisão celular (por inibir a polarização de tubulina); e inibidores de fotossistema II, alterando o fluxo de elétrons essencial para a fotossíntese (Marchi *et al.*, 2008; Cortese *et al.*, 2022).

Herbicidas aplicados às folhas podem ser de ação local (contato), ou seja, não são deslocados. São preferidos aos sistêmicos por agirem rapidamente e não persistirem no solo, podendo uma nova cultura ser plantada logo após o tratamento. A maioria dos herbicidas desta classe matam a planta por destruir membranas celulares, por meio da formação de radicais livres e peroxidação lipídica. A desvantagem é que não são bons contra plantas de raízes profundas. Podem ser: inibidores de fotossistema II ou degradadores de membranas, ativados pela luz, como os inibidores de protoporfirinas oxidases e os inibidores de fotossistema I (Marchi *et al.*, 2008; Cortese *et al.*, 2022).

Os herbicidas aplicados às folhas com ação sistêmica deslocam-se das folhas até os locais de crescimento da planta, via floema, logo após penetrarem pelas cutículas das folhas, controlando muito bem plantas daninhas perenes. Podem ser: reguladores de crescimento, ao imitarem o hormônio auxina, natural para as plantas; inibidores da síntese de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina), importantes para a produção de proteínas essenciais para o crescimento das plantas; inibidores de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), essenciais em proteínas para produção de novas células; e inibidores de lipídeos, importantes para membranas celulares, causando paralisia no crescimento das plantas. Esta classe de herbicidas é a mais tóxica para organismos não-alvo por serem pouco seletivas (Marchi *et al.*, 2008; Cortese *et al.*, 2022).

Agrotóxicos fungicidas são utilizados para controlar doenças causadas por fungos, mas também são utilizados para aumentar a produtividade, reduzir danos estéticos e aumentar o prazo de armazenamento da produção. Podem ser aplicados em vários momentos, como proteção de folhagem e brotações novas; tratamento de sementes; proteção preventiva de ferimentos; desinfecção do solo; tratamento pós-colheita para proteger a produção; e quimioterapia para infecção já instalada (FRAC, 2022).

Fungicidas são classificados de diversas formas. Quanto ao princípio do controle, podem ser protetores (ou preventivos), impedindo o fungo de penetrar na planta; curativos, atuando após a infecção, mesmo sem a planta apresentar sintomas visíveis; erradicantes, atuando após a infecção instalada; e antiesporulantes, evitando que esporos germinem. Quando a modalidade,

podem ser sistêmicos (translocando-se pelas raízes/ xilema ou cutícula das folhas/ floema), de contato (ação local, sem penetrar na planta) ou mesostêmico/ translaminar (movimentando-se pelo limbo foliar). Quanto ao espectro de ação, podem ser seletivos ou multialvos, atuando em um único ponto ou em vários locais da via metabólica do fungo, respectivamente. Quanto ao modo de ação, podem: alterar a biossíntese de esterol em membranas; alterar a biossíntese da parede celular; induzir a defesa em plantas hospedeiras; afetar a mitose e divisão celular; interferir na respiração; alterar a síntese de ácidos nucleicos, de aminoácidos e proteínas; afetar a síntese de lipídios e integridade da membrana e a síntese de melanina na parede celular; afetar a transdução de sinal; podem ser multiação; e ter modo de ação desconhecido ou inespecífico. Também podem ser classificados quanto ao grupo químico, sendo a maioria orgânicos. Existem também os biofungicidas, que são organismos vivos que produzem substâncias ativas contra fungos (FRAC, 2022).

A exposição aos agrotóxicos pode causar doenças e elas estão diretamente relacionadas ao tipo de agrotóxico, tempo de exposição e a quantidade de produto absorvido pelo organismo. É importante considerar também qual é a população exposta, pois gestantes, crianças e adolescentes são mais suscetíveis aos efeitos tóxicos dessas substâncias. A exposição pode ocorrer no ambiente de trabalho, onde se destacam os trabalhadores rurais e de empresas dedetizadoras; e no ambiente doméstico, por pulverizações aéreas e alimentos e bebidas contaminadas, por exemplo (Hamdaoui *et al.*, 2019; ANVISA, 2019; Barbosa *et al.*, 2020; Ganesan *et al.*, 2020; Othmere *et al.*, 2020; Kale *et al.*, 2020; Abdel-Razik *et al.*, 2021; Gorga *et al.*, 2021; Gomes *et al.*, 2021).

De modo geral, as intoxicações agudas por agrotóxicos podem causar na pele: irritação na pele, ardência, desidratação, alergias; nas vias aéreas e trato gastrointestinal: ardência do nariz e boca, tosse, coriza, dor no peito, dificuldade de respirar, dor de estômago, náuseas, vômitos, diarreia. Os efeitos crônicos, quando em baixas doses e repetidas, podem ser relatados como: insônia, falta de memória, aborto, impotência sexual, depressão, problemas respiratórios graves, funcionamento do fígado e dos rins prejudicados, alterações da produção de hormônios da tireoide, dos ovários e da próstata, infertilidade, malformação e problemas no desenvolvimento intelectual e físico das crianças. Muitos agrotóxicos são considerados carcinogênicos (ANVISA, 2019; Dutra *et al.*, 2020; Basso *et al.*, 2021).

Devido ao uso generalizado de agrotóxicos na produção de alimentos, é a exposição ambiental da população a resíduos destes produtos químicos por meio de suas dietas, em baixas doses e

de forma repetida que causa preocupação. Segundo a ANVISA, resíduo de agrotóxico é (ANVISA, 2023):

uma substância ou mistura de substâncias remanescente ou existente em alimentos ou no meio ambiente decorrente do uso ou da presença de agrotóxicos e afins, inclusive, quaisquer derivados específicos, tais como produtos de conversão e de degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas, consideradas toxicológica e ambientalmente importantes.

Além das dietas, as pessoas também podem ser expostas a agrotóxicos usados em vários ambientes, incluindo casas, escolas, hospitais e locais de trabalho, por uso de produtos domésticos; e por pulverizações aéreas programadas para a erradicação de insetos causadores de epidemias (Aktar *et al.*, 2009; Niehe, 2022).

Órgãos nacionais e internacionais preconizam que o controle adequado de pragas está não só relacionado à escolha correta do agrotóxico, como também à forma adequada de aplicação do produto. Estima-se que 50 % das aplicações de produtos não atinjam o alvo intencionado por uso inadequado. Desta forma, as Boas Práticas Agrícolas são apresentadas como abordagens simples para maximizar a eficiência das aplicações dos produtos agrotóxicos, principalmente com uma pulverização apropriada, utilizando as próprias recomendações dos fabricantes dos agrotóxicos, a geração de gotas, os bicos de pulverização e os tipos de alvo (EMBRAPA, 2016).

Resíduos de agrotóxicos começaram a ser analisados em alimentos de origem vegetal na União Europeia em 1996, com sete compostos apenas (acefato, clopirifós, clopirifós-metil, metamidofós, iprodiona, procimidona e clorotalonil) e os ditiocarbamatos. Neste ano, 9700 amostras foram analisadas e 5,2% continham resíduos de algum agrotóxico. Dois anos depois, 20 agrotóxicos eram analisados, sendo que 32% das amostras de alimentos continham algum resíduo. Entretanto, até hoje, os cientistas ainda não têm uma compreensão clara dos efeitos dos resíduos sobre a saúde humana (Aktar *et al.*, 2009).

No Brasil, a ANVISA, por meio do Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos (PARA) em alimentos, verifica se os agrotóxicos estão sendo empregados corretamente no território nacional, entre outras atribuições. Este programa, criado em 2001 como um projeto e transformado em programa em 2003 por meio da RDC n.119 de 19 de maio de 2003, é desenvolvido anualmente pela SNVS (Sistema Nacional de Vigilância Sanitária) e tem como objetivo estruturar um serviço de avaliação e promover a segurança dos alimentos em relação

a resíduos de agrotóxicos. O programa conta com a participação das 26 Unidades Federativas (Paraná retirou-se do programa) para averiguar se os alimentos comercializados em território nacional apresentam concentrações de resíduos de agrotóxicos dentro dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pela ANVISA; verificar se os agrotóxicos empregados nas culturas estão devidamente registrados no país e se foram aplicados apenas nos alimentos para os quais estão autorizados; estimar a exposição da população a resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal e, conseqüentemente, avaliar o risco à saúde decorrente dessa exposição alimentar (ANVISA, 2016; ANVISA, 2019; ANVISA, 2023).

O monitoramento do uso dos agrotóxicos no Brasil tem muitas limitações por ser caro e demorado. Além disso, o que se observa é que quanto mais agrotóxicos são autorizados, menos se monitora. Uma vez que o governo libera uma substância perigosa, é necessário saber o que acontece com o pós-registro (trabalhadores, consumidores e meio ambiente), mas isso não acontece. O programa PARA/ ANVISA monitora 270 substâncias e seus metabólitos, mas demorou 4 anos para apresentar o último relatório (2019-2023). O SISAGUA, um sistema de monitoramento das águas do país, regulamentado pela CONAMA 357, analisa apenas 27 agrotóxicos, dentre 504 monografias autorizadas (em julho de 2022) para uso na produção agrícola. Alimentos processados e ultraprocessados, de origem animal e o próprio meio ambiente (solo e ar) não são monitorados pelo governo, apenas em raras pesquisas científicas (Albuquerque *et al.*, 2016).

O PARA avalia resíduos de agrotóxicos em produtos de origem vegetal desde 2001, mas, apesar de atualmente analisarem 80% destes alimentos citados pela POF 2008 (Pesquisa de Orçamento Familiar), por ano escolhem somente 13-14 alimentos da lista. São até 342 ingredientes ativos de agrotóxicos e seus metabólitos monitorados, dados apresentados no relatório dos ciclos 2018-2019 e 2022 (ANVISA, 2023), enquanto a FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), agência americana, em seu último relatório (outubro de 2023, referente ao ano de 2021) analisou 740 agrotóxicos e produtos químicos industriais, em amostras de origem vegetal, animal e produtos importados (FDA, 2023). Além disso, os valores de Limite Máximo de Resíduos (LMR) permitidos pela legislação brasileira, que são níveis mais altos de resíduos de agrotóxicos tolerados detectados em alimentos, são maiores em comparação com outros países. Desta forma, uma análise de risco da exposição dos consumidores a agrotóxicos no Brasil pode estar subestimada (Nunes *et al.*, 2021).

No Brasil, com a aprovação do Projeto de Lei 6.299/2002 (anteriormente apelidada de PL do veneno, pela opinião pública), a nova Lei dos Agrotóxicos 14.785/2023 entrou em vigor em 27 de dezembro de 2023. Apesar dos vetos presidenciais, o Brasil entrou na contra-mão do procedimento ideal para o uso de agrotóxicos, que seria quanto menos agrotóxicos autorizados, menos o país precisa monitorar. Em julho de 2022, havia 504 ingredientes ativos (IAs) autorizados no país, com respectivas monografias, sendo 3748 formulações autorizadas para comercialização. Comparando com o ano de 2015, eram 430 IAs e 1400 formulações. De 2019 até a presente data, 30% dos IAs autorizados no Brasil não são autorizados em países europeus; 16 deles são altamente perigosos, 235 muito perigosos e 3 proibidos pela União Europeia desde 2009. Além disso, em menos de quatro anos, foram autorizadas 1682 novas formulações (Carneiro, 2015; Nunes *et al.*, 2021; Cione *et al.*, 2024).

Pelo veto presidencial, a nova lei 14.785/2023 mantém, como na lei 7.802/1989, a tríplice autonomia de autorização: o MAPA avalia a eficiência das substâncias no combate às pragas; a ANVISA afere possíveis danos relacionados à saúde humana; e o IBAMA avalia os impactos ambientais. O PL 6.299/2002, se tivesse sido aprovada na íntegra, teria centralizado a autorização no MAPA, ou seja, mesmo que a ANVISA e o IBAMA reprovassem um agrotóxico, o MAPA teria a palavra final, podendo autorizá-lo. O MAPA também ficaria encarregado de divulgar os resultados das análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos, ações estas conjuntas que privilegiaram os grandes agricultores, limitando o perigo da utilização dos agrotóxicos a decisões meramente políticas (Carneiro, 2015; Cione *et al.*, 2024).

A quantidade de formulações com cada composto isolado mais a possibilidade de utilização na lavoura dos três compostos ao mesmo tempo (herbicida, fungicida e inseticida) pelas boas práticas agrícolas, sugerem que há possibilidade de mais de um agrotóxico ser encontrado em uma refeição. A corrente utilização de mistura de agrotóxicos na prática agrícola, hegemônica pelo mercado e pela política governamental, não era contemplada nem na lei 7.802/1989, que regula o uso de agrotóxicos no Brasil, nem está na nova lei 14.785/2023 que a substituiu. O Brasil é um dos países que tem a legislação em vigor sobre registro e comercialização menos restritiva comparada relação à União Europeia, por exemplo, sendo bem mais liberais, onde o governo federal, apoiado pelo congresso nacional, favorece as grandes corporações agroquímicas em detrimento ao meio ambiente e efeitos adversos à saúde humana. Independentemente do país, o que se deve ter em mente é que não cabe às agências regulatórias provarem que um agrotóxico é tóxico. As empresas deveriam ser obrigadas a demonstrar, com o mesmo rigor que utilizam para a aprovação de seus produtos, que os mesmos não são nocivos

para a saúde humana ou para o meio ambiente. O governo deveria ter focado em aprovar o PL 6.670/2016, que regulamenta a Política Nacional de Redução de Agrotóxicos. Este projeto já foi aprovado em 2018 por uma comissão especial e aguarda para ser votado no plenário da Câmara (Carneiro, 2015, Nunes *et al.*, 2021; Cione *et al.*, 2024).

Existem muitas classes de substâncias que são consideradas desreguladores endócrinos, como por exemplo os próprios hormônios naturais estrogênicos, androgênicos (como contaminantes ambientais por meio das excretas) e fitoestrogênicos; plastificantes, como ftalatos e bisfenóis; hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs); parabenos; retardantes de chama; e outros. Entretanto, os agrotóxicos têm chamado muito a atenção para seus efeitos como desreguladores endócrinos, tendo em vista o alcance da exposição humana a estes compostos, além de serem produzidos, diferentemente de outras substâncias, como “veneno” (Boberg *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010; Aquino *et al.*, 2013; Jagne *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Nowak *et al.*, 2018; Kim; Park, 2019; Kubincová *et al.*, 2019; Gonsioroski *et al.*, 2020; Rocha, 2020; Maia *et al.*, 2020; Bajard *et al.*, 2021; Feiteiro *et al.*, 2021).

2.1.2 Desreguladores Endócrinos

O sistema endócrino coordena as funções de inúmeros tipos celulares, em organismos multicelulares, por meio de uma complexa rede de hormônios. Esta rede pode tanto causar estimulação quanto retroação em cascata de eventos para que diferentes parâmetros fisiológicos e suas respectivas funções, como desenvolvimento, crescimento, reprodução, sejam adequados para a saúde e a sobrevivência de todo o organismo e, conseqüentemente, da espécie (Combarous, 2020).

Os hormônios e seus receptores evoluíram para promover a especificidade das ligações dos pares hormônio-receptor em todas as gerações de espécies. A evolução dos receptores nucleares é controlada pela necessidade de reconhecer seu hormônio cognato e também pela necessidade de não se ligar a outra molécula circulante. Além disso, sistemas de conjugação e degradação também foram aperfeiçoados durante a evolução para limitar a meia-vida dos hormônios. Porém, a evolução das espécies não previu, com o desenvolvimento industrial e a introdução de milhares de moléculas orgânicas pequenas, que os receptores nucleares não seriam seletivos para evitar ligações de baixa afinidade. Ou seja, uma porcentagem dessas moléculas sintéticas

introduzidas pelo homem no meio ambiente pode acomodar em um sítio de ligação e promover a ativação ou inativação de um receptor. Estas moléculas atuam como desreguladores endócrinos (Combarous, 2020).

Desreguladores endócrinos (DE), também conhecidos como disruptores endócrinos, perturbadores endócrinos, agentes hormonalmente ativos, interferentes endócrinos e desreguladores químicos endócrinos, são definidos pela Agência de Proteção Ambiental (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*) como agentes exógenos que interferem com a produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo, que são responsáveis pela manutenção da homeostase e a regulação dos processos de desenvolvimento. A Organização Mundial da Saúde (OMS) ainda acrescenta que, além de ser uma substância ou mistura que altera a(s) função(ões) do sistema endócrino, a exposição a esses agentes, conseqüentemente, pode causar efeitos adversos em um organismo intacto, ou sua progênie, ou (sub) populações (IPCS/ WHO, 2002; Aquino *et al.*, 2013; Erguc *et al.*, 2021; EPA, 2021).

Há um grande número de substâncias químicas naturais, presentes nos alimentos, por exemplo, que possuem propriedades biológicas, caracterizando-as como DEs, estendendo, assim, o conceito além de produtos sintetizados pelo homem. Todas essas substâncias, naturais ou sintéticas, podem interferir direta ou indiretamente pela ligação com o receptor do hormônio endógeno por meio de diferentes mecanismos, como ilustrado na figura 1 (Oliveira *et al.*, 2018; Combarous, 2020; Merrill *et al.*, 2020; Erguc *et al.*, 2021).

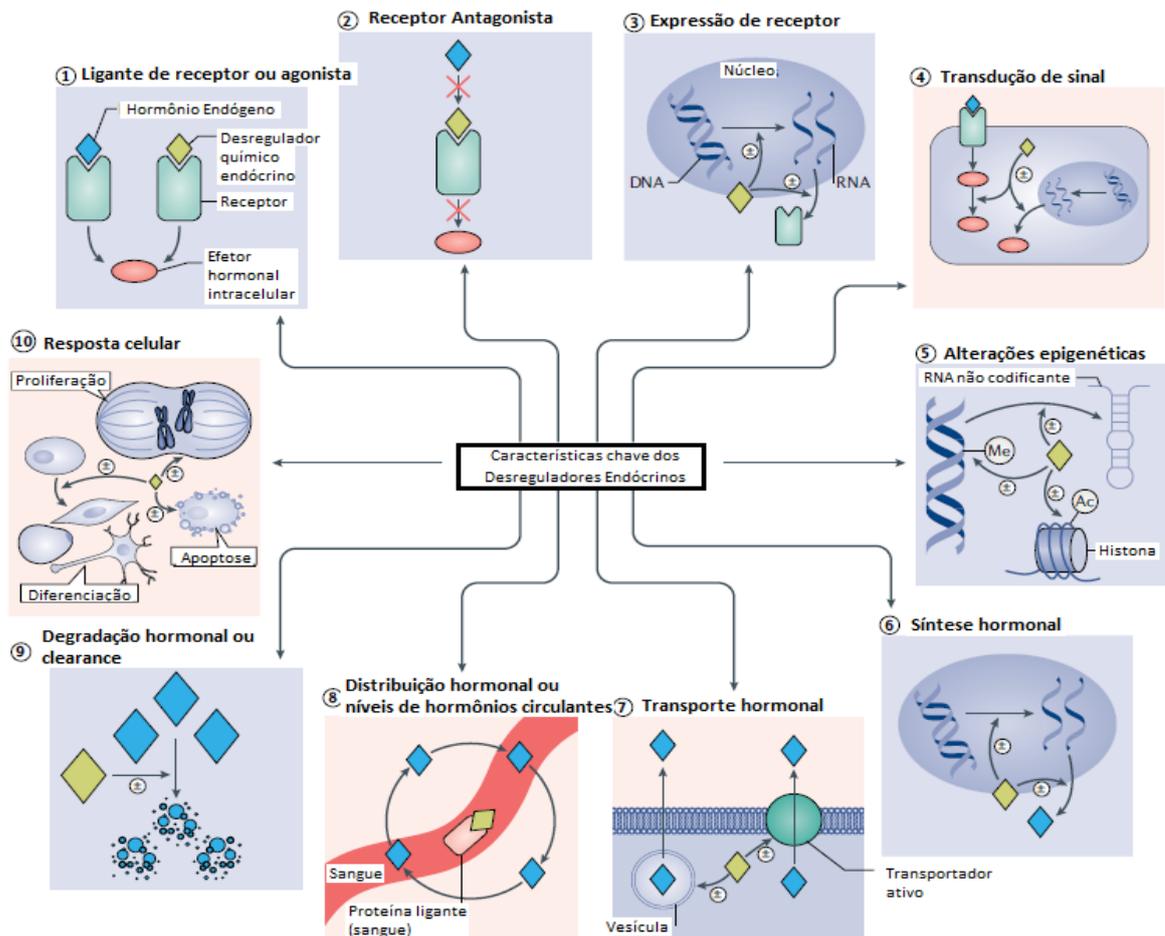
Apesar de existirem mais de 1000 produtos químicos de várias classes que alteram o sistema endócrino, DEs não são classificados quanto a sua estrutura química ou por tipo de uso específico, apenas por seus mecanismos de ação e capacidade de alterar a função do sistema endócrino (Oliveira *et al.*, 2018).

Muitos DEs podem ser encontrados em produtos do dia-a-dia, como ingredientes ativos de produtos de higiene pessoal e limpeza de ambientes, ou mesmo serem contaminantes de alimentos e água, como resíduos de agrotóxicos e medicamentos. Nem sempre as estações de tratamento de água e/ou esgoto são capazes de eliminar substâncias recalcitrantes e, além disso, a reação entre os agentes desinfetantes e matéria orgânica/ inorgânica podem gerar outros desreguladores. (Aquino *et al.*, 2013; Darbre *et al.*, 2017; Gonsioroski, 2020; EPA 2021; Erguc *et al.*, 2021).

Grande parte dos DEs são lipofílicos, depositando no tecido adiposo, e tendo, dessa forma, uma meia-vida muito longa no organismo. Avaliar o impacto total da exposição aos DEs não é fácil, pois os efeitos adversos podem se desenvolver de forma crônica, manifestando-se apenas anos depois da exposição (Gonsioroski *et al.*, 2020; Kahn *et al.*, 2020; Yilmaz *et al.*, 2020).

Figura 1 – As principais características dos desreguladores endócrinos (DEs).

As setas sinalizam dez características-chave específicas, onde o símbolo \pm indica que pode ocorrer aumento (amplificação) ou diminuição (atenuação) dos processos e dos efeitos. DEs: podem interagir/ ativar (1) ou antagonizar (2) os receptores hormonais; Podem alterar a expressão do receptor hormonal (3); Podem alterar a transdução de sinal (incluindo alterações na expressão de proteínas ou RNA, modificações pós-traducionais e/ou fluxo iônico) em células que respondem a hormônios (4); Podem induzir modificações epigenéticas em células produtoras de hormônios ou responsivas a hormônios (5); Podem alterar a síntese hormonal (6); Podem alterar o transporte de hormônios através das membranas celulares (7); Podem alterar a distribuição hormonal ou os níveis hormonais circulantes (8); Podem alterar o metabolismo ou a depuração hormonal (9); Podem alterar a resposta das células produtoras de hormônios ou responsivas a hormônios (10).



Um dos mecanismos de ação bem conhecidos dos DEs é alterar a função endócrina atuando como agonista ou antagonista dos receptores nucleares. Os receptores nucleares (NRs) humanos são uma família de 48 fatores de transcrição regulados por ligantes que controlam uma infinidade de processos biológicos, como desenvolvimento, homeostase de órgãos, metabolismo, função imunológica ou reprodução. Eles abrigam a regulação da transcrição, bem como as propriedades de ligação ao DNA e ao ligante incorporados em três domínios estruturais distintos e respondem a uma grande variedade de pequenos ligantes endógenos, como hormônios, vitaminas, ácidos graxos ou metabólitos. Após a ligação ao ligante, as alterações conformacionais na região C-terminal do domínio de ligação ao ligante permitem que os receptores recrutem co-ativadores transcricionais. Os principais receptores afetados por DEs são os receptores nucleares de estrogênio (ER α e ER β), receptores de androgênicos (ARs), receptores tireoidianos (TRs), receptor X do pregnano (PXR), o receptor G relacionado ao estrogênio (ERRg), os receptores X do retinoide (RXRs) e os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma α e γ (PPAR α e γ), e a família de receptores não nucleares, como o receptor de arilhidrocarboneto (AhR). Receptores, como ERs, AhR e PPARs, também estão presentes na mitocôndria e muitos DEs se movem para dentro dessa organela e interrompem a função mitocondrial. Existem outros tipos de receptores além dos nucleares que DEs podem atuar (Balaguer *et al.*, 2017; Kim; Lee, 2017).

Apesar dos DEs atuarem alterando, imitando ou interrompendo a função dos hormônios gestacionais, incluindo, além dos hormônios estrogênicos e andrógenos, os hormônios tireoidianos, tornando a gravidez um alvo sensível a desregulação, os principais relatos científicos tendem a responder apenas a desregulação relacionada ao sistema reprodutivo, focando nos efeitos (anti)estrogênicos ou (anti)androgênicos em animais silvestres, animais experimentais e humanos. E, uma vez em contato com o organismo, essas substâncias químicas podem, por exemplo, imitar um hormônio de crescimento, resultando em aumento da massa muscular; podem responder em momentos inadequados, produzindo insulina quando não é necessário; bloquear os efeitos de um hormônio de crescimento de certos receptores, alterando o desenvolvimento normal do organismo; podem estimular ou inibir diretamente o sistema endócrino e causar superprodução (hiper) ou subprodução (hipo) de hormônios da tireoide (Marroqui *et al.*, 2018; Pacyga *et al.*, 2019; Kahn *et al.*, 2020; Gonsioroski *et al.*, 2020).

Estudos demonstram que DEs podem alterar o desenvolvimento, a fertilidade e a função reprodutiva de animais silvestres, de seres humanos e da vida aquática. Exposições pré-natais e perinatais podem gerar malformações genitais. Também são relatados aumentos nas

incidências de doenças em fêmeas, como endometriose, síndrome do ovário policístico, miomas uterinos e cânceres de ovário, útero e mamas. Em machos, a síndrome da disgenesia testicular acontece quando as mães são expostas, prejudicando a proliferação e o desenvolvimento das células de *Leydig* no feto, levando à redução da produção de testosterona ao longo da vida. Também em machos pode ocorrer uma piora na qualidade do sêmen, cânceres de próstata e testículos (Jugan *et al.*, 2010; Gonsioroski *et al.*, 2020; Kahn *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, a preocupação com a potencial relação entre o aumento da prevalência de distúrbios do neurodesenvolvimento e o aumento da exposição a poluentes ambientais têm aumentado. Sobre esta relação, estudos analisando os hormônios da tireoide (HTs), que são críticos na regulação do crescimento e diferenciação de muitos tecidos e órgãos, bem como na homeostase energética e inúmeras vias metabólicas importantes, estão sendo conduzidos. É importante lembrar que a desregulação desses hormônios tireoidianos na mãe, que suprem o feto até o segundo trimestre da gravidez, também pode causar grave comprometimento no desenvolvimento, principalmente da maturação do cérebro de mamíferos, resultando em retardo mental e defeitos neurológicos, como transtorno de déficit de atenção, transtorno do espectro autista e disfunção cognitiva e comportamental. Fetos e recém-nascidos, por estarem em desenvolvimento, são os mais susceptíveis à desregulação endócrina. Os DEs podem interferir na síntese, ação e metabolismo dos hormônios esteroides sexuais que, conseqüentemente, causam problemas de desenvolvimento, infertilidade e cânceres sensíveis a hormônios estrogênicos e androgênicos. Alguns DEs exercem efeitos obesogênicos, podendo levar ao desenvolvimento de DM2, por perturbar a homeostase energética. Interferências nos eixos hipotálamo-hipofisário-tireoide e adrenal também são citadas na literatura (Jugan *et al.*, 2010; Kim; Park, 2019; Kahn *et al.*, 2020).

Há muitos estudos associam os DEs a diversas doenças metabólicas, como DM2 e obesidade. Essas substâncias podem afetar vários processos celulares, incluindo alguns relacionados à produção e utilização de energia, levando a alterações na homeostase energética. Alterando o metabolismo energético, os DEs afetam vários eventos celulares em diferentes organelas, incluindo o retículo endoplasmático e as mitocôndrias. As mitocôndrias, essenciais em organismos eucariontes, estão implicadas, principalmente, na conversão de energia celular (fosforilação oxidativa), assim como participam de outros processos, como secreção hormonal, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e apoptose. Desta forma, a disfunção mitocondrial causada por uma capacidade oxidativa reduzida, uma oxidação lipídica prejudicada e um aumento do estresse oxidativo, coloca esta organela no epicentro de muitos

distúrbios, incluindo envelhecimento e doenças metabólicas, como à resistência à insulina e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de DM2 (Fénichel; Chevalier, 2017; Marroqui *et al.*, 2018).

DEs que causam esta alteração metabólica, *in vivo*, por uma variedade de mecanismos, independentemente da suscetibilidade a outros fatores, como dieta rica em gordura, são denominados obesógenos. As substâncias químicas mais estudadas com estas características são bisfenóis, nonilfenóis, agrotóxicos (como glifosato e imidacloprido), ftalatos e parabenos, por exemplo. Os obesógenos podem atuar diretamente nos adipócitos para aumentar seu número, promover o armazenamento de gordura nos adipócitos existentes ou produzir adipócitos disfuncionais; ou também podem aumentar indiretamente a adiposidade por vários mecanismos, como interrupção do metabolismo e controle do apetite, alteração dos pontos de ajuste metabólicos, indução de alterações desfavoráveis na composição do microbioma e aumento da fração da ingestão calórica que é armazenada como gordura. Fetos e crianças são mais sensíveis à exposição por terem uma menor capacidade metabólica, como uma menor expressão de enzimas do citocromo P450, responsáveis pela metabolização de xenobióticos (Tang-Peronard *et al.*, 2011; Kim; Lee, 2017; Amato *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que a obesidade é um fator de risco para outras doenças, incluindo DM2, doenças cardiovasculares, câncer, hipertensão e asma (Tang-Peronard *et al.*, 2011; Amato *et al.*, 2021).

Quando presentes nos alimentos, os primeiros contatos dos DEs, incluindo os resíduos de agrotóxicos, são com o trato gastrointestinal (TGI) e a microbiota intestinal. O TGI é a primeira barreira física e biológica para conter os contaminantes ambientais contidos em alimentos, sendo o primeiro sítio de exposição. Inúmeros estudos demonstram que a microbiota intestinal tem um papel importante na toxicidade de agrotóxicos e, conseqüentemente, na saúde humana e animal. A microbiota se torna, então, um destinatário não intencional destas substâncias. Ela é um órgão metabólico com inúmeras funções críticas para a manutenção da homeostase no hospedeiro. Assim, as doenças causadas por uma disbiose também podem ser provocadas por poluentes ambientais, como as doenças metabólicas (Yuang *et al.*, 2019; Tsiaoussis *et al.*, 2019).

2.1.3 Aspectos toxicológicos dos agrotóxicos Imidacloprido, Tebuconazol e Glifosato

O Programa de Triagem de Desreguladores Endócrinos (EDSP, do inglês *Endocrine Disruptor Screening Program*), da Agência de Proteção Ambiental americana (EPA), em um esforço para identificar compostos desreguladores endócrinos, avalia substâncias químicas por meio de interações com as vias de sinalização de estrogênio, androgênio ou tireoide. A teoria parece simplificada, mas a quantidade de testes aplicados dificulta a avaliação, principalmente porque é necessário considerar a complexidade do sistema endócrino (Marty *et al.*, 2015). Assim, utilizando alguns destes parâmetros, há estudos científicos que consideram o imidacloprido, o tebuconazol e o glifosato, três agrotóxicos amplamente utilizados nas culturas por todo mundo, desreguladores endócrinos (Sun *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2018; Mzid *et al.*, 2018; Berrouagye *et al.*, 2019; Ndonwi *et al.*, 2019; Fernandez-Vizcaíno *et al.*, 2020; Kale *et al.*, 2020; Ndonwi *et al.*, 2020; Othmere *et al.*, 2020; Ruuskanen *et al.*, 2020; Gomes *et al.*, 2021; Kwon *et al.*, 2021; Prasad *et al.*, 2022; Chandran *et al.*, 2023).

O Imidacloprido, 1-[(6-Chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-nitro-2-imidazolidinimine, foi o primeiro inseticida neonicotinoide a ser registrado e é o representante mais importante da classe, com amplo espectro e excelente atividade sistêmica e de contato. Seu mecanismo de ação é devido à estimulação de receptores nicotínicos pós-sinápticos de acetilcolina (nAChR) em insetos. No Brasil, em 2020 foi um dos dez ingredientes ativos mais comercializados no país e desde o relatório PARA/ ANVISA de 2013-15, seu resíduo está entre dez os mais detectados em alimentos de origem vegetal (IBAMA, 2024; ANVISA, 2023). As contaminações de água e solo são preocupantes, pois, além de ser altamente solúvel em água, seu tempo de meia-vida é de 39 dias, podendo chegar a 3 anos se não sofrer fotólise, o que eleva a sua classificação ambiental para II (muito perigoso para o meio ambiente). Sua utilização está proibida desde 2018 em países da União Europeia e Reino Unido por causa do grave risco de extinção de abelhas e geralmente suas formulações são classificadas toxicologicamente como Classe 4 (Produto pouco tóxico) (Agrofit, 2024; IBAMA, 2024; Sun *et al.*, 2017).

É considerado um agrotóxico de baixa toxicidade para humanos, pois tem baixa atividade com os receptores dos vertebrados, entretanto a toxicidade aguda em mamíferos envolve uma combinação de atividades agonistas e antagonistas em vários subtipos de nAChR localizados em vários tecidos, com sintomas colinérgicos semelhantes à nicotina, incluindo náusea, vômito, dor abdominal, diarreia, salivação aumentada, dor de cabeça, tontura, agitação ou confusão,

podendo incluir coma, taquicardia ou bradicardia, hipotensão e insuficiência respiratória. O tratamento recomendado em casos de intoxicação aguda é sintomático, pois não há antagonista específico e os sintomas podem estar associados a outros componentes da formulação do que ao imidacloprido. Como este agrotóxico não inibe a acetilcolinesterase, o tratamento com oxima reativadora (por exemplo, pralidoxima) não é indicado. Aproximadamente 96% do imidacloprido absorvido por via oral é excretado na urina e nas fezes em 48h (razão urina:fezes de 4:1), apresentando circulação entero-hepática. É metabolizado principalmente no fígado, e gera dois metabólitos principais: ácido 6-cloronicotínico (por clivagem oxidativa) e sua glicina conjugada (conjugação) (INCHEM, 2001; Sun *et al.*, 2016). Sabe-se pouco sobre o potencial efeito crônico do imidacloprido em humanos. Estudos em animais indicam que este inseticida pode ser, com doses a partir de 10 mg.kg⁻¹: hepatotóxico, com indução das atividades de P-450, O-desmetilase e N-desmetilase; e neurotóxico, podendo causar morte dos animais. Também pode causar perda de peso corporal (INCHEM, 2001).

Em estudos subcrônicos em animais, de acordo com as recomendações da OECD 408, Yuan e colaboradores (2019) testaram, em camundongos machos, três doses (3, 10 e 30 mg.L⁻¹) de Imidacloprido em água *ad libitum*, por 70 dias. A dose de 30 mg/L causou: perda de peso dos testículos, com alterações histopatológicas; diminuição de LDL sérico, mas sem alterar triglicérides e HDL; diminuição de testosterona (T) e estrogênio (E) séricos, mas sem alterar a relação entre os hormônios E/T (YUAN *et al.*, 2020). Outro estudo, com os mesmos animais, tempo e doses, identificou que a dose de 30 mg.L⁻¹ desencadeia: perda massa do fígado com alterações histopatológicas; redução de enzimas hepáticas séricas; aumento da expressão de genes relativos ao estresse oxidativo; redução dos sais biliares totais (sérico, hepático e nas fezes); redução na expressão do *Cyp7a1* (ativado por sais biliares); aumento de muco intestinal (MUC-1); alteração na microbiota: na abundância relativa de *bacteroidetes* (aumento) e *Bacillota* (diminuição); disbiose (aumento de micro-organismos aeróbios e gram-negativos e diminuição de anaeróbios e gram-positivos) (Yang *et al.*, 2020). Bhardwaj e colaboradores também testaram, por 90 dias em ratas Wistar, três doses de imidacloprido: 5, 10 e 20 mg/kg PC/dia e encontraram sinais de toxicidade apenas na maior dose, com alterações como diarreia, salivação, dispnéia, piloereção, perda de peso, pesos relativos dos órgãos (fígado apresentou necrose focal); além disso, a exposição às três doses apresentaram aumento na glicemia jejum dos animais expostos, sem alterar as dosagens de colesterol e triglicérides (BHARDWAJ *et al.*, 2010).

O tebuconazol, (RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol, é um potente fungicida triazol, formados por compostos heterocíclicos constituídos por três átomos de nitrogênio no mesmo núcleo cíclico. Tem ação sistêmica que inibe a biossíntese de ergosterol, o lipídio fundamental na permeabilidade e fluidez membrana fúngica. Está entre os agrotóxicos com resíduos mais detectados nos alimentos de origem vegetal no Brasil, estando em 4º lugar no último relatório PARA ciclo 2022 (ANVISA, 2023). Sua ampla utilização se deve ao fato de, além de curar e erradicar doenças fúngicas, pode proteger a colheita de infestações, aumentando o seu rendimento (Dong *et al.*, 2024; Othmere *et al.*, 2020-2; Kwon *et al.*, 2021). Tem meia-vida longa no solo de até 180 dias, sendo classificado como Classe II ambientalmente (muito perigoso para o ambiente) e variando, dependendo da formulação, toxicologicamente entre Classe 1 (extremamente tóxico) a Classe 5. (Ma *et al.*, 2023; IBAMA, 2024).

Sintomas de intoxicação aguda do tebuconazol são dor abdominal, vômitos e náuseas, tosse, com tratamento sintomático. Intoxicações crônicas estão relacionadas ao SNC e SNP, tecidos reprodutivos e sistema hematológico, com comprometimento do desenvolvimento esquelético, diminuição de peso, leucopenia e alterações nos triglicerídeos (INCHEM, 1994; Andreu-Sanchez *et al.*, 2012). É excretado preferencialmente pela bile e fezes (90% em 72h), com circulação entero-hepática. Os principais metabólitos são produtos da oxidação de um dos grupos metil da porção butílica terciária, sendo biotransformado a álcool ou a ácido carboxílico, seguido de conjugação com glicuronídeo ou sulfato, com uma pequena clivagem na fração triazol (INCHEM, 1994).

Para estudos subcrônicos em animais, de acordo com as recomendações da OECD 408, o documento do EPA informa que doses maiores que 100 mg.kg^{-1} têm efeitos neurotóxicos em camundongos. Contrapondo esta informação, estudos científicos usam doses variando entre 4,17 a 100 mg.kg^{-1} P.C por dia (em geral 12,5 e 50 mg/kg PC/dia), por 90 dias, e, estas doses, causaram alterações (neurotóxicas e desregulação endócrina). Em ratos, por 28 dias, o tebuconazol (doses entre 0,9 e 50 mg/kg PC/ dia) causa: alteração na glutatona e nas atividades de glutatona S-transferase, superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase no fígado; aumento das atividades da SOD nos rins e testículos, demonstrando que o tebuconazol induz vários CYPs e estresse oxidativo no fígado, além de produzir efeitos antiandrogênicos em ratos machos; peroxidação lipídica por dosagem de malondialdeído (MDA); várias alterações histopatológicas no miocárdio, incluindo infiltração leucocitária, congestão hemorrágica dos vasos sanguíneos cardíacos e vacuolização citoplasmática (Yang *et al.*, 2018;

Othmère *et al.*, 2020). A FISPQ (ficha de informações sobre segurança de produto químico) do fabricante NORTOX, o único efeito crônico citado para ratos (animais de laboratório) é, administração por via oral, nas doses 0, 5, 20 e 80 mg/Kg durante 90 dias, decaimento de peso corporal, sendo mais intensos em fêmeas (FISPQ, 2006).

O glifosato [N-(fosfonometil) glicina], sintetizado por Dr. Henri Martin em 1950, é o herbicida mais amplamente usado no mundo (forma ácida e seus sais); apesar de não ter sido comercializado como herbicida até 1974, hoje é o mais vendido, não somente no Brasil, como também no mundo (IBAMA, 2024; ANVISA, 2023). Classificado como um herbicida não seletivo e sistêmico, um análogo do aminoácido natural glicina, ele atua como um inibidor da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase, na via do chiquimato, que produz aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) usados para a síntese de proteínas e desempenha um papel importante na produção de metabólitos secundários, como a lignina. O glifosato é classificado tanto pela EPA (categoria IV para animais), quanto no Brasil (Classe 5) como produto improvável de causar dano devido ao modo de ação do glifosato estar diretamente ligado a uma pequena variedade de organismos, principalmente plantas verdes. Controverso a esta classificação ambiental, a classificação dada pela IARC (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*) em 2015 é de provável carcinogênico para humanos (Grupo 2A) (Gomes *et al.*, 2021; Chandra *et al.*, 2023).

Este herbicida é rapidamente degradado no ambiente, tendo meia-vida de 0,8-151 dias, dependendo das propriedades do solo e de condições ambientais variáveis. Seu principal metabólito é o AMPA (ácido aminometilfosfônico), mas quando absorvido é basicamente excretado intacto nas fezes e na urina (biotransformações em animais são mínimas, apenas 1%). O glifosato, após 10 dias de exposição, é encontrado principalmente no tecido renal. Sintomas de intoxicação aguda irão variar de acordo com a formulação, mas em geral são: dor de garganta e lesões na mucosa oral; dor abdominal, náuseas e diarreia; hipotensão transitória, taquipneia e edema pulmonar. O tratamento é sintomático (Bai; Ogbourne, 2016).

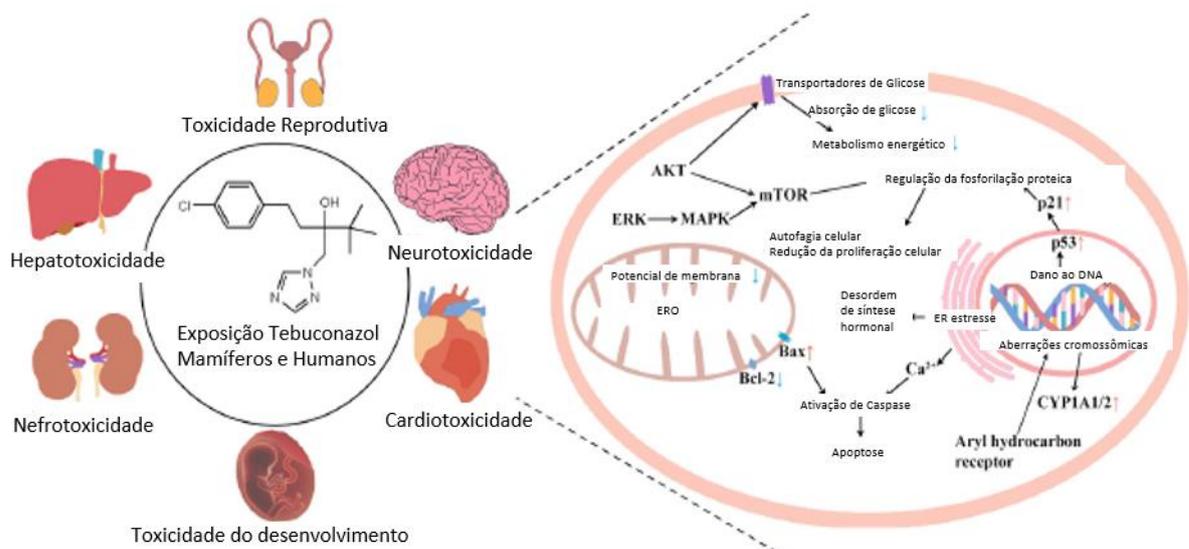
Para estudos subcrônicos, de acordo com a OECD 408, Bali e colaboradores estudaram em camundongos, duas doses de 250 e 500 mg/kg em três tempos de exposição (agudo 28 dias; subcrônico 6 semanas; crônico 12 semanas); por gavagem que o glifosato causa prejuízos de aprendizagem e memória associados à inibição de acetilcolinesterase e estresse oxidativo (Bali *et al.*, 2019). Outro estudo, em camundongos, mesmas doses e tempos de exposição, demonstrou que o glifosato causa, além de ansiedade e depressão, alterações na microbiota

intestinal (Aitbali *et al.*, 2018). Em camundongos Swiss, as doses de 100 mg.kg^{-1} P.C por dia de Roundup® (formulação comercial) e $0,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ P.C por dia de glifosato (padrão), em água *ad libitum*, por 12 semanas, causam disfunção renal por nefrite (Zhang *et al.*, 2021).

É fato que agrotóxicos podem causar danos a organismos não alvo. Muitos destes danos estão relacionados a danos ao DNA, a partir de observações do aumento da frequência de aberrações cromossômicas e micronúcleos. A literatura cita que piretróides, neonicotínicos e carbamatos podem causar dano hepático, estresse oxidativo e, conseqüentemente, efeitos genotóxicos em sistemas orgânicos (Ilyushima *et al.*, 2019).

Mais especificamente, podemos citar que o tebuconazol demonstra potencial toxicidade no desenvolvimento, genotoxicidade, toxicidade reprodutiva, mutagenicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, cardiotoxicidade e nefrotoxicidade relacionados a apoptose mediada por estresse oxidativo, que perturba o metabolismo, incluindo o hormonal, levando a danos ao DNA e anormalidades transcripcionais. Um resumo esquemático da ação do tebuconazol é descrito na figura 2. Seus produtos de degradação podem ser mais tóxicos que o próprio agrotóxico (Ku *et al.*, 2021; Othmère *et al.*, 2021; Othmère *et al.*, 2022; Dong *et al.*, 2024). É considerado pela EPA uma substância potencialmente carcinogênica (EPA, 2024).

Figura 2 – Mecanismo de ação do estresse oxidativo causado pelo agrotóxico tebuconazol. AKT, proteína quinase B; ERO, espécies reativas de oxigênio, ERK, quinase regulada por sinal extracelular, MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; RE, retículo endoplasmático.



Fonte: Adaptado de Dong *et al.* (2024).

O imidacloprido é genotóxico, com danos evidenciados por ensaios cometa e micronúcleo tanto em sangue periférico quanto em análise de PCE de medula óssea. Evidências indicam que seu principal metabólito, o ácido 6-cloro-nicotínico, está envolvido no processo tóxico, por causar danos clastogênicos. Imidacloprido também é considerado um depressor hematopoiético (Kataria et al., 2015; Guo et al., 2018; Saxena et al., 2015; Bagri et al., 2016; Stivaktavis et al., 2016, Ilyushima et al., 2019; Ilyushima et al., 2020).

Talvez o agrotóxico mais polêmico em questão de genotoxicidade é o glifosato. Apesar de ser considerado pouco tóxico pelas agências ambientais, como EPA e ANVISA, a IARC considera o herbicida um produto potencialmente carcinogênico, conclusão baseada em análise de estudos científicos. Entretanto, estes estudos são muito controversos. Há estudos que indicam que o glifosato não tem efeito genotóxico, outros relatam o efeito, e há também aqueles que indicam efeito genotóxico fraco, porém detectável. Para os estudos que afirmam que não há efeito, os autores sugerem que possíveis observações estejam relacionadas a adjuvantes das formulações, como os surfactantes POEAS (Polioxietilenaminas). Outros estudos sugerem que o problema está relacionado ao seu metabólito AMPA (Manas *et al.*, 2009; Kier; Kirkland, 2013; Nagy *et al.*, 2021; He *et al.*, 2022; Rieg *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023).

Um estudo com 79 substâncias, incluindo agrotóxicos, sobre a hematopoiese demonstrou que o glifosato e o imidacloprido não conseguem suprimir a eritropoiese, enquanto que o tebuconazol sim, efeito relacionado a sua atividade anti-androgênica dos fungicidas triazóis, pois hormônios androgênicos estimulam a produção de de glóbulos vermelhos. Entretanto, o glifosato aumenta a frequência de alterações em PCE, enquanto o imidacloprido e o tebuconazol têm as alterações reduzidas (Ilyushima *et al.*, 2019). O mesmo grupo de pesquisa avaliou uma mistura de imidacloprido, tebuconazol e imazidil em camundongos e observaram que a mistura aumenta a frequência de MN na medula dos animais, enquanto que, isoladamente, não, indicando um efeito sinérgico da mistura em baixas doses (Ilyushima *et al.*, 2020).

2.1.4 Avaliação da exposição aos agrotóxicos

Produtos protetores de plantas (PPP), também conhecidos como agrotóxicos, são produtos destinados ao controle de pragas, ervas daninhas e doenças. Apesar dos trabalhadores que manuseiam diretamente estes produtos químicos estarem mais suscetíveis a intoxicações agudas e crônicas, a população em geral também sofre este risco, podendo expor-se ambientalmente de várias outras maneiras, como consumo de água e alimentos contaminados, uso de produtos domésticos e pulverizações aéreas para controle de vetores de doenças endêmicas. Por todos os tipos de exposição citados, a “exposição ambiental a agrotóxicos” torna-se um termo complexo, pois não há exposição a um único produto, mas a uma mistura, e as variáveis intrínsecas podem reduzir ou potencializar o seu risco. Desta forma, a monitorização da exposição torna-se um problema, pois precisa se estender além dos trabalhadores expostos, pois vários riscos à saúde e ambientais estão relacionados aos agrotóxicos, como infertilidade, doenças metabólicas, distúrbios psiquiátricos e câncer (Bolognesi *et al.*, 2011; Nolasco *et al.*, 2023; Sherif *et al.*, 2023).

A detecção precoce da exposição à uma substância química resulta na diminuição ou prevenção de efeitos adversos em decorrência desta exposição. Avaliar uma exposição possibilita tomar decisões inerentes à prevenção e controle dos agentes contaminantes provenientes do uso e da poluição causados pela crescente industrialização e modernização da agricultura e pecuária, por exemplo (Amorim, 2003; Valente *et al.*, 2016).

O biomonitoramento permite mensurar a intensidade, frequência e duração de uma exposição e, conseqüentemente, o potencial risco de uma exposição. Risco é a probabilidade de um perigo real (capacidade de uma substância causar um efeito adverso) acontecer, em condições específicas. Conhecer a toxicocinética (absorção, distribuição, transformação e eliminação) da substância é importante para compreender a interação da substância em seu sítio de ação para identificar seus possíveis efeitos (Valente *et al.*, 2016).

Assim, para o caminho até a tomada de decisão, monitora-se a presença destas substâncias em um organismo, observando-se uma dada resposta biológica ou mesmo seus efeitos adversos, por meio da própria substância, de seus metabólitos ou outra característica mensurável da exposição. Para tudo que pode ser mensurável, ou seja, aos indicadores biológicos da exposição, dá-se o nome de biomarcador, sendo dividido em três categorias: exposição, efeito e suscetibilidade (EPA, 2024).

Biomarcadores de exposição são caracterizados pela interação entre a substância exógena (contaminante), ou seu metabólito, ou um produto de interação e um componente endógeno, disponibilizando informações sobre a quantidade da substância que o organismo foi exposto e a verdadeira quantidade absorvida (dose interna) (Amorim, 2003; Araoud, 2011; Silva, 2016).

Biomarcadores de efeito é o resultado da interação entre quantidade da substância absorvida e receptores biológicos do organismo exposto, gerando fenômenos bioquímicos, precoces e reversíveis, mas que também predizem respostas tardias. Biomarcadores de exposição indicam a quantidade da substância no organismo enquanto os biomarcadores de efeitos indicam o quanto da exposição interagiu com o organismo, podendo, assim, não serem específicos para uma substância, mas que, de certa forma, torna possível avaliar a ação da substância química no órgão alvo a partir da medida de uma alteração biológica associada a esta ação (Prista, Uva, 2007; Silva, 2016; EPA, 2022).

Como nem todos os indivíduos apresentam as mesmas respostas à uma exposição química, os biomarcadores de suscetibilidade identificam a habilidade inerente ou adquirida de um organismo a responder a uma exposição específica. É possível observar quando alguns indivíduos são mais sensíveis, e a resposta está relacionada a fatores genéticos e a fatores biológicos, como estado nutricional, de saúde, estilo de vida e estágio de vida (Amorim, 2003; Silva, 2016; EPA, 2022).

Algumas características fazem o biomarcador ser considerado ideal, como: alta especificidade para o efeito avaliado; refletir o efeito desde o início da exposição; ser mensurável; ser analisado por técnica não invasiva ou pouco invasiva; e ter alta sensibilidade para o fluido/ matriz biológico escolhido. É muito importante que haja uma relação entre a concentração do biomarcador e a exposição à substância química. Desta forma, quanto mais sensível o biomarcador, melhor. O problema é que é muito difícil encontrar um biomarcador com todas as características acima citadas (Valente *et al.*, 2016).

Com o crescente aumento de substâncias químicas novas que são lançadas no mercado mundial, incluindo não apenas agrotóxicos, como também produtos como de higiene pessoal, o biomonitoramento torna-se uma importante ferramenta, uma vez que, além de avaliar os riscos à saúde humana, avalia tendências temporais a determinadas concentrações (dose-resposta); avalia como as mudanças na tecnologia (exemplo: nanomateriais) influenciam na exposição; possibilita a realização de estudos epidemiológicos; e auxilia as agências regulatórias sobre

como proceder, aumentando a eficácia no controle da utilização e da exposição às substâncias (Yusa *et al.*, 2012; Dalmolin *et al.*, 2020).

Apesar dos biomarcadores de exposição serem os mais frequentemente usados para monitorar uma exposição a poluentes ambientais, os biomarcadores de efeito, como estresse oxidativo e genotoxicidade, são importantes para identificar danos causados à célula e ao material genético. A avaliação do estresse oxidativo, dosando as enzimas (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT e glutathiona peroxidase - GSH-Px, por exemplo) ou substâncias formadas por peroxidação lipídica (malondialdeído e hidroperóxidos, por exemplo), indica se substâncias induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem sobrecarregar o sistema antioxidante natural e causar danos celular e/ ou genético. A genotoxicidade causada por uma substância química que interage com o DNA pode induzir anormalidades nucleares (micronúcleo, brotos nucleares e pontes), conduzindo a perda da informação gênica pela célula, inclusive provocando mutações que podem provocar câncer, e sua avaliação (mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA), se faz por meio de observações de: aberrações cromossômicas; troca de cromátides irmãs (recombinação de segmentos por quebra e união, trocando fisicamente regiões de fitas parientais nos cromossomos duplicados); mutações pontuais e oncogênicas; micronúcleos e ensaio cometa (específico para lesão no DNA). É importante ressaltar que todos os agentes mutagênicos são genotóxicos; porém, nem todos agentes genotóxicos são mutagênicos. Por causa da suscetibilidade individual, é importante avaliar o resultado final tanto com as variações genéticas quanto com as epigenéticas (Wilson III; Thompson; 2007; Valente *et al.*, 2016; Mossa *et al.*, 2018; Chaufan *et al.*, 2019).

2.1.4.1 Biomarcadores de Efeito

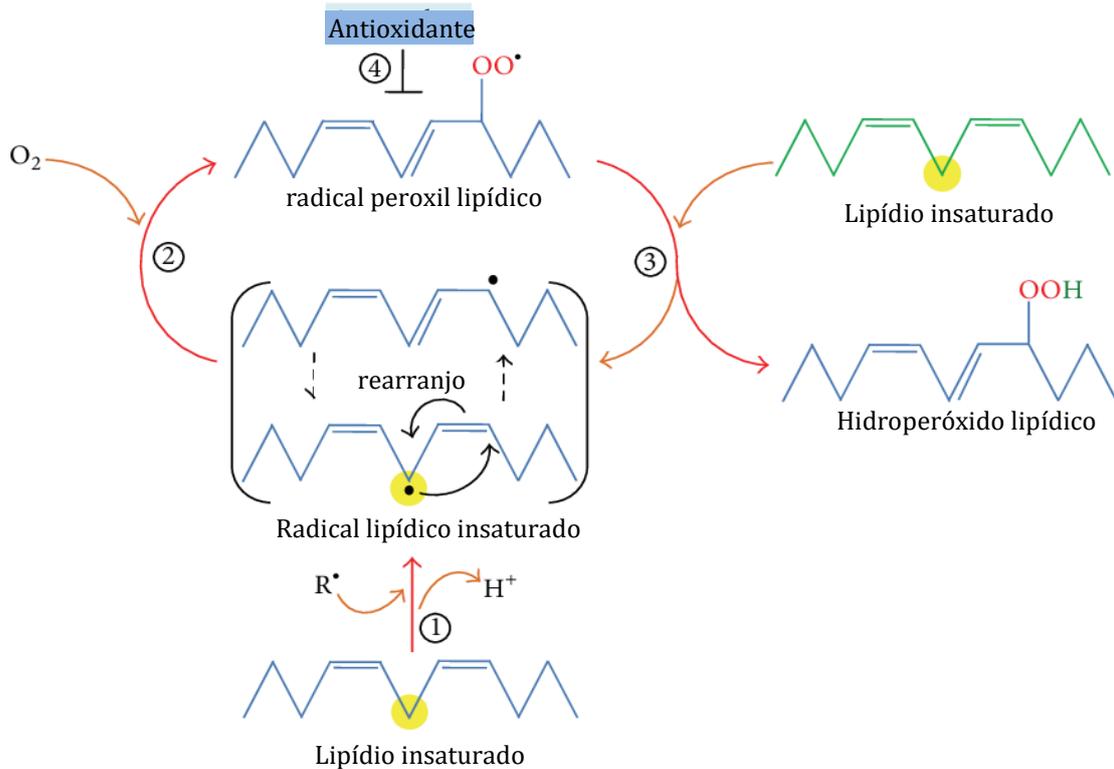
Espécies reativas de oxigênio (ERO) são continuamente produzidas como produtos do metabolismo aeróbio de animais e plantas, em geral em processos envolvendo reações enzimáticas, transporte de elétrons mitocondrial, transdução, ativação de fatores de transcrição nucleares, expressão gênica e ação antimicrobiana de neutrófilos e macrófagos. Podem ser radicais livres, que contêm um átomo de oxigênio como o O_2^- , OH^- e RO_2^- , ou moléculas com capacidade de gerar produtos com elétrons desemparelhados, como H_2O_2 , O_3 e $HOCl$. Dependendo do tipo da ERO, ela pode ser altamente tóxica, reagindo com DNA, lipídeos e proteínas, sendo necessária sua eliminação rapidamente pelos vários mecanismos enzimáticos

e não-enzimáticos do organismo. Quando a estrutura atacada são lipídios, dá-se o nome de peroxidação lipídica e seu produto principal é o malondialdeído (MDA) (Blair, 2001; Apel & Hirt, 2004; Bayir, 2005; Abdel-Razik *et al.*, 2021).

A peroxidação de ácidos graxos insaturados de membranas gera, inicialmente, hidroperóxidos lipídicos (figura 3), sendo estes produtos intermediários dos aldeídos MDA, hidroxihexenal (HHE, derivado de ácidos graxos poliniinsaturados n-3) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE, derivado dos ácidos graxos poliinsaturados n-6) (Abdalla; Senna, 2008, Ayala *et al.*, 2014).

Figura 3 – Formação dos hidroperóxidos lipídicos.

Na Iniciação, os pró-oxidantes abstraem o hidrogênio alílico, formando o radical lipídico centrado no carbono; o radical de carbono tende a ser estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado (etapa 1). Na fase de Propagação, o radical lipídico reage rapidamente com o oxigênio para formar um radical peróxi-lipídico (etapa 2) que abstrai um hidrogênio de outra molécula lipídica gerando um novo radical lipídico e hidroperóxido lipídico (etapa 3). Na reação de Finalização, os antioxidantes doam um átomo de hidrogênio para as espécies de radicais peróxi-lipídicos, resultando na formação de produtos não radicais (etapa 4)



Fonte: Adaptado de Ayala *et al.* (2014).

Em geral, o ambiente redutor intracelular ajuda a prevenir os danos mediados por radicais livres. Esse ambiente redutor é mantido pela ação de enzimas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase, e substâncias antioxidantes, como a glutathione, ascorbato (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) e tioredoxina. Alterações no estado redox e depleção de antioxidantes pela exposição a oxidantes levam ao estresse oxidativo e lesão oxidativa resultante. Processos inflamatórios agudos, com alto recrutamento de macrófagos e neutrófilos, podem produzir muitos radicais livres pela ação da mieloperoxidase (MPO), causando estresse oxidativo. Agrotóxicos podem perturbar este equilíbrio redox, causando danos no organismo e que podem ser detectados por meio de dosagens tanto das enzimas quanto de produtos da oxidação (Blair, 2001; Apel & Hirt, 2004; Bayir, 2005; Abdel-Razik *et al.*, 2021).

A peroxidação lipídica é um marcador muito utilizado de danos oxidativos, sendo o nível de MDA, um produto de degradação estável de ácidos graxos poliinsaturados, dosado pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), onde o MDA se complexa com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico, formando um produto de coloração rosa. Os produtos intermediários da peroxidação lipídica são os hidroperóxidos, que também podem ser dosados pelo ensaio de oxidação ferrosa/laranja de xilenol (FOX). A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que converte o superóxido $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 . O método de dosagem da SOD é baseado na habilidade da superóxido dismutase consumir o $O_2^{\cdot-}$, diminuindo, assim, a razão de auto-oxidação do pirogalol (Blair, 2001; Apel; Hirt, 2004; Bayir, 2005; Abdel-Razik *et al.*, 2021).

Além das membranas celular e nuclear, o DNA é o componente da célula mais suscetível à atuação dos radicais livres. Danos causados ao DNA e mal reparados desencadeiam doenças relacionadas aos processos de mutagenicidade e carcinogenicidade. Por isso, mesmo xenobióticos em baixas concentrações, testes como o ensaio de micronúcleo podem detectar substâncias genotóxicas (Heddle *et al.*, 2010).

Danos ao DNA são reconhecidos e reparados pelo sistema de reparo do DNA dos organismos. Estes danos podem ser micro lesões (puntiformes) ou macro lesões, que correspondem a variações numéricas (ganho ou perda; dano aneugênico) ou estruturais (ruptura, deleção ou rearranjo; dano clastogênico) dos cromossomos. Também podem ocorrer devido à idade e estilo de vida, como hábitos de fumar e etilismo; longas horas de trabalho e poucas horas de sono; inatividade física; tipo de dieta e estresse. Várias substâncias químicas são capazes de causar

esses tipos de danos. Assim, a cada dia mais observa-se a importância de avaliar-se o dano ao DNA por quebra, perda ou rearranjo de cromossomos (Ferraz *et al.*, 2016; Visat, 2020).

Substâncias genotóxicas são aquelas capazes de induzir alterações no material genético de organismos a elas expostos, direta ou indiretamente, formando adutos, alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA, sendo estes danos detectados por testes de genotoxicidade. Dois testes de genotoxicidade são aprovados e recomendados pelos guias da OECD: o teste de micronúcleo e o ensaio cometa (Mossa *et al.*, 2018; Chaufan *et al.*, 2019).

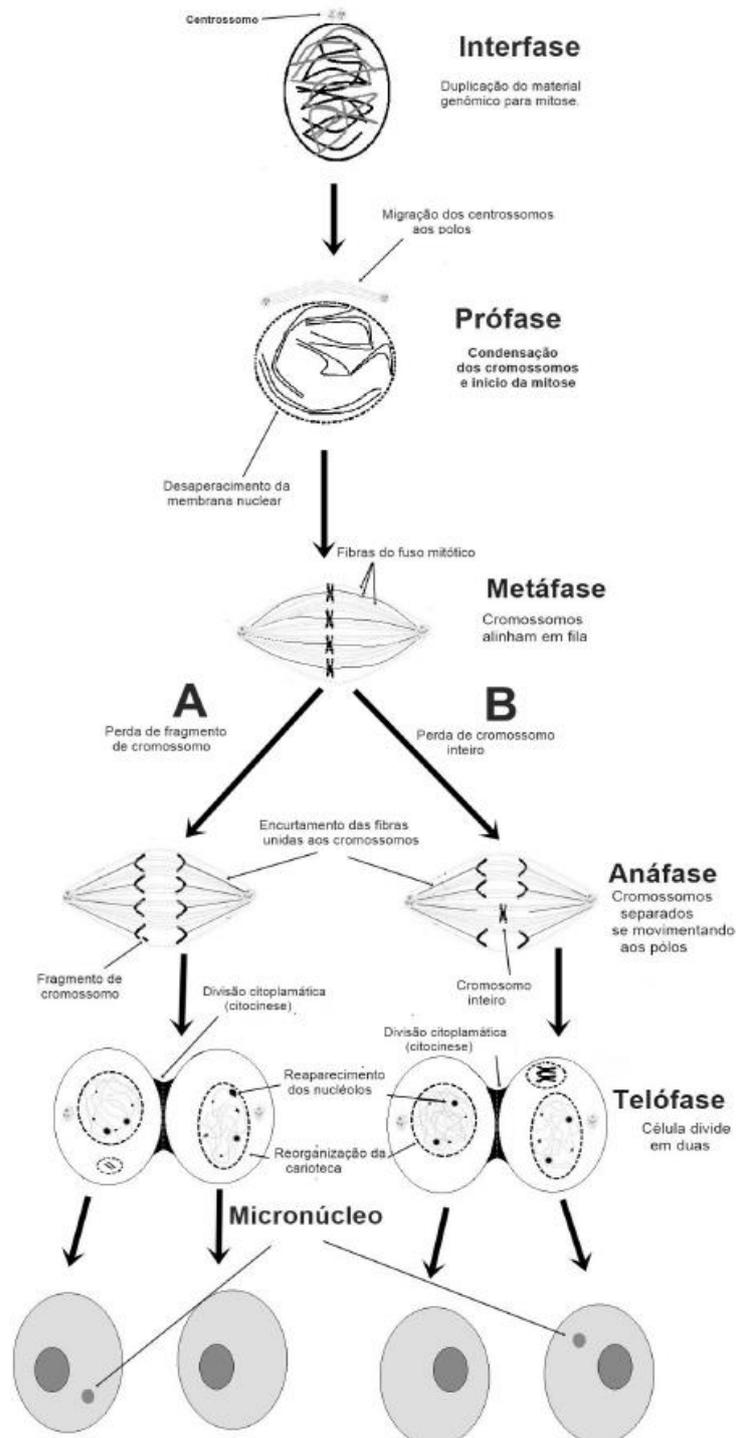
O ensaio de eletroforese em gel de célula única ou ensaio cometa é técnica sensível para detectar danos ao DNA, tendo como base o grau de fragmentação do DNA e sua migração pela eletroforese. Entretanto, não é tão simples em questão de aplicabilidade, pois necessita de corantes específicos (fluorescentes), microscópio específico (para fluorescência) e cuba de eletroforese. Após a lise das membranas celular e nuclear, há uma indução eletroforética, fazendo com que DNA liberado no meio migre pela matriz de gel de agarose. Quando observado em microscópio, apresenta a forma de um cometa, com cabeça, região nuclear e cauda. Quanto maior a cauda, maior o dano ao DNA, pois esta é a região que contém fragmentos ou fitas de DNA que migraram na direção do ânodo. O resultado final, apresentado como o comprimento total da "cauda" e a densidade de DNA, fornece dados indiretos sobre o estado do DNA da amostra (Brianezi *et al.*, 2009).

O ensaio de micronúcleo é mais simples do que o ensaio cometa, sendo a pesquisa de MN é um teste de extrema relevância para a Toxicologia Ambiental, pois que detecta mutações cromossômicas, podendo ser considerados como marcadores precoces para a carcinogênese (Bonassi *et al.*, 2003, Wultsch *et al.*, 2011). Mais especificamente, micronúcleo é um pequeno núcleo extra localizado no citoplasma celular, separado do núcleo principal, e é uma anomalia celular de cromossomas que falharam em migrar para os pólos durante a anáfase. Pode ser causado por dano em cromossomo, ou serem fragmentos (clastogênico) ou cromossomos inteiros (aneugênico) que permaneceram na célula durante a fase mitótica, não sendo incorporados aos núcleos filhos, pois são incapazes de interagir com o eixo formado na citocinese da fase anáfase, conforme figura 4 (Dertinger *et al.*, 2011; Valente *et al.*, 2016; Mossa *et al.*, 2018; Chaufan *et al.*, 2019).

A contagem da frequência de micronúcleo pode ser realizada em células *in vitro*, com paralisação da citocinese, não necessitando de muita expertise para analisar o cromossoma aberrante; ou *in vivo*, em mucosa oral, medula óssea ou sangue periférico. Os corantes mais

utilizados são o laranja de acridina (específico para núcleo, mas de uso limitado por necessitar de microscópio de fluorescência), giemsa, feulgen e o kit panótipo rápido. Recentemente, o uso da automação, como a citometria de fluxo, tem sido utilizado para a quantificação do MN (Le Bihanic *et al.*, 2016).

Figura 4 – Esquema de formação de micronúcleos.



Fonte: Adaptado de Valente *et al.* (2016).

O ensaio de micronúcleo pode ser expandido para o ensaio de citoma, onde outras anomalias são monitoradas, como brotos celulares, apoptose, necrose e frequência da mitose. Entretanto, o ensaio de MN é o mais utilizado, pois sua execução é mais fácil e rápida do que a análise do teste de citoma, que necessita de experiência laboratorial para analisar os resultados. A escolha também se dá pelo fato de que muitos trabalhos correlacionam as aberrações cromossômicas aos MNs. Sendo assim, apenas a análise de MN é capaz de indicar a genotoxicidade de uma exposição (Dertinger *et al.*, 2011; Le Bihanic *et al.*, 2016).

Dentre as amostras disponíveis para o ensaio de MN, a raspagem da mucosa oral é a mais simples e fácil de se obter, podendo ser utilizados espátula, swab de algodão ou escova. Como outras amostras biológicas, o ensaio pode ser realizado em sangue periférico e, em animais de laboratório, diretamente na medula óssea. A análise no sangue periférico somente é possível se o tempo de exposição e a depuração das células sanguíneas pelo baço forem compatíveis. Para a análise em células de medula óssea, recomenda-se a contagem em eritrócitos policromáticos (PCE, do inglês, *polychromatic erythrocytes*), uma vez que são células jovens que acabaram de expulsar o núcleo principal (o MN, se formado, permanece), facilmente identificáveis e possuem um ciclo de vida curto (GODOY *et al.*, 2019; Ilyushima *et al.*, 2019).

Dentre as muitas substâncias químicas consideradas genotóxicas estão os agrotóxicos. Mesmo em baixas concentrações, eles têm a capacidade de aumentar a frequência de micronúcleos em eritrócitos, por exemplo. Agrotóxicos podem agir diretamente no núcleo, atuando sobre o cromossomo ou sobre o fuso mitótico, causando uma perda de parte dos cromossomos, ou de todo o cromossomo; pode atuar indiretamente, por meio da indução de radicais livres e o estresse oxidativo. A maioria dos estudos relacionam a presença de micronúcleos após uma exposição com o estresse oxidativo causado pelos agrotóxicos (Prasad *et al.*, 2009; Abdehafez *et al.*, 2022; Bagri *et al.*, 2016; He *et al.*, 2022; Ilyushima *et al.*, 2019; Ilyushima *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2023; Mohamed *et al.*, 2019; Ring *et al.*, 2022; De Maria-Serra *et al.*, 2021; Mendes *et al.*, 2018).

A biomonitorização à exposição a agrotóxicos deve ser estudada conjuntamente com as diferenças individuais (susceptibilidade diferencial), como a capacidade de reparar danos ao DNA e/ou ativar ou desativar as substâncias genotóxicas (Bolognesi *et al.*, 2011). Pensando na ativação/ desativação das substâncias, a microbiota intestinal representa mais um ponto a ser acrescentado ao estudo da genotoxicidade, pois, assim como o trato gastrointestinal, os microrganismos da microbiota são os primeiros a ficarem expostos, podendo metabolizar as

substâncias antes mesmo que o fígado. A importância da microbiota não está apenas na mediação da toxicidade, como também na facilitação da ação da substância química sobre o organismo devido a sua ampla capacidade enzimática e, conseqüentemente, metabólica (Alexander *et al.*, 2017; Zuo *et al.*, 2018).

2.2 Microbiota Intestinal

O intestino humano abriga incontáveis microrganismos essenciais para a fisiologia e o desenvolvimento do hospedeiro. É o “lar” de um abundante número de organismos procariontes, principalmente bactérias, como também de organismos eucariontes, *archaea* e vírus. A esse universo dá-se o nome de microbiota intestinal. Assim, microbiota intestinal constitui uma complexa comunidade que interage, simultaneamente entre si e com o hospedeiro, por catabolismo e por bioconversão de moléculas complexas, modulando processos biológicos essenciais para a saúde. Microbiota intestinal e o hospedeiro trabalham em conjunto, criando uma interface de múltiplas vias metabólicas, imunes e anti-inflamatórias. Uma perturbação desta homeostase pode levar a doenças no hospedeiro (Alexander *et al.*, 2017; Hall *et al.*, 2017; Young, 2017; Makki *et al.*, 2018; Mendes *et al.*, 2019).

A compreensão do papel biológico dos microrganismos presentes no TGI, como a maturação do sistema imunológico e a modulação do metabolismo da glicose e lipídios, aumentou dramaticamente na última década. Mas, mesmo com milhares de estudos, grande diversidade biológica da microbiota intestinal é considerada uma grande barreira para se elucidar a complexidade das múltiplas vias de interação microbiota-hospedeiro e sua modulação (Alexander *et al.*, 2017).

Em um intestino saudável, em adultos, podem ser encontradas bactérias dos filos *Bacteroidota* e *Bacillota*, em maior número, e de *Pseudomonadota*, *Actinomycedota*, *Verrucomicrobia*, em menor número. Essas bactérias auxiliam na digestão de carboidratos não digestíveis, produção de vitaminas, promoção da homeostase imunológica e previnem a colonização por bactérias patogênicas. Além disso, o co-metabolismo microbiota-hospedeiro converte ácidos biliares (AB) no intestino, reciclando os produtos do catabolismo do colesterol, que agem sobre receptores responsáveis pela obesidade e DM2. A produção de metabólitos como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) têm vários efeitos sobre o hospedeiro, como produção de

mucinas e recrutamento de células do sistema imune (atividade anti-inflamatória). AGCC e AB influenciam a expressão de importantes peptídeos regulatórios. A microbiota também pode modificar a resposta epitelial e sistêmica, ajudando no desenvolvimento e na atividade do sistema imune do hospedeiro, pois este relacionamento simbiótico “educa” o sistema imunológico do hospedeiro. A proteção contra patógenos se dá pela combinação de atividades metabólicas, competição direta por nutrientes e estímulos imunológicos no hospedeiro (Flint *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2016; Hall *et al.*, 2017; Young, 2017).

Entretanto, é importante ressaltar que a variedade da microbiota será influenciada pela genética do hospedeiro, que define a química e a física da área habitada pela microbiota; composição da dieta; e estilo de vida. Todos os fatores que alteram a microbiota intestinal são importantes pois afetam diretamente o hospedeiro. Um desbalanço na microbiota resulta em perda das funções benéficas ou a introdução de funções mal adaptadas pelos microrganismos. Esse desbalanço denomina-se disbiose (alteração na composição da microbiota) e está relacionada a várias doenças, tanto intestinais, como doença celíaca e síndrome do intestino irritável, quanto extra-intestinais, como DM2, asma, obesidade, autismo, artrite reumatoide (Bajaj, 2019; Dalile *et al.*, 2019; Hall *et al.*, 2017).

A microbiota não é apenas nicho-específica. Ela tem uma ecologia dinâmica altamente personalizada. Sua composição da microbiota muda substancialmente ao longo da vida, em três momentos distintos: do nascimento até os 3 anos de idade, com predominância de bactérias anaeróbias facultativas, como *Bifidobacterium* e *Bacteroidetes*; dos 3 anos à dieta normal (a maior parte da vida), quando predominam anaeróbios como a *Bifidobacterium*; e na velhice, onde há uma diminuição da *Bifidobacterium* e um aumento de *Enterobacteriaceae*. A formação e modulação da microbiota é influenciada pelas condições do nascimento (no parto normal a criança entre em contato com a microbiota da mãe); amamentação (bactérias importantes para colonização estão presentes no colostro e no leite materno); dieta (natural x processada); medicação (antibióticos e outros); e a genética do hospedeiro. Após os três anos de idade, a criança tem uma microbiota parecida com a do adulto (Flint *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2016; Alexander *et al.*, 2017; Caminero *et al.*, 2019).

Um grande modulador da microbiota intestinal é a alimentação. Estudos mostram que alimentos com elevados teores de gorduras saturadas e poli-insaturadas proporcionam um ambiente propício para o filo *Bacillota*, permitindo a extração e estocagem de nutrientes com maior eficiência, auxiliando, desta forma, o ganho de peso. Por outro lado, a ingestão de fibras, frutas

e hortaliças, proporciona o aumento da produção de derivados da fermentação de carboidratos resultando um ambiente desfavorável para ele, e favorecendo as bactérias do filo *Bacteroidota*. Uma relação mais alta de *Bacillota/Bacteroidota* é encontrada tanto em animais quanto em humanos obesos. Já em pacientes que têm doença inflamatória intestinal, esta relação F/B está diminuída. Este desbalanço é considerado disbiose e também está relacionado a várias outras doenças. Para a microbiota intestinal humana, a disbiose varia entre as doenças e uma manifestação comum é a substituição da complexa comunidade de anaeróbios típica do adulto saudável por uma comunidade de menor diversidade microbiana, com um aumento de anaeróbios facultativos. (Durço; Maynard, 2018; Magne *et al.*, 2020).

Porém, o ambiente onde o hospedeiro vive também influencia na diversidade da microbiota intestinal. Populações que habitam áreas rurais têm uma diversidade bacteriana maior se comparadas às populações de áreas urbanas. Podemos dizer que a urbanização, com mudanças na dieta (alimentos ultra-processados e aditivos alimentares), uso de antibióticos e a poluição ambiental, também refletem na ecologia da microbiota intestinal. Essas alterações também estão associadas a disbiose (Alexander *et al.*, 2017; Zuo *et al.*, 2018).

Ao contrário do genoma hospedeiro, a microbiota intestinal exibe uma plasticidade e pode facilmente se ajustar a uma grande variedade de estímulos ambientais, além dos estímulos do próprio hospedeiro, pois ela pode modificar a estrutura química de várias moléculas da dieta. Alterações no padrão dietético a longo prazo constituem um importante determinante de enterótipos (categorias das bactérias) de microbiota enquanto dietas de curto prazo alteram a estrutura da comunidade, expressão gênica e produção de metabólitos (Caminero *et al.*, 2019; Zmora *et al.*, 2019).

De modo geral, bactérias que degradam glicanos, como lignina, pectina, celulose, fruto-oligosacarídeos, têm polissacarídeo-liases (CAZ enzimas) e são denominadas degradadoras primárias. Humanos têm um número limitado de glicosil-hidrolases e nenhuma CAZ enzimas. Como exemplos, podemos citar *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*. Essa degradação primária libera glicose. Há também uma degradação secundária, por fermentação, onde são produzidos metabólitos como acetato, propionato, butirato, lactato. Esses produtos do metabolismo bacteriano, além de beneficiar o hospedeiro, também auxiliam outros microorganismos (de forma cruzada). Por exemplo, a fermentação gera H₂, que é consumido por bactérias redutoras de SO₄, metanogênicas e acetogênicas (Zmora *et al.*, 2019).

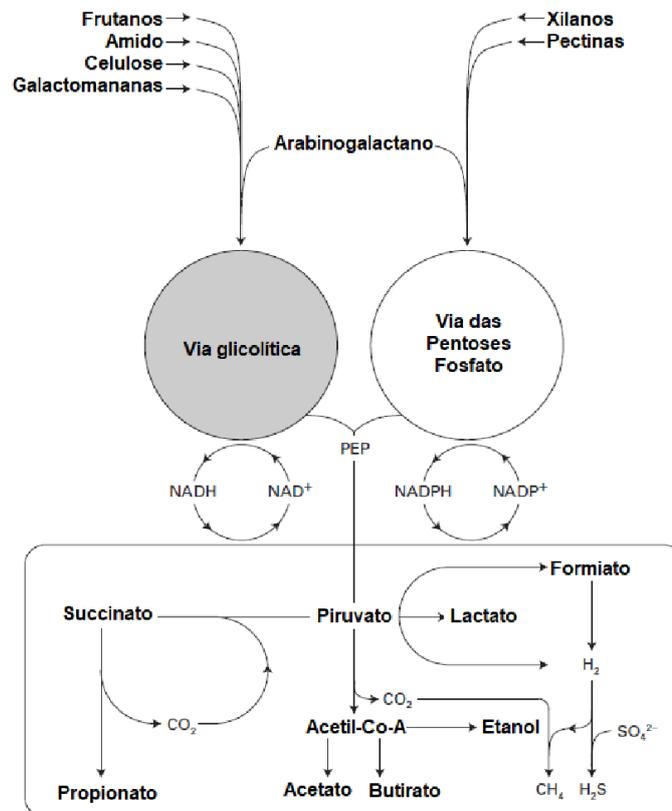
Muitos metabólitos produzidos pela microbiota são benéficos para o hospedeiro. Entre eles, pode-se destacar os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), metabólitos classificados pelo número de seus carbonos gerados por bactérias fermentadoras das fibras da dieta (figura 5). As fibras alimentares são carboidratos complexos, que servem como substratos para a fermentação anaeróbica por bactérias no cólon. Os mais importantes produtos desta fermentação são os ácidos carboxílicos com caudas alifáticas de menos de 6 carbonos, sendo o acetato (C2), propionato (C3) e o butirato (C4) os mais abundantes por constituírem mais de 90% dos AGCCs no cólon. Esses metabólitos controlam o pH intestinal, são dependentes do substrato (fibras), da composição da microbiota e do trânsito intestinal. São absorvidos pelos colonócitos, pois são preferencialmente a fonte de energia dessas células (butirato). No fígado, os AGCCs são usados como substrato de energia para hepatócitos. Além disso, protegem contra inflamação; mantêm a integridade da barreira intestinal por alterar a produção de muco (acetato e butirato aumentam a produção de mucinas); alteram a motilidade intestinal. Grande parte do acetato metabolizado está envolvida na lipogênese, no tecido adiposo e é oxidada no músculo, sendo que ainda podem ser convertidos em butirato pelas bactérias. O butirato media a integridade da barreira intestinal, são substrato energético para colonócitos, atuam na diminuição da inflamação crônica e na manutenção da homeostase intestinal. (Young *et al.*, 2017; Caminero *et al.*, 2019; Cruz *et al.*, 2021; Hou *et al.*, 2022).

Os AGCCs são considerados fonte de energia para o epitélio intestinal e tecidos periféricos, bem como um regulador do metabolismo e da inflamação, tendo dois receptores acoplados à proteína G (GPRs), o GPR41 (FFAR3/FFA3) e o GPR43 (FFAR2/FFA2), capazes de detectá-los. Esses receptores são expressos tanto no intestino como também em vários outros locais, como tecido adiposo, ilhotas pancreáticas e células imunes. Assim, por meio de seus metabólitos, a microbiota intestinal desempenha um papel regulador na saúde gastrointestinal e também em tecidos periféricos, incluindo tecido adiposo, músculo esquelético, fígado e pâncreas, melhorando as condições de hospedeiros que têm doenças metabólicas como obesidade e DM2 (Kim *et al.*, 2014; González Hernández *et al.*, 2019).

O pH intestinal controla as populações bacterianas. Metabólitos ácidos produzidos pela microbiota, ao reduzirem o pH intestinal, desencorajam organismos patogênicos a se desenvolverem, além de estimularem tipos específicos de bactérias a se desenvolverem. Em pH próximo ao neutro (6,5), bactérias gram-negativas, como *Bacteroidota*, predominam. Em pH mais ácido (5,5), bactérias gram-positivas, como *Bacillota*, são as predominantes. Os metabólitos ácidos também podem modular a produção de citocinas, por exemplo, aumentando

a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória; diminuindo IL-2 e IL-5, citocinas pró-inflamatórias; regulando IL-22, uma citocina que age sobre as células epiteliais, mantendo a barreira mucosa íntegra e promovendo a defesa do hospedeiro (Sanders *et al.*, 2019; Vieira *et al.*, 2016).

Figura 5 – Diagrama simplificado de quebra de polissacarídeos e as principais vias de fermentação de carboidratos pela microbiota intestinal no intestino grosso.



FONTE: adaptado de Macfarlane; Macfarlane (2003). PEP, fosfoenolpiruvato.

Uma perturbação da microbiota causada, por exemplo, por um antibiótico ou poluentes ambientais aumenta as concentrações de oxigênio intraluminal alterando a composição da microbiota ao favorecer a proliferação de anaeróbios facultativos. Para restabelecer o equilíbrio, anaeróbios tolerantes ao oxigênio têm a capacidade de colonizar e, assim, restabelecem a produção de butirato. O metabolismo deste AGCC pelos colonócitos causa um esgotamento do oxigênio intraluminal, permitindo retomada da colonização por anaeróbios obrigatórios e, conseqüentemente, da homeostase. O butirato é uma fonte energética primária de calorías para os colonócitos e seu consumo tem se mostrado crucial para manter a hipóxia no lúmen do cólon,

controlando a colonização de anaeróbios facultativos patogênicos, como *Salmonella enterica*. (Kriss *et al.*, 2018; Kolodziejczyk *et al.*, 2019).

Estima-se que mais de 1300 poluentes ambientais possam ser metabolizados pela microbiota intestinal, que promove biotransformações por uma série de reações como redução, reação-lyase, transferência de grupo funcional, hidrólise e transformação enzimática. A microbiota também pode desconjugar químicos que passaram por conjugação pelo hospedeiro, trazendo o xenobiótico a sua forma original ou nova molécula, fazendo que ele seja novamente absorvido pelo organismo. A microbiota intestinal tem grande importância e influência na saúde do hospedeiro e, por causa do aumento da utilização de agrotóxicos, por exemplo, a homeostase pode ser perturbada, por alterar sua composição e, conseqüentemente, afetando seus metabólitos (Tsiaoussis *et al.*, 2019; Yuang *et al.*, 2019).

A relação microbiota intestinal e poluição ambiental tem dois vieses. De um lado, esses poluentes, como nitrotoluenos, agrotóxicos, metais, corantes azo, podem ser metabolizados pela microbiota, auxiliando o hospedeiro. Por outro lado, há poluentes, como os hidrocarbonetos aromáticos e agrotóxicos, que são biotransformados pela microbiota, trazendo ao hospedeiro produtos mais tóxicos, que desregulam o organismo. Assim, a microbiota intestinal com sua ampla capacidade enzimática pode metabolizar poluentes ambientais, potencializando ou reduzindo seus efeitos tóxicos. De qualquer forma, as primeiras alterações visíveis causadas por contaminantes ambientais serão sobre a microbiota, antes mesmo do hospedeiro (Zuo *et al.*, 2018).

A microbiota intestinal exerce um papel importante na patogênese da síndrome metabólica ao modular a absorção de energia, motilidade intestinal, apetite, metabolismo de glicose e lipídios, bem como o armazenamento hepático de gordura do hospedeiro. Uma disbiose, por exemplo, pode fazer com que a microbiota influencie o sistema imunológico do hospedeiro, culminando na translocação intestinal de fragmentos bacterianos e levando à inflamação sistêmica e resistência à insulina (Festi *et al.*, 2014; Iatcu *et al.*, 2021).

2.2.1 Modulação da microbiota

A plasticidade da microbiota permite que ela se ajuste a uma variedade de estímulos, tornando-a, assim, alvo potencial de modulação. A modulação da microbiota intestinal pode reduzir a

inflamação intestinal e melhorar a integridade da barreira intestinal, favorecendo o equilíbrio metabólico e promovendo, por exemplo, a perda de peso. Há estratégias utilizadas para modular, de forma benéfica ao hospedeiro, a microbiota intestinal, como o uso de probióticos, prebióticos e post-bióticos. Probióticos são organismos vivos que precisam ser administrados em quantidades e condições adequadas para que estes benefícios sejam alcançados. Os mais comumente usados são os *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomices*. Prebióticos são substratos seletos que serão utilizados pelas bactérias do hospedeiro; para que os benefícios desta estratégia de modulação sejam alcançados, é necessário identificar os componentes da microbiota do hospedeiro. Os post-bióticos são produtos de bactérias não-viáveis ou metabólitos dos probióticos (Vieira *et al.*, 2016; Sanders *et al.*, 2019; Zmora *et al.* 2019).

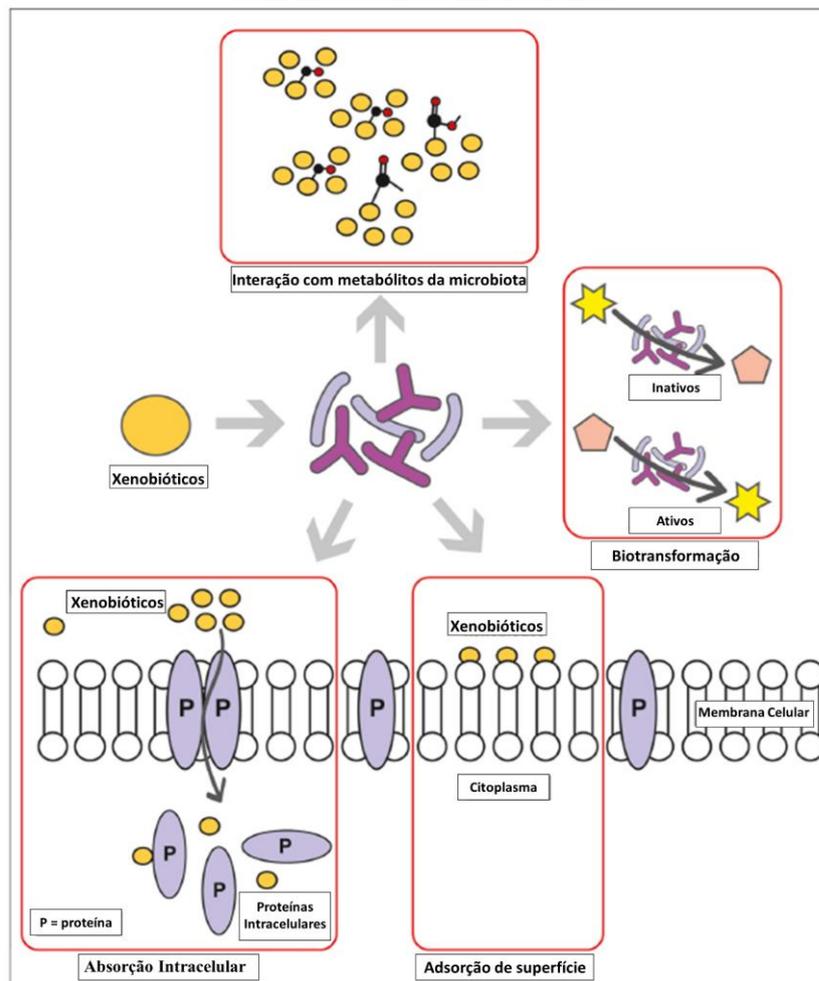
Dos três, os probióticos são a estratégia de modulação mais difundida, mas precisam ser avaliados de modo que seus benefícios para a saúde do hospedeiro sejam conhecidos, contribuindo para o balanço microbiano intestinal do hospedeiro, como por exemplo, em uma inflamação intestinal, regulando os mediadores inflamatórios, aumentando a função protetora da barreira intestinal, aumentando a produção de AGCC e hidratação do cólon, normalizando a motilidade intestinal. Probióticos também podem aumentar a atividade de células natural killer (fagocitose); interagir diretamente com células dendríticas (apresentadoras de antígenos); regular a produção de anticorpos e melhorar a resposta às vacinas; aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias e reduzir as citocinas pró-inflamatórias. Probióticos, além da produção de AGCC, produzem bacteriocinas que podem ser ativas em outros sítios, atuando contra patógenos no trato urinário, por exemplo (Sanders *et al.*, 2019; Cruz *et al.*, 2021).

As doenças que contaminantes ambientais caracterizados por desreguladores endócrinos podem desencadear são as mesmas doenças causadas por uma disbiose da microbiota intestinal e geralmente estas doenças são iniciadas silenciosamente, o que torna uma exposição a xenobióticos um ciclo prejudicial à saúde do hospedeiro, se não controlados tanto a exposição química quanto a disbiose (Ursel *et al.*, 2014; Ortiz *et al.*, 2022). Uma abordagem promissora que tem como intuito reduzir o risco relacionado com a presença de contaminantes ambientais nos alimentos é uma desintoxicação biológica feita por estirpes probióticas e suas enzimas. Há estudos que confirmam que os probióticos são uma ferramenta eficaz, viável e barata que pode prevenir a disbiose induzida por substâncias químicas e, desta forma, amenizar ou eliminar a sua toxicidade. As estirpes probióticas tradicionais mais vendidas incluem as bactérias lácticas (BAL), como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Estas cepas têm elevada tolerância ao pH ácido e à bile, forte adesão à mucosa intestinal e forte capacidade antioxidante e/ou imunorregulador,

características que lhes permitem adaptar-se a alterações induzidas por xenobióticos no ambiente intestinal. Os principais mecanismos de desintoxicação estão descritos na figura 6 (Larsson *et al.*, 2018; Roman *et al.*, 2019; Srednicka *et al.*, 2021).

Figura 6 – Mecanismos de desintoxicação de contaminantes ambientais alimentares por cepas probióticas.

As vias de desintoxicação de xenobióticos por cepas probióticas incluem (1) absorção intracelular (2), adsorção de superfície, (3) biotransformação de xenobióticos (4) interações com metabólitos microbianos



Fonte: Adaptada de Srednicka *et al.* (2021).

A interação via absorção física é reversível e metabolicamente passiva, sendo um processo físico-químico onde os xenobióticos interagem com células microbianas diretamente, podendo elas estarem vivas ou mortas. A biotransformação de xenobióticos por probióticos, antes ou depois de serem biotransformados pelo fígado do hospedeiro, pode alterar a meia-vida, a

toxicidade e a biodisponibilidade destas substâncias químicas, bem como o seu potencial de desregulação endócrina. Outro mecanismo de biotransformação é a interação com metabólitos das bactérias probióticas, como ácidos, compostos fenólicos, ácidos graxos, peptídeos bioativos de baixo peso molecular, que podem se ligar aos xenobióticos e alterar sua toxicidade. Além disso, o probiótico pode alterar a resposta do hospedeiro, modificando a expressão gênica, permeabilidade intestinal, amenizar estresse oxidativo pela produção de metabólitos microbianos antioxidantes, como butirato, folato e vitaminas B1, B12. Como mecanismos extras de proteção ao hospedeiro, as bactérias probióticas podem estimular o peristaltismo intestinal, facilitando assim a excreção dos contaminantes ambientais por meio das fezes. A suplementação com probióticos estabiliza a comunidade microbiana intestinal, restaurando a “assinatura” microbiana perturbada pela exposição a xenobióticos (Srednicka *et al.*, 2021).

A *Bifidobacterium longum* 5^{1A} é uma cepa probiótica que foi isolada das fezes de uma criança saudável de 5 anos de idade, da cidade de Salvador, Bahia. Seu potencial probiótico é relatado vários estudos anteriores, onde: demonstrou a eficácia no tratamento da constipação funcional em crianças (Guerra *et al.*, 2011); protegeu camundongos contra a infecção por *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* (Souza *et al.*, 2013); controlou infecção pulmonar murina induzida por *Klebsiella pneumoniae* (Vieira *et al.*, 2016); reduziu da inflamação em um modelo murino de gota (Vieira *et al.*, 2015); atenuou danos intestinais e resposta inflamatória na colite experimental (Abrantes *et al.*, 2019); reverteu o surgimento de efeitos colaterais e resistência observados no tratamento convencional da giardíase ao reduzir 70% da carga parasitária quando associado ao e *W. paramesenteroides* WpK4 (Fonseca *et al.*, 2019); atenuou os sinais de inflamação em um modelo murino de alergia alimentar (Santos *et al.*, 2021); e atenuou as lesões intestinais causadas pela mucosite induzida por irinotecano, um antineoplásico, em camundongos (Quintanilha *et al.*, 2022).

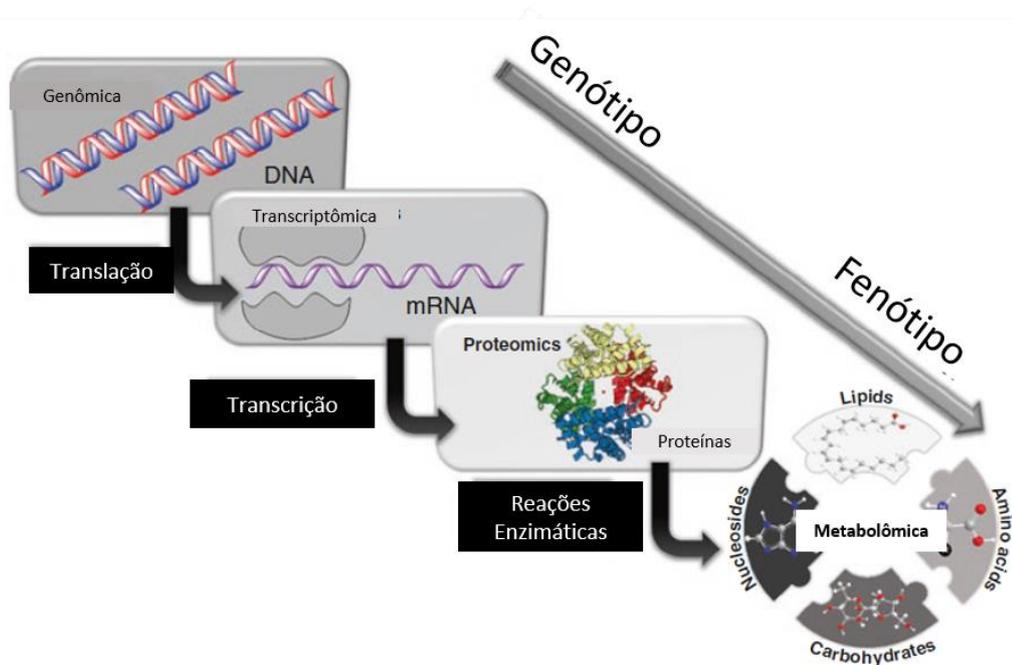
Esta cepa 5^{1A} de *B. longum* possui 26 genes únicos, seis dos quais possivelmente relacionados ao metabolismo de carboidratos e produção de acetato, sugerindo que ela pode utilizar diferentes fontes de carboidratos para uma maior produção deste AGCC e oferecendo mais benefícios à saúde do hospedeiro (Da Silva *et al.*, 2021). A escolha da *Bifidobacterium* para este estudo está relacionada ao fato de que, além dos benefícios citados anteriormente, bactérias do filo *Actinomycedota* (colonizadores bem sucedidos de todos os ambientes terrestres) são amplamente utilizadas para biorremediação (limpeza) ambiental de agrotóxicos e metais pesados. Por apresentar diversas propriedades fisiológicas e metabólicas específicas, como a produção de enzimas extracelulares e a formação de uma grande variedade de metabólitos

secundários, estas bactérias auxiliam nas áreas farmacêuticas e médicas (antibióticos e antitumorais), e biotecnológicas, como a biorremediação (Alvarez *et al.*, 2017).

2.3 Análise Metabolômica

A perturbação no metabolismo, reversível ou não, que uma molécula bioativa pode provocar em um organismo ao afetar as vias e fluxos metabólicos, pode ser mensurada por meio de análises específicas das ciências “-ômicas”. Com base no dogma central da biologia molecular, onde a replicação e transcrição do DNA e tradução do RNA transforma a informação do código genético em resposta final, o genoma, o transcriptoma e o proteoma apresentam as informações do que poderia/ deveria acontecer a um sistema biológico, enquanto o metaboloma fornece as informações sobre o que realmente está acontecendo no organismo, naquele momento, formando um elo entre o genoma e o fenômeno (Figura 7) (Abdelnur, 2011; Palazoglu; Fiehn, 2013; Aliferis, 2011; Alseekh *et al.*, 2021).

Figura 7 – Uma correlação entre as principais estratégias-ômicas utilizadas em estudos de biologia de sistemas.



Fonte: Adaptado de Sussulini (2017).

As ciências -ômicas referem-se a vários métodos usados para caracterizar e descrever os papéis de diferentes tipos de moléculas em um organismo. Ao estudá-las, caracteriza-se suas estruturas, funções e dinâmicas no organismo. Podem ser: genômica, estudo das sequências de DNA para prever propriedades de (micro)organismos; transcriptômica, estudo da transcrição do RNA em organismos; proteômica, estudo das diversas proteínas produzidas pelo organismo; metabolômica, estudo dos metabólitos de células, fluidos biológicos, tecidos e organismos; lipidômica, estudo dos lipídeos celulares de sistemas biológicos; fenômica, estudo do estilo de vida e meio ambiente na expressão gênica; epigenômica, estudo das modificações epigenéticas entre célula(s) e organismo(s); entre outras (Gruszecka -Kosowska *et al.*, 2022).

A análise metabolômica, especificamente, estuda de forma sistemática, em sistemas complexos e em determinado status ou fenótipo de um organismo vivo, microrganismos e células hospedeiras, o perfil de metabólitos (pequenas moléculas) em amostras biológicas, como fezes, urina e tecidos. Para isso, utiliza métodos analíticos de alta eficiência/ rendimento, como a espectrometria de massas (EM) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), por terem identificação robusta e sensível a metabólitos, possibilitando, assim, também os quantificar, quando for de interesse da análise. O objetivo da metabolômica é mapear os metabólitos, pois eles concebem leituras moleculares do estado celular, refletindo um fenótipo fisiológico (Ursel *et al.*, 2014; Fiehn, 2016; Vernocchi *et al.*, 2016; Farag *et al.*, 2020).

Compreender as informações relacionadas ao metaboloma, ou seja, a composição do conjunto de pequenas moléculas de metabólitos (produtos finais do metabolismo de uma célula) de um organismo, é elucidar a influência de um estímulo, tanto do ambiente ou quanto de substâncias, sobre um genótipo e como este altera um fenótipo. Desta forma, monitorar de forma abrangente o metaboloma de um organismo pode incorrer informações importantes sobre o estado fisiológico e as alterações desenvolvidas após uma exposição a compostos bioativos ou, até mesmo, trazer informações sobre uma toxicidade observada. Para isso, o estudo sempre é realizado em forma de comparação, que pode ser simples, como em uma cultura de células, ou pode ser complexa, como em um organismo humano, onde observam-se as diferenças de um estado inicial, ou organismo controle, com um segundo momento, ou organismo tratado ou mesmo doente, pois este é o objetivo da análise metabolômica: identificar diferenças metabólicas ao destacar metabólitos relevantes, aumentados ou diminuídos como resultado de uma intervenção. A metabolômica é uma ferramenta poderosa utilizada há mais de 20 anos para elucidar mecanismos de ação, não apenas de doenças e fármacos, como também de substâncias como agrotóxicos. A descoberta de biomarcadores, por exemplo de exposição, de efeito e de

predição, também faz parte do escopo da utilização da análise metabolômica (Abdelnur, 2011; Palazoglu; Fiehn, 2013; Aliferis, 2011; Alseekh, *et al.*, 2021).

Fiehn (2002) definiu a análise metabolômica como “uma análise abrangente e quantitativa do metaboloma”. Entretanto, a diversidade química e as diferentes propriedades físico-químicas dos metabólitos associados a uma grande faixa dinâmica de concentrações de metabólitos em diferentes amostras biológicas, torna praticamente impossível se medir completamente um metaboloma. Ao selecionar o instrumental analítico específico e um fluido biológico em que os metabólitos serão identificados, a análise metabolômica estará restrita a estas condições específicas. Soro, plasma, urina, fezes e tecidos são as matrizes biológicas mais estudadas. Além disso, a análise metabolômica requer o uso de cooperação científica multidisciplinar, sobretudo da bioinformática, para a interpretação de *big data* obtidos por meio dessas técnicas analíticas de alto rendimento (Fiehn, 2016; Gruszecka -Kosowska *et al.*, 2022).

Após a definição geral de Fiehn para análise metabolômica, outros termos relativos à ciência foram criados: *Perfil metabólico* (análise de um número limitado e predefinido de metabólitos para investigação de vias bioquímicas específicas); *Análise Metabólica fingerprinting* (classificação rápida de amostras de acordo com sua origem ou relevância biológica); *Análise Metabólica footprinting* (o que uma célula ou sistema excreta sob condições controladas - exometaboloma); e *Perfil Metabolômico real-time* (monitoramento de centenas de metabólitos em ciclos de alguns segundos durante várias horas após a injeção direta de bactérias e células em um espectrômetro de massa de alta resolução). A lipidômica é uma área específica da metabolômica que caracteriza as moléculas lipídicas e seus papéis biológicos, sendo uma análise importante no entendimento do metabolismo e da função lipídica (Koek *et al.*, 2011; Sussulini *et al.*, 2017; Antonelli *et al.*, 2019).

Apesar dos vários termos acima citados, não há consenso geral sobre seu uso. Muitos pesquisadores preferem termos mais simples e gerais ao invés de criar um novo. Assim, a análise *Targeted* (direcionada, alvo) é uma análise quantitativa ou semiquantitativa de alguns metabólitos e/ou substratos de reações metabólicas, podendo-se utilizar padrões analíticos. Exemplos de análises *Targeted* são o *Perfil metabólico* e a Lipidômica (apesar de haver controvérsias). Já a análise *Untargeted* (não direcionada, global) é uma análise qualitativa ou semiquantitativa do maior número possível de metabólitos em uma amostra biológica, para escanear e criar um perfil. Tanto a análise *fingerprinting* quanto a *footprinting* pertencem a esta definição (Abdelnur, 2011; Koek *et al.*, 2011; Sussulini *et al.*, 2017).

Apesar dos anos de estudo em metabolômica, ainda é um desafio, por causa da natureza das moléculas e suas diversidades, a escolha de um método que dê uma cobertura adequada de forma que alcance e complete as informações de genoma, transcriptoma e proteoma. Estima-se que existam mais de 1 milhão de metabólitos diferentes na árvore da vida, variando o quantitativo entre espécies. Um metaboloma pode conter 600 metabólitos, se observado um microorganismo, ou até 200 mil metabólitos primários e secundários, se estudado um organismo vegetal, por exemplo. O metaboloma também pode variar em complexidade de moléculas, desde baixo peso molecular, polares e voláteis, até metabólitos com maiores pesos moleculares, apolares e não voláteis. Para finalizar, a concentração de um metabólito pode não corresponder totalmente a sua importância na análise, ou seja, um açúcar não precisa ser mais importante do que um hormônio (Abdelnur, 2011; Alseekh, *et al.*, 2021).

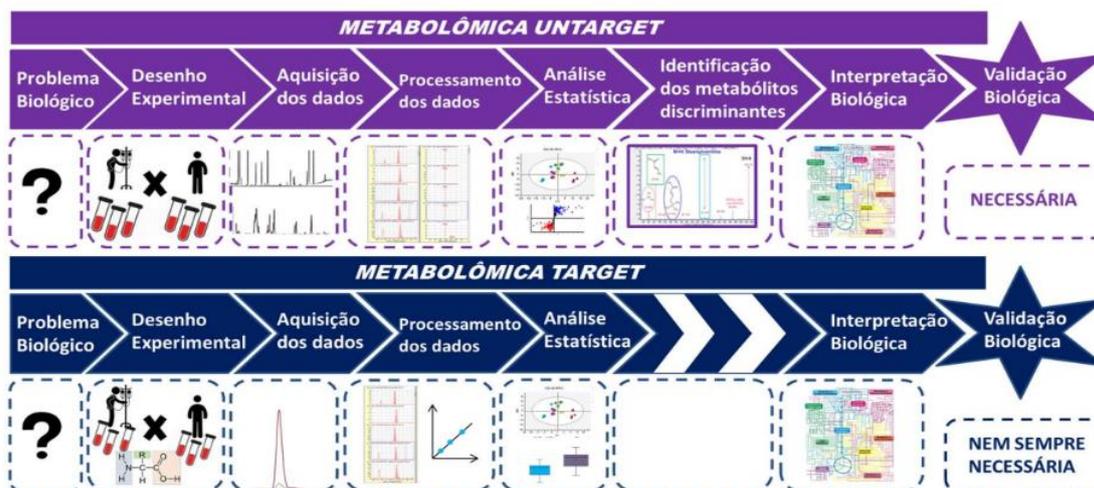
Ainda pensando em concentrações, ampla faixa dinâmica na abundância celular, tempo de renovação rápido e a complexidade das moléculas, a escolha de um preparo de amostra, método analítico e equipamentos adequados para o estudo da metabolômica faz-se necessário, uma vez que se deve ter consciência da questão biológica que precisa ser respondida em um estudo. Isso porque um equipamento apenas, mesmo sendo sofisticado e de alta resolução, característica obrigatória neste tipo de análise, não irá mapear todo o metaboloma de um organismo. A capacidade atual de detecção, mesmo para os equipamentos mais modernos e combinados, está muito aquém da estimativa. Por exemplo, mesmo para uma combinação de métodos analíticos pode-se analisar apenas 8.000 metabólitos de 114.000 previstos para estarem presentes em um ser humano. Assim, além das boas práticas de trabalho, a normalização dos dados obtidos deve ser rigorosa, sempre partindo do objetivo da análise (*targeted*, *untargeted*, *fingerprint* etc). Erros podem gerar uma má interpretação dos dados (Abdelnur, 2011; Alseekh *et al.*, 2021).

2.3.1 Fluxo de trabalho

Assim, a primeira coisa a se pensar quando se está planejando uma análise metabolômica é a pergunta para o problema abordado. Uma pergunta bem formulada gera um desenho experimental bem delineado: qual análise utilizar (*targeted* ou *untargeted*); tipo de amostra (sangue, urina, tecidos etc); tamanho amostral (controles e amostras teste); coleta das amostras; extinção metabólica (interromper a ação de enzimas por adição de solventes ou congelamento a imediato com nitrogênio líquido); armazenamento das amostras (tempo e temperatura -80°C);

preparo adequado das amostras; plataformas analíticas a serem utilizadas (Sussulini *et al.*, 2017). A figura 8 ilustra a diferença entre os fluxos de trabalho para as análises metabolômicas *Untargeted* e *Targeted*.

Figura 8 – Fluxo de trabalho da metabolômico *Untargeted* (global - roxo) e *Targeted* (alvo - azul)



Fonte: Adaptado de Sussulini (2017).

2.3.2 Preparo de Amostra

Para garantir a qualidade dos dados metabolômicos, é importante escolher bem o tipo de amostra a ser estudado. O tipo de coleta e armazenamento também influenciam, além do preparo e extração dos metabólitos de interesse. Em geral, para estudar biomarcadores utiliza-se biofluidos e, para elucidar mecanismos histopatológicos, avalia-se órgão específico (*in situ*). Quando a amostra ideal não pode ser analisada, escolhe-se uma substituta, desde que ela ainda seja quali e quantitativamente significativa. Por exemplo, se a biópsia de um rim não pode ser realizada, estuda-se a urina (Koek *et al.*, 2011; Sussulini *et al.*, 2017; Antonelli *et al.*, 2019).

As amostras podem ser metabolicamente ativas, como metaboloma intracelular (endometaboloma), ou inativas, como metaboloma extracelular (exometaboloma). O exometaboloma não precisa de extinção do metabolismo, aceita o mínimo preparo de amostra e reflete a imagem cumulativa do metabolismo ao longo do tempo. Entretanto, é importante ter

cuidado com os biofluidos, pois eles podem ser considerados metabolicamente inativos, mas, ainda estarem metabolicamente ativos, como soro e saliva. O endometaboloma requer a extinção de metabólitos, extenso preparo de amostra e técnicas mais difíceis de extração. Como é uma foto instantânea do metabolismo, não realizar a extinção do metabolismo pode alterar a sua composição e, conseqüentemente, os resultados das análises. A extinção metabólica é realizada com a lavagem rápida do tecido com salina ou tampão fosfato, para a retirada de sangue superficial, e o congelamento rápido em nitrogênio líquido (Koek *et al.*, 2011; Sussulini *et al.*, 2017).

O preparo da amostra está diretamente ligado ao tipo de amostra (plasma, urina, tecido), qual análise metabolômica (*Targeted* ou *Untargeted*) e equipamento analítico. Uma análise *Targeted*, por exemplo, requer uma extração de metabólitos direcionada, com remoção de interferentes e pré-concentração (extração líquido-líquido ou fase sólida) para melhorar a detecção do composto de interesse. A metabolômica *Untargeted* requer uma preparação minimalista. Em geral, é realizada uma precipitação de proteínas, filtração e diluição das amostras. Há particularidades inerentes ao tipo de amostra e equipamento. Tecidos e culturas celulares precisam de extrações mais elaboradas, além da lise celular; análises por cromatografia gasosa exigem derivatização das amostras. Desta forma, quanto mais etapas o preparo de amostra contém, mais propenso a erros ele está (Koek *et al.*, 2011; Sussulini *et al.*, 2017; Antonelli *et al.*, 2019).

2.3.2 Técnicas analíticas

O desafio da metabolômica é a composição química das amostras. Uma plataforma analítica única não irá identificar e quantificar, de forma abrangente, todo o conjunto de metabólitos de um sistema biológico. Os dois métodos de detecção mais utilizados na metabolômica são a EM e a RMN. Cada uma das técnicas tem suas vantagens, sendo o RMN altamente seletivo, não destrutivo, entretanto com baixa sensibilidade e alta complexidade espectral, enquanto o EM dispõe uma boa combinação de seletividade e sensibilidade (Abdelnur, 2011; Sussulini *et al.*, 2017).

O espectrômetro de massas é um analisador que, após a passagem de moléculas neutras ou carregadas por uma fonte de ionização, detecta a razão entre uma massa e uma carga (m/z) de

íons (gasosos), podendo não necessitar de vácuo, como a ESI (do inglês, *Electrospray Ionization*) e o MALDI (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*); ou ionizando a alto vácuo, como a EI (do inglês, *Electron Impact*) e a CI (do inglês, *chemical ionization*). Apesar de detectarem substâncias diretamente, em geral, a EM está acoplada a cromatógrafos (líquido - CL ou gasoso - CG), que otimizam a análise, minimizando a complexidade da amostra e reduzindo os efeitos de supressão da ionização, aumentando a sensibilidade de detecção e a cobertura do perfil metabólico (Abdelnur, 2011; Sussulini *et al.*, 2017).

A otimização do preparo das amostras, que deve ser cuidadosamente estudada, depende muito do tipo de matriz biológica, da classe do composto de interesse e do equipamento a ser utilizado. No CG, que separa compostos voláteis e termicamente estáveis, para uma análise metabolômica adequada, por causa da natureza dos metabólitos nas amostras, é necessário realizar uma derivatização, para que os grupos funcionais hidrofílicos (ligações de hidrogênio) sejam substituídos nas amostras para aumentar a volatilidade. A derivatização é o principal limitante da análise metabolômica por CG, condicionada ao tempo de preparo da amostra, baixo rendimento e propensa a erros de variabilidade e artefatos. Como a derivatização tem tempo de validade (máximo 48h em ambiente refrigerado), há um limite de amostras que podem ser analisadas por CG (Sussulini *et al.*, 2017; Antonelli *et al.*, 2019).

Como exemplo de derivatização, há a trimetilsililação, um procedimento que reduz, drasticamente, pontos de ebulição das moléculas, melhorando tanto a estabilidade térmica quanto a separação cromatográfica dos metabólitos. Antes da derivatização, a oxiaminação com metoxiamina é realizada para que grupos funcionais cetônicos sejam protegidos de tautomerismo e descarboxilação do ceto-enol, inibindo também a formação de anéis de açúcares redutores. Como solvente para capturar prótons e aumentar a nucleofilicidade da metoxiamina, normalmente se usa a piridina (Palazoglu; Fiehn, 2013; Sussulini *et al.*, 2017).

Apesar da necessidade e certa dificuldade de derivatização das amostras, a especificidade estrutural dos adutos permite a criação de bibliotecas espectrais muito úteis na detecção dos metabólitos (Palazoglu; Fiehn, 2013; Sussulini *et al.*, 2017).

Para as amostras biológicas, controles de qualidade (QCs) são preparados com pequeno volume de todas as amostras (*pool* das amostras teste). A estabilidade instrumental é verificada com várias injeções iniciais do QC (ambientação do equipamento) e durante as análises, intercalando a injeção do QC depois de cinco ou seis amostras, dependendo do tempo de execução. A

repetibilidade dos espectros dos QCs é inspecionada visual e estatisticamente (Sussulini *et al.*, 2017).

2.3.4 Processamento dos dados e Análise Estatística

As análises realizadas em espectrômetros de massas acoplados a cromatógrafos produzem dados tridimensionais que normalmente são exibidos como um cromatograma de íons totais (TIC, do inglês *Total Ion Chromatogram*) bidimensional. Desta forma, muita informação está contida em um pico, sendo necessário o tratamento dos dados para extrair a informação correta das análises, principalmente para as análises *Untargeted*. Tratar os dados analíticos é um desafio, pois quanto maior a complexidade dos dados, maior a necessidade de etapas de pré-tratamento e controle de qualidade antes da análise estatística em si. Não há um protocolo padrão para análise dos dados que, com o avanço tecnológico, se tornam cada vez mais complexos. Cada estudo tem que ter uma abordagem personalizada. Assim, entender cada passo do tratamento dos dados e executar adequadamente tanto do pré-processamento quanto das análises estatísticas permite um resultado fidedigno, mais próximo possível da realidade (Sussulini *et al.*, 2017; Antonelli *et al.*, 2019).

Tratar dados envolve ferramentas computacionais que validam a identificação do metabólito. Em geral, softwares são fornecidos pelo fabricante do equipamento utilizado ou podem ser de acesso gratuito. O pré-processamento e processamento dos dados inclui vários passos: desconvolução espectral, criação de conjunto de dados, agrupamento, alinhamento, preenchimento de lacunas de dados, normalização e transformação de dados. Softwares adequados, como XCMS, Mass Profiler Professional (MPP, Agilent Technologies), MZmine, MetAlign, MassLynx (Waters Corp.) e AMDIS, entre outros, determinam quais picos em cada execução cromatográfica são do mesmo composto e quais são diferentes (Palazoglu; Fiehn, 2013; Sussulini *et al.*, 2017; Antonelli *et al.*, 2019).

O objetivo do pré-processamento é transformar os dados 3D em uma tabela de *Features* (sem tradução, é uma característica do metabólito que correlaciona m/z e RT; molécula detectada e não identificada), onde nas linhas podem ser encontradas as informações das amostras do estudo e nas colunas estarão as informações do par m/z – RT. Para isso, a desconvolução espectral extrai, da “mistura” complexa dos sinais do equipamento, apenas os sinais valiosos para a

análise, tratando ruído, corrigindo linha de base e extraindo componentes coeluídos. Após a desconvolução, o alinhamento corrige os desvios causados pela fase móvel ou estacionária, variações de temperatura e pressão do sistema, envelhecimento da coluna e efeito de matriz, imputando aumento da reprodutibilidade das análises. É realizado observando-se uma janela de m/z e RT e, terminada esta etapa, o pico pode ser integrado (altura ou área) para a atribuição em tabela (Sussulini *et al.*, 2017).

Com a tabela pronta, o preenchimento de lacunas (*gap fillings*) deve ser realizado. A presença de valores faltantes (*missing values*), em geral, se dá por íon correspondente ausente, picos mal formados, por baixa intensidade ou baixa repetibilidade. Softwares têm algoritmos que preenchem as lacunas ou pesquisando estruturas de picos nos dados brutos ou estimando valores, por utilizar valores vizinhos como referência (*k-nearest neighbor*). A tabela de dados final deve ser concluída sem valores faltantes (Sussulini *et al.*, 2017; Gallo, 2022).

Na análise por CG, a identificação dos compostos antecede o processamento dos dados, sendo muito úteis bibliotecas de dados como a Fiehn RTL e a NIST (do inglês, *National Institute of Standards and Technology*). A vantagem da utilização da biblioteca Fiehn é que ela inclui tanto tempo de retenção quanto índice de retenção, aumentando a confiabilidade e reduzindo falsos-positivos, quando os experimentos são seguindo rigorosamente o mesmo método analítico. Bibliotecas espectrais são a grande vantagem das análises de CG-EM sobre a CL-EM (Sussulini *et al.*, 2017).

O processamento dos dados, após a confecção da tabela, representa os passos: Normalização, Centralização e Escalonamento, e Transformação. Normalizar é dividir cada linha da tabela por um fator com o intuito de remover variações indesejadas entre as amostras e permitindo, assim, comparação entre elas. Estas variações podem ser, como exemplo mais comum, diferença muito grande entre concentração de diferentes metabólitos (açúcares e hormônios). Como exemplos, pode-se citar: Adição de padrão interno/ externo (*feature* referência); Normalização da Área Total (*Total area normalization*) ou Soma (*Sum*); Normalização do Quociente Probabilístico (*Probabilistic Quotient Normalization*); Normalização Quantílica (*Quantile normalization*) ou pela Mediana (*Median*) (Sussulini *et al.*, 2017, Gallo, 2022).

Com base na dispersão da variável, a centralização e escalonamento dos dados ajusta cada variável/*feature* por um fator. Desta forma, qualquer tipo de variação biológica não será ofuscado, pois os metabólitos mais abundantes deixarão de contribuir mais para o modelo do que os menores e, assim, os resultados estatísticos não serão tendenciosos. Como exemplos:

Autoescalamento (escala de variância unitária); Pareto; *Range scaling*; *Vast* (estabilidade variável) (Sussulini *et al.*, 2017).

Dados tanto de RMN quanto de EM tendem a ter ruídos heterocedásticos. O problema é que ferramentas estatísticas assumem que estes ruídos são homocedásticos. Além disso, para variáveis de metabólitos diferentes de zero, as distribuições são frequentemente distorcidas à direita (curva gaussiana). Para contornar esta situação, os dados precisam, então, serem transformados. Transformações podem ser: *log transformation*; *G log transformation*; *Power transformation* ou *Square root transformation*; *Cube root transformation*; *Box-cox transformation*; *Z-transformation* (Van der Berg *et al.*, 2006; Martínez-Arranz *et al.*, 2015; Sussulini *et al.*, 2017; Antonelli *et al.*, 2019).

Após o processamento dos dados, os resultados encontrados são bastante complexos e, por isso, requerem ferramentas quimiométricas, que se baseiam em métodos computacionais que ajudam a identificar padrões e quantificar componentes, para revelar metabólitos discriminantes entre os grupos de amostras de controle e de teste. As análises multivariadas, que dependem da normalização dos dados, são empregadas tanto para visão geral do experimento quanto para classificação da amostra. Pode ser não supervisionada, como análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principle Component Analysis*), e supervisionada, como análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least-Squares Discriminant Analysis*) e projeções ortogonais para análise discriminante de estruturas latentes (OPLS-DA, do inglês *Orthogonal partial least squares-discriminant analysis*). A análise univariada também pode ser usada, com os testes estatísticos teste t de Student, teste U de Mann-Whitney, etc, para corroborar os resultados multivariados encontrados. Procedimentos de validação cruzada e testes de permutação validam a análise multivariada. Softwares específicos ajudam a realizar a quimiometria, onde podemos citar o *Metaboanalyst* (gratuito) e o *SIMCA+* (Agilent Technologies) (Sussulini *et al.*, 2017).

A ferramenta mais utilizada em quimiometria, a PCA, é um método linear de análise multivariada baseada na correlação e projeção simples para encontrar um novo conjunto de variáveis, reduzindo, assim, a complexidade de conjuntos de dados originais, resumindo-os em componentes principais (combinações lineares das variáveis originais). O método consiste em ordenar as variáveis por importância, onde o primeiro componente representa a maior variabilidade possível (matematicamente, é o que melhor se aproxima dos dados, no sentido de mínimos quadrados). Desta forma, este método não supervisionado é usado em análises

exploratórias e, na metabolômica, proporciona uma visualização global simples, detectando tendências, grupos e *outliers* (deve-se ter cuidado ao removê-los, pois eles “ajudam” a criar o modelo). A avaliação dos QCs é realizada utilizando a PCA (Sussulini *et al.*, 2017).

Enquanto que a PCA reduz a dimensionalidade maximizando a variância dos dados, o PLS-DA maximiza a covariância latente entre os dados originais e a variável de resposta (que define os grupos), encontrando a relação entre as duas matrizes (dados X e resposta Y). É uma análise supervisionada, que utiliza o aprendizado de máquina, compreendendo quais variáveis de X (metabólitos) estão mais relacionados com Y (resposta), prevendo a classificação de novas amostras (Sussulini *et al.*, 2017).

A PCA é um método que não precisa de validação, diferente da PLS-DA que necessita de validação cruzada interna. A validação é feita dividindo-se o conjunto de dados em subconjuntos. Um modelo é construído por vez, contendo todas as variáveis, exceto as de um subconjunto, que é testado, e a diferença entre os valores previsto e esperado são salvas. Repete-se com todos os subconjuntos estados e a soma dos erros residuais previstos (PRESS, do inglês *predicted residual error sum of squares*) e outras análise estatísticas confirmam ou não a qualidade de previsão do modelo. São três avaliações importantes, que juntas respondem sobre a predição do modelo R²X (quanto da variação X relaciona-se com a diferença entre classes?); R²Y (quão boa é a separação entre duas classes?); e Q² (quão bem podemos prever as duas classes?). Q² é a estatística mais importante de qualidade do modelo, podendo variar entre (-infinito, 1), onde Q² negativo pode indicar que o modelo está sobreajustado, sendo o valor ideal de Q² maior que 0,4 (Sussulini *et al.*, 2017; Gallo, 2022).

Para finalizar as informações sobre a validação do modelo R²/Q², a acurácia avalia qual é a porcentagem de predições corretas, sendo uma porcentagem entre 70-90% é uma predição real (Gallo, 2022).

Outra forma de validar o método é executando o teste de Permutação. Ele avalia a significância do poder preditivo estimado (Q²). A avaliação da validade é feita observando se qualquer outro modelo “aleatório” em dois grupos arbitrários é significativamente melhor do que o que está sendo avaliado. É necessário ver as caudas da distribuição, por isso o número de permutação deve ser grande (*big data*) (Sussulini *et al.* 2017; Gallo, 2022).

É importante entender quais são os *features* importantes (discriminantes) para o modelo e qual a sua significância estatística. Assim a VIP (do inglês, *Variable Importance on the Projection*)

é encontrada ordenando-se os vetores relevantes (*p-loadings*) por magnitude e os mais importantes têm valores maiores do que 1. A ausência de um $VIP > 1$ aumenta o erro de predição (Sussulini *et al.*, 2017; Gallo, 2022).

Análises univariadas podem ser úteis, sendo usadas em conjunto com as análises multivariadas, pois avalia a significância de cada *feature* separadamente. É importante ressaltar que 65% dos dados metabolômicos não atendem parâmetros de normalidade e igualdade de variância, sendo considerados não-paramétricos. Como métodos univariados que podem ser aplicados, podem ser citados: *fold changes*, t-test, ANOVA e correlação (Sussulini *et al.*, 2017; Gallo, 2022).

2.3.5 Identificação e Interpretação Biológica

Metabólitos precisam ser identificados quando a análise metabolômica é *Untargeted*. A identificação do metabólito é realizada pesquisando as características espectrais em uma biblioteca de referência, mas é necessário observar o contexto e ter domínio (conhecimento). Esta é a etapa gargalo para muitos estudos metabolômicos. Como exemplos de bancos de dados e bibliotecas gratuitas, para dados adquiridos em equipamentos de LC de alta resolução, têm-se: HMDB, KEGG, PubChem, Metlin, MassBank, LIPID MAPS, ChEBI, MMD, BioMagResBank, MetaboID. Uma vez identificado, o metabólito deve ser confirmado com a utilização de padrões analíticos, comparando-se o padrão de fragmentação entre as moléculas (validação) (Sussulini *et al.*, 2017; De Souza *et al.*, 2020).

Listados os metabólitos e confirmados sua identificação, o próximo passo da metabolômica é relacionar as vias metabólicas, utilizando bancos de dados disponíveis, como: MetabolAnalyst, KEGG, MetaCyc, SMPDB, MetaboLights e Reactome. Esta etapa é subjetiva e demorada e abrange três passos principais: procura dos metabólitos; leitura da literatura relevante; e síntese da informação para ajustar a “história” biológica. Esta é a etapa que tenta responder à questão biológica original, que originou o estudo metabolômico (Sussulini *et al.*, 2017; De Souza *et al.*, 2020).

Apesar de ser pouco executada, a validação biológica final corrobora os resultados obtidos no estudo metabolômico, quando novas amostras são avaliadas ou mesmo, na metabolômica *Untargeted*, as mesmas amostras são novamente analisadas, consolidando a interpretação biológica dos resultados (Sussulini *et al.*, 2017; De Souza *et al.*, 2020).

2.3 6 Principais vias metabólicas alteradas pelos agrotóxicos

A metabolômica consegue refletir sobre o efeito das influências genéticas e ambientais em um organismo e, conseqüentemente, fornece uma abordagem diferenciada na avaliação do mecanismo de ação de exposições ambientais complexas, como à exposição à mistura de agrotóxicos. Entretanto, é difícil encontrar estudos com análises metabolômicas usadas para este fim. Os poucos estudos encontrados relatam mais as alterações causadas por agrotóxicos isolados e algumas misturas. A tabela 2 traz exemplos de estudos com a exposição a agrotóxicos e análises metabolômicas.

Tabela 2 – Principais vias metabólicas alteradas por exposição a agrotóxicos (*continua*).

Agrotóxico	Vias metabólicas alteradas	Referência Bibliográfica
Glifosato	Vias do metabolismo da galactose, das purinas e da ureia	Glinski <i>et al.</i> , 2021
Glifosato	Metabolismo da glutatona e via das pentoses fosfato.	Freitas-Silva <i>et al.</i> , 2017
Glifosato	Diversas vias metabólicas: ciclo de Krebs e a cadeia respiratória; metabolismo do piruvato e a glicólise/gliconeogênese; e a via das pentoses fosfato e a síntese e metabolismo de nucleotídeos.	Qi <i>et al.</i> , 2023
Glifosato	Metabólito glioxilato inibe a oxidação de ácidos graxos.	Ford <i>et al.</i> , 2017
Tebuconazol e difenoconazol (fungicidas)	Metabolismo lipídico, o metabolismo do ácido araquidônico, a biossíntese de hormônios esteróides e o metabolismo do triptofano.	Jiang <i>et al.</i> , 2022
Imidacloprido	Vias da glicólise e da gliconeogênese, metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, metabolismo de glutatona, metabolismo de fenilalanina, metabolismo de tirosina, por estresse oxidativo.	Nannan-Lv <i>et al.</i> , 2021
Imidacloprido e Hexaconazole (fungicida)	Vias metabólicas da glicólise, do piruvato, do glioxilato e dicarboxilato, da galactose e de glicolípidos.	Deore <i>et al.</i> , 2024-1; Deore <i>et al.</i> , 2024-2
Permetrina (inseticida)	Metabolismo de aminoácidos intermediários ciclo do ácido cítrico (ácidos aspártico, glutâmico e cítrico).	Jellali <i>et al.</i> , 2021
Atrazina (herbicida)	Metabolismo do carbono e do azoto e metabolismo de ácidos graxos	Szewczyk <i>et al.</i> , 2020
2,4-D (herbicida)	Metabolismo de aminoácidos e de ácidos graxos.	Bernat <i>et al.</i> , 2018
Dinotefurano, Nitenpiram e Acetamiprido (inseticidas neonicotinoides isolados)	Metabolismo de aminoácidos e síntese de ácidos graxos.	Yan <i>et al.</i> , 2021
Paraquat (Herbicida)	Via das pentoses fosfato, glicólise e o ciclo do ácido cítrico.	Lei <i>et al.</i> , 2014

Tabela 2 – Principais vias metabólicas alteradas por exposição a agrotóxicos (*conclusão*).

Fenvalerato (inseticida piretróide)	Via da pentose fosfato, o metabolismo do amido e da sacarose, o metabolismo dos ácidos graxos e o metabolismo do ácido glutâmico.	Zhang <i>et al.</i> , 2020
Mistura de boscalida, captana, clopirifós, tiaclopride, tiofanato e ziram	Metabolismo da glicose.	Lukowicz <i>et al.</i> , 2018
Mistura de boscalida, captana, clopirifós, tiaclopride, tiofanato e ziram	Alterações específicas nos metabolomas urinários e fecais, com alterações duradouras na microbiota intestinal.	Smith <i>et al.</i> , 2020
Mistura de alacloro, captan, diazinon, endosulfan, maneb, mancozeb	Alterações específicas ligadas ao gênero (machos e fêmeas) no nível de metabólitos hepáticos envolvidos no estresse oxidativo e na regulação do metabolismo da glicose.	Merhi <i>et al.</i> , 2010

A partir dos dados citados na literatura, as principais vias metabólicas alteradas pela exposição aos agrotóxicos são explicadas a seguir.

Metabolismo energético - Ciclo do ácido tricarboxílico e fosforilação oxidativa

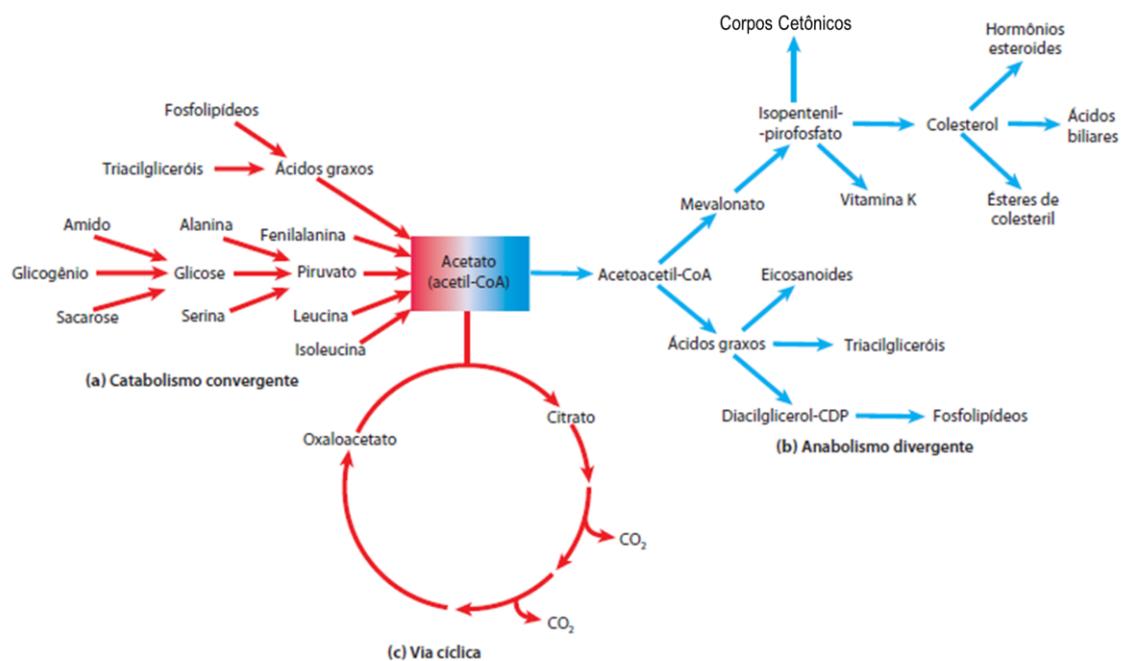
Uma rede complexa de reações bioquímicas forma o metabolismo celular, que tem como objetivo principal de converter substratos nutrientes para o crescimento e a sobrevivência dos organismos vivos. Estes processos metabólicos necessitam de grande troca energética, alcançada por meio de reações de oxidação-redução, onde elétrons são transferidos de uma molécula para outra. Assim, inúmeras vias de sinalização e redes reguladoras controlam o equilíbrio entre as vias catabólicas (que decompõem para aproveitar a energia), e as vias anabólicas (que sintetizam moléculas) (Fernie *et al.*, 2004; Arnold; Finley, 2022; Nelson; Cox, 2022).

Moléculas precursoras, que participam do anabolismo celular, são aminoácidos, açúcares, ácidos graxos e bases nitrogenadas. Utilizando energia proveniente de ATP, NADH, NADPH, FADH₂, formam macromoléculas celulares (proteínas, polissacarídeos, lipídios, e ácidos nucleicos). Para regenerar os transportadores de energia (ADP, NAD⁺, NADP⁺, FAD), os nutrientes energéticos são metabolizados (catabolismo), gerando produtos finais sem energia, como CO₂, H₂O e NH₃. A Acetato/ Acetil-CoA é a molécula que está presente tanto no metabolismo quanto no anabolismo. A figura 9 ilustra a interligação entre anabolismo e catabolismo celular (Fernie *et al.*, 2004; Arnold; Finley, 2022; Nelson; Cox, 2022).

Um ciclo que controla o metabolismo catabólico e anabólico é o ciclo do ácido tricarbóxico (TCA do inglês *tricarboxylic acid*; ciclo do ácido cítrico; ciclo de Krebs), uma série cíclica de reações que aproveitam elétrons, oxidando nutrientes e gerando a bioenergia celular (Ferne *et al.*, 2004; Arnold; Finley, 2022; Nelson; Cox, 2022).

Figura 9 – Interação entre as vias metabólicas não lineares.

A: convergente anabólica (exemplos: metabolismo de ácidos graxos, metabolismo do amido e da sacarose, glicogenólise, metabolismo de aminoácidos, glicólise); B: cíclica (ciclo do ácido tricarbóxico); C: divergente catabólica (exemplos: via do mevalonato, síntese de colesterol, síntese de triglicerídeos).



Fonte: Adaptado de Nelson; Cox (2022, p.504).

Várias vias metabólicas fornecem substratos para o ciclo TCA, como a glicólise fornece piruvato e oxaloacetato; Acetil-CoA pode advir de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos, ou mesmo do acetato; Succinil-Coa pode vir da oxidação de ácidos graxos ou metabolização de valina, isoleucina e metionina; fumarato pode ser fornecido pela metabolização de aspartato, fenilalanina e tirosina. E vários intermediários servem de precursores de outras vias metabólicas, como: Oxaloacetato para formação de fosfoenolpiruvato, que alimenta as vias glicolítica e de síntese de alguns aminoácidos; oxaloacetato também pode gerar aspartato,

asparagina, que geram pirimidinas; succinil-Coa está envolvido na síntese de porfirinas e grupo heme; alpha-cetoglutarato gera glutamato, envolvido na síntese de purinas e dos aminoácidos glutamina, prolina e arginina; e o citrato está envolvido na síntese de ácidos graxos e esteroides (Fernie *et al.*, 2004; Arnold; Finley, 2022; Nelson; Cox, 2022).

O ciclo de TCA pode ser regulado por uma série de fatores, como pelos metabólitos que controlam a produção de acetil-CoA, sinalizando a suficiência de energia metabólica (ATP, NADH, ácidos graxos e a própria acetil-CoA), ou indicando a redução de energia (AMP, NAD⁺, CoA). Enzimas também controlam o ciclo, por inibição alostérica como a alpha-cetoglutarato-desidrogenase (Fernie *et al.*, 2004; Arnold; Finley, 2022; Nelson; Cox, 2022).

Via das pentoses fosfato

A via das pentoses fosfato é uma via paralela à glicólise. É um importante processo fisiológico que ocorre em duas fases, a oxidativa e a não oxidativa. A fase oxidativa, a partir da glicose-6-fosfato produz fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH, do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) e ribose-5-fosfato. A fase não oxidativa têm várias reações cujos intermediários conectam-se a várias outras vias, como a síntese de nucleotídeos, síntese de aminoácidos aromáticos e a glicólise. O oxaloacetato pode ser desviado do ciclo do TCA para a formação de fosfoenolpiruvato (PEP) e alimentar a via das pentoses; o contrário também pode ocorrer (Tang, 2020; Nelson; Cox, 2022).

O ácido glicônico é formado pela oxidação da glicose, por meio das enzimas glicose oxigenase e catalase. Esse ácido, na via das pentoses fosfato, é convertido à ribulose-5-fosfato e, conseqüentemente, a ribose-5-fosfato. Esta reação da glicose também produz, além do ácido glicônico, peróxido de hidrogênio. A formação de NADPH é crucial para a redução da glutathiona, prevenindo, assim, danos oxidativos. A catalase, enzima do sistema antioxidante, também necessita de NADPH para funcionamento adequado (Mafra, 2013; Lei *et al.*, 2014).

Vias glutaminolíticas

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular. É sintetizada por todos os tecidos a partir de outros aminoácidos e está envolvida em várias vias metabólicas

que, agrupadas, são chamadas de vias glutaminolíticas. De modo geral, a glutamina está envolvida na proliferação e desenvolvimento das células, principalmente do sistema imune; no balanço ácido-básico; no transporte de amônia dos tecidos; na doação de esqueletos de carbono para a gliconeogênese; e está diretamente relacionada com o sistema antioxidante do organismo (Cruzat *et al.*, 2009; Varol *et al.*, 2016; Nelson; Cox, 2022).

Duas são as enzimas principais envolvidas na catálise e síntese da glutamina: a glutamina sintetase e a glutaminase, respectivamente. A glutamina sintetase pode ser regulada por glicocorticoides, hormônios tireoidianos, hormônios do crescimento e pela insulina, sendo fundamental em situações de estresse e patogênicas. A glutaminase transforma a glutamina em glutamato (ácido glutâmico) e amônia (metabolismo do nitrogênio e ciclo da ureia). Em todas as células, a glutamina pode ceder átomos de nitrogênio para a síntese de purinas, pirimidinas (metabolismo das pirimidinas e das purinas) e aminoaçúcares. Glutamato também é precursor de GABA, 2-oxoglutarato, glicose, ornitina, ureia e outros aminoácidos além da glutamina. A glutamina desempenha um papel na regulação do metabolismo energético, afetando a atividade de enzimas e transportadores envolvidos na metabolização de ácidos graxos (Cruzat *et al.*, 2009; Varol *et al.*, 2016; Nelson; Cox, 2022).

É a insulina e os hormônios de crescimento tipo insulina que estimulam o transporte da glutamina para o meio extracelular. A glutamina é capaz de promover a sinalização celular, ativando a expressão de genes de síntese e degradação de proteínas; proliferação celular e ativação de cascatas de apoptose (Cruzat *et al.*, 2009; Varol *et al.*, 2016; Nelson; Cox, 2022).

Oxidação de Aminoácidos e o Ciclo da Ureia

Os aminoácidos sofrem degradação em três momentos: normalmente, durante a síntese e degradação de proteínas celulares; em dieta rica em proteínas e aminoácidos; e durante o jejum ou DM2 não controlado (carboidratos não estão disponíveis e proteínas são utilizadas como fonte energética). Em todos os momentos, os aminoácidos formam ceto-ácidos (esqueletos de carbono), quando perdem seu grupo amino. Ceto-ácidos são convertidos, pela gliconeogênese, em glicose ou são oxidados a CO₂ e H₂O, no ciclo do TCA, ou podem seguir via paralela, de catabolismo de ácidos graxos. O grupo amino é doado para o α -cetoglutarato, formando o glutamato. Na mitocôndria ocorre a desaminação do glutamato, com liberação de amônia, que em mamíferos é dependente de aspartato-arginina-succinato e ATP, formando ureia, um

produto de excreção de nitrogênio. Enquanto o glutamato é essencial para o metabolismo intracelular do grupo amino, a glutamina é a responsável pelo transporte da amônia pela corrente sanguínea. Outro aminoácido importante no transporte do grupo amino do músculo para o fígado é a alanina, pela adição ou subtração do grupo amino ao piruvato (Fernie *et al.*, 2004; Varol *et al.*, 2016; Nelson; Cox, 2022).

Biossíntese e degradação de ácidos graxos insaturados

A biossíntese de ácidos graxos ocorre, principalmente, no citosol dos adipócitos e hepatócitos. Necessita de NADPH e ATP para transformar a Acetil CoA em uma molécula de ácido graxo. A degradação, ou β -oxidação, ocorre na mitocôndria e necessita de FADH₂ e NADH. Para que eles sejam metabolizados é necessário primeiro ativá-los, transformando seu grupo carboxilato num tio-éster da coenzimaA (CoASH). Além da Acetil CoA, ela forma corpos cetônicos, como o ácido 2-hidroxi-butírico e o acetoacetato, que podem ser utilizados quando há restrição de glicose. Quando a β -oxidação está prejudicada, por causa de uma resistência à insulina, por exemplo, a ω -oxidação é a via alternativa, que produz ácidos dicarboxílicos, como o ácido adípico. O ácido 2-cetoadípico é utilizado como biomarcador da DM2 (Villarreal-Pérez *et al.*, 2014; Nelson; Cox, 2022).

Via do Mevalonato

A via do mevalonato é uma importante via metabólica que gera moléculas bioativas vitais, como o colesterol e os corpos cetônicos, a partir de Acetil CoA e HMB-CoA (β -Hydroxy β -methylglutaryl-CoA). A diferença entre a formação de colesterol e corpos cetônicos está na localização do HMB-CoA sintases. No citosol forma colesterol e são 19 etapas até a formação do colesterol, precursor indispensável na síntese de ácidos biliares, lipoproteínas e hormônios esteróides, como progesterona, estradiol e testosterona; na mitocôndria forma corpos cetônicos, acetona, acetoacetato e ácido 2-hidroxi-butírico, via regulada por ácidos graxos (quando há lipólise intensa) (Hegardt, 1999; Zhang *et al.*; 2023).

Metabolismo da galactose e outras vias metabólicas relacionadas

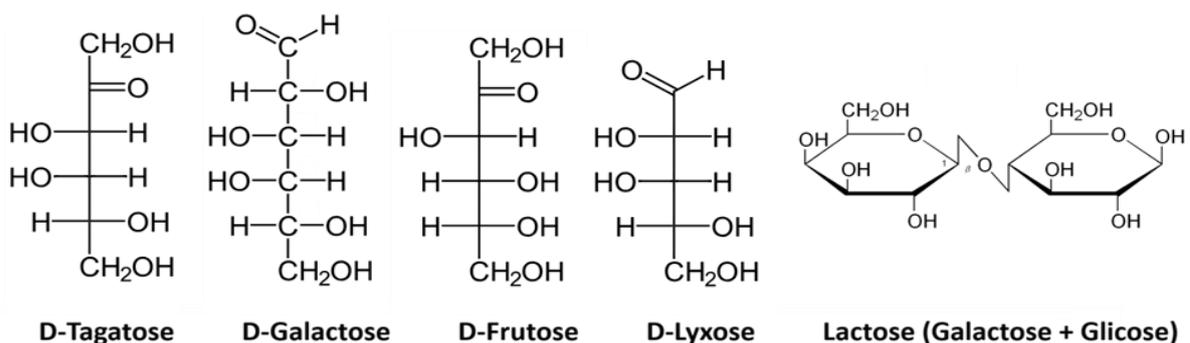
A galactose é um dos açúcares mais abundantes da dieta e é muito importante no metabolismo celular. Este monossacarídeo de seis carbonos é uma aldose (figura 10), sendo transformado diretamente em glicose por ação de várias enzimas. A galactose é proveniente do dissacarídeo lactose, juntamente com a glicose (Conte *et al.*, 2021; Nelson; Cox, 2022).

A tagatose é um monossacarídeo raro, presente em quantidades mínimas em substâncias alimentares que ocorrem naturalmente, mas principalmente em produtos lácteos (figura 10), podendo ser biotransformada a partir da galactose, pela enzima L-arabiose isomerase. Estudos indicam que tem propriedade anti-diabética, com redução sérica da glicose, e efeitos promotores de crescimento em bactérias intestinais benéficas, sendo considerado um nutracêutico. Dentro da via metabólica da galactose, a tagatose é transformada em frutose-6-fosfato e segue para a via das pentoses fosfato (Roy *et al.*, 2018; Guerrero-Wyss *et al.*, 2018; Oliveira; Gonçalves, 2019).

A lisose é uma pentose rara, encontrada em glicolipídios bacterianos (figura 10). A D-lisose isomerase, além de converter D-lisose e D-xilulose, também converte D-frutose e D-manose, sendo uma enzima importante no catabolismo de monossacarídeos microbiano para a formação de intermediários da via das pentoses fosfato (Liang *et al.*, 2023).

A frutose é uma cetose de seis carbonos e seu metabolismo excessivo está relacionado a DM2, obesidade, hipertensão e esteatose não alcoólica. O lactato, um dos substratos do ciclo do ácido cítrico, pode representar até 25% da frutose ingerida e, quando acumulado, gera EROs, prejudicando a absorção de ácidos graxos pela mitocôndria e reduzindo a geração de ATP mitocondrial (Johnson *et al.*, 2023; Liang *et al.*, 2023).

Figura 10 – Estrutura química dos monossacarídeos Tagatose (cetose 6C), Galactose (aldose 6C); Frutose (cetose 6C), Lisose (aldose 5C) e Lactose (Galactose + Glicose).



O metabolismo da galactose envolve inúmeros compostos, como myo-inositol, glicerol, frutose e tagatose, e está interligado a outras vias metabólicas, como metabolismo de aminoácidos e açúcares nucleotídeos; metabolismo do amido e da sacarose; metabolismo da frutose e manose; e via das pentoses fosfato (Conte *et al.*, 2021; Nelson; Cox, 2022).

Metabolismo do Glioxilato e dicarboxilato

O ciclo do glioxilato é uma via alternativa para o metabolismo de Acetil-CoA. Como substrato, pode utilizar ácidos graxos oriundos de triglicérides. A Acetil-CoA é convertida em citrato na presença de oxaloacetato, sendo transformado em seu isômero isocitrato antes da reação que formará succinato, que segue para o ciclo do TCA, e glioxilato, que é convertido a ácido glicólico e ácido oxálico. Organismos vertebrados não conseguem converter ácidos graxos e/ou acetato diretamente a carboidratos. Para isso, é necessária a conversão de fosfoenolpiruvato a piruvato, e piruvato a Acetil-CoA (Dolan; Welch, 2018; Nelson; Cox, 2022).

Glioxilato também pode ser formado a partir de glioxil por reação mediada pela glutatona. O glioxil é um composto gerado durante o estresse oxidativo por glicação de proteínas. O glioxilato é um aldeído que reage com aminoácidos nucleofílicos (cisteína, lisina, histidina e serina) e há estudos que indicam que tanto o glioxilato quanto o glioxil são moléculas genotóxicas (Samsel; Seneff; 2015). Também é relatado na literatura que o glioxilato é um biomarcador precoce de DM2 (Nikiforova *et al.*, 2014).

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a exposição subcrônica à mistura de agrotóxicos em baixas doses em camundongos C57bl/6 por meio de parâmetros bioquímicos e histopatológicos; a microbiota intestinal e sua modulação pelo probiótico *B. Longum* 5^{1A}; e a identificação de possíveis biomarcadores de efeito.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar parâmetros bioquímicos nos animais expostos e não expostos, tratados e não-tratados, por meio de dosagem de glicemia jejum, sensibilidade à insulina, colesterol total e triglicérides;
- Avaliar alterações na microbiota intestinal dos animais expostos e não expostos, tratados e não-tratados, por análise da microbiota cultivável das fezes e da dosagem de ácidos graxos de cadeia curta e no conteúdo intestinal.
- Avaliar biomarcadores de efeito (estresse oxidativo e ensaio de micronúcleo) no fígado dos animais expostos e não expostos, tratados e não-tratados;
- Avaliar inflamação por meio da análise da atividade da mieloperoxidase (MPO) no baço e intestino e grosso, e da avaliação histopatológica de rins, baço e intestino grosso, nos animais expostos e não expostos;
- Analisar o perfil metabólico, utilizando a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) no soro dos animais expostos e não-expostos, por meio da metabolômica *Untargeted*; e identificar potenciais biomarcadores de efeito e vias metabólicas associadas a exposição aos agrotóxicos e ao tratamento com o probiótico *B. longum* 5^{1A};

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57bl/6, jovens (idade: 6 a 8 semanas), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (BC/UFMG). Os animais tiveram livre acesso a água filtrada e ração sólida *ad libitum*. Para os experimentos, os camundongos foram mantidos em gaiolas modelo (32 cm comprimento x 20 cm de largura x 21 cm altura, área de piso: 451 cm²) (Alesco Ind. e Com. Ltda, Campinas, SP, Brasil), no biotério NB1 do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG (bloco F2). Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério, assim como aeração e temperatura (23°C) foram controladas. Foi respeitado um número máximo de 6 animais por gaiola. Não houve necessidade de vermifugação por se tratarem de animais SPF (do inglês, *Specific Pathogen Free*). Como enriquecimento ambiental, as gaiolas receberam tubos de papelão para que os camundongos utilizassem como toca/ esconderijo; e lenço de papel e algodão para que confeccionassem ninhos.

Os procedimentos experimentais realizados nesta tese de doutorado foram executados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG). O presente estudo foi aprovado pelo CEUA sob protocolo nº 123/2022.

4.2 Escolha dos Agrotóxicos

Para a escolha dos agrotóxicos do estudo, foram utilizados bancos de dados governamentais: Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009)/ IBGE; Relatórios de 2013-2015 e 2018-2019 (parcial) do Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos (PARA)/ ANVISA; e os Dados abertos de Monografias de Agrotóxicos/ ANVISA. Para completar a seleção dos agrotóxicos, foram consultados os bancos de dados da Agrofit (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários), do MAPA, e os bancos de dados para artigos científicos *Science Direct* e *Pubmed*. Optou-se por não utilizar os dados do SISAGUA, programa de monitoramento das águas brasileiras, coordenado pelo Ministério da Saúde, pois apenas 27 agrotóxicos são

analisados, enquanto no programa PARA/ ANVISA, 270 agrotóxicos, incluindo seus metabólitos, eram analisados (atualmente são 311 agrotóxicos analisados).

As análises de todos os dados (POF, PARA e monografias) foram realizadas entre os meses de janeiro e março do ano de 2020, por isso os dados do último relatório PARA 2018-2019/ 2022 (publicado em dezembro de 2023) não foram utilizados.

A partir da lista de 11 alimentos de origem vegetal mais consumidos pela população de Minas Gerais/ Brasil (arroz, feijão, tomate, cebola, batata, cenoura, alface, banana, laranja, maçã e mandioca/farinha), a busca no banco de dados abertos das monografias de agrotóxicos foi realizada, com o intuito de encontrar quais os agrotóxicos permitidos para cada cultura e, em seguida, quais agrotóxicos são coincidentes.

A tabela 3 foi criada cruzando os dados das Monografias e os dados dos relatórios do PARA. Nela é possível observar os principais agrotóxicos de cada grupo químico, o número de culturas em que é permitido, se foi detectado nos relatórios do PARA e qual o posicionamento quanto ao número de detecções. Observa-se que o Imidacloprido, um inseticida neonicotinoide, e o Tebuconazol, um fungicida triazol, vêm ganhando destaque nos relatórios, sendo detectados cada vez mais entre as culturas. Observa-se também que a detecção de herbicidas não é significativa. O glifosato e o 2,4-D, antes dos relatórios de 2018-2019, não eram analisados por dependerem de métodos de análises específicos. No relatório PARA 2018-2019 parcial, o glifosato foi detectado apenas na cultura de arroz, apesar de ser permitido em outras 6 culturas.

A mistura de agrotóxicos deste presente estudo foi composta por: Tebuconazol (fungicida), Imidacloprido (inseticida) e Glifosato (herbicida). Segundo o site Agrofit, não eram comercializadas até a data de março/ 2020, no Brasil, qualquer formulação combinada dos três agrotóxicos deste estudo.

Tabela 3 – Principais representantes de cada classe de agrotóxicos detectados nos relatórios PARA 2013-2015 e PARA 2017-2018 (parcial), números de culturas permitidas (arroz, feijão, tomate, cebola, batata, cenoura, alface, banana, laranja, maçã, mandioca) e ranking geral de detecção em cada relatório.

	Principais	Classe	Culturas	Analisado pelo PARA	2013-2015	2017-2018
Estrobilurina	Piraclostrobina	Fungicida	11	Sim	8°	4°
	Trifloxistrobina	Fungicida	11	Sim	14°	20°
	Azoxistrobina	Fungicida	9	Sim	9°	10°
Benzimidazol	Tiabendazol	Fungicida	10	2013-2015	18°	-
	Tiofanato-metílico	Fungicida	9	Não	-	-
Neonicotinoide	Acetamiprido	Inseticida	9	Sim	11°	18°
	Imidacloprido	Inseticida	9	2013-2015	5°	1°
	Tiametoxam	Inseticida	9	Sim	13°	12°
Organofosforado	Malationa	Inseticida, acaricida	6	Não	-	-
	Clorpirifós	Inseticida, Formicida, acaricida	6	Sim	7°	13°
	Profenofós	Inseticida, acaricida	5	2018-2019	-	32°
Piretroide	Bifentrina	Inseticida, formicida, acaricida	9	Sim	15°	22°
	Beta-Ciflutrina	Inseticida	8	Não	-	-
	Lambda-cialotrina	Inseticida	8	Sim	16°	11°
	Cipermetrina (alfa, beta, zeta)	Inseticida	7	Sim	19°	9°
Triazol	Tebuconazol	Fungicida	11	Sim	4°	2°
	Difenoconazol	Fungicida	10	Sim	6°	6°
	Flutriafol	Fungicida	9	Sim	26°	27°
Organofosforado	Acefato	Inseticida, acaricida	4	Sim	3°	7°
Anilina	Boscalida	Fungicida	7	Sim	27°	16°
Benzimidazol	Carbendazim	Fungicida	4	Sim	1°	3°
Dicarboximida	Procimidona	Fungicida	7	Sim	17°	8°
Glicina Substituída	Glifosato	Herbicida	7	2018-2019	-	>35°
Ureia	Linurom	Herbicida	4	Sim	> 30°	31°

FONTE: Relatórios 2013-2015 e 2017-2018 (parcial) do Programa PARA/ ANVISA e Dados Abertos de Monografias de Agrotóxicos.

4.3 Estudo subcrônico e escolha das doses

A partir da avaliação dos artigos encontrados nos bancos de dados, as doses para os tratamentos foram escolhidas, correlacionando-as com as informações da DL₅₀, NOAEL e IDA (tabela 4). O tempo de tratamento (6 semanas) foi escolhido de acordo com documento da OCDE 408, para estudo subcrônico de toxicidade oral com doses repetidas (EFSA, 2011).

Tabela 4 – Doses de escolha para o tratamento dos camundongos a partir das doses de DL50, NOAEL, para estudos em camundongos, e IDA preconizados pela ANVISA, para os agrotóxicos Imidacloprido, Tebuconazol e Glifosato.

	Imidacloprido:	Tebuconazol:	Glifosato:
DL₅₀ oral em camundongos:	131 mg.kg ⁻¹ P.C.	1615 mg.kg ⁻¹ P.C.	10.000 mg.kg ⁻¹ P.C.
NOAEL em camundongos:	5,7 mg.kg ⁻¹ P.C. por dia	5.9 mg.kg ⁻¹ P.C. por dia	500 mg.kg ⁻¹ P.C por dia
IDA:	0,05 mg.kg ⁻¹ P.C. por dia	0,03 mg.kg ⁻¹ P.C. por dia.	ANVISA 0,5 mg.kg ⁻¹ P.C por dia; FDA 1,75 mg.kg ⁻¹ P.C por dia.
Dose de escolha:	5 mg.kg⁻¹ P.C por dia (100 x IDA)	4 mg.kg⁻¹ P.C por dia (133 x IDA)	15 mg.kg⁻¹ P.C por dia (30 x IDA/ Brasil)

FONTES: EFSA (2008); ANVISA (2019). NOAEL, Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis (do inglês, *No Observed Adverse Effect Level*) de um fármaco ou de uma toxina ou de um agente físico (como radiação ou pressão).

4.4 Mistura de Agrotóxicos (AGT) – Preparo

A partir dos dados do acompanhamento do peso corporal, as doses dos AGT foram calculadas, correspondentes a: Imidacloprido 5 mg/Kg⁻¹ P.C./ dia (98,5%; Dr Ehrenstorfer GmbH, #C14283700, Lote: G988243), Tebuconazol 4 mg/Kg⁻¹ P.C./dia (99,3%; Pestanal® Analytical Standard, Sigma-Aldrich, #32013, Lote: BCCC5713) e Glifosato 15 mg/Kg⁻¹ P.C./dia (98,1%; Pestanal® Analytical Standard, Sigma-Aldrich, #45521, Lote: BCBZ6585). Cada AGT foi pesado em balança analítica (MSU125P-1CE-DU, Sartorius, mín. 1 mg) em um mesmo tubo plástico de 2 mL tipo Eppendorf® e foram adicionados 2,0 mL de água purificada tipo I (Direct Q3 UV, MilliQ, Merck). Para a completa dissolução, o tubo contendo a mistura foi ao banho-ultrassônico (Sonitop 404A, Soni-tech) por 10 minutos.

Cada animal do grupo AGT recebeu o tratamento, por gavagem, de 0,1 mL da mistura de AGT. Os animais do grupo CTRL receberam apenas água purificada. Este tratamento foi realizado no período da tarde. A agulha de gavagem foi inicialmente autoclavada e depois foi mantida em álcool 70°, para evitar contaminações cruzadas. A mistura foi de preparo diário para evitar degradação dos agrotóxicos.

4.5 Probiótico *Bifidobacterium longum* 5^{1A} - Preparo e tratamento

O meio de cultura De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Difco, Detroit, MI, EUA) foi preparado pesando 55 g de MRS e 0,5 g cisteína, em um litro de água purificada tipo I (Direct Q3 UV, MilliQ, Merck). O caldo foi solubilizado e aliqotado (10 mL) em tubos plásticos de 15 mL tipo falcon e autoclavados. O meio foi mantido sob refrigeração a 8-10°C.

Uma alíquota do probiótico (PROB) da linhagem *Bifidobacterium longum* 5^{1A}, pertencente ao acervo de culturas do Laboratório de Agentes Bioterapêuticos (cedido pelo professor Flaviano dos Santos Martins, Microbiologia/ UFMG), foi descongelada (estoque mantido a -80°C). As bifidobactérias foram cultivadas em caldo MRS a 37°C por 48 h sob condições anaeróbicas, sem agitação. O ambiente anaeróbico foi obtido usando uma câmara (Forma Scientific Company, Marietta, OH, EUA) com a atmosfera contendo 80% N₂, 10% H₂ e 10% CO₂.

Para manutenção da integridade genética do probiótico, a validade dos repiques do probiótico foi de 2 semanas. Antes do vencimento do repique, uma nova alíquota do probiótico original (estoque a -80°C) foi descongelada e preparada conforme descrito acima.

Para o tratamento, retirou-se uma alíquota (100 µL) do probiótico (mantido em estufa a 37°C dentro da câmara de anaerobiose) e adicionou-se em novo meio de cultura MRS caldo estéril (10 mL). O repique foi mantido nas mesmas condições anteriores de anaerobiose. O probiótico remanescente no tubo plástico, centrifugou-se a 1500 rpm por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e o pellet de bactérias foi ressuspendido em 10 mL de salina 0,9% estéril.

Os camundongos (grupos PROB e AGT+PROB) foram tratados com 0,1 mL do probiótico (em solução salina), onde este volume corresponde a aprox. log₁₀ 10⁹ UFC/mL de bactérias *B. longum* 5^{1A}. O tratamento foi realizado todas as manhãs, respeitando o ciclo circadiano dos animais. Os grupos CTRL e AGT receberam apenas salina 0,9% estéril.

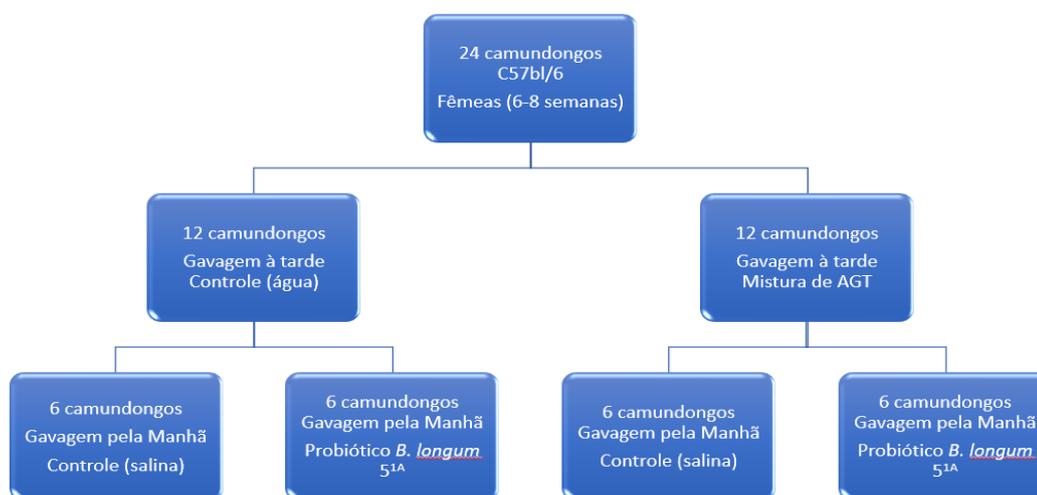
A agulha de gavagem foi inicialmente autoclavada e depois foi mantida em álcool 70°, para evitar contaminações cruzadas.

4.6 Desenho Experimental

Os camundongos da linhagem C57bl/6 (24 fêmeas, 6-8 semanas), após o período de aclimatação, foram divididos em 4 grupos, cada um deles composto de 6 animais (figura 11, tabela 5). O experimento foi realizado entre janeiro e fevereiro de 2022, no Laboratório de

Microbiota e Imunomodulação (LMI), do departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os tratamentos tiveram duração total de 6 semanas (exposição subcrônica, segundo a OCDE 408 - *Guideline for the testing of chemicals*) (EFSA, 2011). A eutanásia ocorreu no dia 42 (6 semanas).

Figura 11 – Fluxograma dos tratamentos dos camundongos C57bl/6 fêmeas.



Fonte: do autor.

Tabela 5 – Protocolo de exposição à mistura de agrotóxicos e tratamento com o probiótico.

24 camundongos C57bl/6 fêmeas foram separados em 4 grupos, com 6 animais cada, e receberam duas gavagens diárias com os tratamentos (probiótico e mistura de agrotóxicos).

Grupo	Tratamento
CTRL	Os animais foram tratados com gavagem diária com 0,1 mL de salina 0,9% e 0,1 mL de água purificada, por todo período de tratamento, manhã e tarde, respectivamente.
AGT	Os animais foram tratados com gavagem diária com 0,1 mL de salina 0,9% pela manhã e 0,1 mL da mistura de AGT à tarde, por todo período de tratamento.
PROB	Os animais foram tratados com gavagem diária com 0,1 mL de probiótico com aprox. 10^9 log UFC/mL de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} pela manhã e 0,1 mL de água purificada à tarde, por todo período de tratamento.
AGT + PROB	Os animais foram tratados com gavagem diária com 0,1 mL de probiótico com aprox. 10^9 log UFC/mL de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} pela manhã e 0,1 mL da mistura de AGT à tarde, por todo período de tratamento.

Fonte: do autor.

Água e ração comercial foram oferecidas aos camundongos *ad libitum*. A ração foi amostrada para análise para identificação de possíveis contaminantes, uma vez que contém em sua

formulação componentes vegetais, como milho e soja. As análises foram realizadas no laboratório do Instituto Octávio Magalhães - IOM/FUNED/MG.

Os animais foram pesados desde a semana -1 (aclimatação) até a semana 6 para ajuste da dose da mistura de AGT e avaliação de possível intoxicação. Nas semanas 3 e 6, o sangue foi coletado por punção venosa caudal para análise da glicemia jejum (6 horas), por glicosímetro, utilizando fitas reagentes. Quatro dias antes da eutanásia, foi realizado teste de resistência à insulina, por punção venosa caudal. Um dia antes da eutanásia, foram coletadas amostras fecais para análises microbiológicas.

4.7 Eutanásia

Ao final do período experimental (6 semanas), os animais foram eutanasiados (80 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina), o sangue foi retirado por punção cardíaca, seguido de deslocamento cervical. Os órgãos e fluidos foram coletados, pesados e depois congelados a -80°C e/ou fixados em bouin/ formol tamponado a 4%. O sangue foi centrifugado a 12000 rpm, por 10 minutos a 4° C para separação do soro e armazenado a -80°C até a realização das análises metabômicas. 5µL de sangue foi coletado com ponteira preparada com EDTA para preparo de esfregaços sanguíneos.

O intestino delgado foi retirado inteiro e o conteúdo intestinal foi coletado para análise de AGCC (estocado a -80°C até o momento da análise). O intestino grosso foi retirado inteiro, o conteúdo coletado para análise de ACGG (estocado a -80°C até o momento da análise) e fracionado, onde os 3 cm iniciais foram para análise da histopatológica (fixação rápida em Bouin, seguido da confecção de rolinhos) e restante para a análise da atividade da MPO (congelado em freezer -80°C).

Após fixação rápida em Bouin (ácido pícrico, ácido acético e formaldeído), o intestino grosso foi transferido para formaldeído tamponado a 4%. Esta solução foi trocada todos os dias até clareamento, ou seja, até que a cor amarela do ácido pícrico não se desprendesse mais do tecido. Baço (metade) e rim (um) foram fixados diretamente em formaldeído tamponado a 10%. O fígado foi congelado a -80°C para avaliação de estresse oxidativo.

4.8 Estudo dos parâmetros bioquímicos e histopatológicos

4.8.1 Acompanhamento do Peso Corporal e cálculo do Peso Relativo

Os animais foram pesados individualmente em balança desde aclimatação até o dia da eutanásia, uma vez por semana. Para identificação, cada animal foi marcado na cauda com caneta permanente, recebendo de 1 a 5 marcas ou ficando sem marcação. Os dados das pesagens foram lançados em planilha do Excel (Microsoft® Office 2019). O peso corporal também foi utilizado para avaliar o estado fisiológico dos animais. Caso os animais perdessem mais do que 10 % do peso corporal inicial, a eutanásia seria adiantada, pois indicaria que as doses causaram intoxicação aguda e/ou os tratamentos com a gavagem geraram muito estresse (distresse), consequentemente, desconforto aos animais e prejuízo dos resultados.

Após a eutanásia, os órgãos foram coletados e pesados isoladamente. Cada peso relativo (%), também chamado index, foi calculado pela fórmula {peso órgão x 100/ peso corporal}.

4.8.2 Avaliação da Glicose Jejum e da Sensibilidade à Insulina

4.8.2.1 Glicose Jejum (6h)

Pela manhã, os animais de todos os grupos foram colocados em jejum por 6 horas (apenas a água foi mantida *ad libitum*). Após este período, com agulha estéril 0,38 x 13 (27,5G x 1/2”, marca Luer Slip), a cauda de cada animal foi puncionada para a coleta de 1 gota de sangue, recolhida diretamente sobre a fita reagente posicionada no glicosímetro (marca: Roche, modelo: Accu-check Active). O resultado foi expresso em mg de glicose /dL de sangue.

4.8.2.2 Sensibilidade à Insulina

Os animais foram pesados pela manhã para o cálculo da insulina a ser injetada (75 U/ kg P.C.). Preparou-se uma solução intermediária de 27 U/ mL em PBS estéril, a partir da Insulina

Humana Comercial (100 U/mL). Utilizando o valor médio do peso dos camundongos (18,3 g), preparou-se a solução de uso (0,137 U/mL). O volume de injeção foi calculado individualmente para cada camundongo (peso corporal \times 5,47 = μ L de insulina injetado).

O teste de sensibilidade à insulina foi realizado à tarde, antes do tratamento com a mistura de AGT. Não foi necessário deixar os animais em jejum (ração e água foram mantidas *ad libitum*).

Com agulha estéril 0,38x13 (27,5G x 1/2", marca Luer Slip), a cauda de cada animal foi puncionada para a coleta de 1 gota de sangue, recolhida diretamente sobre a fita reagente posicionada no glicosímetro. Imediatamente após análise (tempo 0), injetou-se (intraperitoneal) 0,75 U/kg P.C. de insulina (solução de uso a 0,137 U/ mL). Realizaram-se novas medições nos tempos 15, 30 e 60 min após a injeção. O resultado foi expresso em mg de glicose /dL de sangue.

4.8.3 Avaliação de Colesterol Total e Triglicérides

As análises de colesterol total e de triglicérides foram realizadas no laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG, autorizadas pela professora Iêda de Fátima Oliveira Silva.

4.8.3.1 Dosagem de Colesterol Total sérico (método de Trinder)

Procedeu-se como recomendado pelo fabricante do kit (Bioclin, kit K083-2). Descongelou-se a amostra (soro). Homogeneizou-se em agitador de tubos tipo vórtex a 2200 rpm por 1 min. Em tubos de vidro de 5 mL, adicionou-se 10 μ L da amostra, padrão e soro controle. Em seguida, acrescentou-se 1 mL da solução reagente. Homogeneizou-se com cuidado (leves batidas na lateral do tubo) e incubou-se em banho-maria à 37°C por 10 minutos. Após este tempo, realizou-se leitura em analisador bioquímico semi-automático (marca BIOCLIN 2200) a 500 nm. A concentração do colesterol total foi expressa em mg/ dL.

4.8.3.2 Dosagem de Triglicérides sérico pelo método de Trinder

Procedeu-se como recomendado pelo fabricante do kit (Bioclin, kit K117-1). Descongelou-se a amostra (soro). Homogeneizou-se em agitador de tubos tipo vórtex a 2200 rpm por 1 min. Em tubos de vidro de 5 mL, adicionou-se 10 µL da amostra, padrão e soro controle. Em seguida, acrescentou-se 1 mL da solução reagente. Homogeneizou-se com cuidado (leves batidas na lateral do tubo) e incubou-se em banho-maria à 37°C por 10 minutos. Após este tempo, realizou-se leitura em espectrofotômetro a 500 nm. A concentração de triglicérides foi expressa em mg/ dL.

4.8.4 Avaliação da atividade da Mieloperoxidase

As amostras de baço e intestino grosso ficaram congeladas a -80°C até o momento das análises. Em tubos plásticos de 2 mL tipo Eppendorf®, pesou-se aproximadamente 100 mg de tecido (baço ou intestino grosso previamente descongelados), adicionou-se Buffer 1 (NaCl 0,1 mol.L⁻¹, Na_3PO_4 0,02 mol.L⁻¹, Na_2EDTA 0,015 mol.L⁻¹, pH = 4,7) gelado (1,9 mL para cada 100mg de tecido) e homogeneizou-se em triturador de tecidos tipo moinho de esferas a 50 hz por 10 minutos. Centrifugou-se a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se NaCl 0,2% gelado (500 µL para cada 100mg de tecido) ao precipitado remanescente. Aguardou-se aproximadamente 30 segundos e em seguida, adicionou-se NaCl 1,6% com glicose 5% gelado (1,5 mL para cada 100 mg de tecido). Homogeneizou-se rapidamente as amostras (50 Hz e 5 minutos) e centrifugou-se novamente a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se Buffer 2 (Na_3PO_4 0,05 mol.L⁻¹, HETAB - Hexadecyltrimethylammonium bromide 0,05% v/v, pH = 5,4) gelado (1,9 mL para cada 100 mg de tecido; temperatura ambiente) ao precipitado remanescente, homogeneizando rapidamente as amostras (50 Hz e 5 minutos) em seguida. Para completa lise celular, congelou-se e descongelou-se as amostras 3x em nitrogênio líquido, finalizando o procedimento com centrifugação a 4°C por 15 minutos a 10.000rpm. Coletou-se o sobrenadante para o ensaio enzimático.

Em placa de 96 poços, adicionou-se 25 µL do sobrenadante, em duplicata. Para baço, foi necessário diluir as amostras (1:24 em Buffer 2). Como branco, utilizou-se o Buffer 2 (25

$\mu\text{L/poço}$). A cada poço, adicionou-se 25 μL do substrato TMB (3,3,5,5'-tetrametilbenzidina; 3,8 mg/mL em DMSO) e incubou-se a placa a 37°C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 100 μL de H_2O_2 (0,002% em Buffer 2) e incubou-se novamente a 37°C por 5 minutos. Para parar a reação, adicionou-se 100 μL de H_2SO_4 (1 mol.L⁻¹) e a placa foi lida em leitor de microplacas (POLARIS, Celer Biotecnologia S.A) em comprimento de onda a 450nm. O resultado foi expresso em O.D. (densidade óptica).

4.8.5 Avaliação Histopatológica

Os tecidos fixados em Bouin (intestino grosso) e formaldeído 4% (baço e rim) foram encaminhados para o laboratório Celulavet para a confecção das lâminas histológicas (5 μm de espessura) com colocação Hematoxilina-Eosina (HE). A análise histopatológica foi realizada em parceria com o laboratório de Patologia Comparada (LPC), do professor Dr. Geovanni Dantas Cassali, em microscopia óptica de luz. Os seguintes critérios foram estabelecidos para a análise: aumento de 10x (100x) para avaliação da celularidade e qualidade da coloração; aumento de 20x (200x) para as características dos tipos celulares; e aumento de 40x (400x) para análise morfológica individual das células (características nucleares e citoplasmáticas) para estabelecer um diagnóstico. Pelo menos um animal por grupo teve a lâmina fotografada para registro.

4.8.6 Análises Estatísticas

Foi utilizado o software Graphpad Prism 8.0. Após análise da normalidade (por Shapiro-Wilk) e presença de outliers (HOUT), para dados não-paramétricos foram utilizados o teste Mann Whitney ou Wilcoxon com correção de Dunn (pos-hoc). Para análise do peso corporal, foi utilizado o teste de ANOVA one-way para medidas repetidas.

4.9 Avaliação da Microbiota Intestinal

4.9.1 Avaliação da microbiota fecal cultivável

As fezes foram coletadas assepticamente em tubo de plástico de 2 mL tipo Eppendorf® estéreis (autoclavados), pesadas e diluídas em solução salina 0,9% m/v estéril (1:10). Em seguida, foram plaqueadas em placas de 96 poços, para facilitar as diluições seriadas correspondentes para cada tipo de bactéria, conforme tabela 8. Feitas as diluições, cada placa de meio de cultura recebeu uma microgota (10µL) da suspensão de fezes. Todo procedimento, desde coleta das fezes até plaqueamento, foi realizado em capela de fluxo laminar.

Para cultivo de populações da microbiota fecal, placas com de meios seletivos e diferenciais foram usadas como segue: ágar Manitol Salgado Hipertônico (Neogen® Cuture Media) para isolamento de *Staphylococcus*; ágar MacConkey (Sigma-Aldrich, NutriSelect® Basic) para isolamento de *Enterobacteriaceae*; ágar Bile Esculina (BE; Neogen® Cuture Media) para isolamento de *Streptococcus* e *Enterococcus*; ágar Bacteroides Bile Esculina adicionado de 0,1% v/v de gentamicina (BBE; Neogen® Cuture Media, adicionado de 0,1% v/v de gentamicina Vigor®) para isolamento de *Bacteroides*; ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS; Acumedia®) em aerobiose para isolamento de bactérias ácido lácticas (BAL), e em anaerobiose para isolamento de *Bifidobacterium* e BAL; Ágar sangue (Microgen®) foi utilizado para cultivo da microbiota total aeróbia, e ágar sangue suplementado com hemina e menadiona 1% v/v foi utilizado para cultivo da microbiota total anaeróbia. Para cada população bacteriana foi necessário diluir as amostras de fezes de forma a favorecer a contagem das colônias (tabela 8).

Tabela 6 – Preparo das diluições utilizadas no cultivo das fezes para análise da microbiota cultivável, por técnica de microgotas (10 µL), em cada meio de cultura, a partir da diluição inicial de 1:10 em solução salina 0,9% estéril.

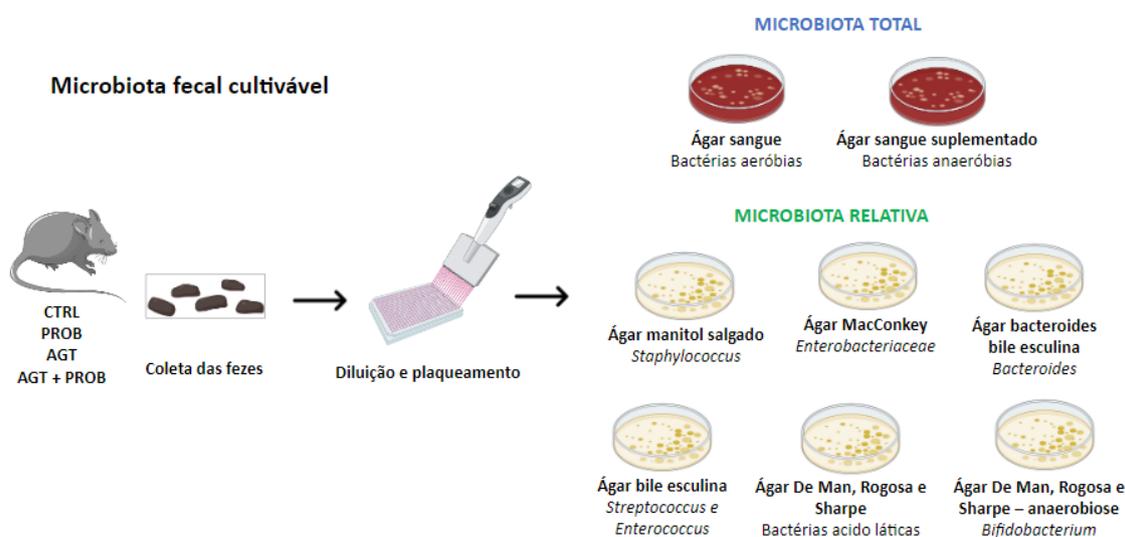
Placa	Diluições		
Ágar Sangue	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Ágar Sangue suplementado	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Manitol	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
MacConkey	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Bile Esculina	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Bacteroides Bile Esculina	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
De Man, Rosa e Sharpe (MRS) aeróbio	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
De Man, Rosa e Sharpe (MRS) anaeróbio	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷

Fonte: do autor.

As placas foram incubadas em condições de aerobiose e anaerobiose de acordo com a necessidade do microrganismo de interesse, a 37°C durante 48h (figura 12). Após o período de incubação, unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e os resultados expressados como Log_{10} média \pm SEM de UFC/g de fezes.

Figura 12 – Esquema da análise da microbiota cultivável.

As fezes são coletadas em ambiente estéril e diluídas de acordo com o tipo de bactéria a ser identificada. Microbiota Total: 1. Ágar sangue: bactérias aeróbicas; 2. Ágar Sangue Suplementado: bactérias anaeróbicas; Microbiota Relativa: 3. Ágar Manitol Salgado: *Staphylococcus*; 4. Ágar MacConkey: *Enterobacteriaceae*; 5. Ágar Bacteroides Bile Esculina: *Bacteroides*; 6. Ágar Bile Esculina: *Streptococcus* e *Enterococcus*; 7. Ágar de Man, Rogosa e Sharpe: Bactérias ácido lácticas (BAL); 8. Ágar de Man Rogosa e Sharpe (anaerobiose): *Bifidobacterium* e BAL.



Fonte: Laboratório de Microbiota e Imunomodulação (LMI).

4.9.2 Avaliação dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC) em Conteúdo Intestinal/ Fezes

As dosagens de AGCC foram realizadas no Laboratório de Toxicologia (LATO/FAFAR/UFMG), coordenado pela professora Leiliane Coelho André.

O método de análise de AGCC por CLAE-UV foi validado segundo critérios da EURACHEM e atendeu aos critérios de seletividade, linearidade, precisão, tendência/ recuperação, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (EURACHEM, 2014).

4.9.2.1 Preparo das soluções padrões e amostras de fezes e conteúdo intestinal

O preparo de amostras foi adaptado do método desenvolvido por Gallotti e colaboradores (2021).

As amostras de conteúdo intestinal (total: intestino delgado e grosso) foram pesadas e ressuspendidas em solução de ácido orto-fosfórico (85% grau HPLC, Merck) a 1% v/v na proporção de 1:6 (m/v) e padrão interno (ácido 2-etil-butírico) a 0,1 mol. L⁻¹, seguida de agitação em vórtex por 1 minuto a 2200 rpm. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000G por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa PVDF (acetato de celulose) 22 µm e acondicionadas em vials de 2 mL de vidro para CLAE.

A curva de calibração foi preparada em matriz (pool de fezes) da mesma forma que as amostras e os padrões analíticos adicionados (soluções intermediárias de concentração 0,01 mol.L⁻¹ cada AGCC), conforme tabela (9) a seguir:

Tabela 7 – Volumes das soluções utilizadas para o preparo da curva de calibração matrizada (por adição de padrão) para análise de ácido graxos de cadeia curta em fezes/ conteúdo intestinal por CLAE-UV.

	Conc. (µM)	Pool fezes	Padrão Acetato	Padrão Propionato	Padrão Butirato	P.I.	Sol. de extração (H ₃ PO ₄ 1%)
Branco	-	565	-	-	-	60	375
P1	250	565	25	25	25	60	300
P2	500	565	50	50	50	60	225
P3	750	565	75	75	75	60	150
P4	1000	565	100	100	100	60	75
P5	1250	565	125	125	125	60	-

Fonte: do autor.

4.9.2.2 Condições Cromatográficas do CLAE-UV

O método de análise foi adaptado da técnica desenvolvida Gallotti e colaboradores (2021).

Um volume de 10 μL da amostra recém extraída foi injetado no CLAE com detector ultravioleta (UV) e amostrador automático (Marca: Thermo, modelo: Finigan Surveyor Plus UV-VIS). Como fase móvel foi utilizada solução de ácido ortofosfórico a 0,1% v/v (preparada a cada 2 dias, filtrada e degaseificada). A coluna utilizada foi de troca iônica SUPELCOGEL C610H, 6% crosslinked HPLC, partícula 9 μm , 30 cm de largura \times 7,8 mm I.D. (Sigma-Aldrich) com coluna de guarda de troca iônica SUPELCOGEL C610H, 6% crosslinked HPLC, partícula 9 μm , 5 cm de largura \times 4,6 mm I.D. (Sigma-Aldrich). As condições cromatográficas (resumidas na tabela 10) foram: 35 minutos com fluxo da fase móvel a 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, seguido de um fluxo de 0,7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ até 60 minutos de corrida. A coluna permaneceu a 30°C e a leitura foi em comprimento de onda a 210 nm.

Tabela 8 – Condições cromatográficas do CLAE-UV para análise de ácidos graxos de cadeia curta em fezes/ conteúdo intestinal.

	Fluxo ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	Temperatura	Tempo	Tempo total
Rampa	0,5	30°C	35	35 min
	0,7	30°C	25	60 min

Fonte: do autor.

Como controle de qualidade, foram preparados branco de reagentes e padrões de checagem (concentração 750 μM de cada AGCC). Para manutenção do sistema, a cada 6 amostras foi injetada a solução de extração (ácido orto-fosfórico a 1% v/v). As amostras foram analisadas em duplicata (erro aceitável: 5%). Os tempos de retenção para cada AGCC foram: acetato 19,8 minutos; butirato 29,0 minutos e padrão interno 42,0 minutos.

4.10 Avaliação dos biomarcadores de efeito

4.10.2 Avaliação do Estresse Oxidativo

As dosagens de estresse oxidativo foram realizadas no Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABIN/ ICB/UFMG), coordenado pela professora Jacqueline Isaura Alvarez-Leite.

4.10.2.1 Preparo das amostras

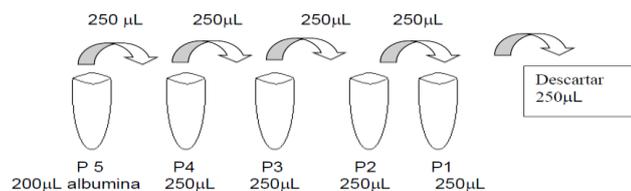
Os ensaios foram realizados em fígado dos animais tratados. O tecido ficou congelado a -80°C até o momento das análises. No dia do procedimento, descongelou-se as amostras, pesou-se 100 mg de tecido e adicionou-se 1mL de tampão fosfato (50 mM) gelado. Homogeneizou-se a amostra em triturador de tecidos tipo moinho de esferas (50 Hz, 5 minutos). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi aliqotado para a realização das quatro dosagens e alíquotas mantidas a -80°C até realização das análises.

4.10.2.2 Dosagem de Proteínas pelo método de Lowry

Para uma normalização dos resultados, os valores nas dosagens de Malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD) e hidroperóxidos foram corrigidos pela quantidade de proteína total do tecido analisado. O método de Lowry é confiável e amplamente utilizado para dosar proteínas e é baseado na reação do reativo de Folin (redução), na presença cobre (II), um catalisador da oxidação de aminoácidos aromáticos, formando uma coloração azul que é dependente do índice de tirosina e triptofano da amostra (Lowry *et al.*, 1951).

Como padrão de proteína utilizou-se albumina (solução estoque 1 mg.mL^{-1}). Em tubo de plástico de 2 mL tipo eppendorf®, adicionou-se 200 μL de padrão. Em seguida, adicionou-se 250 μL de água purificada tipo I (tubo 5) e em mais 4 tubos, realizando uma diluição seriada para preparo da curva de calibração (figura 13 e tabela 11).

Figura 13 – Esquema para diluição seriada para dosagem de proteína total pelo método de Lowry.



FONTE: Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABIN/ ICB/UFMG)

Pipetou-se, em tubo plástico de 2 mL tipo eppendorf®, 5 µL do homogenato das amostras (seção 4.10.2.1) e adicionou-se 245 µL de água purificada tipo I. A seguir, em todos os tubos, adicionou-se 250 µL da solução A (CuSO_4 : tartarato de sódio : Na_2CO_3 , 1:1:100), inclusive na curva padrão. Adicionou-se 25 µL de reativo de Folin (1:2) em cada tubo, inclusive para a curva padrão, e agitou-se imediatamente em agitador de tubos tipo vórtex, a 2200 rpm. As amostras foram incubadas por 30 minutos. Plaqueou-se, com 200 µL em cada poço, em placa de 96 poços: branco, todos os pontos da curva padrão, e de cada amostra, em duplicata. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 660nm e o resultado expresso em mg de proteína/ g de tecido.

Tabela 9 – Volumes das soluções utilizadas para o preparo da curva de calibração para análise de proteína total pelo método de Lowry, por espectrometria.

Padrão de Albumina (1 mg/L)	Quantidade de PTN por tubo em mg	Quantidade de PTN por tubo em µg	Concentração da Albumina (mg/mL)	Concentração da Albumina (µg/mL)
P1	0,0125	12,5	0,025	25
P2	0,025	25	0,050	50
P3	0,050	50	0,100	100
P4	0,100	100	0,200	200
P5	0,200	200	0,400	400
Branco	-	-	0	0

FONTE: Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABIN/ ICB/UFMG)

4.10.2.3 Dosagem de Malondialdeído pelo método de TBARS

Pipetou-se, em tubo de plástico de 2 mL tipo eppendorf®, 250 µL do homogenato (seção 4.10.2.1). Preparou-se o branco e os padrões para construção da curva padrão, utilizando a

solução padrão de MDA (solução estoque 500 μM) e PBS 1x, de acordo com a tabela (12) abaixo:

Tabela 10 – Volumes das soluções utilizadas para o preparo da curva de calibração para análise de malondialdeído pelo método de TBARS, por espectrometria.

	Quantidade de MDA	Quantidade de PBS 1x	Concentração $\mu\text{Mol.L}^{-1}$
Branco	-	250 μL	0
Padrão 1	1 μL	249 μL	2
Padrão 2	1,5 μL	248,5 μL	3
Padrão 3	2,5 μL	247,5 μL	5
Padrão 4	5,0 μL	245 μL	10
Padrão 5	25 μL	225 μL	50

FONTE: Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABIN/ ICB/UFMG)

Adicionou-se 0,5mL da solução TBARS (ácido tricloroacético 15% m/v; ácido tiobarbitúrico 0,375% m/v; ácido clorídrico 0,25 mol.L^{-1}) em todos os tubos, inclusive nos padrões e branco. Cobriu-se os tubos com papel alumínio antes de levá-los a banho-maria fervente por 15 minutos. Resfriou-se os tubos em água corrente fria. Adicionou-se 0,75 mL de butanol em todos os tubos, em capela de exaustão. Os tubos foram agitados imediatamente em um agitador de tubos tipo no vórtex, a 2200 rpm. Centrifugou-se as amostras, padrões e branco a 6000 rpm por 10 minutos. Plaqueou-se 200 μL do sobrenadante (cor rosa intensa), em placa de 96 poços, em duplicata. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 535nm. A dosagem de TBARS foi expressa em μM MDA/ mg proteína.

4.10.2.4 Dosagem de Hidroperóxidos

Foram preparadas duas placas de 96 poços, uma sem o reagente TTP (Trifenilfosfina 0,262% m/v) e outra com o reagente TTP. Sem o reagente, em triplicata, plaqueou-se 20 μL do homogenato de tecido de fígado (seção 4.10.2.1) por poço e adicionou-se 180 μL do reagente de FOX-2 (xileno Orange 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; sulfato ferroso amoniacal 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; ácido sulfúrico 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Como branco, plaqueou-se 20 μL de PBS 1x por poço e adicionou-se 180 μL do reagente de FOX-2. Cobriu-se a placa com papel alumínio e incubou-se, a temperatura ambiente, por 30 minutos. A leitura (leitor de ELISA) foi realizada em

comprimento de onda a 560nm. Com o reagente TTP, em triplicata, plaqueou-se 15 μL do homogenato por poço, 5 μL do reagente TTP e 180 μL do reagente de FOX-2. Como branco, plaqueou-se 15 μL de PBS 1x, 5 μL do reagente TTP e 180 μL do reagente de FOX-2. Cobriu-se a placa com papel alumínio e incubou-se, a temperatura ambiente, por 30 minutos. A leitura (leitor de ELISA) foi realizada em comprimento de onda a 560nm. O resultado foi obtido após a subtração das leituras sem e com TTP> O TTP reagem apenas com os hidroperóxidos e a subtração das leituras promove a para a exclusão do peróxido de hidrogênio, obtendo apenas o correspondente aos demais hidroperóxidos. O resultado é expresso em μmol de hidroperóxidos / mg proteína, utilizando curva de calibração previamente preparada no LABIN.

4.10.2.5 Dosagem da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Em placa de 96 poços, plaqueou-se as amostras (homogenato de fígado - seção 4.10.2.1), padrões e branco, segundo a tabela (13) a seguir, em duplicata.

Incubou-se as amostras, por 5 minutos, em estufa a 37°C. Para paralisar a reação, cada poço recebeu 150 μL de DMSO (dimetilsulfóxido). A placa foi lida em leitor de ELISA em comprimento de onda de 570nm. Uma unidade (U) de SOD é responsável pela oxidação de 50% do pirogalol. O resultado foi expresso em U SOD/ mg de proteína.

Tabela 11 – Volumes das soluções utilizadas para o preparo da curva de calibração para análise da atividade de Superóxido dismutase (SOD) pela oxidação do pirogalol, por espectrometria.

	Amostra (μL)	Tampão Fosfato PBS (μL)	MTT (1,25 $\mu\text{Mol.L}^{-1}$) (μL)	Pirogalol (100 $\mu\text{Mol.L}^{-1}$) (μL)
Branco	-	144	6	-
Padrão (= 1 U de SOD)	-	129	6	15
Amostra	30	99	6	15

FONTE: Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABIN/ ICB/UFGM).

4.10.2 Ensaio de Micronúcleo

Durante a eutanásia dos animais, o esfregaço sanguíneo (dois por animal) foi preparado com 5 uL de sangue coletados com ponteira preparada com EDTA. Após secagem das lâminas (24 horas a temperatura ambiente), a coloração de Panótico Rápido foi realizada (Castro *et al.*, 2018), 30 s em cada reagente, seguindo as instruções do fabricante.

A contagem dos MN foi realizada seguindo os critérios descritos por Hendle; Salamone (1981) e Titenko-Holland *et al.*, (1997) e preconizados pelo protocolo da OECD 474, considerando para contagem: apenas células íntegras apresentando forma arredondada com citoplasma intacto, com as estruturas intracitoplasmáticas identificáveis; os micronúcleos apresentando forma arredondada, no mesmo plano do citoplasma, sem refringência e de tamanho entre 1/20 e 1/5 do tamanho do núcleo do leucócito.

Foram contados 1000 eritrócitos por lâmina, em duplicata por animal e o resultado expresso em frequência de MN/ 1000 eritrócitos. Não foram diferenciados eritrócitos imaturos de maduros, porque o tratamento nos animais foi contínuo, excedendo a vida útil do eritrócito no camundongo (4 semanas) e a depleção esplênica de eritrócitos micronucleados em camundongos não é forte o suficiente para comprometer a detecção dos MN (OECD 474).

4.10.3 Análises Estatísticas

Foi utilizado o software Graphpad Prism 9.0. Após análise da normalidade (por Shapiro-Wilk) e presença de outliers (HOUT), para dados não-paramétricos foram utilizados o teste Mann Whitney ou Wilcoxon com correção de Dunn (pos-hoc); para dados paramétricos foram utilizados teste t (considerando ou não a igualdade de variância - para dois conjuntos de dados) ou ANOVA two-way/ Tukey (pos hoc).

4.11 Análise Metabolômica

A análise metabolômica global (*Untargeted*) para identificar possíveis biomarcadores de efeito para a exposição à mistura de agrotóxicos e do efeito do tratamento dos camundongos com o probiótico *B. longum* 5^{1A} foi realizada no Laboratório de Toxicologia (LATO/FAFAR/UFMG), coordenado pela professora Leiliane Coelho André.

4.11.1 Preparo das amostras

O protocolo de preparo de amostras de soro foi realizado de acordo com Rey-Stolle *et al.*, 2022. Em banho de gelo, as amostras de soro foram descongeladas. Após homogeneização das amostras em vórtex (MS 3 digital - Ika®) por 2 minutos, 40 uL de soro foi transferido para tubo tipo eppendorf de 1,5 mL, adicionando-se em seguida, 120 uL de acetonitrila (grau LC-MS Sigma-Aldrich®) gelada (-20°C). Agitou-se as amostras em vortex por 2 min, seguido de repouso por 20 minutos em banho de gelo. Decorrido o tempo, para total precipitação das proteínas, as amostras foram centrifugadas (Sigma, modelo 2K15) a 15.400G por 10 minutos a 4°C.

Coletou-se 200 uL do sobrenadante em inserto de vidro com mola e secou-se o extrato a 30°C, por 2 horas, a vácuo, em concentrador de amostras Speedvac (Eppendorf®). Após extrato totalmente seco, adicionou-se 10 µL de cloridrato de metoxiamina (15 mg/mL Sigma-Aldrich®, em piridina, Sigma-Aldrich®) ao inserto. Agitou-se por 5 min em vórtex, seguido de revezamento entre banho ultrassônico (modelo Sonitop 404 A - Soni-Tech®) e vortex, 2 minutos em cada equipamento, por três vezes. Incubou-se as amostras a temperatura ambiente, por 16 horas, protegidas da luz.

Após o tempo de reação, adicionou-se 10 µL de BSTFA (com 1% TMCS, Sigma-Aldrich®). Agitou-se as amostras por 5 minutos em vortex (2000 rpm) e incubou-se a 70 °C durante 60 min em bloco digestor. Para finalizar, resfriou-se as amostras a temperatura ambiente por 15 minutos e adicionou-se 100 uL de tricosano (20 ppm, Sigma-Aldrich® em heptano, Sigma-Aldrich® - padrão interno 2) às amostras, agitando por 2 minutos em vortex (2000 rpm).

Para o preparo dos QCs (controles de qualidade), de cada inserto (amostra) retirou-se 30 uL para formar o pool dos extratos. Homogeneizou-se e dividiu-se em novos insertos com volumes iguais. A quantidade de QCs foi relativa à quantidade de injeções (cinco injeções iniciais para aclimatação do equipamento; a cada 6 injeções, uma nova análise de QC). Foram preparados brancos de reagentes e da extração.

4.11.2 Condições analíticas do CG-EM

As condições cromatográficas foram padronizadas segundo protocolo de Fiehn *et al.* (2016). Em cromatógrafo gasoso modelo 7890A com amostrador automático acoplado a um espectrômetro de massas com detector simples quadrupolo 5975C da Agilent Technologies, a análise metabolômica de soro foi realizada. O método foi travado (*RT lock*) com a injeção de padrão de C18 metil estearato (Sigma-Aldrich). Antes das análises, o sistema foi checado com *autotune*, observando as massas m/z 69, 219 e 502 para ajustar os parâmetros dos elementos do analisador, e vazamentos de ar e água conferindo as massas m/z 18 (H₂O), 28 (N₂) e 32 (O₂) (inferiores a 5%).

As amostras (1 μ L) foram injetadas individualmente em *liner* desativado em modo *split* (1:10) em injetor a 250°C, usando hélio como gás de arraste (fluxo de 1,1 mL/min). A coluna utilizada foi a DB5-MS com 30m de comprimento, 0,25 mm i.d. e 0,25 μ m (part number: 122-5532; Agilent Technologies®). A programação de temperatura iniciou-se a 60°C por 1 minuto, aumentando 10°C/min até atingir 325°C e mantida por 10 minutos, antes de resfriar. Outros parâmetros do espectrômetro de massas utilizados: linha de transferência a 280°C, fonte de filamento a 230°C, quadrupolo 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 da Agilent *Mass Hunter Workstation Data Acquisition* (Agilent Technologies).

Todas as amostras foram analisadas randomicamente, para minimizar possíveis problemas relacionados à ordem da injeção (*carry over*) e impedir o efeito de mudanças graduais da sensibilidade do instrumento. Brancos e padrão de C18 metil estearato e F.A.M.E. mix (do inglês, *Fatty Acid Methyl Esters*) também foram injetados para complementar o controle de qualidade da análise.

4.11.3 Pré-processamento dos dados

Uma etapa fundamental para selecionar dados úteis e apropriados da análise metabolômica é o pré-processamento dos dados. Esta etapa abrange desconvolução, identificação na biblioteca e alinhamento (Mastrangelo *et al.*, 2015). O software *Agilent ChemStation* (Agilent Technologies) foi usado para processar os dados coletados pelo software *Agilent Mass Hunter Workstation Data Acquisition*. Foram verificados: os brancos (picos de contaminantes foram identificados e anotados para posterior exclusão); os tempos de retenção dos padrões internos (C18 metil éster e tricosano) nos QCs; similaridade nas aquisições dos QCs (tempo de retenção e intensidade). Os tempos de retenção dos metil-ésteres do F.A.M.E. mix foram anotados para correção.

Utilizando o software *AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System)*, os tempos de retenção do F.A.M.E. mix foram corrigidos para calibração da biblioteca. O espectro do F.A.M.E. foi aberto no software e, de acordo com a biblioteca de compostos alvo *Fiehn.mls*, os RTs experimentais substituíram os dados originais. Uma biblioteca *.cls foi criada para desconvolução dos dados adquiridos para as amostras.

Para a desconvolução, carregou-se o arquivo de calibração recém criado, com os RTs corrigidos, e usou-se a biblioteca *Fiehn* para identificação dos compostos. Foi utilizado como tipo de análise o *use retention index data*, por apresentar excelente reprodutividade e aumentar a capacidade de identificação (Porto, 2015). Uma lista de metabólitos identificados, com 30 *minimum match factor*, que é o menor fator de correspondência que o software aceita para avaliação comparada com a biblioteca de compostos alvo (Mastrangelo *et al.*, 2015), e não identificados foi gerada.

Em seguida, os dados em forma de tabela foram carregados no software *Mass Profiler Professional* (MPP, Agilent Technologies), para alinhamento e filtragem (íons requeridos 5; *minimum quality score* 40% - condições menos restritivas podem gerar falsos positivos durante a identificação dos metabólitos). O filtro de *frequency* foi adicionado para 75% das amostras, além do filtro de *flags* para 75% das amostras do mesmo grupo. Desta forma, assegura-se que os metabólitos são característicos do grupo (Porto, 2015).

Nova lista de metabólitos gerada com *Mass*, *RT* e *CAS number*, retornou ao AMDIS para nova desconvolução após conferência de íon majoritário e RT. Íons majoritários identificados como 73 ou 147 (provenientes do derivatizante) ou 207 (proveniente da coluna) foram substituídos pelos íons majoritários diretamente relacionados ao composto. Íons majoritários repetidos em um intervalo de 0,5 s também foram substituídos por um íon qualificador. Desta forma, garantiu-se que os compostos foram identificados corretamente, eliminando falsos-positivos.

Após segunda desconvolução, novo alinhamento foi realizado no MPP e a matrix final de dados (formato *.cvs) foi salva para processamento dos dados.

4.11.4 Processamento dos dados

O processamento dos dados explora e remove qualquer informação errônea da matriz (Mastrangelo *et al.*, 2015). Neste estudo, avaliou os brancos (para descartar ou subtrair os contaminantes ou compostos acumulados das análises); eliminou de compostos provenientes da derivatização (2-hidroxipiridina), solventes (heptano), plastificantes (ftalato), compostos provenientes da degradação da coluna, etc. A filtragem de dados foi realizada para manter apenas as variáveis presentes em um alto percentual de amostras, sendo consideradas as mais representativas da variância biológica em estudo.

Após realização da filtragem, foi realizada a normalização (*sum*, para reduzir a variabilidade intra e interlote), o escalonamento (*auto scaling*, ajustar a importância que o composto) e a transformação dos dados (*log*, para corrigir a heterocedasticidade). Esta etapa do processamento foi realizada no software MetaboAnalyst® versão 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>), que tem um conjunto de ferramentas *online* e gratuitas.

4.11.5 Análise Uni e Multivariada

No software MetaboAnalyst® versão 6.0, a matriz foi submetida à análise estatística multivariada. Foram utilizados métodos quimiométricos não supervisionados (PCA) e supervisionados (PLS-DA) com predição de QCs. A partir das análises supervisionadas, foram

identificados os metabólitos discriminantes entre os grupos, por meio da classificação de *Variable Importance Projection* (VIP).

Foi utilizado o software Graphpad Prism 8.0 para realização da estatística descritiva. Após análise da normalidade (por Shapiro-Wilk) e presença de outliers (HOUT), para dados não-paramétricos foram utilizados o teste Mann Whitney ou Wilcoxon com correção de Dunn (pos-hoc); para dados paramétricos foram utilizados teste t (considerando ou não a igualdade de variância - para dois conjuntos de dados) ou ANOVA two-way/ Tukey (pos hoc). Uma associação foi considerada estatisticamente significativa quando o valor-p foi menor do que 0,05.

4.11.6 Interpretação biológica

Metabólitos são resultados de processos bioquímicos e por meio deles é possível reconhecer vias metabólicas alteradas durante uma exposição ou doença, por exemplo (Mastrangelo *et al.*, 2015). O software MetaboAnalyst® versão 6.0 foi utilizado para avaliar as possíveis vias metabólicas alteradas pela exposição à mistura de agrotóxicos. Ele utiliza o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) ou HMDB (*Human Metabolome Database*) para agrupar os metabólitos significativos dentro de uma via biológica comum.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da ração

A ração comercial Presence® Labina Peletizada Para Ratos Camundongos e Roedores foi amostrada durante o experimento e analisada no laboratório Instituto Octávio Magalhães - IOM/FUNED apresentou contaminações: Pirimifós Metil 0,22 mg/kg; Triciclazol 0,01mg/kg; Glifosato 2,0 mg/kg de ração. A tabela completa pode ser visualizada no anexo A.

Não foram detectados nem imidacloprido nem tebuconazol na amostra de ração. Os outros agrotóxicos detectados são permitidos nas culturas de milho (pirimifós metil e glifosato), soja (glifosato), arroz (pirimifós metil, glifosato e triciclazol) e trigo (pirimifós metil e glifosato), ingredientes presentes da composição da ração (tabela 15). Para o Pirimifós Metil, considerando um consumo médio de 5g de ração por dia, cada camundongo consumiu 0,0011 mg diariamente do agrotóxico, e para o triciclazol, por camundongo/dia, o consumo foi de 0,00005 mg. A concentração encontrada de glifosato (2,0 mg/kg de ração) foi maior do que os outros dois agrotóxicos, porque para a cultura da soja, a quantidade aplicada é maior, permitindo, assim, que o LMR seja de 10 mg/kg. Entretanto, isso expôs os camundongos a 0,01 mg de glifosato por dia, 30x menor do que a concentração de exposição na mistura (0,3 mg/dia).

Pelas concentrações encontradas, concluímos que estes valores não influenciaram os experimentos. Os controles também se alimentaram da mesma ração. Mesmo a ração apresentando glifosato, a literatura relata que a menor dose que apresenta efeito adverso em exposições crônicas é de 2,0 mg/ kg P.C./ dia (0,04 mg consumidos por um camundongo de 20g por dia) (Alarcon *et al.*, 2020; Ganesan *et al.*, 2020).

Infelizmente, não foram encontrados estudos que avaliam as contaminações por agrotóxicos em ração para roedores. Diferente do programa de análises americano, que analisa rações para animais (domésticos e aves) e que encontrou como maior contaminante o glifosato nas rações, o PARA não realiza esta avaliação, que poderia nortear o delineamento de experimentos, por exemplo, uma vez que se sabe que rações são contaminadas por agrotóxicos e que dependendo das concentrações encontradas, podem causar alguma alteração no estudo (FDA, 2023). A presença de glifosato pode estar diretamente ligada à presença de organismos geneticamente

modificados na ração. Apesar da soja transgênica ser tolerante ao glifosato, o uso deste agrotóxico é feito para acelerar o desenvolvimento das plantas resistentes (Carneiro, 2015).

O uso da ração comercial foi a escolha por conter todos os nutrientes necessários da dieta do camundongo. Entretanto, a presença de componentes de origem vegetal traz este risco de exposição (oculto). O preparo da ração no laboratório seria uma alternativa para este inconveniente, porém as fórmulas padrão (ANI93, por exemplo) contém amido de milho e óleo de soja, o que poderia também incorrer neste mesmo problema.

Tabela 12 – Comparação da Composição das rações Comercial Presence Labina Peletizada Para Ratos, Camundongos e Roedores e fórmula padrão AIN 93.

Ração	Ingredientes
Ração comercial Presence Labina Peletizada Para Ratos, Camundongos e Roedores	Farelo de soja* , milho integral moído, dextrina, casca de arroz , farelo de trigo , farelo de arroz , óleo de soja refinado*, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, calcário calcítico, cloreto de sódio (sal comum), óxido de magnésio, sulfato de ferro, sulfato de cobre, monóxido de manganês, óxido de zinco, iodato de cálcio, sulfato de cobalto, selenito de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido pantotênico, vitamina B6, ácido fólico, biotina, vitamina B12, cloreto de colina, lisina, metionina, ácido propiônico.
	Espécies doadoras do gene: * <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e/ou <i>Arabidopsis thaliana</i> e/ou <i>Bacillus thuringiensis</i> e/ou <i>Streptomyces viridochromogenes</i> e/ou <i>Zea mays</i> .
Fórmula padrão AIN 93 (Souza, 2010)	Proteína (animal, como caseína), metionina, amido de milho , sacarose (de cana de açúcar), celulose, óleo de soja , BHT, Mistura de minerais, mistura de vitaminas, bitartarato de colina, água.

Fonte: informações da embalagem da ração comercial Presence® Labina Peletizada Para Ratos Camundongos e Roedores; e Souza (2010).

5.2 Avaliação da exposição à mistura de agrotóxicos

5.2.1 Estudo dos parâmetros bioquímicos e histopatológicos dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos

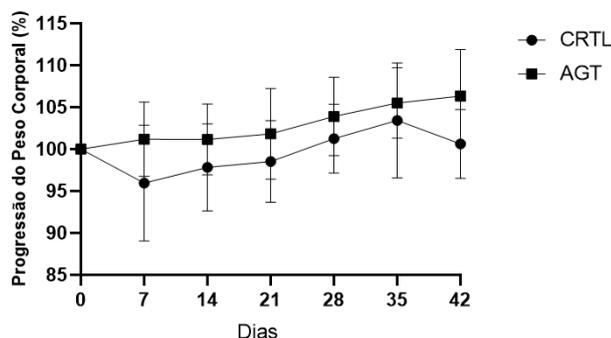
5.2.1.1 Acompanhamento do Peso Corporal e Peso Relativo

O ganho/perda de peso corporal dos camundongos foi mensurado semanalmente com o objetivo de preparar adequadamente a mistura de agrotóxicos (dose) e também verificar se a exposição causaria intoxicação aguda nos animais e distresse. Uma perda de peso superior a 10% anteciparia a eutanásia dos animais. Durante este acompanhamento, não foram observados episódios de diarreia nos animais.

Os resultados do acompanhamento do peso corporal são apresentados abaixo (figura 14), em porcentagem para normalização dos dados, considerando o peso no dia 0 igual a 100%. A análise estatística utilizada foi a análise da variância ANOVA one-way para medidas repetidas. O valor de p foi considerado significativo quando menor do que 0,05. Não houve diferença estatística entre os diferentes grupos tratados durante todo período de tempo do tratamento. Observou-se variações do peso no início do tratamento no grupo controle, provavelmente relacionadas ao estresse das gavagens diárias. Os animais, principalmente os expostos à mistura de agrotóxicos, mostraram-se mais agitados, dificultando a contenção. Para amenizar o estresse, o enriquecimento ambiental das gaiolas foi implementado. Estes animais e os dos demais grupos recuperaram o peso com o passar do tempo, ganho equivalente ao envelhecimento.

Após a eutanásia, foram avaliados os pesos relativos de: gordura periuterina, fígado e baço. Foram realizados testes estatísticos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk), de *outliers* (método de ROUT) e o teste Mann Whitney. O valor de p foi considerado significativo quando menor do que 0,05. Não houve diferença estatística entre os grupos expostos para os dados de peso relativo de baço, rim, gordura periuterina e fígado dos camundongos. Os dados estão representados na tabela 15.

Figura 14 – Avaliação do peso corporal dos camundongos expostos e não expostos a mistura de agrotóxicos. (acompanhamento semanal do ganho/perda de massa corporal, em porcentagem).



Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 13 – Análise do Peso Relativo (%) dos órgãos Fígado, Baço, Rim e Gordura periuterina dos camundongos expostos e não expostos a mistura de agrotóxicos.

Peso Relativo	CTRL (Média +- DP)	AGT (Média +- DP)	p valor
Fígado	4,8902 +- 0,1911 %	4,7379 +- 0,3890 %	p > 0,05
Baço	0,4814 +- 0,1983 %	0,4227 +- 0,0560 %	p > 0,05
Rim	1,2429 +- 0,2464 %	1,2058 +- 0,1460 %	p > 0,05
Gordura Periuterina	1,7014 +- 0,5423 %	1,8485 +-0,2074 %	p > 0,05

Fonte: dados da pesquisa.

Como primeiros parâmetros avaliados, o peso corporal e o peso relativo dos órgãos dos animais não demonstraram diferença estatística entre os animais expostos e não-expostos à mistura. Avaliar peso corporal e tecido adiposo é importante porque o tecido adiposo branco (TAB) subcutâneo tem características funcionais, como regulação do armazenamento e liberação de triglicerídeos e produção de adipocinas, sendo considerado um órgão endócrino sexualmente dimórfico. Outros mecanismos biológicos relacionados ao TAB incluem alterações na função dos hormônios tireoidianos e esteroides e ativação de receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPR), que desempenham um papel importante na diferenciação de adipócitos e armazenamento de energia. Assim, a interferência no controle hormonal das funções do tecido adiposo, por desreguladores endócrinos, pode, portanto, levar a depósitos inadequados de gordura. Por isso, a exposição a DEs tem sido associada a triglicerídeos e colesterol elevados, glicemia de jejum alterada e DM2, todos fatores relacionados à obesidade (Tang-Peronard *et al.*, 2011; Darbre *et al.*, 2017; Amato *et al.*, 2021).

Geralmente, os resultados de peso corporal e peso relativo (ou absoluto) apresentados pela literatura para tratamentos de camundongos/ ratos com agrotóxicos individualmente são controversos, porque os resultados estão diretamente relacionados ao tipo, à dose do agrotóxico, ao tempo de exposição, ao tipo de animal experimental e ao gênero destes animais (Abdel-Razik *et al.*, 2021; Barbosa *et al.*, 2020; Ganesan *et al.*, 2020; Gorga *et al.*, 2021; Hamdaoui *et al.*, 2019; Othmere *et al.*, 2020; Kale *et al.*, 2020; Gomes *et al.*, 2021). Adicionado a isso, o efeito de uma mistura de agrotóxicos pode não ter o efeito previsto a partir dos resultados de cada substância isolada. Uma mistura de Mancozeb (8.000 mg.Kg⁻¹ PC) e Imidacloprido (131 mg.Kg⁻¹ PC) em camundongos Swiss (machos e fêmeas), por exemplo, causou em animais expostos à mistura, mas não em animais expostos aos agrotóxicos isolados, um aumento do peso corporal a partir de 21 dias de exposição (Bhaskar; Mohanty, 2014). Entretanto, com uma mistura de seis agrotóxicos (Boscalid, Captana, Clorpirifós, Tiacloprido, Tiofanato e Ziram) em camundongos C57bl/6, por 13 ou 52 semanas com doses de IDA, observou-se que machos tendem a ganhar peso, por acúmulo de gordura corporal, enquanto que as fêmeas não, mostrando a importância do dimorfismo (Lukowicz *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2020). Já uma mistura de outros seis agrotóxicos (alaclor, captana, diazinon, endosulfan, maneb e mancozeb), por 6 semanas expostos a doses IDA, não alterou nem o peso corporal nem peso do fígado em camundongos C57bl/6 (Merhi *et al.*, 2010).

Os resultados encontrados neste presente estudo indicam que as doses da mistura não foram tóxicas para os animais, no período de 6 semanas, de forma a alterar o peso corporal, acumular gordura periuterina ou alterar o peso relativo dos órgãos estudados. Porém, estes parâmetros não podem ser avaliados isoladamente, sendo dados bioquímicos de glicose, sensibilidade à insulina, colesterol total e triglicérides complementares.

5.2.1.2 Avaliação da Glicose Jejum e da Sensibilidade à Insulina

Para a glicose jejum, sangue dos animais foi coletado para avaliação em dois momentos, nas semanas 3 e 6 de exposição, sendo aplicados, após análise da normalidade (Shapiro-Wilk) e de *outliers* (método de ROUT) dos dados obtidos, os testes estatísticos de Mann Whitney pareado e não pareado. O valor de p foi considerado significativo quando menor do que 0,05.

Avaliando a glicemia jejum em três e seis semanas de tratamentos, não houve diferença estatística para a exposição à mistura de agrotóxicos, nem em comparação de tempo (grupo x semanas 3 e 6), nem em comparação a cada animal isolado (teste pareado). Os resultados podem ser visualizados na tabela 16.

Tabela 14 – Avaliação da Glicose jejum (3 semanas e 6 semanas) dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.

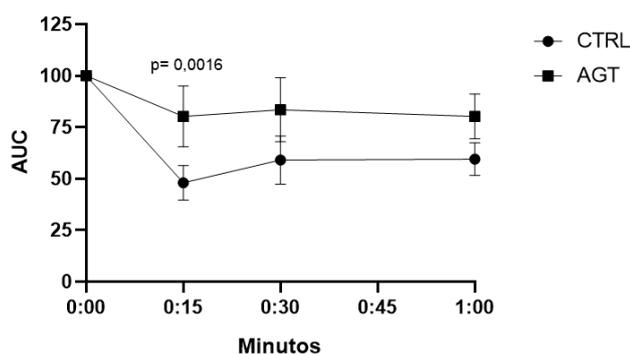
	CTRL (Média +- DP)	AGT (Média +- DP)	p valor (não pareada)
Glicose Jejum (3 semanas) mg.dL ⁻¹	136,50 ± 17,01	136,50 ± 23,31	p > 0,05
Glicose Jejum (6 semanas) mg.dL ⁻¹	139,16 ± 15,29	133,30 ± 16,70	p > 0,05
p valor (pareado)	p > 0,05	p > 0,05	

Fonte: dados da pesquisa.

Na avaliação do teste de sensibilidade à insulina (4 dias que antecederam à eutanásia para que a insulina exógena não alterasse outros parâmetros que seriam analisados), os testes estatísticos foram realizados nos dados normalizados pelo delta (subtração do valor encontrado em um tempo pelo tempo anterior) (Figura 15) e pela área sob a curva (AUC). Foram aplicados os testes de normalidade (Shapiro-Wilk), de *outliers* (método de ROUT) e teste de Mann Whitney. O valor de p foi considerado significativo quando menor do que 0,05.

Avaliação do delta dos tempos 0-15 minutos apresentou resultados estatisticamente significativos, com $p < 0,05$, identificando a presença da resistência à insulina. No grupo controle (CTRL), houve uma redução de $51,96 \pm 8,40$ % da glicose circulante após 15 minutos da injeção de insulina, enquanto que o grupo exposto a mistura (AGT) apresentou uma redução “menor” na glicose sérica, correspondendo a $19,71 \pm 14,80$ %, com diferença estatística significativa $p = 0,0001$. Os deltas 15-30 e 30-60 não foram significativos provavelmente porque a redução da insulina exógena e a predominância da insulina endógena não permitiram a visualização da diferença entre os grupos.

Figura 15 – Avaliação da sensibilidade à insulina dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos. Glicemia através dos tempos 0, 15, 30 e 60. AUC: área sob a curva.



Fonte: dados da pesquisa.

Quando se trata de uma exposição a substâncias que causam desregulação endócrina, nem sempre é possível visualizar alterações morfológicas, histológicas e bioquímicas nos tempos iniciais da exposição, antes da doença definitivamente se instalar. Nossos resultados de glicemia jejum não apresentaram alterações estatisticamente significativas, porém, a resistência à insulina estava presente nos animais expostos, indicando que em um tempo maior de exposição, os animais poderiam se tornar diabéticos. Esta conclusão corrobora com outros estudos que apresentam resultados semelhantes. Com camundongos fêmeas expostos a uma mistura de 6 agrotóxicos (doses diárias de IDA) demonstrou-se que a resistência à insulina foi detectada após 16 semanas, enquanto que o aumento da glicose sanguínea só foi evidenciada com mais de 36 semanas após o início da exposição. Outro achado importante neste estudo foi que, por meio da análise metabolômica, demonstrou-se que o biomarcador *2-ketoadipic acid* para diabetes pode ser detectado no sangue dos animais a partir de 6 semanas (Lukowicz *et al.*, 2018). A mesma mistura de seis agrotóxicos, também na concentração de IDA, por 15 semanas em camundongos, induziu a resistência à insulina em camundongos machos apenas após 14 semanas de exposição (Smith *et al.*, 2020). Estudos com os agrotóxicos isolados demonstraram que: glifosato não afeta parâmetros corporais, mas causa resistência à insulina em camundongos C57bl/6 (fêmeas e prole) por alterar níveis de alanina, aminoácido importante na regulação metabolismo da glicose (Gomes *et al.*, 2022); imidacloprido, em ratos, tem efeito hiperglicêmico, com alterações estruturais no tecido pancreático, incluindo o declínio na expressão de insulina (Khalil *et al.*, 2017); tebuconazol, em porcos, causa alterações na glicemia, função renal (altera razão ureia/ creatinina) e enzima hepática gama glutamil

transpeptidase (GGT) (Jeong *et al.*, 2022). Assim, os dados da literatura corroboram que a mistura de glifosato, imidacloprido e tebuconazol pode afetar a sensibilidade dos tecidos à insulina, confirmando os resultados encontrados neste estudo.

5.2.1.3 Avaliação de Colesterol total e de Triglicérides

Para a avaliação do colesterol total e triglicérides (tabela 17) no sangue coletado no dia da eutanásia dos animais expostos e não expostos, após análise da normalidade (Shapiro-Wilk) e de *outliers* (método de ROUT) dos dados obtidos, foram aplicados os testes estatísticos de Mann Whitney. O valor de p foi considerado significativo quando menor do que 0,05.

Tabela 15 – Valores de Colesterol Total e Triglicérides séricos em camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.

	CTRL (Média +- DP)	AGT (Média +- DP)	p valor
Colesterol Total sérico, mg.dL -1	60,094 +- 3,103*	70,391 +- 3,890*	* p = 0,0083
Triglicérides sérico, mg.dL -1	136,559 +- 10,644**	97,205 +- 13,720 **	** p = 0,016

Fonte: dados da pesquisa.

A análise estatística dos dados obtidos apresenta diferenças estatísticas significativas entre os grupos expostos e não-expostos tanto na determinação do colesterol total (aumento) quanto para a determinação dos triglicérides (diminuição) séricos. Assim como na avaliação do peso corporal e peso relativo, a literatura apresenta resultados divergentes para estes parâmetros, demonstrando que também são dependentes de tempo (estudos subcrônicos e crônicos) e dose de exposição ao agrotóxico ou mistura. Por exemplo, porcos expostos a tebuconazol tiveram níveis significativamente diferentes de colesterol total após 14 dias de exposição (Jeong *et al.*, 2022). O mesmo agrotóxico, em ratos Wistar machos, aumenta significativamente o colesterol total, HDL e LDL e os triglicérides dos animais, causando subsequente dano ao tecido cardíaco (Othmène *et al.*, 2020). Entretanto, em um estudo com ratos expostos ao imidacloprido por 90 dias, apesar de encontrar leves lesões nos hepatócitos e alterações nas enzimas hepáticas (GPT - transaminase glutâmico pirúvica e GOT - Transaminase Glutâmica Oxaloacética), não foram encontradas alterações significativas nem no colesterol total nem nos triglicérides séricos dos animais (Bhardmaj *et al.*, 2010). O imidacloprido, em ratos machos albinos, causa degeneração

hidrópica e áreas de necrose no fígado dos animais, com aumento significativo do colesterol total nos animais expostos (Hassan *et al.*, 2020). Ratos Wistar (machos e fêmeas) expostos a Roundup® (formulação comercial de Glifosato) não apresentam diferenças estatísticas entre os grupos expostos e controle, para as dosagens de colesterol total, HDL e LDL, apesar da análise histopatológica apontar necrose focal no fígado (Caglar *et al.*, 2008). Mas outro estudo demonstrou que ratos albinos expostos ao Roundup® ou glifosato apresentam um aumento significativo no colesterol total e nos triglicérides dos animais expostos (El-Shenawy *et al.*, 2008). Para finalizar, um estudo com mistura de 6 agrotóxicos por 52 semanas, observa-se que, em camundongos C57bl/6 machos, mas não em fêmeas, há presença de esteatose hepática (análise histopatológica), com elevada presença de triglicérides/ mg de tecido, sugerindo que a presença de triglicérides no órgão está relacionada a lipólise no tecido adiposo e não a síntese de novo pelo fígado (Lukowicz *et al.*, 2018).

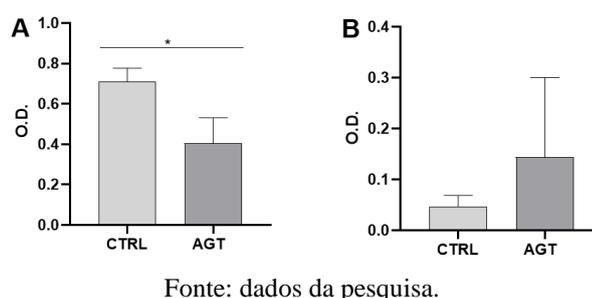
Os resultados do presente estudo demonstram que a mistura de imidacloprido, glifosato e tebuconazol é capaz de alterar os níveis séricos de colesterol total e triglicérides nos animais expostos comparados com o grupo controle, por ação aditiva ou sinérgica entre si.

5.2.1.4 Avaliação da Mieloperoxidase

Estudos indicam uma relação entre colesterol elevado e resistência à insulina promovendo uma inflamação sistêmica em baixo grau (Ménégaud *et al.*, 2023). Assim, a avaliação da MPO no baço e intestino grosso dos animais expostos, foi realizada com intuito de avaliar a possível inflamação causada pela mistura de agrotóxicos. Após análise da normalidade (Shapiro-Wilk) e de *outliers* (método de ROUT) dos dados obtidos, foram aplicados o teste estatístico de Mann Whitney. O valor de p foi considerado significativo quando menor do que 0,05.

A atividade da MPO está reduzida no baço dos animais expostos à mistura em comparação aos animais não-expostos ($p = 0,0095$). Entretanto, não houve diferença estatística na atividade quando analisada a atividade no intestino grosso (figura 16).

Figura 16 – Avaliação da atividade da MPO no baço e intestino grosso dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos. A: baço; B: intestino grosso.



Apesar de ser uma heme peroxidase muito conhecida por estar presente em neutrófilos, a presença da mieloperoxidase também é descrita em monócitos e alguns macrófagos, por que monócitos circulantes têm plasticidade para se diferenciar em macrófagos especializados, atribuindo homeostase específica ao tecido em que está fixado e funções imunológicas. Em neutrófilos e macrófagos, a MPO está diretamente ligada à eliminação de patógenos, principalmente a microrganismos, e a determinação de sua ativação corresponde a um biomarcador de inflamação (Lee; Choi, 2020; Gurski; Dittel, 2022). O acetato, produzido pela microbiota intestinal, modula uma série de respostas inflamatórias, no intestino e fora dele, por várias vias, sendo uma delas ligando-se ao receptor Gpr43/FFAR2. Este receptor está muito expresso em células inflamatórias, especialmente macrófagos e neutrófilos (Da Silva *et al.*, 2021).

Foram encontrados poucos estudos relacionando a ação de agrotóxicos, inflamação localizada e a diminuição do baço ou intestino grosso/ número de células B e T, esplenócitos e macrófagos, mas não são os agrotóxicos do presente estudo. Em uma exposição ao endossulfan, tilápias expostas apresentaram peso relativo do baço menor do que o grupo controle, sem que houvesse diferença estatística quando quantificados os esplenócitos, indicando uma diminuição em outros tipos celulares do baço. Entretanto, as células fagocíticas (macrófagos) apresentaram atividade aumentada no órgão em resposta ao estresse oxidativo causado pelo agrotóxico (Tellez-Banuelos *et al.*, 2009). Lee e Choi, em uma revisão sobre agrotóxicos e sistema imune, reuniram informações como: bifentrinas são capazes de inibir os níveis de transcrição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α ao desencadear estresse oxidativo em macrófagos; cipermetrina é capaz induzir a morte de macrófagos por apoptose mediada por EROs e seus metabólitos podem inibir a atividade fagocítica dos macrófagos; atrazina tem efeitos prejudiciais na viabilidade e função das células T, inibindo a proliferação de células

TCD4+, também ativando apoptose celular destas células via caspase 3 e caspase 8; carbamatos também induzem apoptose de células T e induzem produção de IL-2 (citocina pró-inflamatória); acetamiprido diminui significativamente a proliferação de células B e células T durante uma infecção (Lee; Choi, 2020). Em outros estudos, observa-se que autores avaliam o peso (absoluto ou relativo) do baço de animais expostos e não-expostos a agrotóxicos isolados ou em misturas, mas não realizam avaliações adicionais a esta avaliação (Merhi *et al.*, 2010; Metais *et al.*, 2013). Em uma exceção, observou-se que filhotes de cervos de cauda branca que morreram após o nascimento (exposição via materna) apresentaram um acúmulo de imidacloprido no baço. Quanto maior a concentração do agrotóxico encontrada no órgão, menor tamanho e peso ele apresentava. Além da dosagem do imidacloprido no órgão, nenhuma outra avaliação foi realizada (Berheim *et al.*, 2020).

Sem dados adicionais, sugere-se que a depleção da atividade da MPO no baço esteja relacionada ou a uma menor fixação de macrófagos no baço sem aumento da atividade fagocítica, uma vez que, a atividade da MPO está diminuída e, como será relatado a seguir, não houve alteração morfológica no baço dos animais, o que poderia indicar uma diminuição do quantitativo das células B e T da polpa branca. Outra hipótese é a ação do acetato (resultados serão discutidos a seguir) produzido pelas bactérias intestinais agindo sobre os receptores de macrófagos e neutrófilos do baço e inibindo estas células inflamatórias no tecido esplênico. Esta diminuição da atividade da MPO pode indicar um comprometimento do sistema imune pela exposição à mistura de agrotóxicos.

O TGI é o primeiro a ter contato com contaminantes ambientais. Na lâmina própria da mucosa do intestino grosso, células imunes podem ser encontradas, como macrófagos, mastócitos e plasmócitos. Nesta porção do intestino, são observados folículos linfóides ocasionais. Substâncias que causam inflamação ativam o sistema imune, recrutando neutrófilos. Estas células podem ser fonte de MPO no tecido, tendo a atividade da MPO três vezes menor no intestino do que nos outros tecidos do organismo (Nasciutti *et al.*, 2016). Poucos estudos avaliam a influência da exposição a estas substâncias sobre o sistema digestório. Ratos wistar expostos ao glifosato por inalação apresentaram processo inflamatório moderado no intestino delgado, com hiperplasia (aumento celular) linfóide. O intestino grosso também apresentou processo inflamatório linfocítico, porém leve, e displasia celular (alterações celulares anormais) moderada (de Maria Serra *et al.*, 2021). O estudo citado contradiz os achados do presente estudo, que além de não encontrar aumento da atividade da MPO, que indica aumento da

inflamação tecidual, também não encontrou alterações histopatológicas, como será descrito a seguir.

5.2.1.5 Avaliação Histopatológica

A análise microscópica de tecidos por meio da avaliação histopatológica pode indicar não só lesões, como também natureza, extensão e gravidade da lesão. Não foram observadas alterações histopatológicas nos cortes de intestino grosso, como infiltrado inflamatório na mucosa ou submucosa ou degeneração tecidual da mucosa; nem alterações nos cortes de baço, como hiperplasia das polpas branca ou vermelha e infiltrado inflamatório, mantendo os animais expostos a cápsula íntegra e zona marginal bem delimitada. Nas lâminas de rins, não houve alteração nas zonas cortical ou medular, mas dois animais do grupo exposto à mistura de agrotóxicos apresentaram alterações no glomérulo, com espessamento da cápsula de Bowman, formando um crescente fibrocelular (Figura 17; ponta da seta). Como apenas dois animais apresentaram esta condição, a análise foi considerada um achado ocasional.

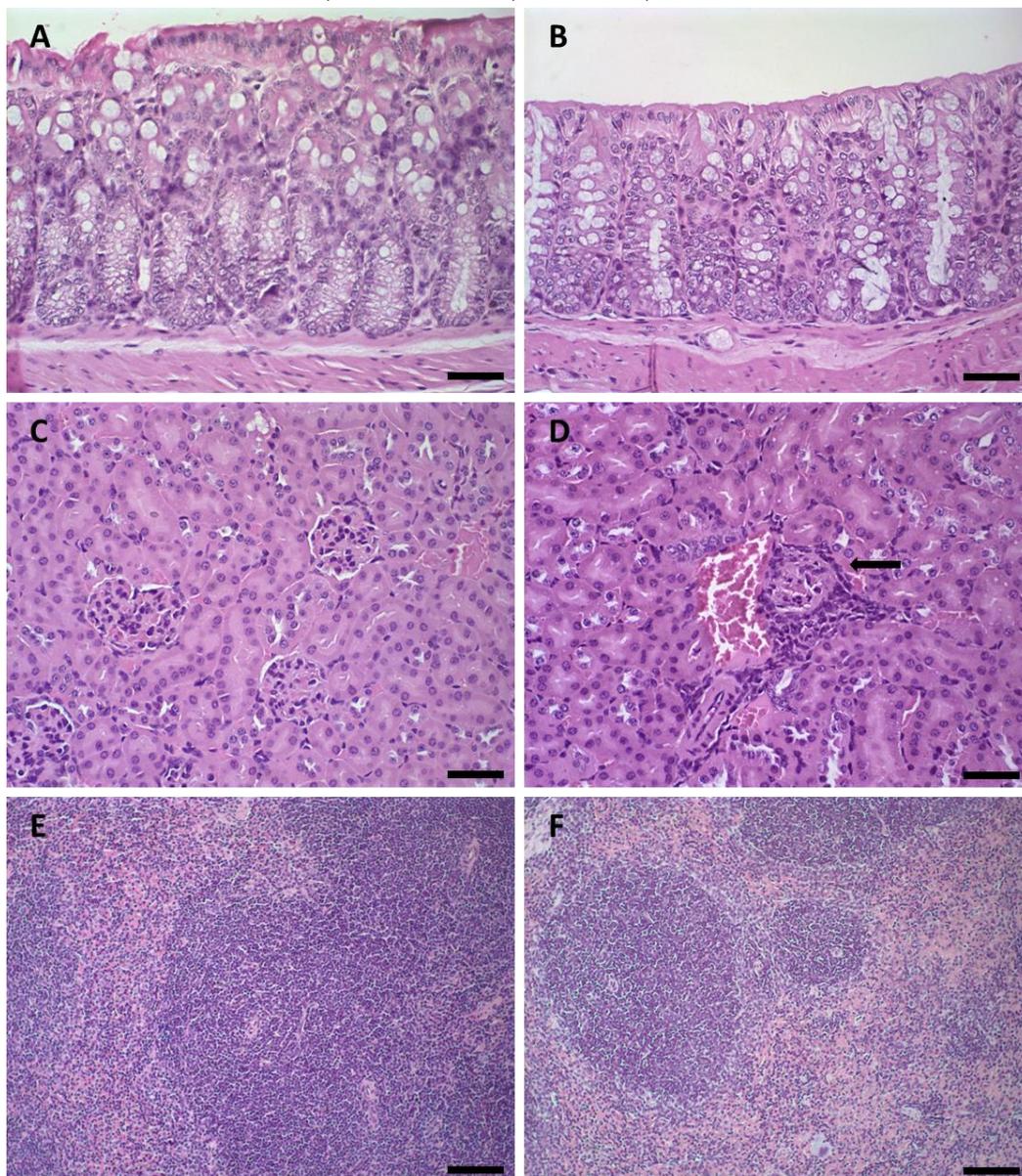
Camundongos BALB/C expostos ao Imidacloprido demonstrou que doses maiores que 5 mg/kg causam redução peso relativo do baço dos animais expostos, com alterações histopatológicas relacionadas a uma depleção de linfócitos na polpa branca esplênica, sugerindo que o imidacloprido tem efeitos imunossupressores, principalmente sobre células T (Badgular *et al.*, 2013). Outros agrotóxicos (Atrazina, Mancozeb e Fipronil), diferentes da mistura deste estudo, são capazes de reduzir o peso relativo do baço por morte celular programada (apoptose), confirmada avaliação imuno-histoquímica da caspase 3 (Morgan *et al.*, 2019). Uma mistura de agrotóxicos (glifosato, cloromequat, pirimifós, tebuconazol, clorpirifós e deltametrina), em ratos por 90 dias, induz inflamação e alteração vascular no mesentério, além de degeneração pancreática (Sevim *et al.*, 2024).

A cápsula glomerular, ou de Bowman, é uma camada celular que protege o glomérulo renal. Com aspecto de taça, ela funciona como um recipiente coletor de água e impurezas do sangue, assim como sais, glicose e aminoácidos, que formam a urina. A formação do crescente fibrocelular contém células epiteliais, linfócitos e macrófagos, e geralmente está relacionada a existência de uma doença grave (glomerulonefrite rapidamente progressiva), que, em humanos, duplica os níveis séricos de creatinina em 3 meses (Bonegio; Salant, 2024). Em ratos que

consumiram glifosato (dose 10x IDA), houve aumento do peso renal, com injúria tecidual e estresse oxidativo, indicando um risco aumentado de perda progressiva da função renal (Nacano *et al.*, 2024). Com apenas 10 dias, o glifosato já pode ser detectado em tecido renal (bioacumulação) (Bai; Ogbourne, 2016). A exposição de camundongos ao imidacloprido (5-1 mg/kg/dia por 15 dias) leva ao aumento do peso do rim, de creatinina e ureia séricas e perda de proteínas pela urina (Arfat *et al.*, 2014). Ratos wistar expostos ao tebuconazol sofrem estresse oxidativo e danos ao DNA, que levam a apoptose de células renais (Othmère *et al.*, 2020). Estes achados são controversos ao deste presente estudo, onde não houve diferença estatística nem nos pesos relativos dos baço e rim, nem na histopatologia dos órgãos. Uma possível explicação pode estar relacionada ao tempo de exposição à mistura.

Figura 17 – Análise histopatológica dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.

A, C e E: Grupo não exposto apresentando histologia normal para intestino grosso (A), rim (C) e baço (E). B: Não foram encontradas alterações no intestino grosso dos animais expostos. D: Espessamento da cápsula de Bowman (ponta de seta) em alguns animais expostos à mistura de agrotóxicos. F: Não foram encontradas alterações no baço dos animais expostos. Coloração Hematoxilina-Eosina. A, B, C e D: 160x, barra = 100um; E e F: 80x, barra = 50um.



Fonte: do autor

5.2.2 Avaliação da Microbiota dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos

5.2.2.1 Avaliação da Microbiota Fecal Cultivável

Uma disbiose intestinal causada pela presença de agrotóxicos na dieta pode desencadear a perda da homeostase pelo hospedeiro, que, se mantida, pode causar doenças gastrointestinais e metabólicas. Para a avaliação da microbiota cultivável, foram aplicados os testes de normalidade (Shapiro-Wilk), de *outliers* (método de ROUT) e o teste estatístico de Mann Whitney. O valor de p foi considerado significativo quando menor do que 0,05.

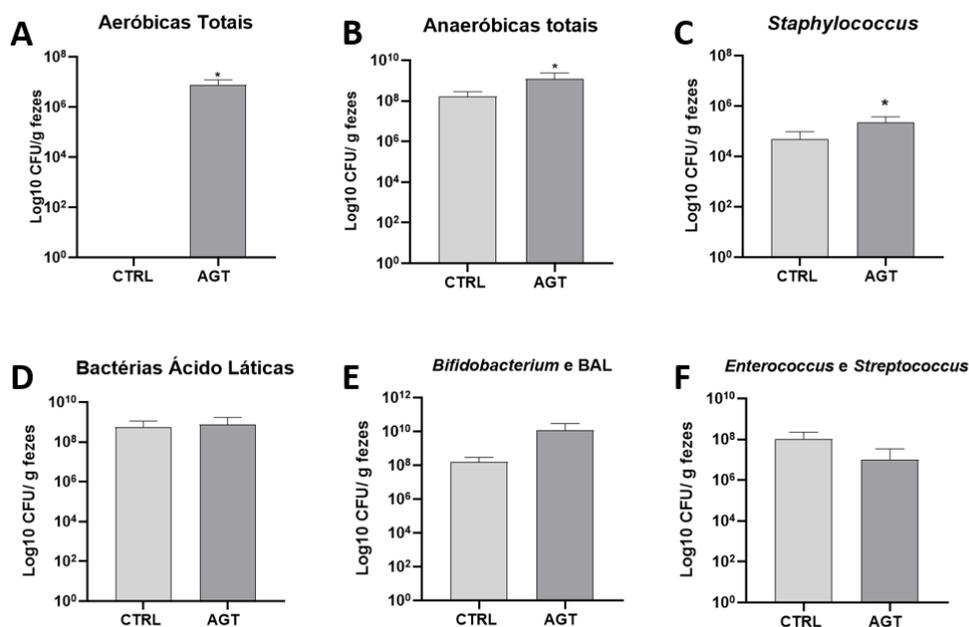
A melhor forma de avaliar a microbiota (taxonômica e filogenética) é por meio do sequenciamento 16s rRNA (método independente de cultura), que utiliza a identificação das bactérias pela subunidade ribossomal 16s por possuir sequências de bases de nucleotídeos altamente conservadas do genoma bacteriano. Entretanto, esta é uma análise cara. Uma alternativa, mas que é a convencional de identificação, é o cultivo da microbiota (método dependente de cultura) em meios de cultura não-seletivos e seletivos. Os meios são preparados de acordo com as necessidades das bactérias, e, além do meio, é importante controlar temperatura e atmosfera (aeróbica e anaeróbica) e outros fatores que afetem o crescimento bacteriano (Ribeiro, 2017; Calumby, 2021).

O cultivo de populações da microbiota fecal em placas com meios seletivos e diferenciais não cresceram com 24 horas de estufa, por isso, as contagens foram realizadas com 48h. Mesmo assim, não houve crescimento bacteriano nos meios ágar Bacteroides Bile Esculina (BBE) adicionado de 0,1% v/v de gentamicina para isolamento de *Bacteroides spp.*, e ágar MacConkey para isolamento de *Enterobacteriaceae*. Os resultados a seguir (figura 18) são da melhor diluição da placa e expressos em log₁₀ UFC/ mg de fezes.

A análise das bactérias aeróbicas totais apresentou diferença estatística entre os grupos expostos e não expostos (não houve crescimento de bactérias aeróbicas no grupo controle), indicando que a exposição priorizou o crescimento de bactérias anaeróbicas facultativas. A avaliação das bactérias anaeróbicas totais também apresentou diferença estatística entre os grupos. Todas as placas apresentaram crescimento bacteriano nas três diluições.

Figura 18 – Avaliação da microbiota cultivável dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.

A – Aeróbicas em Ágar sangue; B – Anaeróbicas em ágar sangue suplementado com hemina e menadiona 1% v/v; C – *Staphylococcus* em ágar Manitol Salgado, D – Bactérias ácido lácticas (aeróbicas) em ágar De Man, Rogosa e Sharpe (aeróbicas), E – *Bifidobacterium* e bactérias ácido lácticas em ágar De Man, Rogosa e Sharpe (anaeróbicas), F – *Streptococcus* e *Enterococcus* em ágar Bile Esculina.



Fonte: dados da pesquisa.

Na avaliação diferencial, houve diferença estatística entre os grupos expostos e não expostos apenas na cultura de *Staphylococcus spp.*, bactérias que podem ser aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, indicando uma possível alteração positiva no filo *Bacillota*. As bactérias *Enterobacteriaceae*, representantes do filo *Pseudomonadota*, não cresceram no meio seletivo, mas como são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, podem ter crescido no meio não seletivo ágar sangue, junto com as aeróbicas totais. A maioria das espécies bacterianas em um intestino humano saudável são anaeróbicas obrigatórias e pertencem aos filios *Bacteroidota* (Gram-negativas) e *Bacillota* (maioria Gram-positiva), correspondendo a 90% das bactérias totais. Em contraste, *Pseudomonadota* (até 5%, exemplo: família *Enterobacteriaceae*, como a *Escherichia coli*), *Actinomycedota* (de 2 a 14%, por exemplo a *Bifidobacterium*), *Fusobacteria*, *Cyanobacteria* e *Verrucomicrobia* são filios menos abundantes (Wang *et al.*, 2017; Tsiaoussis *et al.*, 2019). As alterações encontradas na microbiota fecal cultivável dos animais expostos sugerem que houve uma disbiose intestinal causada pela mistura de agrotóxicos. Há vários

relatos na literatura de que agrotóxicos afetam a microbiota intestinal, principalmente de abelhas e animais de vida aquática (Dutra *et al.*, 2011; Dornelles; Oliveira, 2014; Dornelles; Oliveira, 2016; de Moura *et al.*, 2017; Blot *et al.*, 2018; Motta *et al.*, 2018; Banaee *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2021; Fu *et al.*, 2022). E estudos em camundongos também relatam esta perturbação (Yang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Smith *et al.*, 2020).

5.2.2.2 Avaliação dos AGCC em conteúdo intestinal

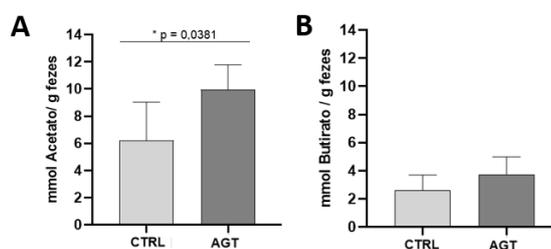
A produção de AGCC pela microbiota intestinal auxilia a saúde do hospedeiro, participando por exemplo, do metabolismo e da produção de mediadores inflamatórios. Para a avaliação dos AGCCs, acetato e butirato, no conteúdo intestinal e no soro dos animais expostos e não expostos, foram aplicados os testes de normalidade (Shapiro-Wilk), de *outliers* (método de ROUT) e o teste estatístico de Mann Whitney. O valor de p foi considerado significativo quando menor do que 0,05.

Não houve diferença estatística na produção de butirato ($p = 0,08$) no conteúdo intestinal dos animais expostos e não-expostos à mistura de agrotóxicos. Entretanto, houve diferença na produção de acetato, com aumento significativo deste AGCC ($p = 0,038$). Resultados podem ser visualizados na figura 19.

Estes resultados indicam que, assim como a análise da microbiota cultivável evidencia, há disbiose e alterações no metabolismo das bactérias causadas pela mistura de agrotóxicos. Estudos com misturas, na concentração de IDA, dos seis agrotóxicos (Ziram, Thifanato, Captan, Chlorpyrifós, Boscalin, Tiacloprid) mais utilizados no sul da França indicam que a diferença entre os sexos induz respostas diferentes à exposição de camundongos à mistura. Machos apresentam ganho de peso corporal, aumento da concentração de triglicérides hepáticos, intolerância à glicose; enquanto que fêmeas apresentam modificações na microbiota intestinal, com aumento da produção de acetato e ácido graxos de cadeia média, geralmente associados a doenças intestinais (Lukowicz *et al.*, 2019). Estes resultados são compatíveis com os encontrados em nosso estudo, onde as camundongos fêmeas, além de apresentar resistência à insulina, aumento do colesterol total e diminuição de triglicérides séricos, apresentou disbiose na microbiota intestinal evidenciada por um aumento das bactérias aeróbias totais e anaeróbias totais, e um aumento da produção de acetato.

Figura 19 – Análise dos ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo intestinal dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.

A – Acetato, B – Butirato. Barra = DP; * $p < 0,05$.



Fonte: dados da pesquisa.

A degradação primária de glicanos da dieta, como lignina, pectina, celulose, produz glicose, por bactérias como *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*. Na degradação secundária, por fermentação, são produzidos metabólitos chamados os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC; acetato, propionato, butirato, lactato), muito estudados por beneficiar o hospedeiro (Zmora *et al.*, 2019). Esses metabólitos controlam o pH intestinal, são dependentes do substrato (fibras), da composição da microbiota e do trânsito intestinal. Grande parte do acetato metabolizado por bactérias intestinais são fonte de energia para tecidos periféricos do hospedeiro, e este AGCC está envolvido na lipogênese, no tecido adiposo e no músculo (Young *et al.*, 2017; Caminero *et al.*, 2019; Zmora *et al.*, 2019; Cruz *et al.*, 2021; Hou *et al.*, 2022). Os resultados deste presente estudo apresentam acetato aumentado no conteúdo intestinal, podendo ser o responsável por perturbar a homeostasia da glicose. Acetato aumentado pode ativar o sistema nervoso parassimpático a produzir insulina, aumentando também a secreção do hormônio grelina e resultando em um feedback positivo, levando à hipertriglicemia, deposição lipídica hepática, resistência à insulina no fígado e nos músculos, por perturbar a homeostasia da glicose (Perry *et al.*, 2016). A produção de acetato aumenta o pH intestinal (menor do que 5,5), o que pode promover uma proliferação de bactérias Gram-positivas *Bacillota*, como podemos observar no estudo, com o aumento de *Staphylococcus spp.* (bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas). Assim, o acetato chega ao fígado e ativa a gliconeogênese. Quando a exposição a agrotóxicos interfere nas bactérias intestinais, fazendo com que elas expressem mais enzimas esterases, por exemplo, para eliminar estes contaminantes, uma consequência é a produção maior de acetato. O acetato entra no ciclo do glioxilato, formando Acetil CoA para produção de energia, síntese de ácidos graxos e oxalacetato para a gliconeogênese. Assim, há

uma tolerância aumentada à glicose, via gliconeogênese, causada pela exposição à agrotóxicos (Banks *et al.*, 2010; Roman *et al.*, 2019).

O butirato auxilia na manutenção da integridade da barreira intestinal, é substrato energético para colonócitos, atua na diminuição da inflamação crônica e na manutenção da homeostase intestinal e estudos indicam sua atuação na prevenção da obesidade e sensibilidade à insulina (Young *et al.*, 2017; Caminero *et al.*, 2019; Zmora *et al.*, 2019). Em camundongos expostos ao tebuconazol, por 13 semanas (1,35 e 3,1 mg/kg PC/ dia), o acúmulo de *Enterococcus* durante uma disbiose intestinal causada pelo agrotóxico leva à inflamação intestinal, com aumento da permeabilidade intestinal e lesões nas microvilosidades, e reduz a flora produtora de butirato. Além do aumento do peso corporal, os animais desenvolveram resistência à insulina, com aumento nos triglicérides e colesterol total séricos. Estas alterações foram atribuídas a disbiose intestinal causada pela exposição, principalmente ao tebuconazol, onde o aumento do filo *Bacillota* (em relação ao *Bacteroides*) na microbiota intestinal é relatado como indutor de obesidade, por transformar glicose em reserva energética (gordura) (Liu *et al.*, 2021). Apesar de não haver diferença estatística no crescimento das bactérias *Enterococcus* nem na estatística da produção de butirato, os resultados sugerem que alterações na microbiota podem ter levado ao aumento do colesterol total, diminuição dos triglicérides e resistência à insulina. A produção de acetato pode estar aumentada para direcionar também o aumento da produção do butirato. O butirato, no colonócito, ativa receptor PPAR γ , que, conseqüentemente, ativa a β -oxidação, consumindo ácidos graxos e oxigênio (sanguíneo). Quando xenobióticos modificam o metabolismo das bactérias da microbiota, reduzindo a produção de butirato, o O₂ é direcionado para o lúmen do intestino, priorizando as bactérias anaeróbicas facultativas e os colonócitos, sem butirato, também alteram metabolismo, produzindo lactato pela ω -oxidação (Byndloss *et al.*, 2017; Litvak *et al.*, 2018). O favorecimento das bactérias anaeróbicas tolerantes ao oxigênio, para tentar reestabelecer o equilíbrio, busca priorizar novamente a produção de butirato que, ao ser metabolizado pelos colonócitos, leva a um esgotamento do oxigênio intraluminal, permitindo a retomada do crescimento das bactérias anaeróbicas obrigatórias e a homeostase (Kriss *et al.*, 2018; Kolodziejczyk *et al.*, 2019). A presença do estresse oxidativo e a formação de EROs sugerem que a produção de butirato pode não ser suficiente para reestabelecer a homeostasia.

Estrogênios são conhecidos por promover uma proteção às fêmeas frente a doenças metabólicas, sendo que a estrogênio sulfotransferase, uma enzima controla a homeostase do estrogênio por meio da conjugação por sulfatação, é alvo de vários poluentes ambientais.

Estrogênios sulfatados não podem se ligar ao receptor de estrogênio (ER) e, portanto, são hormonalmente inativos (Chai, 2017). A microbiota intestinal participa da circulação entero-hepática, recirculando o estrogênio/androgênio, gerando glicocorticoides, e é claro que esta interação hormônios-microbiota é afetada pelo sexo e, conseqüentemente, sua resposta frente a um contaminante ambiental (Lukowicz *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2020). Como não foram testados animais machos, não há como responder à pergunta se as conseqüências da exposição seriam diferentes entre os sexos (dimorfismos).

O imidacloprido é metabolizado principalmente no fígado, induzindo as enzimas CYP-450 O-desmetilase e N-desmetilase, gerando dois metabólitos principais: ácido 6-cloronicotínico (via clivagem oxidativa) e seu conjugado de glicina (via conjugação) (Sun *et al.*, 2016). Os principais metabólitos do tebuconazol resultam da oxidação de um dos grupos metila da porção butila terciária, sendo biotransformado em álcool ou ácido carboxílico, seguido de conjugação com glicuronídeo ou sulfato, com menor clivagem na fração triazólica, podendo induzir diversos CYPs (Yang *et al.*, 2018; O principal metabólito do glifosato é o AMPA (ácido aminometilfosfônico), mas também forma glioxilato, que reage com a proteína cisteína do fígado. As bactérias intestinais também podem metabolizar o glifosato em glioxilato e sarcosina, um marcador de câncer intestinal (Ford *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2020). Estudos indicam que os três agrotóxicos e seus metabólitos induzem a formação de radicais livres (EROs) que causam peroxidação lipídica (MDA), afetando principalmente mitocôndrias e retículo endoplasmático, reduzindo NADPH e NADH e causando privação de glutamato na fotorrespiração (Othomère, 2020a; Othmère, 2021; Othmère, 2022; Singh Liu *et al.*, 2023; Os metabólitos dos três agrotóxicos são excretados na bile/fezes, entrando no ciclo entero-hepático, e há estudos indicando disbiose intestinal causada pela exposição a esses agrotóxicos (Yang *et al.*, 2020; Aitbali *et al.*, 2018; Ku *et al.*, 2023). Estes resultados encontrados na literatura esclarecem os resultados do presente estudo, onde camundongos expostos à mistura de glifosato, imidacloprido e tebuconazol, por um período de exposição de 6 semanas, têm disbiose intestinal significativa, fato comprovado com a elevação das bactérias aeróbicas totais e das bactérias anaeróbicas totais, sugerindo uma troca das bactérias anaeróbicas obrigatórias por facultativas. A hipótese é que a presença de resistência à insulina, o aumento do colesterol total e redução dos triglicérides estejam relacionados a uma ação conjunta da alteração na microbiota (disbiose) e do estresse oxidativo causado pelos agrotóxicos/ metabólitos (peroxidação lipídica) no fígado dos animais, uma das principais causas citada na literatura para estas alterações metabólicas.

Geralmente, negligencia-se a alteração da microbiota intestinal em uma exposição à agrotóxicos, sendo que a disbiose pode ser a resposta primária para a perda da homeostasia do organismo hospedeiro (Matsuzaki *et al.*, 2023). Estudos utilizando a análise da microbiota intestinal para avaliar a exposição a baixas doses de agrotóxicos são limitados, porém já há evidências acumuladas permitem estabelecer de forma segura que a exposição ambientalmente relevante a agrotóxicos pode causar alterações a curto e longo prazo nas comunidades microbianas do intestino dos mamíferos e, conseqüentemente, a produção de seus metabólitos (Yuan *et al.*, 2019; Gambarte; Wolansky, 2022). Assim, sugere-se que a análise da microbiota intestinal possa ser empregada em programas de biomonitorização a exposição a contaminantes ambientais.

5.2.3 Biomarcadores de efeito nos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos

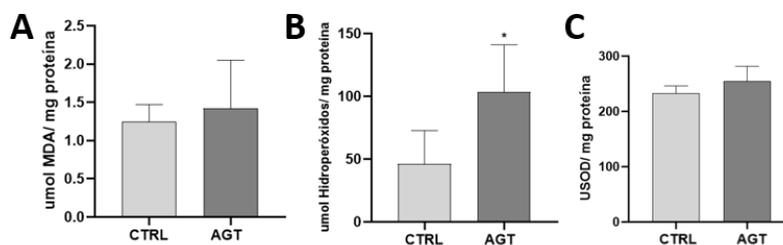
5.2.3.1 Avaliação do Estresse Oxidativo

Para mensurar o dano oxidativo causado pela exposição à mistura de agrotóxicos ao tecido hepático, foi realizada a avaliação do estresse oxidativo no fígado dos animais expostos e não-expostos, por meio das dosagens de MDA, hidroperóxidos e atividade da enzima SOD. Para os resultados de todas as dosagens, após análise da normalidade (Shapiro-Wilk) e de *outliers* (método de ROUT) dos dados obtidos, foi aplicado o teste estatístico de Mann Whitney. O valor de p foi considerado significativo quando menor do que 0,05.

Não foi evidenciada alteração estatisticamente significativa relacionada a peroxidação lipídica na dosagem de MDA nem a atividade da enzima SOD nos animais expostos à mistura comparados ao grupo controle. Mas a dosagem de hidroperóxidos apresentou diferença estatística ($p < 0,05$), com aumento de aproximadamente 25% na formação de hidroperóxidos entre os grupos não expostos e expostos (Figura 20).

Figura 20 – Avaliação do estresse oxidativo no fígado dos animais expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.

A: dosagem de MDA; B: Dosagem de hidroperóxidos; C: Atividade da SOD. MDA: Malondialdeído. SOD: Superóxido dismutase. Barra = DP; * $p < 0,05$.



Fonte: dados da pesquisa.

O principal órgão responsável pela desintoxicação de compostos químicos devido à sua capacidade de biotransformar moléculas é o fígado. Se uma lesão hepática ocorrer, por causa de uma peroxidação lipídica, por exemplo, diversos distúrbios na homeostasia de um organismo também podem ocorrer (Gomes *et al.*, 2021). A literatura traz muitas explicações sobre a influência do estresse oxidativo nas alterações bioquímicas encontradas em animais expostos a agrotóxicos e misturas. O Imidacloprido (dose 5,6 mg/kg PC/ dia) causa estresse oxidativo isoladamente em ratos Wistar, mas não em mistura com lambda-cialotrina, reduzindo a concentração no fígado e rim de SOD, catalase e glutathione, e aumentando MDA, alterações estas que são transmitidas à prole. O Imidacloprido é hepatotóxico, mas em mistura, dependendo do outro agrotóxico, pode ter seu efeito antagonizado (Ndonwi *et al.*, 2019). O glifosato, em ratos expostos a doses orais entre 50 - 250 mg/ kg PC/ dia, agrava a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), evidenciada pelo aumento de MDA. Este herbicida altera a atividade das enzimas antioxidantes do fígado, por reduzir SOD e catalase, perturbando a homeostasia da glicose, por reduzir enzimas de glicólise e aumentar enzimas da gliconeogênese, assim, consequentemente, alterar a ação da insulina no fígado, via sinalização de NF-KB. Além do aumento da glicose jejum e resistência à insulina, redução da testosterona sérica também foi identificada pelo grupo de pesquisa (Prasad *et al.*, 2022). Tebuconazol, a uma dose de 100x a IDA, durante 4 semanas em camundongos, acumula-se no fígado, mas não no rim, causando estresse oxidativo por alterar a homeostase redox, evidenciado pelo aumento das concentrações de MDA e GSH e redução na atividade da SOD. Estes resultados se repetem quando o tebuconazol está na presença do Carbendazim, indicando que há efeitos aditivos na mistura, pois o Carbendazim não apresenta estes efeitos isoladamente (Ma *et al.*, 2023). Nossos

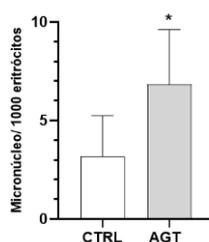
resultados demonstram que há uma alteração nas concentrações do colesterol total e dos triglicerídeos séricos, e que estas alterações podem estar diretamente ligadas ao estresse oxidativo causado no fígado dos animais pela exposição à mistura.

5.2.3.2 Ensaio Micronúcleo

A frequência de micronúcleos (MN) é utilizada como biomarcador de efeito para detectar as mutações causadas por perda de cromatina por dano cromossômico estrutural ou no processo mitótico. Após análise da normalidade (Shapiro-Wilk) e de *outliers* (método de ROUT) dos dados obtidos, foi aplicado o teste estatístico de Mann Whitney. O valor de p foi considerado significativo quando menor do que 0,05. Os animais expostos (AGT) apresentaram aumento na frequência de micronúcleos, comparado com os animais controle (CTRL), com $p = 0,0115$ (figura 21).

Figura 21 – Avaliação da frequência de micronúcleos em sangue periférico de camundongos expostos à mistura de agrotóxicos.

Teste estatístico: t test. Barra = DP; * = 0,0115)



Fonte: dados da pesquisa.

Avaliar uma exposição a substâncias químicas possibilita tomar decisões inerentes à prevenção e controle dos agentes contaminantes. Mas o caminho até a tomada de decisão precisa ser monitorado (Amorim, 2003; Valente *et al.*, 2016). Apesar dos biomarcadores de exposição serem os mais frequentemente usados para monitorar uma exposição a poluentes ambientais, biomarcadores de efeito, como estresse oxidativo e genotoxicidade, são importantes para identificar danos causados à célula e ao material genético. A avaliação do estresse oxidativo, ao se dosar as substâncias formadas por peroxidação lipídica (MDA e hidroperóxidos), indica se a exposição induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem sobrecarregar o sistema antioxidante natural e causar danos celular e/ ou genético, ou seja,

genotoxicidade (Valente *et al.*, 2016; Mossa *et al.*, 2018; Chaufan *et al.*, 2019). A genotoxicidade causada por uma substância química que interage com o DNA pode induzir anormalidades nucleares como micronúcleos, conduzindo a perda da informação gênica pela célula, inclusive provocando mutações que podem provocar câncer (Valente *et al.*, 2016; Mossa *et al.*, 2018; Chaufan *et al.*, 2019).

Agrotóxicos são capazes de causar estresse oxidativo, levando a danos no DNA. A mistura utilizada neste estudo foi capaz de causar peroxidação lipídica nas células do fígado, evidenciado pelo aumento da concentração de hidroperóxidos. Muitos estudos indicam que os três agrotóxicos isoladamente podem causar estresse oxidativo, causando peroxidação lipídica e desbalanço no sistema antioxidante natural no organismo, sendo assim difícil imputar o resultado encontrado a apenas um dos agrotóxicos da mistura. Coelho expostos ao imidacloprido (30 mg/kg PC, por 2,5 meses), mesmo não apresentando alterações na dosagem da glutathione, apresentaram um número significativo de micronúcleos (126% comparado com o grupo controle), por inibição da enzima aldeído oxidase (Vardavas *et al.*, 2018). O Tebuconazol é genotóxico por vias dependentes de EROs. Os radicais livres agem sobre mitocôndrias e retículo endoplasmático, ativando rotas de morte celular programada (apoptose) dependente de caspases (Othomère, 2020; Othmère, 2021; Othmère, 2022). A IARC (*International Agency for Research on Cancer*), em 2015, classificou o glifosato, e seu principal metabólito AMPA (do inglês, *aminomethylphosphonic acid*), no grupo 2A como “provável carcinogênico”, baseado em estudos publicados sobre seus efeitos genotóxicos, *in vitro* e em animais. Entretanto, há evidências de que a frequência de MN aumentada em células HepG2 e sangue periférico humano, não causam danos ao DNA (evidenciado pelo ensaio cometa para mutagenicidade) e nem é gerado por estresse oxidativo (Kasuba *et al.*, 2017; Martins-Gomez *et al.*, 2022). O Imidacloprido, *in vitro*, pode aumentar a frequência de MN, mutações na enzima timidina quinase (importante na síntese de DNA) e danos ao DNA, sem apresentar alterações nas EROs intracelulares (Guo *et al.*, 2018) e, *in vivo*, é depressor hematopoiético com potencial clastogênico, aumentando a frequência de MN sem apresentar efeito citotóxico (Kataria *et al.*, 2015; Bagri *et al.*, 2016; Stivaktakis *et al.*, 2016). Mas, apesar destas evidências, os estudos com as misturas de agrotóxicos sempre relatam resultados diferentes, quando comparados a estudos individuais. Por exemplo, Zebrafish expostos a uma mistura de Imidacloprido, Acetaclor e Tebuconazol, apresentaram peroxidação lipídica muito mais acentuada quando comparada a exposição aos mesmos agrotóxicos isoladamente, demonstrando efeitos sinérgicos entre as substâncias (Chang *et al.*, 2020).

Observa-se que a exposição à mistura de agrotóxicos aumentou a frequência de micronúcleos em eritrócitos do sangue periférico dos animais. Além de amplamente estudada a presença e aumento de micronúcleos causados por exposição a agrotóxicos, estes estudos indicam que a frequência dos MNs é dependente da dose dos agrotóxicos; quanto maior a dose, maior a frequência (Iturburu *et al.*, 2019; Stivaktakis *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2018). Da mesma forma, a maioria dos estudos também correlaciona a peroxidação lipídica com o aumento da frequência dos micronúcleos durante o período da exposição aos agrotóxicos (Abdel-Halim; Osman, 2020; Bali *et al.*, 2019; Hajer *et al.*, 2020; Kasuba, 2017). Assim, os mecanismos detalhados envolvendo a genotoxicidade da mistura permanecem obscuros, pois não foram dosadas glutatona e as outras enzimas do sistema antioxidante natural (além da SOD).

5.2.4 Análise Metabolômica no soro dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos

A análise metabolômica *Untargeted* por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas gera numerosos resultados analíticos, com características 3D (RT, massa e abundância) devido a complexidade do metaboloma. Um processamento de dados adequado inclui a desconvolução e o alinhamento dos picos; exclusão de dados irrelevantes; e identificação adequada dos compostos. A partir da matriz gerada no pré-processamento é importante verificar se os dados precisam ser normalizados, transformados e/ou escalonados (Ferreira, 2015; Pilon, *et al.*, 2020; Araújo, *et al.*, 2021). Este estudo utilizou as ferramentas dos softwares ChemStation, AMDIS, MPP e Metaboanalyst 6.0 para o pré-processamento e processamento dos dados metabolômicos. Os QCs apresentaram similaridade nas aquisições, tanto para RT quanto em abundância. Não houve grande variação entre os RTs teóricos e aplicados do padrão de C18 e do F.A.M.E. mix. Os brancos não apresentaram contaminações relevantes. Foram excluídos da tabela de dados gerados: *2-hydroxipiridine* (proveniente da derivatização) e *phthalate* (proveniente dos tubos e ponteiras plásticos).

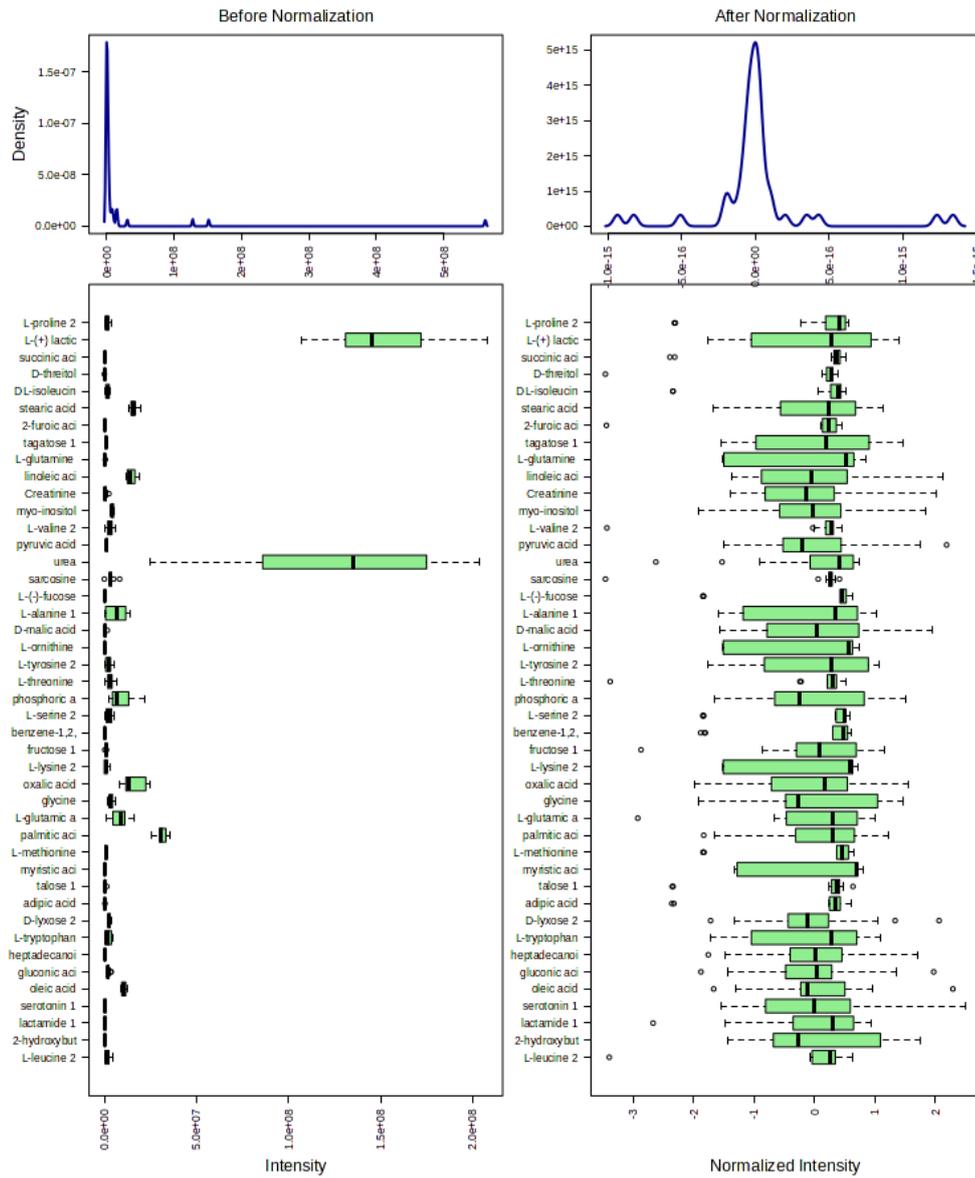
A primeira etapa da análise multivariada no Metaboanalyst 6.0 foi a filtragem dos dados, altamente recomendada para conjuntos de dados metabolômicos *Untargeted*. Ela é requerida para identificar e remover variáveis que provavelmente não serão úteis na modelagem dos

dados. Assim, as variáveis não informativas com baixa repetibilidade foram filtradas pela análise dos QCs, onde metabólitos com alto Desvio Padrão Relativo ($DPR > 30\%$) foram removidos. Para os filtros de variância (DPR não paramétrico) e de abundância (valor de intensidade mediana), foram filtrados 5% devido à quantidade de metabólitos identificados (< 250 metabólitos). Dois metabólitos foram excluídos. Desta forma, a normalização, transformação e escalonamento foram realizados a seguir.

Para normalização dos dados foi utilizado o método de Soma (*sum*), para deixar as amostras em uma escala pré-definida e reduzir o erro sistemático (Mastrangelo *et al.*, 2015). Os dados foram transformados (*log transformation*) para reduzir os ruídos heterocedásticos e corrigir distribuições distorcidas da curva de normalidade (Sussulini *et al.*, 2017; Antonelli *et al.*, 2019). E o Auto escalonamento (*Auto Scaling*) foi realizado para os metabólitos contribuíssem de forma equivalente para o modelo (Sussulini *et al.*, 2017). A figura 22 ilustra a normalização, transformação e escalonamento realizado nos dados animais expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.

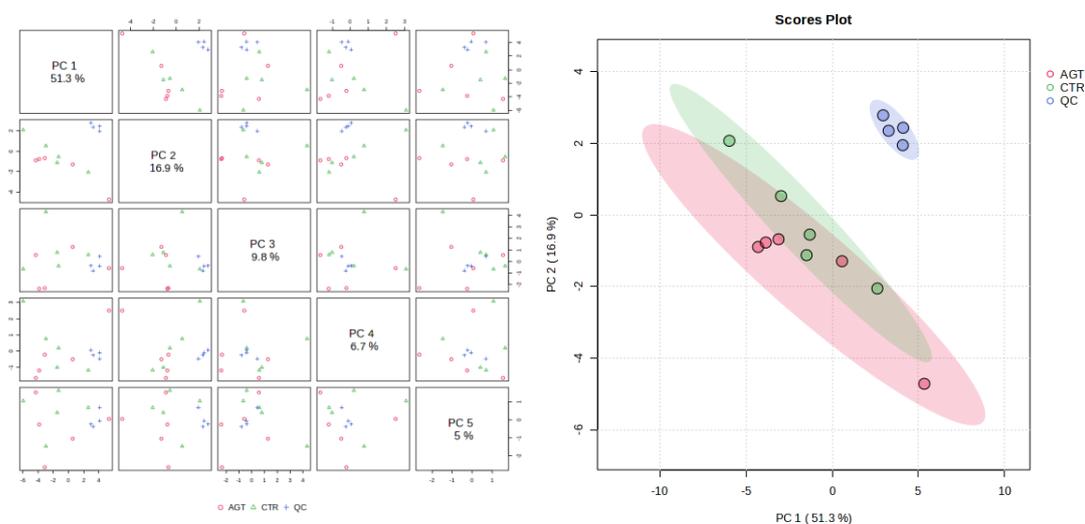
O primeiro método multivariado aplicado aos dados foi a análise dos componentes principais, o PCA. Este método não-supervisionado para reconhecimento de padrões permite reduzir a complexidade do conjunto de dados originais, resumindo-os a componentes principais (Sussulini *et al.*, 2017). O PCA foi utilizado para a análise exploratória do soro para uma visualização global simples dos dados. Assim, encontrou similaridades e diferenças entre as amostras, demonstrou que QCs se agrupam fortemente no gráfico de pontuações, indicando que houve estabilidade analítica, qualidade e confiabilidade dos dados obtidos. Não foi removida nenhuma amostra anômala (*outlier*). A figura 23 representa os componentes principais do PCA e a separação não supervisionada dos animais expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.

Figura 22 – Normalização pela Soma, transformação logarítmica e auto escalonamento realizado nos dados dos animais expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.



Fonte: do autor, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

Figura 23 – Modelo de análise de componentes principais (PCA) dos animais expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos e as amostras do controle de qualidade (QCs).

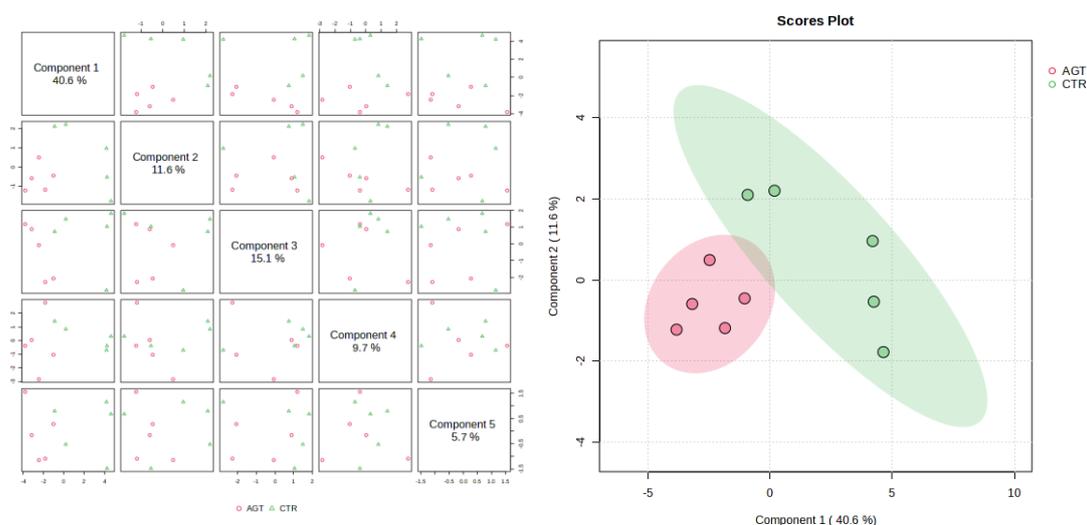


Fonte: dados da pesquisa, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

Após avaliação da PCA, a análise multivariada supervisionada PLS-DA foi realizada. Enquanto a PCA reduz a dimensionalidade maximizando a variância dos dados, a PLS-DA maximiza a covariância latente entre os dados originais e a variável de resposta (que define os grupos), encontrando a relação entre as duas matrizes (dados X/ metabólitos e resposta Y/ resposta) (Sussulini *et al.*, 2017). Para a análise, os dados foram novamente normalizados (da mesma forma citada anteriormente), sem a presença dos QCs. A figura 24 ilustra a separação supervisionada dos dados dos animais expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.

Para testar a validade dos resultados obtidos na PLS-DA, o teste de validação cruzada (5-fold) foi realizado, gerando valores para os parâmetros de R² (adequação do modelo) e Q² (previsibilidade do modelo). Valores usuais para experimentos biológicos são Q² > 0,4 e R² > 0,7. A acurácia deve estar entre 70-90%, indicando a porcentagem de predições reais (Godzien, *et al.*, 2013; Pilon, *et al.*, 2020; Araujo, *et al.*, 2021; Gallo, 2022). A validação do modelo, para cinco componentes principais, apresentou R² = 0,654 e Q² = 0,393, com acurácia de 80%. Apesar dos valores estarem limítrofes, o ajuste dos dados foi considerado adequado. O teste de permutação não foi realizado porque ele é indicado apenas para grandes conjuntos de dados. A figura 25 apresenta os dados de R², Q² e acurácia da análise de PLS-DA entre os grupos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.

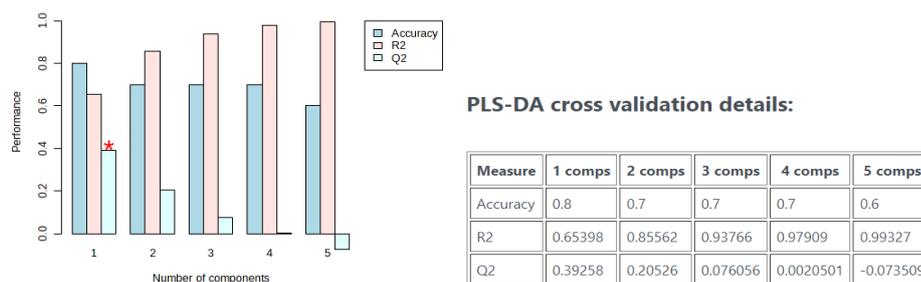
Figura 24 – Modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) indicando efetiva discriminação entre os grupos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.



Fonte: dados da pesquisa, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

Figura 25 – Classificação do modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) pela validação cruzada.

$R^2 = 0,654$ (adequação do modelo); $Q^2 = 0,393$ (previsibilidade do modelo); acurácia (accuracy) = 0,8 (80%).



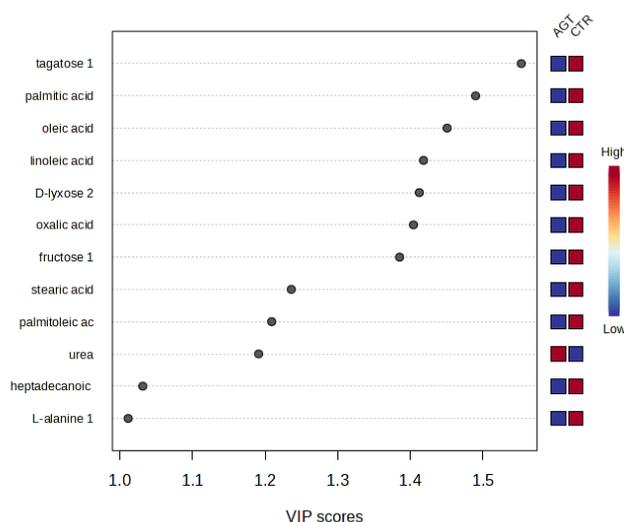
Fonte: dados da pesquisa, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

A análise multivariada supervisionada e não supervisionada traz informações importantes a um estudo, uma vez que são as alterações metabólicas que dividem os grupos, criando padrões específicos, a chamada assinatura metabólica. É por meio da assinatura metabólica que podemos refletir sobre a exposição a substâncias químicas, como a mistura de agrotóxicos (Nolasco *et al.*, 2023). Estudos que utilizaram as análises metabômicas como ferramentas de avaliação demonstraram que exposições a diferentes misturas de agrotóxicos têm assinaturas próprias, com modificações metabólicas significativas nos organismos expostos, levando a

alterações fisiológicas, como resistência à insulina e obesidade (Bonvallot *et al.*, 2014; Lukowicz *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2020; Nolasco *et al.*, 2023).

Os metabólitos mais importantes para o modelo são denominados VIP (do inglês, *Variable Importance on the Projection*) (Gallo, 2022). Os onze metabólitos da figura 26 com VIP > 1 foram os mais influentes e, desta forma, discriminaram os perfis dos animais expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos. As caixas à direita indicam as concentrações relativas (vermelha/ azul) do metabólito correspondente em cada grupo em estudo.

Figura 26 – Valores da pontuação de Variáveis Importantes da Projeção (VIP) de onze metabólitos identificados no modelo da Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) dos animais expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.



Fonte: dados da pesquisa, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

Utilizando o software Metaboanalyst 6.0, tabela 24 representa a correlação entre o valor VIP, o test t (não-paramétrico - valor p) e o *fold change* dos metabólitos discriminantes identificados na análise metabolômica do soro dos animais expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos. Por meio da *Pathway Analysis*, ferramenta do Metaboanalyst, as vias metabólicas possivelmente alteradas pela exposição também estão identificadas na tabela 18.

Tabela 16 – Metabólitos discriminadores na análise metabolômica pela técnica CG-EM, no soro de camundongos expostos à mistura de agrotóxicos.

Down significa que está reduzido no grupo exposto.

Metabólito	VIP	p.value	Fold change	Regulação	Classe	Via Metabólica
<i>Tagatose</i>	1,553	0,0134	1,5881	Down	Monossacarídeo	Metabolismo da Galactose
<i>Palmitic acid (hexadecanoic acid)</i>	1,490	0,0201	1,3615	Down	Ácido graxo saturado	Biossíntese de ácidos graxos insaturados; degradação de ácidos graxos.
<i>Oleic acid ((9z)-octadecenoic acid)</i>	1,451	0,0254	1,3617	Down	Ácido graxo insaturado	Biossíntese de ácidos graxos insaturados
<i>Linoleic acid (9-12-octadecadienoic acid)</i>	1,418	0,0303	1,4702	Down	Ácido graxo insaturado	Biossíntese de ácidos graxos insaturados; Metabolismo do ácido linoléico
<i>D-lyxose</i>	1,412	0,0313	1,6603	Down	Monossacarídeo	Metabolismo de aminoácidos e açúcares nucleotídeos.
<i>Oxalic acid</i>	1,404	0,0326	1,7836	Down	Ácido Orgânico	Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato.
<i>D-fructose</i>	1,385	0,0360	1,7278	Down	Monossacarídeo	Metabolismo do amido e da sacarose; Metabolismo da frutose e manose; Metabolismo da galactose.

Fonte: dados da pesquisa.

5.2.4.1 Análise das vias metabólicas alteradas pela exposição à mistura de agrotóxicos

Biossíntese e degradação de ácidos graxos insaturados

Observa-se que, nos animais que receberam a mistura de agrotóxicos, há uma diminuição dos ácidos graxos palmítico, oleico e linoleico (tabela 18). A ferramenta do Metaboanalyst de análise da via metabólicas (*pathway analysis*) indica que a biossíntese de ácidos graxos insaturados foi prejudicada pelos agrotóxicos. Esta avaliação pode ser corroborada pela diminuição dos TGs séricos (glicerol + três ácidos graxos).

O tebuconazol e seus metabólitos induzem a formação de radicais livres (EROs) que causam peroxidação lipídica (MDA) prejudicando, principalmente, mitocôndrias e retículo endoplasmático (Othomère, 2020a; Othmère, 2021; Othmère, 2022). Em plantas, o glifosato pode causar estresse oxidativo com redução de NADPH e NADH e causar privação de glutamato na fotorrespiração (Singh *et al.*, 2020). O glifosato e o imidacloprido também podem causar peroxidação lipídica, por meio de estresse oxidativo (Vardavas *et al.*, 2018; Chang *et al.*, 2020; Rieg *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023; Dong *et al.*, 2024).

Uma hipótese para a redução dos ácidos graxos palmítico, oleico e linoleico é que o estresse oxidativo causado pela mistura de agrotóxicos pode ter prejudicado a biossíntese de ácidos graxos ao agir nestas moléculas, uma vez que sugerimos que não há escassez de Acetil CoA, advindo do acetato. A síntese também pode estar prejudicada pela utilização do NADPH, formada na via das pentoses, para regeneração da glutatona, possivelmente utilizada para controlar o estresse oxidativo causado pela mistura de agrotóxicos.

Os ácidos graxos também podem estar reduzidos por sua utilização para obtenção de energia, uma vez que há uma resistência à insulina causada pela mistura de agrotóxicos, pois a insulina é a principal sinalizadora para as células tanto de que há glicose disponível, quanto para inibir a degradação de ácidos graxos. Sem este estímulo, há degradação para obtenção de energia e um aumento na produção de corpos cetônicos, pela via do mevalonato (Laffel, 1999; Veneti *et al.*, 2023).

Uma última hipótese para a diminuição dos ácidos palmítico, oleico e linoleico é a ação das EROs sobre os ácidos graxos livres, não apenas de membranas, causando a peroxidação lipídica e formando intermediários reativos, como os hidroperóxidos, que estão aumentados no fígado.

Metabolismo da galactose e outras vias metabólicas relacionadas

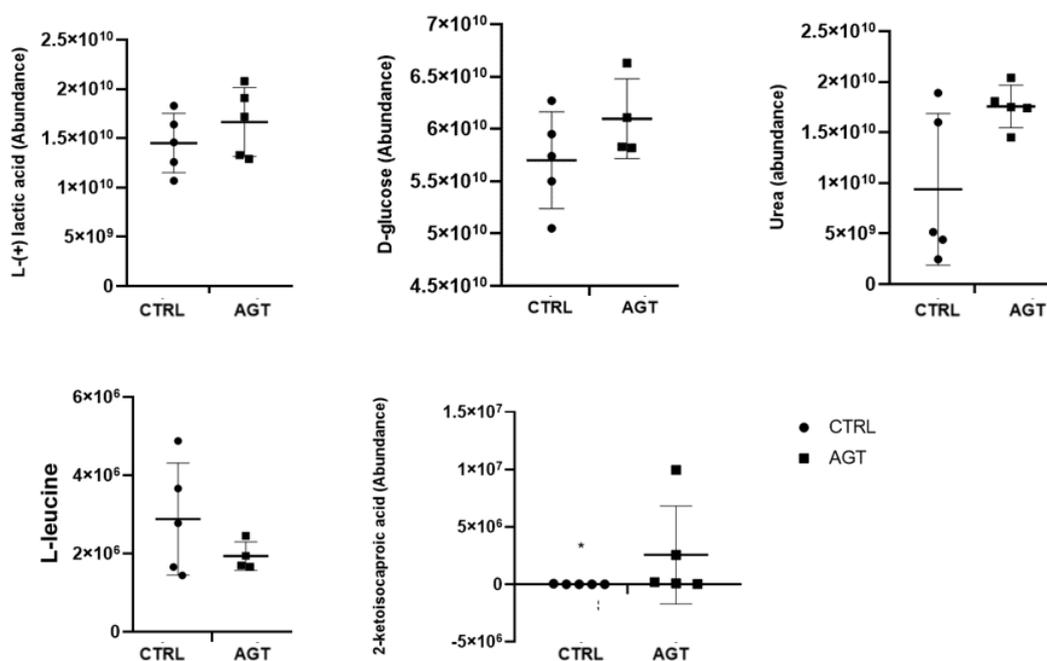
Nos animais que receberam a mistura de agrotóxicos, há uma diminuição dos monossacarídeos tagatose, frutose e lisose (tabela 18). A ferramenta do Metaboanalyst de análise da via metabólicas (*pathway analysis*) indica que o metabolismo da galactose, amido e sacarose; e frutose e manose foram prejudicados pelos agrotóxicos da mistura.

A hipótese é que a mistura de agrotóxicos causou disbiose, fazendo com que as bactérias consumissem mais galactose e frutose, com consequente aumento da produção de ácido láctico

(figura 27) e acetato. Uma vez estes monossacarídeos sendo consumidos pelas bactérias ou a galactose sendo menos biotransformada em tagatose, há uma menor disponibilidade para o hospedeiro (camundongo), prejudicando, assim, a via metabólica da galactose, identificada pela diminuição da tagatose na análise metabolômica, e, conseqüentemente, as vias da frutose e manose, e amido e sacarose, pela redução da frutose. A alteração do metabolismo do amido e sacarose culmina na via do metabolismo de aminoácidos e açúcares nucleotídeos, vias também alteradas pela redução da frutose e da lisose (tabela 18). Uma menor disponibilidade de tagatose também pode ter deixado “livre” as dissacaridasas intestinais, facilitando a absorção da glicose.

A frutose, tagatose e lisose como podem formar intermediários na via das pentoses. Outra hipótese é que, com o estresse oxidativo causado pela exposição aos agrotóxicos e a necessidade de NADPH, estes monossacarídeos foram consumidos para formar substrato para a via e regenerar a glutatona.

Figura 27 – Análise estatística (não-paramétrica) do ácido láctico, ureia, glicose e ácido 2-cetoisocaproico dos animais expostos e não-expostos à mistura de agrotóxicos. Valores expressos em abundância. Barra indica desvio padrão. * $p < 0,05$.



Fonte: dados da pesquisa.

Um estudo realizado em rãs recém transformadas, a exposição ao glifosato perturbou 66% de seu metabolismo, com redução de ácido oleico, frutose, galactose, e aumento de glicose, ácido

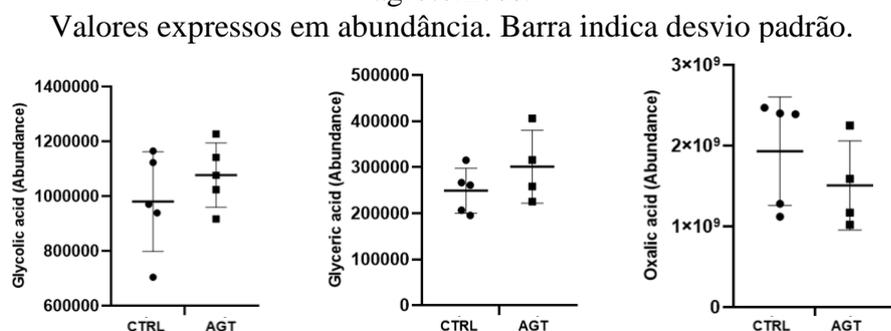
lático e ureia. Estes achados indicam que o glifosato interfere nas vias do metabolismo da galactose, das purinas e da ureia (Glinski *et al.*, 2021). Qualquer aminoácido pode fornecer seu grupamento amina para a formação de glutamato, em uma reação denominada transaminação. Esta metabolização de aminoácidos forma *alpha*-cetoácidos, sendo *alpha-ketoisocaproic acid* formado a partir da leucina. Na mitocôndria, onde ocorre a desaminação do glutamato, há liberação de amônia, que em mamíferos é via dependente de aspartato e ATP, forma-se a ureia. Estes resultados são compatíveis com o presente estudo, indicando outra hipótese para a diminuição dos níveis de frutose e tagatose e aumento da ureia, ácido lático e glicose sendo a exposição ao glifosato da mistura. Observa-se que, os animais expostos à mistura de agrotóxicos, alguns aminoácidos tendem a estarem reduzidos no soro dos animais (tabela 20), com aumento da ureia e do ácido 2-cetoisocaproico (figura 27).

Metabolismo do Glioxilato e dicarboxilato

Os animais que receberam a mistura de agrotóxicos apresentam uma alteração no ácido oxálico, um ácido orgânico dicarboxílico (tabela 18). A ferramenta do Metaboanalyst de análise da via metabólicas (*pathway analysis*) indica que o metabolismo do glioxilato e dicarboxilato foi modificado pela mistura de agrotóxicos.

Observa-se que há uma alteração no ciclo do glioxilato causada pela mistura de agrotóxicos, com tendência a um aumento na formação de ácido glicérico e ácido glicólico (figura 28) e uma diminuição do ácido oxálico (tabela 18 e figura 28).

Figura 28 – Análise estatística (não-paramétrica) dos metabólitos do ciclo do glioxilato: ácido glicólico, ácido glicérico e ácido oxálico nos animais expostos e não-expostos à mistura de agrotóxicos.



Fonte: dados da pesquisa.

Um estudo com glifosato, em camundongos, usando a proteômica, identificou que o glifosato é metabolizado não apenas em AMPA, mas também em glioxilato, onde o último metabólito reage com a cisteína das proteínas do fígado. O glioxilato formado pela metabolização do herbicida inibe a oxidação de ácidos graxos, causando lipidose no fígado dos animais (Ford *et al.*, 2017). Bactérias intestinais também podem metabolizar glifosato em glioxilato e sarcosina (Singh *et al.*, 2020). Como evidenciado neste presente estudo, a mistura de agrotóxicos é genotóxica, aumentando a frequência de micronúcleos em eritrócitos do sangue periférico. Uma hipótese é que o glifosato metabolizado a glioxilato pelas bactérias intestinais e no fígado dos animais, levando a estresse oxidativo e, conseqüentemente, causando a peroxidação lipídica observada, priorizando a formação de ácido glicólico e não de ácido oxálico. A peroxidação lipídica pode se agravar, com a formação de glioxil, que forma mais glioxilato por meio da glutatona, criando um reforço negativo na via do glioxilato.

Metabolismo de Aminoácidos

A ferramenta do Metaboanalyst de análise da via metabólicas (*pathway analysis*) indica que a diminuição de lisose (tabela 18) nos animais que receberam a mistura de agrotóxicos é resultado da alteração no metabolismo dos aminoácidos e açúcares nucleotídeos. A tabela 19 resume os aminoácidos, precursores e sua identificação via análise metabolômica.

Em uma visão geral, nos animais expostos à mistura de agrotóxicos, temos os aminoácidos que alimentam a formação de piruvato (alanina, valina, leucina e isoleucina) diminuídos; os que formam o glicerol-3-fosfato (serina e glicina) aumentados; os que formam fosfoenolpiruvato e eritrose-4- fosfato (triptofano e tirosina) aumentados; e os que formam oxaloacetato (metionina, treonina, lisina) diminuídos, indicando uma alteração no metabolismo destes aminoácidos. Somado ao aumento da produção de ureia (figura 27), temos a metabolização e não síntese dos aminoácidos sendo afetada pela mistura.

Tabela 17 – Aminoácidos, seus precursores e abundância (tendência) no soro de camundongos expostos à mistura de agrotóxicos via análise metabolômica. ND: não detectado; ↑ aumento; ↓ diminuição.

Precursor	Aminoácido	Análise Metabolômica
α-Cetogluturato	Glutamato	↑
	Glutamina	↑
	Prolina	↓
	Arginina	ND
Piruvato	Alanina	↓
	Valina	↓
	Leucina	↓
	Isoleucina	↓
Glicerol-3-fosfato	Serina	↑
	Glicina	↑
	Cisteína	ND
Fosfoenolpiruvato e eritrose-4- fosfato	Triptofano	↑
	Fenilalanina	↑
	Tirosina	↑
Oxaloacetato	Aspartato	ND
	Asparagina	ND
	Metionina	↓
	Treonina	↓
	Lisina	↑
Ribose-5-fosfato	Histidina	ND

Fonte: dados da pesquisa.

A análise metabolômica de *Aphis gossypii* (pulgões) expostos a doses subletais de imidacloprido identificou 16 metabólitos alterados (aminoácidos, ácidos nucleicos e carboidratos), importantes para as vias da glicólise e da gliconeogênese, metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, metabolismo de glutatona, metabolismo de fenilalanina, metabolismo de tirosina. O mecanismo identificado, que levou a estas alterações, foi o estresse oxidativo (Nannan-Lv *et al.*, 2021). Ratos expostos a permetrina em baixas doses identificou, por meio da análise metabolômica, vários metabólitos alterados, incluindo os aminoácidos (glutamina, valina, leucina, isoleucina, asparagina, serina, arginina, lisina, cisteína, metionina, prolina, histidina) e intermediários ciclo do ácido cítrico (ácidos aspártico, glutâmico e cítrico) (Jellali *et al.*, 2021). Outro estudo metabolômico da exposição da atrazina no fungo *Metarhizum robertsii*, identificou que o herbicida induziu estresse oxidativo com perturbações no metabolismo do carbono e do azoto (ácido L-aspártico, L-asparagina, L-tirosina, L-treonina, L-isoleucina, L-fenilalanina, 1-metil-L-histidina, L-triptofano, L-valina, L-alanina, O-fosfo-L-serina, L-sarcosina e L -lisina). A presença de metabólitos derivados de ácidos graxos, como o

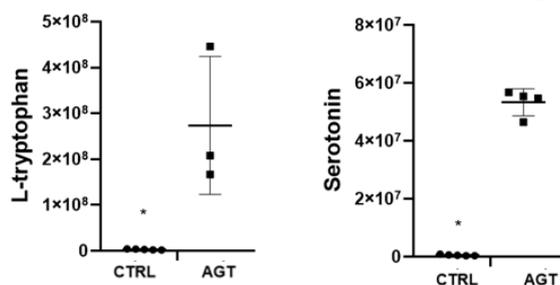
ácido linoleico, confirmou a presença da peroxidação lipídica (Szewczyk *et al.*, 2020). Outro estudo utilizando cepa fúngica e o 2,4-D demonstrou que o herbicida tem a capacidade de alterar as concentrações gerais de aminoácidos (a maioria diminuiu, exceto leucina, glicina, serina, asparagina e hidroxiprolina) e os perfis de ácidos graxos e lipídios, por estresse oxidativo evidenciado pelo aumento da peroxidação lipídica (Bernat *et al.*, 2018). Yan e colaboradores (2021) avaliaram a exposição de três inseticidas neonicotinoides isolados (dinotefurano, nitenpiram e acetamiprid) em camundongos e verificaram, a partir do perfil metabolômico, que a exposição causa distúrbios no metabolismo de aminoácidos (principalmente leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, tirosina e triptofano), acúmulo de lipídios e estresse oxidativo. Estudos indicam que os aminoácidos de cadeia ramificada tendem a amenizar a resistência à insulina (Tremblay *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2011). Estes achados confirmam os resultados do presente estudo, indicando que o estresse oxidativo, alterações em lipídios e aminoácidos parecem ser um mecanismo comum à exposição a agrotóxicos. Outra hipótese é que os aminoácidos alanina, valina, leucina e isoleucina estão diminuídos por causa da glicólise anaeróbica nos músculos, que gera ácido lático; a diminuição dos aminoácidos metionina, treonina, lisina formadores de oxalacetato, que também alimenta o ciclo da ureia; que, com o tempo, pode levar a alterações em outras vias de metabolismo de arginina e prolina; metabolismo de alanina, aspartato e glutamina; metabolismo do glioxilato e carboxilatos; e metabolismo do nitrogênio.

Estudos mostram que o triptofano é um aminoácido que está aumentado em indivíduos diabéticos (Yang *et al.*, 2019). Observa-se que há, nos camundongos expostos a mistura de agrotóxicos, uma maior abundância do aminoácido triptofano e do neurotransmissor serotonina (figura 29). A exposição ao glifosato afeta microrganismos da microbiota intestinal que tem a via chiquimato, com inibição da produção de aminoácidos como o triptofano, importante para manutenção do humor, cognição e comportamento do hospedeiro. Esta exposição desencadeia depressão, ansiedade, alteração na locomoção, perda de memória e aprendizado (Martinez *et al.*, 2018). O triptofano e a tirosina são aminoácidos essenciais sintetizados apenas por plantas e microrganismos, a partir da eritrose 4-fosfato, um intermediário da via das pentoses fosfato, ou do fosfoenolpiruvato, um intermediário glicolítico (Klaessens *et al.*, 2022). Como houve uma disbiose intestinal causada pela mistura de agrotóxicos, a produção de triptofano e tirosina pode ter sido beneficiada pela formação de fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato, levando a uma absorção maior destes aminoácidos e, conseqüentemente, a uma produção maior de serotonina. Foi observado nos camundongos do estudo um estado de agitação além do estresse

da gavagem, indicando uma possível síndrome serotoninérgica. Mais uma vez, observa-se que a exposição a misturas não apresenta resultados esperados quando comparada com uma exposição apenas a um agrotóxico isolado.

Figura 29 – Análise estatística (não-paramétrica) dos metabólitos do ciclo do glioxilato: ácido glicólico, ácido glicérico e ácido oxálico nos animais expostos e não-expostos à mistura de agrotóxicos.

Valores expressos em abundância. Barra indica desvio padrão. * $p < 0,05$.



Fonte: dados da pesquisa.

De um modo geral, os resultados da avaliação de vias metabólicas da exposição à mistura de glifosato, imidacloprido e tebuconazol sugere que a exposição aos agrotóxicos produz toxicidade por meio de múltiplos mecanismos, principalmente por estresse oxidativo via disfunção mitocondrial, que afeta o metabolismo energético. A disbiose causada pela exposição levou a um aumento da produção de acetato pelas bactérias intestinais. Acetato pode inibir o ciclo do ácido cítrico, o metabolismo de purinas e a via das pentoses fosfato; e estimular o metabolismo de glicerol, gliconeogênese e metabolismo de ácidos graxos (Banks *et al.*, 2010). No fígado, acetato é substrato para a formação de Acetil-CoA, que reagindo três moléculas entre si forma o HMB-CoA (β -Hydroxy β -methylglutaryl-CoA), na via do mevalonato, substrato tanto para a produção de colesterol no citosol quanto de corpos cetônicos na mitocôndria (Zhang *et al.*, 2022). Desta forma, é possível explicar o aumento do colesterol e a resistência à insulina causados pela mistura de agrotóxicos.

5.3 Avaliação da modulação da microbiota intestinal

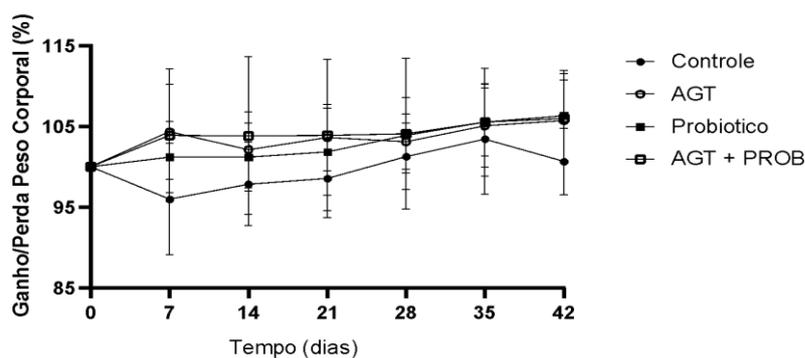
5.3.1 Estudo dos parâmetros bioquímicos e histopatológicos dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos, tratados e não-tratados com o probiótico *B. longum* 5^{1A}

5.3.1.1 Acompanhamento do Peso Corporal

O peso corporal foi utilizado para avaliar o estado fisiológico dos animais, sendo considerado intoxicação ou distresse a perda de mais do que 10 % do peso corporal inicial. Não houve diferença estatística entre os animais controle, expostos à mistura de agrotóxicos e/ou tratados com probiótico (figura 30). O ganho de peso corporal foi considerado normal pelo envelhecimento.

Figura 30 – Avaliação do peso corporal dos animais por acompanhamento semanal do ganho/perda de massa corporal, em porcentagem, de todos os grupos que foram expostos e tratados.

Teste estatístico: ANOVA two-way de medidas repetidas. As barras representam o DP (desvio padrão), o n = 6 animais por grupo; o dia 0 corresponde a 100% (peso inicial) para todos os animais.



Fonte: dados da pesquisa.

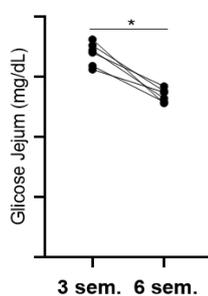
5.3.1.2 Avaliação da Glicose jejum e Sensibilidade à Insulina

Para a glicemia jejum, após análise da normalidade (Shapiro-Wilk) e de *outliers* (método de ROUT) dos dados obtidos, foi aplicado o teste Mann Whitney pareado, comparando-se os animais do mesmo grupo, em tempos diferentes (3 e 6 semanas). Para significância estatística, considerou-se $p < 0,05$.

Em uma análise pareada apenas com os animais que receberam o probiótico, observa-se que o probiótico é capaz de alterar a glicemia jejum dos animais, com redução da glicose sérica de $169,00 \pm 8,89$ mg/dL (DP) para $134,33 \pm 5,05$ mg/dL, com $p = 0,0008$ (figura 31). Infelizmente, a avaliação da glicemia jejum não pode ser realizada por completo porque os animais do grupo AGT+PROB não ficaram em jejum.

Figura 31 – Avaliação pareada da Glicose Jejum (6h), comparação entre 3 e 6 semanas de tratamento para o grupo tratado com o Probiótico.

Teste estatístico: Mann Whitney pareado, $n = 6$ animais por grupo. * $p = 0,0008$.



Fonte: dados da pesquisa.

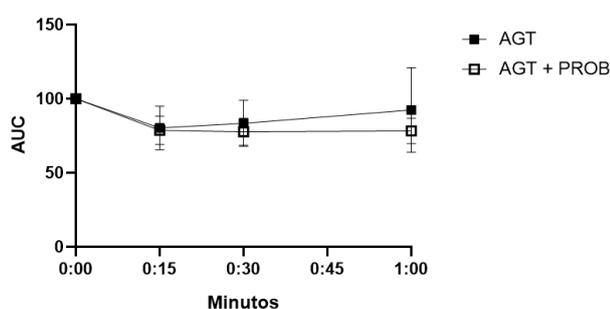
A literatura cita que o tratamento de camundongos C57bl/6 com diabetes induzida por estreptozotocina com *Bifidobacterium spp.*, consegue reduzir significativamente os níveis de glicose no sangue dos camundongos, aumentando a expressão proteica do receptor de insulina beta, concluindo que esta bactéria pode ser promissora para o tratamento da diabetes (Li *et al.*, 2015). Outro estudo investigou o uso de *Bifidobacterium spp.* em camundongos Swiss obesos e concluiu que o probiótico melhora a resistência à insulina e a tolerância à glicose por reduzir a inflamação, ao reduzir a produção da interleucina pró-inflamatória IL-6 (Le *et al.*, 2014). Othman e colaboradores utilizaram *Bifidobacterium longum* inativadas, por 5 semanas, em camundongos obesos e diabéticos e observaram que camundongos tratados apresentaram uma diminuição significativa no ganho de peso corporal, na massa de tecido adiposo e níveis de glicose no sangue, assim como uma redução significativa na glicose (durante um teste oral de sensibilidade à glicose), no colesterol e nos triglicerídeos do sangue (Othman *et al.*, 2020). Estes

resultados são compatíveis com o efeito benéfico da *B. longum* 5^{1A} sobre a glicemia jejum dos animais.

Na avaliação do teste de sensibilidade à insulina (4 dias que antecederam a eutanásia para que a insulina exógena não alterasse outros parâmetros que seriam analisados), os testes estatísticos foram realizados nos dados normalizados pelo delta (subtração do valor encontrado em um tempo pelo tempo anterior) e pela área sob a curva (AUC). Foram aplicados os testes de normalidade (Shapiro-Wilk), de *outliers* (método de ROUT) e teste de Mann Whitney. O valor de p foi considerado significativo quando menor do que 0,05.

Não houve diferença estatística entre as áreas sob a curva entre os grupos AGT e AGT + PROB, que apresentaram uma redução menor na glicose sérica após a injeção de insulina, correspondendo a $19,71 \pm 14,80$ % e $20,50 \pm 8,87$ %, respectivamente, indicando que o tratamento com probiótico não alterou a condição de resistência à insulina causado pela mistura de agrotóxicos (figura 32). Este resultado contradiz a literatura, que apresenta vários estudos que indicam probióticos, como *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*, são capazes de reverter estados alterados de glicemia e resistência à insulina, indicando que é possível que a mistura de agrotóxicos deste estudo pode afetar a microbiota de forma a impedir que ela auxilie no controle da glicemia pelo hospedeiro (Do *et al.*, 2018; Falcinelli *et al.*, 2018; Heianza *et al.*, 2018; Kijmanawat *et al.*, 2019; Koutnikova *et al.*, 2018).

Figura 32 – Avaliação da sensibilidade à insulina dos camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico.
Glicemia através dos tempos 0, 15, 30 e 60. AUC: área sob a curva.



Fonte: dados da pesquisa.

5.3.1.3 Avaliação do Colesterol Total e Triglicérides séricos

Para a avaliação do colesterol total e triglicérides no sangue coletado no dia da eutanásia dos animais expostos e não expostos, após análise da normalidade (Shapiro-Wilk) e de *outliers* (método de ROUT) dos dados obtidos, foram aplicados os testes estatísticos de Mann Whitney. O valor de p foi considerado significativo quando menor do que 0,05.

Não houve diferença estatística entre os grupos exposto (AGT) e exposto e tratado (AGT+PROB) na avaliação do colesterol total e triglicérides séricos (tabela 20). Estes resultados contrapõem a literatura. A disbiose intestinal está associada a doenças cardiovasculares e, alterações nos níveis séricos de colesterol e triglicérides são biomarcadores destas doenças (Jia *et al.*, 2022). Estudos com probióticos indicam que bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são redutores eficientes dos níveis de colesterol, ao regular seu metabolismo por meio da produção de ácidos graxos de cadeia curta e ácidos biliares secundários (diminuição da absorção e no aumentando a excreção) (Palaniyandi *et al.*, 2020; Jia *et al.*, 2022). Linhagens específicas de bactérias lácticas conseguem reduzir, significativamente, o colesterol total sérico, triglicérides séricos e triglicérides hepáticos, com mecanismo de ação relacionado a redução da absorção de ácidos biliares (reciclagem entero-hepática) e aumento do catabolismo do colesterol em ácidos biliares sem suprimir a síntese (Lim *et al.*, 2020).

Tabela 18 – Valores de Colesterol Total e Triglicérides séricos nos camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico.

	AGT (Média +- DP)	AGT+PROB (Média +- DP)	p valor
Colesterol Total sérico, mg.dL -1	70,391 +- 3,890	67,230+-9,038	p > 0,05
Triglicérides sérico, mg.dL -1	97,205 +- 13,720	89,606+-9,70	p > 0,05

Fonte: dados da pesquisa.

5.3.2 Avaliação da Microbiota dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos, tratados e não-tratados com o probiótico *B.longum* 5^{1A}

5.3.2.1 Avaliação da Microbiota Fecal Cultivável

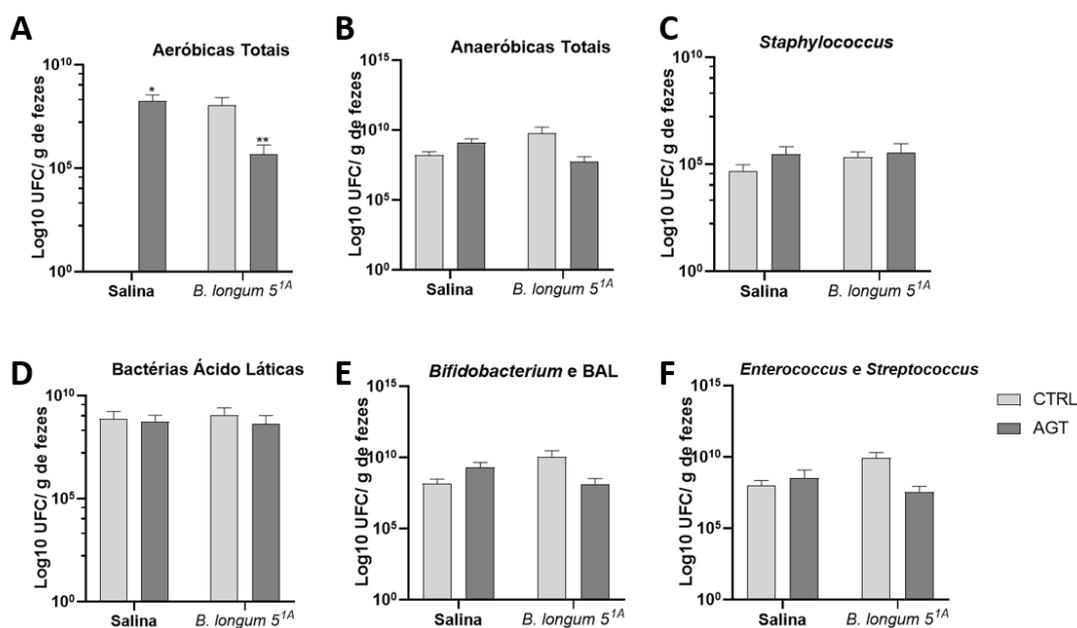
Os cultivos das populações da microbiota fecal em placas com meios seletivos e diferenciais não cresceram com 24 horas de estufa, por isso, as contagens foram realizadas com 48h de incubação. Mesmo assim, não houve crescimento bacteriano nos meios ágar *Bacteroides* Bile Esculina (BBE) adicionado de 0,1% v/v de gentamicina para isolamento de *Bacteroides*, e ágar MacConkey para isolamento de *Enterobacteriaceae*. Os resultados a seguir (figura 33) são da melhor diluição da placa e expressos em log₁₀ UFC/ mg de fezes.

Quando se observa a contagem das bactérias *Bifidobacterium* e Bactérias ácido lácticas (BAL), em anaerobiose, há uma tendência ($p = 0,0693$) à redução da contagem dessas bactérias em presença da mistura de agrotóxicos (as bactérias anaeróbicas totais apresentaram diferença estatística, com $p = 0,0065$ comparando-se os grupos AGT e AGT+PROB). A bifidobactéria é uma bactéria de caráter anaeróbico obrigatório. Em modelo murino (C57bl/6, exposição de 3 semanas), observa-se que a linhagem probiótica *Lactobacillus fermentum* U-21, uma bactéria BAL, é resistente ao herbicida paraquat. Sem o tratamento com o probiótico, há uma alta taxa de mortalidade, com intensa deterioração dos órgãos internos e prejuízo de neurônios dopaminérgicos. O tratamento com a cepa probiótica aumentou a taxa de sobrevivência dos animais, com coordenação do movimento e manutenção dos neurônios dopaminérgicos no cérebro preservados. Os autores sugerem, inclusive, que a cepa pode tratar estágios iniciais da doença de Parkinson (Marsova *et al.*, 2020). Desta forma, como não houve diferença estatística entre os grupos expostos e tratados na análise da BAL (aerobiose), sugere-se que a exposição à mistura de agrotóxicos pode afetar diretamente as bifidobactérias (anaerobiose), sem afetar a população de BAL.

Não houve diferença estatística quando se avaliou as outras culturas de bactérias (*Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*) entre os grupos expostos à mistura de agrotóxicos e os tratados com probiótico.

Figura 33 – Avaliação da microbiota cultivável nos camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico.

A – Aeróbicas em Ágar sangue; B – Anaeróbicas em ágar sangue suplementado com hemina e menadiona 1% v/v; C – *Staphylococcus* em ágar Manitol Salgado, D – Bactérias ácido lácticas (BAL) (aerobiose) em ágar De Man, Rogosa e Sharpe, E – *Bifidobacterium* e BAL (anaerobiose) em ágar De Man, Rogosa e Sharpe, F – *Streptococcus* e *Enterococcus* em ágar Bile Esculina. $p < 0,05$ para: Bactérias Aeróbicas: * $p = 0,0487$; ** $p = 0,0495$.



Fonte: dados da pesquisa.

5.3.2.2 Avaliação dos AGCC em conteúdo intestinal

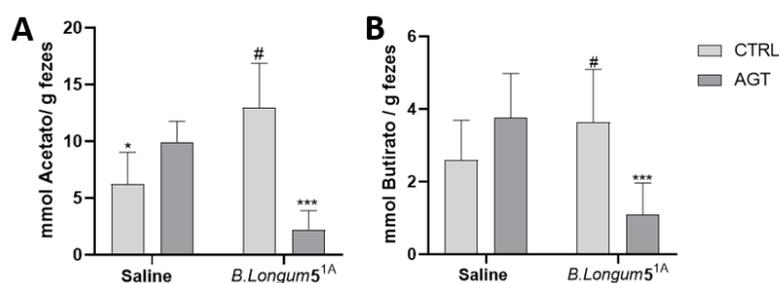
Além da microbiota cultivável, outra forma de avaliar se houve modulação da microbiota intestinal, tanto pelo probiótico quanto pela mistura de agrotóxicos, é dosando-se AGCC, metabólitos produzidos pelas bactérias por meio da fermentação de fibras da dieta. Para a avaliação dos AGCCs, acetato e butirato, foram aplicados os testes de normalidade (Shapiro-Wilk), de *outliers* (método de ROUT) e análise da variância ANOVA two-way.

Como esperado, o acetato foi produzido em maior quantidade pela *B. longum* 5^{1A}, mas, junto com o butirato, sofreu interferência na produção quando em presença da mistura de agrotóxicos (figura 34). *B. longum* 5^{1A} é uma linhagem produtora de acetato (Da Silva *et al.*, 2021) e a exposição à mistura de agrotóxicos indica uma disbiose porque a produção, tanto deste AGCC quanto de butirato, está reduzida no conteúdo fecal dos animais. Liu e colaboradores observaram, que em camundongos expostos ao tebuconazol, por 13 semanas (1,35 e 3,1 mg/kg

PC/ dia), o acúmulo de *Enterococcus* durante uma disbiose intestinal causada pelo agrotóxico leva à inflamação intestinal, reduzindo a flora produtora de butirato e, conseqüentemente, este ACGG no intestino. Além disso, eles observaram um aumento da permeabilidade intestinal e lesões nas microvilosidades. Eles também observaram um aumento significativo das bactérias *Enterobacteriaceae*, o que poderia promover um acúmulo de endotoxinas no lúmen intestinal (Liu *et al.*, 2021). Infelizmente, não houve crescimento destas bactérias no ágar MacConkey, que poderia corroborar ou não esta evidência.

Figura 34 – Análise dos AGCCs do conteúdo intestinal nos camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico.

A – Acetato, B – Butirato. Teste estatístico: ANOVA two-way. As barras representam o DP (desvio padrão). $p < 0,05$: * diferença entre CTRL e PROB (acetato $p = 0,0065$); # diferença entre PROB e AGT+PROB (acetato $p = 0,0001$; butirato $p = 0,0115$); *** diferença entre AGT e AGT+PROB (acetato $p = 0,0044$, butirato $p = 0,0084$).



Fonte: dados da pesquisa.

É possível visualizar, pela análise dos AGCC, que houve modulação da microbiota causada pela exposição à mistura de agrotóxicos com alteração, pelo menos, no metabolismo das bactérias intestinais. No estudo de Liu, citado anteriormente, os pesquisadores observaram 43 metabólitos diferentes em amostras de soro, fezes e fígado, quando compararam os grupos expostos e não-expostos ao tebuconazol, utilizando a técnica de análise metabolômica *untargeted* e *targeted*. Eles observaram também que estes metabólitos alterados estão diretamente envolvidos com doenças metabólicas como DM2 e obesidade, e conseguiram identificar quais eram provenientes da microbiota intestinal e quais eram do hospedeiro (Liu *et al.*, 2021).

5.3.3 Biomarcadores de efeito nos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos, tratados e não-tratados com o probiótico *B. longum* 5^{1A}

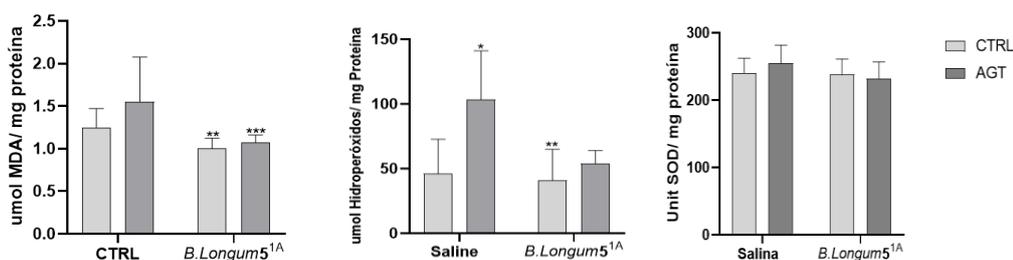
5.3.3.1 Avaliação do Estresse Oxidativo

Para avaliar a ação de radicais livres (EROs) sobre as membranas celulares, avalia-se a peroxidação lipídica por meio das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), como o Malondialdeído (MDA). Hidroperóxidos são produtos intermediários da reação de peroxidação. A dosagem da SOD é relativa a observação do balanço/ desbalanço do sistema antioxidante natural. A escolha do tecido hepático se deve ao fato de que, após absorvidos pelo TGI, os agrotóxicos sofrem metabolismo de primeira passagem no fígado. Os testes estatísticos aplicados foram de normalidade (Shapiro-Wilk), de *outliers* (método de ROUT) e análise da variância ANOVA two-way.

Apesar de não apresentar diferença estatística entre os grupos CTRL e AGT na dosagem de MDA no fígado, observa-se a peroxidação lipídica no fígado dos animais expostos pelo aumento de hidroperóxidos causado pela exposição à mistura de agrotóxicos ($p = 0,0335$) (figura 35). Observa-se também que os tratamentos com probiótico (PROB e AGT+PROB) foram capazes de reduzir tanto MDA quanto hidroperóxidos, comparando-se com os animais que receberam apenas a mistura de AGT. Não houve diferença estatística nas dosagens de SOD entre os grupos expostos e tratados.

Figura 35 – Avaliação do Estresse oxidativo nos camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico.

A – TBARS (MDA); B – Hidroperóxidos; C – SOD. Teste estatístico: ANOVA two-way. As barras representam o DP (desvio padrão). $p < 0,05$: * diferença entre CTRL e AGT; ** diferença entre AGT e PROB; *** diferença entre AGT e AGT+PROB. (MDA: ** $p = 0,0192$; *** $p = 0,0462$; Hidroperóxidos: * $p = 0,0335$; ** $p = 0,0392$).



Fonte: dados da pesquisa.

Muitos estudos relatam o efeito de agrotóxicos sobre a indução do estresse oxidativo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Abdel-Halim e Osman testaram, *in vitro* células humanas normais (linhagem celular WPM-Y.1 epitelial da próstata), concentrações subletais de imidacloprido e glifosato e observaram um aumento no nível de malondialdeído (MDA) em comparação com as células não tratadas. Houve também uma rápida diminuição do conteúdo de glutathiona (GSH) e da atividade da glutathiona-S-transferase (GST) e aumento nas atividades da catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). Os pesquisadores concluíram que os dois agrotóxicos são capazes de causar estresse oxidativo e eventos apoptóticos (Abdel-Halim; Osman, 2020). Bali e colaboradores observaram que camundongos que receberam diariamente com glifosato, em duas diferentes doses (250 ou 500 mg/kg PC), em exposições subcrônicas (6 semanas) e crônicas (12 semanas), apresentaram redução nas atividades da SOD e peroxidase, no cérebro dos animais. Os pesquisadores também observaram que os animais apresentaram deficiência na memória de reconhecimento (Bali *et al.*, 2019). Ratos Wistar tratados com tebuconazol (100 mg/kg PC) demonstraram um aumento na concentração de MDA no tecido testicular, indicativo de superprodução de EROs. Quando produzidas em excesso, as EROs causam lesão tecidual, incluindo oxidação de proteínas e danos ao DNA. As atividades de GPx e SOD também foram reduzidas pela exposição ao tebuconazol (Hajer *et al.*, 2020).

Os probióticos são conhecidos por muitos efeitos benéficos à saúde e algumas linhagens específicas podem apresentar atividade antioxidante e reduzir os danos causados pela oxidação promovida por processos inflamatórios. Bactérias têm seus próprios sistemas antioxidantes, como a Mn-SOD e a catalase, além de produzir metabólitos antioxidantes, como a glutathiona e o butirato, e estimular o sistema antioxidante do hospedeiro. Os probióticos, ao regular a composição da microbiota intestinal, inibem a proliferação excessiva de bactérias nocivas, o que também pode contribuir para a diminuição do estresse oxidativo (Wang *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos neste presente estudo indicam que a mistura foi capaz de causar um estresse oxidativo por peroxidação lipídica, sendo este estresse amenizado pelo tratamento com o probiótico, mesmo a mistura de agrotóxicos desfavorecendo o crescimento e metabolismo das bifidobactérias. Entretanto, não é possível afirmar que a exposição não causou desbalanço enzimático antioxidante apenas com a dosagem da SOD.

5.3.3.2 Ensaio de Micronúcleo

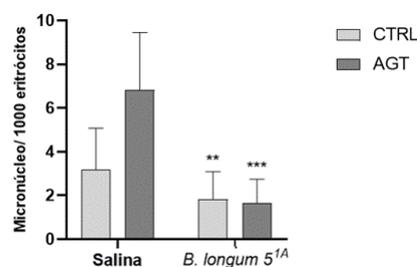
A frequência de micronúcleos (MN) é utilizada como biomarcador de efeito para detectar as mutações causadas por perda de cromatina por dano cromossômico estrutural ou no processo mitótico. Os testes estatísticos aplicados foram de normalidade (Shapiro-Wilk), de *outliers* (método de ROUT) e análise da variância ANOVA two-way.

Os animais expostos (AGT) apresentaram aumento na frequência de micronúcleos, comparado com os animais controle (CTRL), com $p = 0,0115$. O tratamento com o probiótico foi capaz de prevenir a formação dos MN (figura 36), sendo que o grupo AGT+PROB apresentou uma frequência de $1,66 \pm 1,08$ MN/ 1000 eritrócitos, enquanto que o grupo AGT apresentou frequência de $(6,83 \pm 2,62)$, com $p = 0,0005$.

Nas lâminas coradas com Panótico (figura 37), é possível ver os MN (setas) nas figuras A, B e E, em aumento de 400x, corados em azul escuro, de formatos arredondados, não refringentes, dentro de eritrócitos com citoplasma íntegro. Na figura F (AGT), para exemplificar o aumento da frequência nos animais expostos à mistura, estão presentes 3 MN que não foram contados por não apresentarem os requisitos necessários de avaliação.

Figura 36 – Avaliação da frequência de micronúcleos em sangue periférico de camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico.

Teste estatístico: ANOVA two-way. As barras representam o DP (desvio padrão). $p < 0,05$: * diferença entre CTRL e AGT ($p = 0,0115$); ** diferença entre AGT e PROB ($p=0,0006$); *** diferença entre AGT e AGT+PROB ($p=0,0005$).



Fonte: dados da pesquisa.

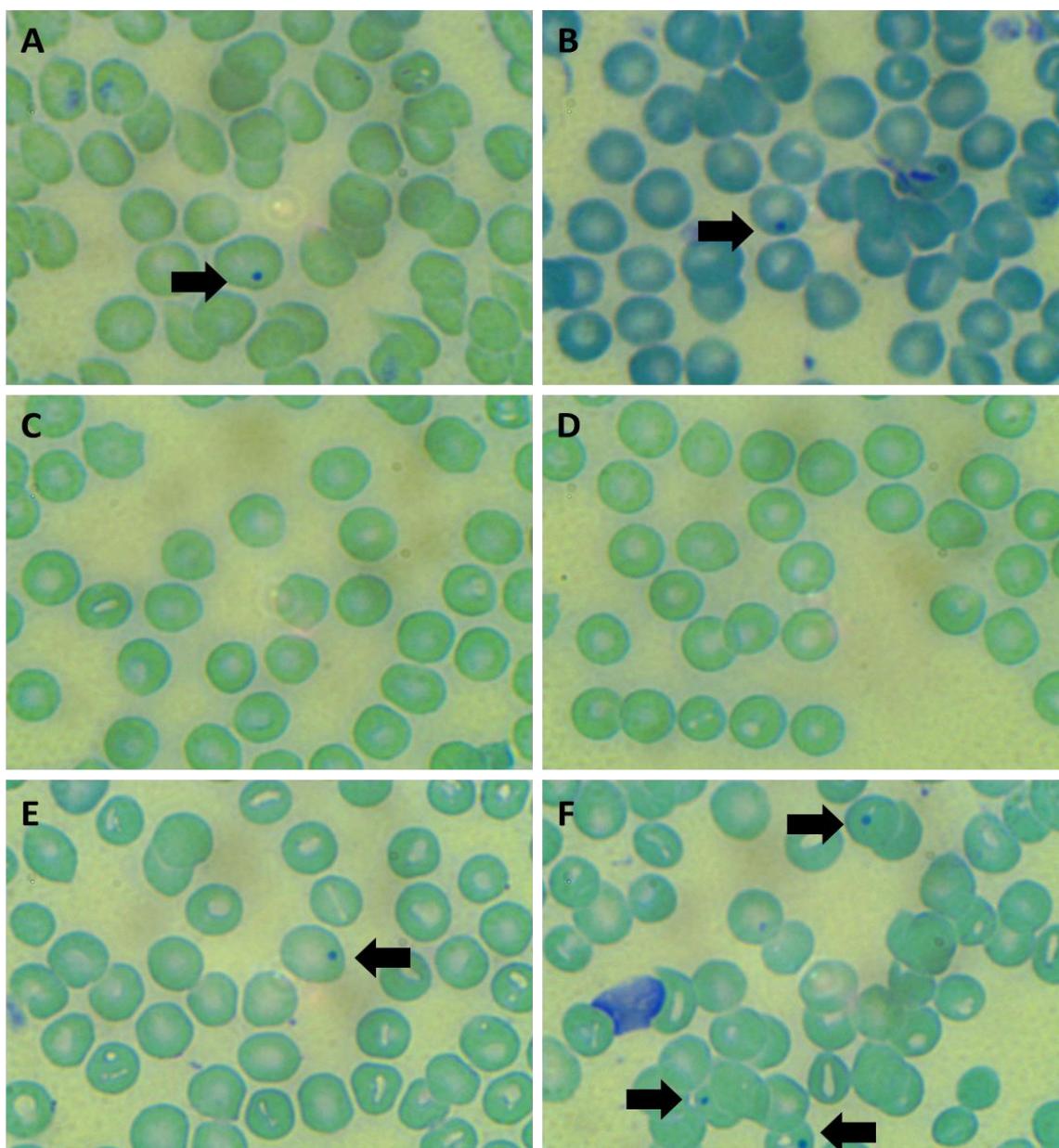
A avaliação do estresse oxidativo, ao se dosar as substâncias formadas por peroxidação lipídica (MDA e hidroperóxidos), indica se a exposição induz a formação de EROs, que podem sobrecarregar o sistema antioxidante natural e causar genotoxicidade, visualizada pela formação de micronúcleos (Valente *et al.*, 2016; Mossa *et al.*, 2018; Chaufan *et al.*, 2019). Agrotóxicos são capazes de causar estresse oxidativo, levando a danos no DNA. A mistura

utilizada neste estudo foi capaz de causar peroxidação lipídica nas células do fígado, evidenciado pelo aumento da concentração de hidroperóxidos.

Recentemente, a eliminação de xenobióticos por microrganismos, como probióticos, tem sido extensivamente estudada, mas esta atividade protetora é dependente de vários fatores como: tipo de linhagem do probiótico, pH médio intestinal, estrutura e concentração do xenobiótico (Djekkoun *et al.*, 2020; Yousefi *et al.*, 2020). Comparada a outras linhagens de bifidobactérias, a linhagem 5^{1A} de *B. longum* possui 26 genes únicos, seis possivelmente relacionados ao metabolismo de carboidratos e produção de acetato, oferecendo mais benefícios à saúde do hospedeiro, como a redução da inflamação e atenuação de danos intestinais causados pela resposta inflamatória (Da Silva *et al.*, 2021). Pela primeira vez, a linhagem *B. longum* 5^{1A} foi usada com intuito de metabolizar agrotóxicos e o presente estudo demonstrou, inicialmente, que a mistura de agrotóxicos afeta o crescimento e a produção de AGCC pela bifidobactéria. Entretanto, apesar da diminuição da produção dos metabólitos, o probiótico foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica no fígado e a frequência de MN no sangue periférico dos animais, indicando outra via protetiva sobre a exposição à mistura. Os chamados ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato, butirato, lactato), formados por fermentação na degradação secundária dependente de substrato (fibras), são muito estudados por beneficiar o hospedeiro, onde o acetato é fonte de energia para tecidos periféricos do hospedeiro, participando da lipogênese, no tecido adiposo e no músculo; e o butirato mantém a integridade da barreira intestinal e atua na diminuição da inflamação crônica, sendo o principal substrato energético para colonócitos (Young *et al.*, 2017; Caminero *et al.*, 2019; Zmora *et al.*, 2019; Cruz *et al.*, 2021; Hou *et al.*, 2022). A *B. longum* 5^{1A}, como probiótico, auxiliou o organismo dos animais a manter a integridade celular, em via independente da produção de AGCC. O fígado e a microbiota têm papéis importantes na regulação do metabolismo energético do hospedeiro e do metabolismo dos xenobióticos, sendo que a microbiota também é capaz de regular enzimas metabólicas do hospedeiro, como o citocromo P450 (Jiang, *et al.*, 2021). Algumas linhagens específicas de probióticos apresentam atividade antioxidante e reduzem os danos causados pela oxidação promovida por processos inflamatórios, por exemplo. A ação protetiva de *B. longum* 5^{1A} pode ter sido conferida por seus próprios sistemas antioxidantes, como a Mn-SOD, catalase e glutatona, que auxiliaram o sistema antioxidante do hospedeiro.

Figura 37 – Ensaio de Micronúcleos em sangue periférico de camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico.

A: Grupo não exposto (CTRL). B: Grupo não exposto e tratado com probiótico (PROB). C e D: Grupo exposto à mistura de AGT e tratado com probiótico (AGT+PROB). E e F: Grupo exposto à mistura de AGT. Coloração Panótico rápido. Aumento: 400x, Seta sinaliza micronúcleo.



Fonte: do autor.

5.3.4 Análise Metabolômica no soro dos camundongos expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos, tratados e não-tratados com o probiótico *B. longum* 5^{1A}

5.3.4.1 Análise Metabolômica no soro dos camundongos (todos os grupos)

A análise metabolômica *Untargeted* para os quatro grupos (CTR, AGT, PROB e AGT+PROB) foi realizada com o mesmo pré-processamento e processamento de dados citado anteriormente foi realizado também utilizando as ferramentas dos softwares ChemStation, AMDIS, MPP e Metaboanalyst 6.0.

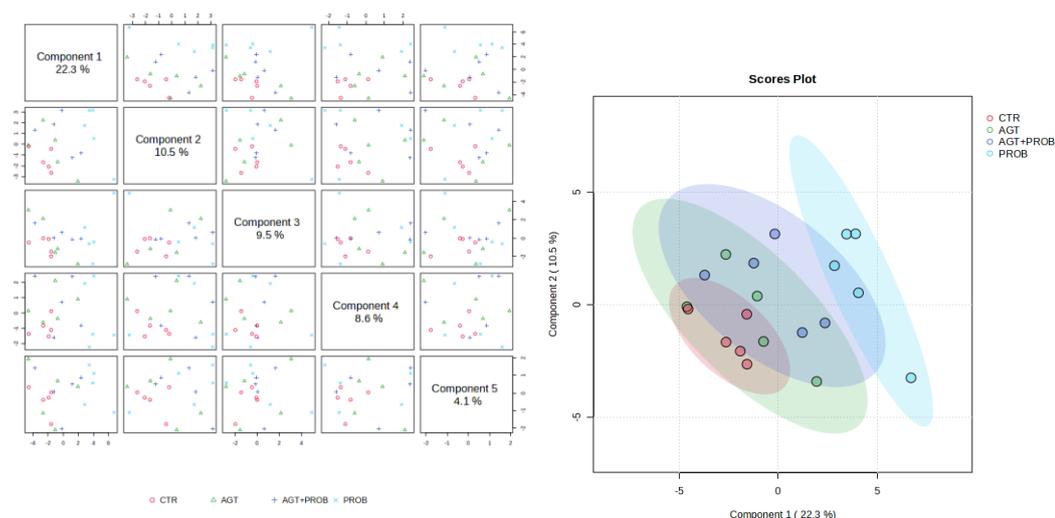
Os QCs apresentaram similaridade nas aquisições, tanto para RT quanto em abundância. Não houve grande variação entre os RTs teóricos e aplicados do padrão de C18 e do F.A.M.E. mix. Os brancos não apresentaram contaminações relevantes. Foram excluídos da tabela de dados gerados: *2-hydroxipiridine* (proveniente da derivatização) e *phthalate* (proveniente dos tubos e ponteiros plásticos).

No Metaboanalyst 6.0, a filtragem dos dados foi de 5% tanto para o filtro de variância (DPR não paramétrico) quanto para o filtro de abundância (valor de intensidade mediana). Três metabólitos foram excluídos. Para normalização dos dados foi utilizado o método da Mediana (*Median*); os dados foram transformados por *log transformation* e auto escalonados (*Auto Scaling*). O PCA demonstrou que os QCs se agrupam fortemente no gráfico de pontuações, indicando que houve estabilidade analítica, qualidade e confiabilidade dos dados obtidos. Não foi removida nenhuma amostra anômala (*outlier*).

A PLS-DA foi realizada com os dados novamente normalizados (da mesma forma citada anteriormente), sem a presença dos QCs. A figura 38 ilustra a separação supervisionada dos dados de todos os grupos do estudo.

A validação do modelo, para cinco componentes principais, apresentou $R^2 = 0,5859$ e $Q^2 = 0,2141$, com acurácia de 45%. O teste de permutação não foi realizado porque ele é indicado apenas para grandes conjuntos de dados. A figura 39 apresenta os dados de R^2 , Q^2 e acurácia da análise de PLS-DA entre todos os grupos (CTR, AGT, PROB e AGT+PROB). Observa-se que não houve uma separação clara entre todos os grupos e o parâmetro de previsibilidade do modelo foi insatisfatório ($Q^2=0,21$). Por isso, a avaliação do tratamento com o probiótico foi realizada apenas comparando-se dois grupos.

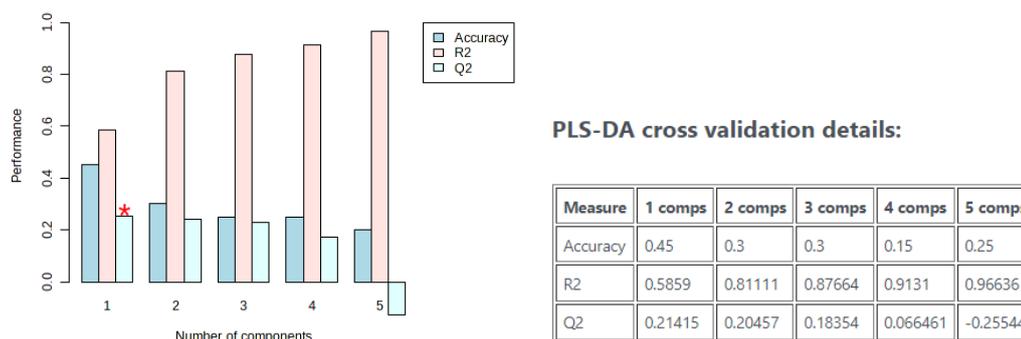
Figura 38 – Modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) indicando a discriminação dos quatro grupos (CTR, AGT, PROB e AGT+PROB).



Fonte: do autor, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

Figura 39 – Classificação do modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) pela validação cruzada dos quatro grupos (CTR, AGT, PROB e AGT+PROB).

$R^2 = 0,5859$ (adequação do modelo); $Q^2 = 0,21415$ (previsibilidade do modelo); acurácia (accuracy) = 0,45 (45%).

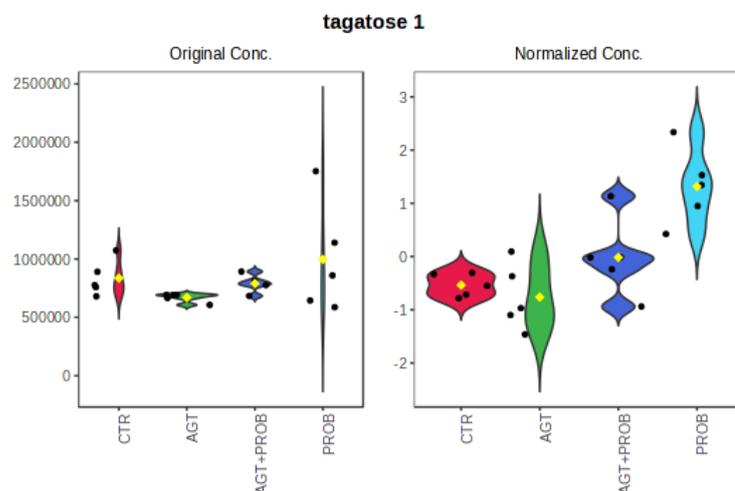


Fonte: do autor, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

Quando realizada a análise ANOVA one-way (Tukey pos-hoc), apenas a Tagatose (figura 41) apresentou significância entre todos os grupos ($p < 0,05$), indicando que este metabólito pode ser proveniente da microbiota intestinal e que a disbiose causada pela mistura de agrotóxicos alterou o metabolismo bacteriano.

Figura 40 – Análise estatística (não-paramétrica) tagatose nos quatro grupos (CTR, AGT, PROB e AGT+PROB).

Valores expressos em abundância.



Fonte: do autor, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

5.3.4.2 Análise Metabolômica no soro dos camundongos tratados e não-tratados com o probiótico *B. longum* 5^{IA}

Antes de avaliar a modulação da microbiota intestinal pela *B. longum* 5^{IA} e sua capacidade de auxiliar na eliminação dos agrotóxicos da mistura que os animais do estudo foram expostos, a análise metabolômica *Untargeted* para o probiótico foi avaliada. O intuito foi confirmar informações da literatura sobre os benefícios da *B. longum* 5^{IA}.

O mesmo pré-processamento e processamento de dados citados anteriormente foram realizados, também utilizando as ferramentas dos softwares ChemStation, AMDIS, MPP e Metaboanalyst 6.0.

Os QCs apresentaram similaridade nas aquisições, tanto para RT quanto em abundância. Não houve grande variação entre os RTs teóricos e aplicados do padrão de C18 e do F.A.M.E. mix. Os brancos não apresentaram contaminações relevantes. Foram excluídos da tabela de dados gerados: *2-hydroxipiridine* (proveniente da derivatização) e *phthalate* (proveniente dos tubos e ponteiros plásticos).

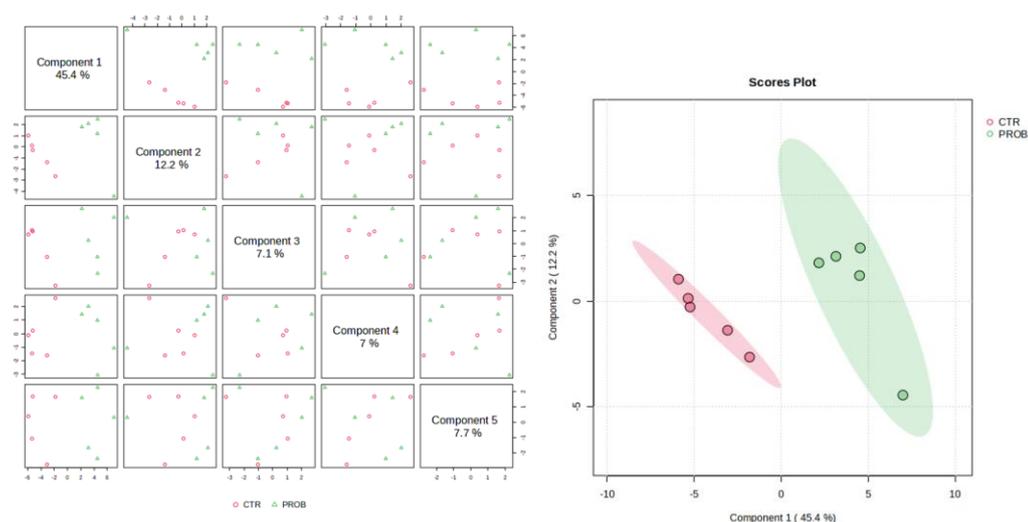
No Metaboanalyst 6.0, a filtragem dos dados foi de 5% tanto para o filtro de variância (DPR não paramétrico) quanto para o filtro de abundância (valor de intensidade mediana). Três

metabólitos foram excluídos. Para normalização dos dados foi utilizado o método de Soma (*sum*); os dados foram transformados por *log transformation* e auto escalonados (*Auto Scaling*). O PCA demonstrou que os QCs se agrupam fortemente no gráfico de pontuações, indicando que houve estabilidade analítica, qualidade e confiabilidade dos dados obtidos. Não foi removida nenhuma amostra anômala (*outlier*).

A PLS-DA foi realizada com os dados novamente normalizados (da mesma forma citada anteriormente), sem a presença dos QCs. A figura 41 ilustra a separação supervisionada dos dados dos animais tratados e não tratados com *B. longum 5^{IA}*.

A validação do modelo, para cinco componentes principais, apresentou $R^2 = 0,9660$ e $Q^2 = 0,8016$, com acurácia de 100%. O teste de permutação não foi realizado porque ele é indicado apenas para grandes conjuntos de dados. A figura 42 apresenta os dados de R^2 , Q^2 e acurácia da análise de PLS-DA entre os grupos tratados e não tratados com *B. longum 5^{IA}*.

Figura 41 – Modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) indicando efetiva discriminação entre os grupos tratados e não tratados com *B. longum 5^{IA}*.

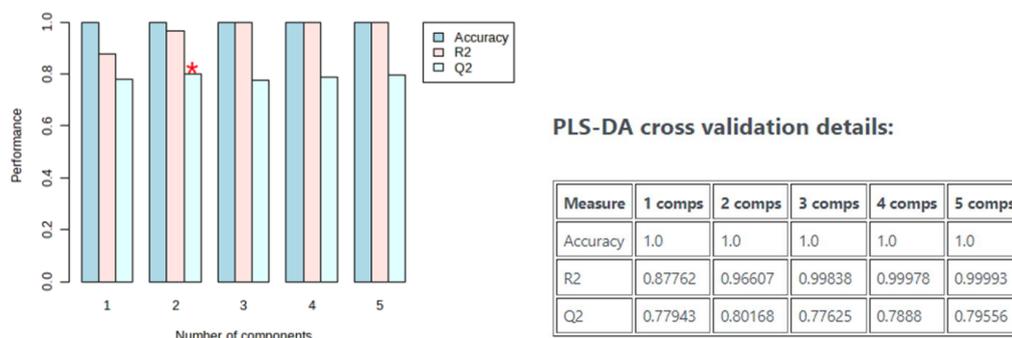


Fonte: do autor, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

Os vinte e dois metabólitos apontados na figura 43 tem $VIP > 1$, sendo os mais influentes para o modelo e, desta forma, discriminaram os perfis dos animais tratados e não tratados com *B. longum 5^{IA}*. As caixas à direita indicam as concentrações relativas (vermelha/ azul) do metabólito correspondente em cada grupo em estudo.

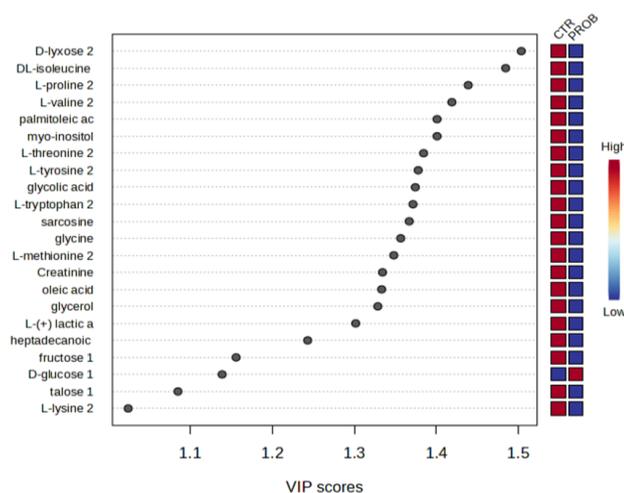
Figura 42 – Classificação do modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) pela validação cruzada entre os grupos tratados e não tratados com *B. longum* 5^{1A}.

R²= 0,9660 (adequação do modelo); Q²= 0,8016 (previsibilidade do modelo); acurácia (accuracy) = 1,0 (100%).



Fonte: do autor, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

Figura 43 – Valores da pontuação VIP de 22 metabólitos identificados no modelo de PLS-DA entre os grupos tratados e não tratados com *B. longum* 5^{1A}.



Fonte: do autor, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

Utilizando o software Metaboanalyst 6.0, tabela 21 representa a correlação entre o valor VIP, o test t (não-paramétrico) e o *fold change* dos metabólitos discriminantes identificados na análise metabolômica do soro dos animais tratados e não tratados com o probiótico. Por meio da *Pathway Analysis*, as vias metabólicas possivelmente alteradas pela exposição também estão identificadas na tabela 21.

Tabela 19 – Metabólitos discriminadores na análise metabolômica pela técnica CG-EM, no soro do grupo tratados com *B. longum* 5^{1A} comparados com os animais não tratados.

Metabólito	VIP	p.value	Fold Change	Regulação	Classe	Via metabólica
<i>D-lyxose</i>	1,503 5	0,000055	2,7733	Down	Monossacarídeo	Metabolismo de aminoácidos e açúcares nucleotídeos.
<i>DL-isoleucine</i>	1,484 4	0,000111	2,8149	Down	Aminoácidos, peptídios e análogos	Biossíntese de valina, leucina e isoleucina
<i>L-proline</i>	1,438 8	0,000405	3,2343	Down	Aminoácidos, peptídios e análogos	Metabolismo de arginina e prolina; Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato
<i>L-valine</i>	1,418 9	0,000634	2,94	Down	Aminoácidos, peptídios e análogos	Biossíntese de valina, leucina e isoleucina
<i>Palmitoleic acid</i>	1,400 8	0,000914	2,0255	Down	Hidroxi-ácido	Degradação de ácidos graxos
<i>Myo-inositol</i>	1,400 8	0,000914	2,875	Down	Monossacarídeo	Metabolismo da galactose; Metabolismo do fosfato de inositol
<i>L-threonine</i>	1,384 4	0,001237	3,6803	Down	Aminoácidos, peptídios e análogos	Metabolismo de glicina, serina e treonina; Biossíntese de valina, leucina e isoleucina
<i>L-tyrosine</i>	1,377 8	0,001387	2,6862	Down	Aminoácidos, peptídios e análogos	Biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano
<i>Glycolic acid</i>	1,374 3	0,001472	2,4539	Down	Ácido Orgânico	Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato
<i>L-tryptophan</i>	1,371 5	0,001544	3,1025	Down	Aminoácidos, peptídios e análogos	Metabolismo do triptofano
<i>Sarcosine</i>	1,366 9	0,001666	3,0019	Down	Aminoácidos, peptídios e análogos	Metabolismo de glicina, serina e treonina
<i>Glycine</i>	1,356 5	0,001965	3,4242	Down	Aminoácidos, peptídios e análogos	Metabolismo de glicina, serina e treonina; Metabolismo da Glutaciona; Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato; Biossíntese primária de ácidos biliares
<i>L-methionine</i>	1,348	0,002237	3,8276	Down	Aminoácidos, peptídios e análogos	Metabolismo da cisteína e metionina
<i>Creatinine</i>	1,334 3	0,002735	3,7002	Down	Amina	Metabolismo de glicina, serina e treonina
<i>Oleic acid ((9z)-octadecenoic acid)</i>	1,333 3	0,002775	166900 0000	Down	Ácido graxo monoinsaturado	Biossíntese de ácidos graxos insaturados
<i>Glycerol</i>	1,328 6	0,002963	12,049	Down	Álcool	Metabolismo glicerolípídico; Metabolismo da galactose
<i>L-(+) lactic acid</i>	1,301 7	0,004229	5,5526	Down	Ácido Orgânico	Metabolismo do piruvato
<i>Heptadecanoic acid</i>	1,243 1	0,008245	2,0312	Down	Ácido graxo saturado	Degradação de ácidos graxos; Biossíntese de ácidos graxos.

Fonte: dados da pesquisa.

Pela análise do metaboloma dos animais tratados, uso da *B.longum* 5^{1A} altera: biossíntese de valine, leucina e isoleucina, fenilalanina, tirosina e triptofano; metabolismo da arginina e prolina, glicina, serina e treonina; cisteína e metionina; degradação da lisina; metabolismo do glioxilato e dicarboxilato; metabolismo da galactose; metabolismo do Inositol fosfato; metabolismo da glutatona; metabolismo de glicolipídeos; degradação de ácidos graxos; biossíntese de ácidos graxos insaturados; metabolismo do piruvato; e metabolismo do amido e sacarose. Todos os metabólitos discriminados, exceto a glicose, estão diminuídos (*down regulation*) nos animais tratados com o probiótico. A microbiota intestinal é capaz de metabolizar inúmeras substâncias, incluindo contaminantes ambientais. O uso de probióticos para modular a microbiota intestinal é citado por vários autores como benéfico para a saúde do hospedeiro. Biotransformações catalisadas pelo microbioma intestinal podem proteger o hospedeiro de vários contaminantes ambientais (Haiser; Turnbaugh, 2013; Zimmermann *et al.*, 2019). A microbiota intestinal, assim como o TGI do hospedeiro, são os primeiros que entram em contato com os contaminantes ambientais, quando presentes na alimentação. Sabe-se que substâncias químicas desreguladoras endócrinas, além de causar disbiose, também podem aumentar o risco de DM2 devido aos efeitos no metabolismo da glicose e disfunção mitocondrial, levando também à obesidade. Recentemente, a eliminação de xenobióticos por microrganismos, como bactérias lácticas e probióticos, tem sido extensivamente estudada e a degradação de agrotóxicos, por exemplo, por enzimas hidrolíticas, tem-se destacado. Mas esta atividade protetora é dependente de vários outros fatores como: tipo de cepa do probiótico, pH médio intestinal, fase de crescimento do hospedeiro, estrutura e concentração do xenobiótico (Djekkoun *et al.*, 2020; Yousefi *et al.*, 2020).

Poucos são os artigos que fazem análise metabolômica de animais tratados com probióticos. Em uma análise genômica da cepa probiótica produtora de ácido láctico (*Lactobacillus reuteri* S5) indica que ela tem uma via metabólica primária completa, codificando as principais enzimas funcionais da via da glicólise e da via das pentoses fosfato, além de genes codificadores de antioxidantes, indicando que ela tem excelentes características probióticas (Shi *et al.*, 2022). Um estudo que correlacionou genoma e metaboloma da cepa probiótica identificou que no probiótico *Limosilactobacillus fermentum* LAB-1 (bactéria ácido láctica) estavam presentes as vias completas do metabolismo central de carboidratos, incluindo glicólise, oxidação do piruvato, via das pentoses fosfato e gliconeogênese, indicando seu potencial probiótico em aplicações alimentares funcionais, biotecnológicas e relacionadas com a saúde (Hossain, 2022).

Da Silva e colaboradores (2021), em estudo genômico, identificaram 26 genes únicos na *B. longum* 5^{1A}, onde 6 genes relacionam-se diretamente a vias metabólicas de carboidratos (transportador de açúcar; carboidrato quinase; D-lisose cetol isomerase; regulador transcricional DeoR/GlpR; ribulose-fosfato 3-epimerase; D-arabinose 5-fosfato isomerase GutQ). Os pesquisadores sugerem que estes seis genes estão envolvidos no metabolismo da arabinose e da lisose, pois formam produtos com funções semelhantes às enzimas que modificam esses monossacarídeos em xilulose 5-fosfato, que é convertida em acetil fosfato, sem utilização de ATP, pela enzima frutose 6-fosfato fosfocetolase.

Desta forma, a partir dos metabólitos identificados na análise metabolômica e identificação das vias metabólicas é possível confirmar que o probiótico *B. longum* 5^{1A} modula de forma positiva a microbiota intestinal, beneficiando o hospedeiro, sendo passível de utilização para eliminar contaminantes ambientais e restabelecer a homeostasia alterada por estas substâncias.

5.3.4.3 Análise Metabolômica do soro dos camundongos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com o probiótico *B. longum* 5^{1A}

Com o intuito de avaliar a modulação da microbiota intestinal pela *B. longum* 5^{1A} e sua capacidade de auxiliar na eliminação dos agrotóxicos da mistura que os animais do estudo foram expostos, a análise metabolômica *Untargeted* também foi avaliada. O mesmo pré-processamento e processamento de dados citado anteriormente foram realizados, também utilizando as ferramentas dos softwares ChemStation, AMDIS, MPP e Metaboanalyst 6.0.

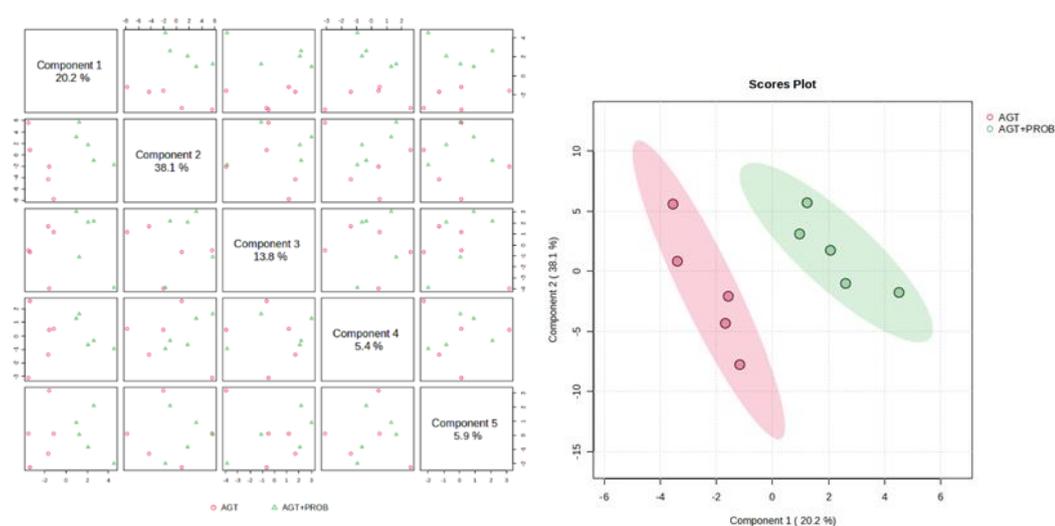
Os QCs apresentaram similaridade nas aquisições, tanto para RT quanto em abundância. Não houve grande variação entre os RTs teóricos e aplicados do padrão de C18 e do F.A.M.E. mix. Os brancos não apresentaram contaminações relevantes. Foram excluídos da tabela de dados gerados: *2-hydroxipiridine* (proveniente da derivatização) e *phthalate* (proveniente dos tubos e ponteiros plásticos).

No Metaboanalyst 6.0, a filtragem dos dados foi de 5% tanto para o filtro de variância (DPR não paramétrico) quanto para o filtro de abundância (valor de intensidade mediana). Três metabólitos foram excluídos. Para normalização dos dados foi utilizado o método de Soma (*sum*); os dados foram transformados por *log transformation* e auto escalonados (*Auto Scaling*). O PCA demonstrou que os QCs se agrupam fortemente no gráfico de pontuações, indicando

que houve estabilidade analítica, qualidade e confiabilidade dos dados obtidos. Não foi removida nenhuma amostra anômala (*outlier*).

A PLS-DA foi realizada com os dados novamente normalizados (da mesma forma citada anteriormente), sem a presença dos QCs. A figura 44 ilustra a separação supervisionada dos dados dos animais expostos e não expostos à mistura de agrotóxicos.

Figura 44 – Modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) indicando efetiva discriminação entre os grupos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com o probiótico *B. longum* 5^{1A}.

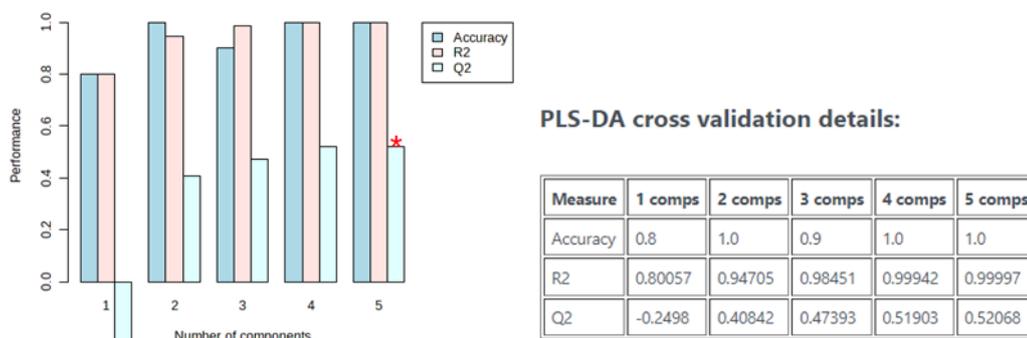


Fonte: do autor, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

A validade dos resultados obtidos na PLS-DA foi testada com o teste de validação cruzada (5-fold). A validação do modelo, para cinco componentes principais, apresentou $R^2 = 0,999$ e $Q^2 = 0,521$, com acurácia de 100%. O teste de permutação não foi realizado porque ele é indicado apenas para grandes conjuntos de dados. A figura 46 apresenta os dados de R^2 , Q^2 e acurácia da análise de PLS-DA entre os grupos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com o probiótico *B. longum* 5^{1A}. Os vinte metabólitos mais importantes ($VIP > 1$) para o modelo estão identificados na figura 45. As caixas à direita indicam as concentrações relativas (vermelha/azul) do metabólito correspondente em cada grupo em estudo.

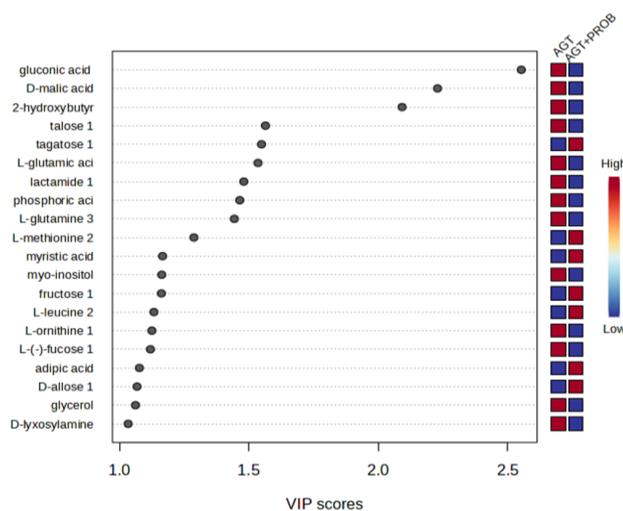
Figura 45 – Classificação do modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) pela validação cruzada dos grupos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com o probiótico *B. longum* 5^{1A}.

R²= 0,999 (adequação do modelo); 0,521 (previsibilidade do modelo); acurácia (accuracy) = 1,0 (100%).



Fonte: do autor, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

Figura 46 – Valores da pontuação VIP de 20 metabólitos identificados no modelo de PLS-DA dos grupos expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com o probiótico *B. longum* 5^{1A}.



Fonte: do autor, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

Utilizando o software Metaboanalyst 6.0, a tabela 22 representa a correlação entre o valor VIP, o test t (não-paramétrico - valor p) e o *fold change* dos metabólitos discriminantes identificados na análise metabolômica do soro dos animais expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com o probiótico *B. longum* 5^{1A}. Por meio da *Pathway Analysis*, as vias metabólicas possivelmente alteradas pela exposição e pelo tratamento também estão identificadas na tabela. Apesar de 20 metabólitos terem VIP > 1, apenas quatro apresentaram p < 0,05.

Tabela 20 – Metabólitos discriminadores na análise metabolômica pela técnica CG-EM, no soro de camundongos expostos à mistura de agrotóxicos) comparado com os tratados com o probiótico *B. longum* 5^{1A}.

Metabólito	VIP	Fold Change	p valor	Regulação	Classe	Via metabólica
<i>Gluconic acid</i>	2,552	1,8349	0,00793	Up	Ácido Carboxílico	Via das pentoses fosfato
<i>L-glutamine</i>	1,444	3,4929	0,00793	Up	Aminoácidos, peptídios e análogos	Biossíntese de arginina; Metabolismo do nitrogênio; Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato; Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato; Metabolismo pirimidina; Metabolismo das purinas; Metabolismo da glutatona; Metabolismo de arginina e prolina.
<i>2-hydroxy butyric acid</i>	2,092	1,7198	0,03174	Up	Ácido Hidroxi-carboxílico	Metabolismo de ácidos graxos
<i>D-malic acid</i>	2,229 1	2,8694	0,0317	Up	Ácido Dicarboxílico	Metabolismo energético, Biossíntese de ácidos graxos.

Fonte: dados da pesquisa.

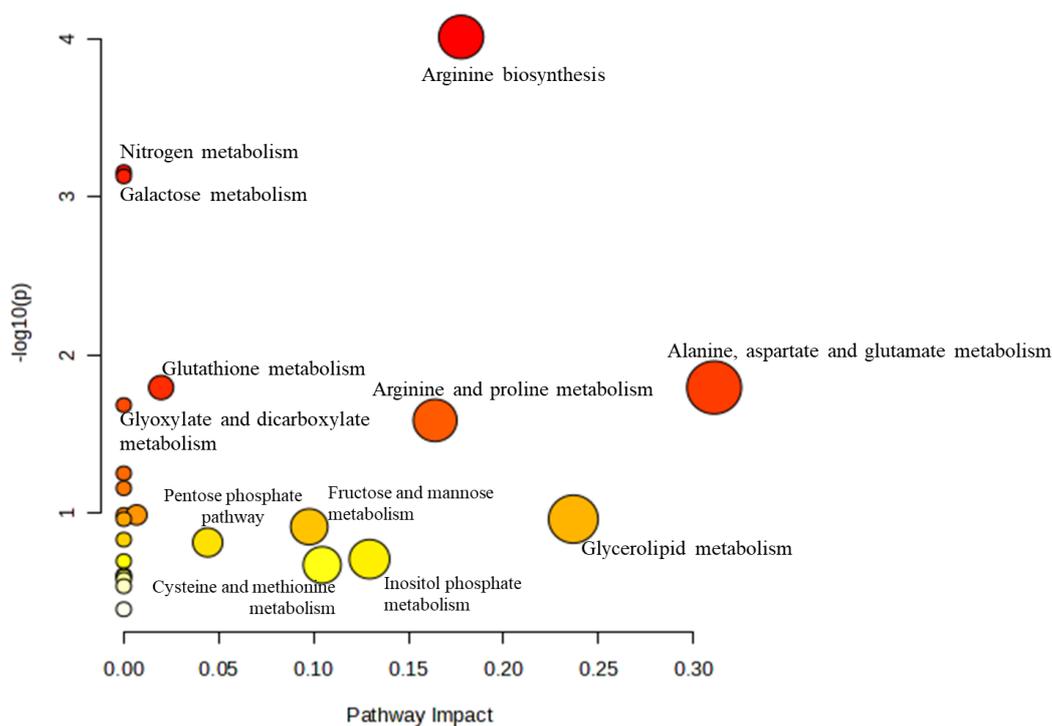
5.3.4.4 Análise das vias metabólicas alteradas pela exposição à mistura de agrotóxicos e tratamento com o probiótico *B. longum* 5^{1A}

O tratamento com o probiótico nos animais expostos à mistura de agrotóxicos identificou, além da via do metabolismo de glioxilato e dicarboxilato, outras vias metabólicas alteradas pela exposição à mistura de agrotóxicos, como a via das pentoses fosfato, biossíntese de arginina; metabolismo do nitrogênio; metabolismo de alanina, aspartato e glutamato; metabolismo pirimidina; metabolismo das purinas; metabolismo da glutatona; metabolismo de arginina e prolina; metabolismo propanoato; metabolismo de ácidos graxos. As alterações podem ser visualizadas na figura 47 pela visão geral da análise das vias gerada pelo MetabolAnalyst 6.0.

Não foram encontrados estudos metabolômicos com exposição a agrotóxicos e tratamento com probiótico simultâneos. Em um estudo de exposição ao íon metálico do cobre, *in vitro*, onde as cinco estirpes de probióticos testadas (bactérias do ácido láctico), baixas doses do íon alteraram a via das pentoses fosfato e o metabolismo da pirimidina. Com o aumento das doses, os principais metabolismos de aminoácidos e lipídios começaram a se alterar também, causando

inibição do crescimento das bactérias e prejudicando a produção de metabólitos primários dos microrganismos (Li *et al.*, 2023b). Considerando este estudo, é possível que, com a mistura afetando o crescimento e metabolismo do probiótico, os benefícios visualizados anteriormente para o tratamento com a *B. longum* 5^{1A} podem não serem todos atingidos, se houver exposição em doses maiores do que a do presente estudo. Isso explicaria apenas quatro metabólitos discriminantes apresentando $p < 0,05$.

Figura 47 – Visão geral da análise das vias metabólicas alteradas pela exposição à mistura de agrotóxicos e tratamento com o probiótico *B. longum* 5^{1A}.



Fonte: do autor, gerado pelo metaboanalyst 6.0.

Ácido glicônico

A alteração de ácido glicônico nos animais expostos à mistura de agrotóxicos indica, segundo a análise das vias pelo Metaboanalyst 6.0, que a via das pentoses fosfato foi alterada.

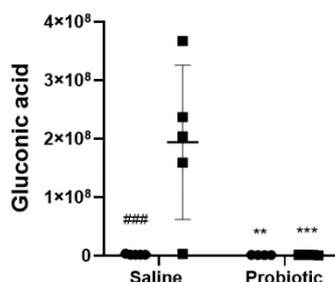
No cérebro, como a glicose é o substrato energético obrigatório, os neurônios a metabolizam principalmente por meio da via das pentoses fosfato, para manter as defesas antioxidantes (NADPH) adequadas. O herbicida paraquat, por exemplo, altera a via das pentoses fosfato

(positivamente) e os níveis de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), a enzima que regula negativamente a glicólise e o ciclo do ácido cítrico. Esta alteração no metaboloma indica que a exposição ao paraquat aumenta o risco de desenvolvimento da doença de Parkinson por causar do estresse oxidativo e, conseqüentemente, disfunção mitocondrial (Lei *et al.*, 2014). Estudo com a planta *Arabidopsis thaliana* indica que o herbicida Glifosato causa aumento geral de glutathiona e na atividade de enzimas antioxidantes (como a catalase e todos os componentes enzimáticos do ciclo ascorbato-glutathiona), assim como das duas enzimas da fase oxidativa da via das pentoses fosfato, G6PD e 6-fosfogluconato desidrogenase, envolvidas na geração de NADPH (Freitas-Silva *et al.*, 2017). O piretroide fenvalerato, em camundongos machos, causou alterações nos hormônios tireoidianos, e a análise metabolômica indicou modificações na via da pentose fosfato, o metabolismo do amido e da sacarose, no metabolismo dos ácidos graxos e no metabolismo do ácido glutâmico (Zhang *et al.*, 2020). Um estudo com glifosato demonstrou que a exposição causou disfunção mitocondrial em espermatogônias, levando a um aumento de malformações nos espermatozoides. Quando avaliada a metabolômica, os metabólitos indicaram alterações em diversas vias metabólicas, como o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória, bloqueando o metabolismo do piruvato e a glicólise/gliconeogênese e influenciando a via das pentoses fosfato e a síntese e metabolismo de nucleotídeos (Qi *et al.*, 2023).

Desta forma, sugerimos que a mistura de agrotóxicos (imidacloprido, glifosato e tebuconazol) leva a uma utilização maior da glutathiona, para amenizar o estresse oxidativo, com isso necessitando de mais formação de NADPH para sua regeneração, alterando, assim, a via das pentoses fosfato. A formação de ácido glicônico, para alimentar a via (figura 48), formando o ribose-5-fosfato, agrava mais o estresse oxidativo, com a formação conjunta de peróxido de hidrogênio. Esta ERO pode causar peroxidação lipídica. Uma vez que a *B. longum*^{5^{1A}} tem genes que se relacionam diretamente com as vias metabólicas de carboidratos, sugere-se que o probiótico foi capaz de normalizar a abundância do marcador ácido glicônico, um produto da oxidação da glicose, indicando que a glicólise pode ter sido privilegiada com o tratamento dos animais expostos, aliviando a via das pentoses fosfato. Desta forma, a peroxidação lipídica foi amenizada com o tratamento, diminuindo a necessidade da glutathiona de ser reduzida e, conseqüentemente, normalizando a produção de NADPH.

Figura 48 – Análise estatística (não-paramétrica) do ácido glicônico em camundongos não-expostos e expostos à mistura de agrotóxicos, não-tratados e tratados com o probiótico *B. longum* 5^{IA}.

Valores expressos em abundância. Barra indica desvio padrão. **, ***, ### p < 0,05.



Fonte: dados da pesquisa.

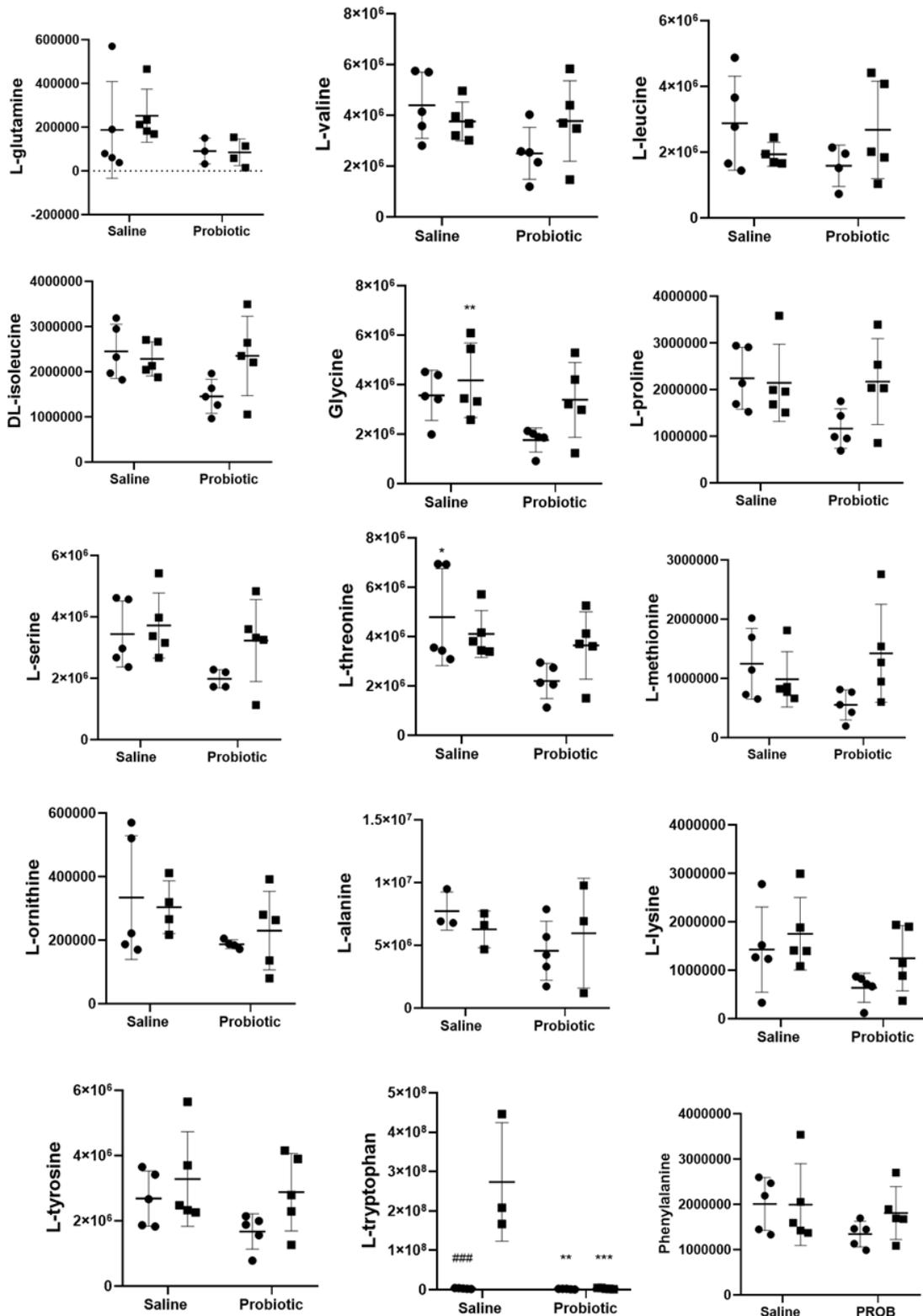
Glutamina e ácido málico (malato)

A alteração da glutamina nos animais expostos à mistura de agrotóxicos indica, segundo a análise das vias pelo Metaboanalyst 6.0, que várias vias metabólicas podem ter sido alteradas (biossíntese de arginina; metabolismo do nitrogênio; metabolismo de alanina, aspartato e glutamato; metabolismo de glioxilato e dicarboxilato; metabolismo pirimidina; metabolismo das purinas; metabolismo da glutatona; metabolismo de arginina e prolina). O ácido málico (malato) indica alteração no metabolismo energético e biossíntese de ácidos graxos.

Diferente da exposição à mistura de agrotóxicos, que a abundância dos aminoácidos aumentou ou diminuiu, dependendo do precursor, nos animais tratados com probiótico, todos os aminoácidos estão reduzidos (figura 49). Isto pode indicar que houve uma normalização na síntese/ metabolização. Entretanto, quando observamos os animais que receberam a mistura e foram tratados, exceto para a glutamina e triptofano, o perfil está muito mais próximo da exposição à mistura do que para o tratamento. Apesar disso, é possível notar que estes animais tiveram uma melhora no estresse oxidativo, visualizado pela redução peroxidação lipídica, indicando que a glutamina aumentada nos animais expostos estava provavelmente direcionada a produção de glutatona (pela incorporação de cistina e glicina) e sua regeneração.

Figura 49 – Análise estatística (não-paramétrica) dos aminoácidos em camundongos não-expostos e expostos à mistura de agrotóxicos, não-tratados e tratados com o probiótico *B. longum* 5^{1A}.

Valores expressos em abundância. Barra indica desvio padrão. * $p < 0,05$.

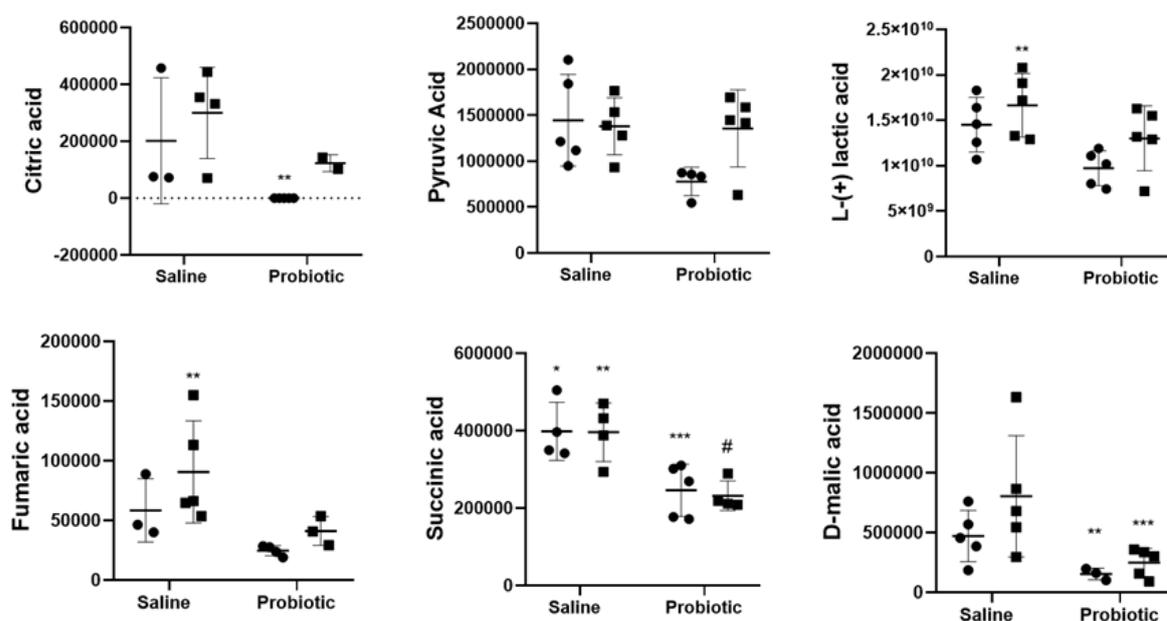


Fonte: dados da pesquisa.

O glifosato, o imidacloprido e o tebuconazol, assim como vários outros agrotóxicos, isolados ou em misturas, alteram muito o metabolismo, sendo o mecanismo de ação comum o estresse oxidativo. As vias alteradas podem ser: o ciclo de TCA; via das pentoses; glicólise e da gliconeogênese; metabolismo de alanina, aspartato e glutamato; metabolismo de glutatona; metabolismo de fenilalanina, metabolismo de tirosina; biossíntese e metabolismo de ácidos graxos (Freitas-Silva *et al.*, 2017; Ford *et al.*, 2017; Lukowicz *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2020; Szewczyk *et al.*, 2020; Glinski *et al.*, 2021; Jellali *et al.*, 2021; Nannan-Lv *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2022; Qi *et al.*, 2023; Deore *et al.*, 2024-1; Deore *et al.*, 2024-2).

Com a redução da glutamina nos expostos e tratados, assim como a redução de ácido láctico e piruvato, do metabolismo de carboidratos; e redução de citrato, succinato, fumarato e malato, do ciclo do TCA (figura 50), podemos sugerir que o metabolismo energético estava se normalizando e que a resistência à insulina, evidenciada na avaliação da AUC, se o tratamento persistisse, deixaria de existir.

Figura 50 – Análise estatística (não-paramétrica) do ácido cítrico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico e ácido málico em camundongos não-expostos e expostos à mistura de agrotóxicos, não-tratados e tratados com o probiótico *B. longum* 5^{1A}. Valores expressos em abundância. Barra indica desvio padrão. * p < 0,05.



Fonte: dados da pesquisa.

A redução do ácido málico (malato) sugere que houve uma regulação do ciclo do TCA pelo probiótico *B. longum* 5^{1A}. A hipótese é que o probiótico, por ser uma cepa que altera o metabolismo de carboidratos, consegue equilibrar as reações anabólicas e catabólicas, otimizando a produção energética, controlando substratos, com a produção mínima de metabólitos. Desta forma, também consegue minimizar o estresse oxidativo natural do organismo.

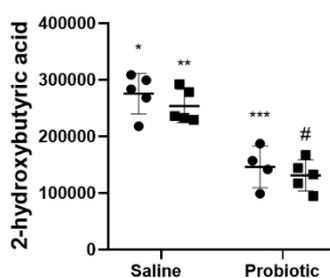
Ácido 2-hidroxi-butírico

A alteração de ácido 2-hidroxi-butírico (figura 51) nos animais expostos à mistura de agrotóxicos indica, segundo a análise das vias pelo Metaboanalyst 6.0, que o metabolismo dos ácidos graxos foi alterado.

No estresse oxidativo, há um aumento na demanda de glutathione, há uma produção maior de ácido 2-hidroxi-butírico, um biomarcador de estresse oxidativo. O ácido 2-hidroxi-butírico é um corpo cetônico, produzido pela via do mevalonato, e também é usado como biomarcador de sensibilidade à insulina. Estudos relatam o efeito do glifosato, imidacloprido e tebuconazol sobre a indução do estresse oxidativo, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Bali *et al.*, 2019; Abdel-Halim; Osman, 2020; Hajar *et al.*, 2020), assim como há estudos que relatam que cepas probióticas específicas podem apresentar atividade antioxidante, contribuindo para a diminuição do estresse oxidativo (Wang *et al.*, 2017). Com a redução deste biomarcador nos animais expostos à mistura e tratados com probiótico, mais uma vez podemos sugerir que o metabolismo energético estava se normalizando, com a redução do estresse oxidativo e que a resistência à insulina poderia deixar de existir, se o tratamento persistisse.

Figura 51 – Análise estatística (não-paramétrica) do ácido 2-hidroxi-butírico em camundongos não-expostos e expostos à mistura de agrotóxicos, não-tratados e tratados com o probiótico *B. longum* 5^{1A}.

Valores expressos em abundância. Barra indica desvio padrão. $p < 0,05$.

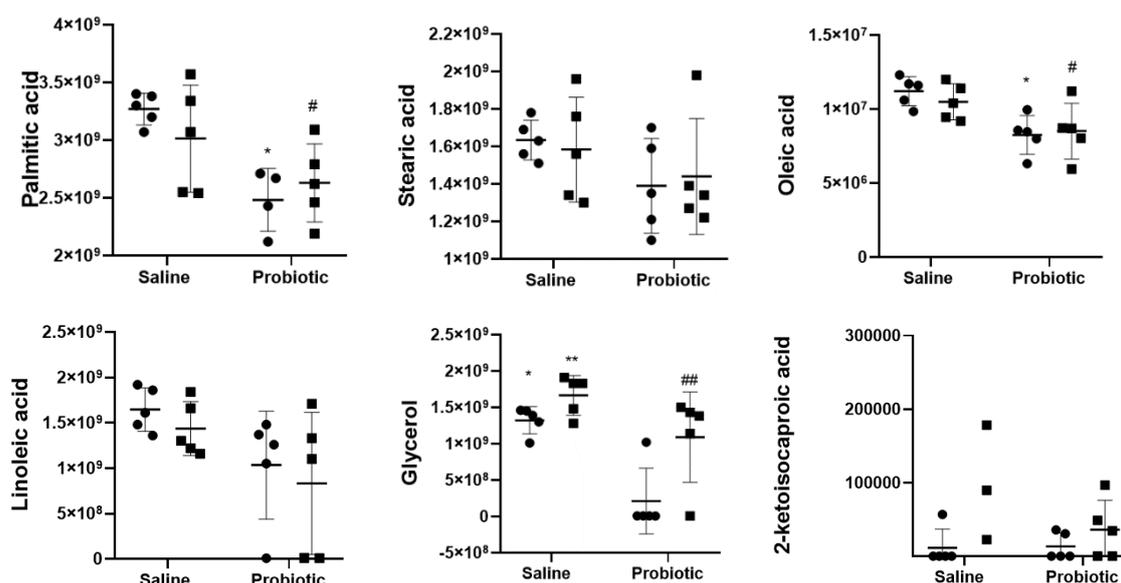


Fonte: dados da pesquisa.

Outros metabólitos

Podemos observar que a abundância dos ácidos graxos palmítico, oleico, linoleico e esteárico (Figura 52) estão diminuídos nos animais tratados com probiótico. Agrupando os dados obtidos anteriormente sobre triglicérides, peso corporal e gordura periuterina, podemos observar que, mesmo não havendo diferença estatística para estes parâmetros entre os grupos expostos à mistura e tratados e não tratados com probiótico, a diminuição sérica evidenciada pela análise metabolômica indica que a biossíntese e, principalmente, a β -oxidação podem estar se normalizando. Este fato pode estar relacionado à redução do estresse oxidativo, com menor necessidade de regeneração de glutatona e NADPH. Houve também redução no glicerol sérico (Figura 53) nos animais tratados, corroborando esta hipótese.

Figura 52 – Análise estatística (não-paramétrica) dos ácidos graxos palmítico, oleico, linoleico e esteárico e do glicerol em camundongos não-expostos e expostos à mistura de agrotóxicos, não-tratados e tratados com o probiótico *B.longum* 5^{1A}. Valores expressos em abundância. Barra indica desvio padrão. * $p < 0,05$.



Fonte: dados da pesquisa.

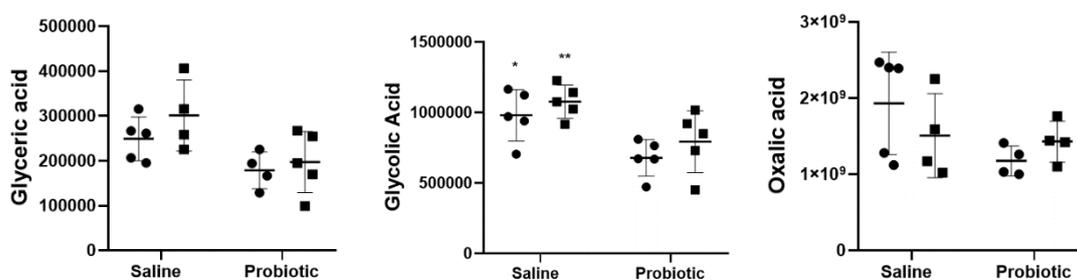
Como visto anteriormente, a via do glioxilato é uma via alternativa para o metabolismo de Acetil-CoA, que forma, os ácidos glicérico, glicólico e oxálico. O glioxilato também pode ser formado a partir do glioxil, produto do estresse oxidativo por glicação de proteínas, além de ser um metabólito do glifosato. Os animais expostos à mistura de agrotóxicos e tratados com probiótico têm tanto ácido glicérico quanto ácido glicônico diminuídos (figura 53), comparado

ao grupo somente exposto à mistura, indicando que o tratamento pode ter reduzido da formação de glioxil, por inibir o estresse oxidativo, explicando porque o probiótico reduziu a frequência de micronúcleos.

Figura 53 – Análise estatística (não-paramétrica) dos ácidos glicérico, glicólico e oxálico em camundongos não-expostos e expostos à mistura de agrotóxicos, não-tratados e tratados com o probiótico *B. longum* 5^{1A}.

Valores expressos em abundância. Barra indica desvio padrão. * $p < 0,05$.

Abundância dos ácidos graxos glicérico, glicólico e oxálico em camundongos não-expostos e expostos à mistura de agrotóxicos, não-tratados e tratados com o probiótico *B. Longum*.



Fonte: dados da pesquisa.

6 CONCLUSÕES

Com a ampla utilização de agrotóxicos nas culturas é inevitável a presença de seus resíduos nos alimentos. Vários estudos científicos vêm sendo desenvolvidos no intuito de avaliar o verdadeiro impacto dos agrotóxicos sobre organismos não-alvo e já é possível encontrar evidências de que eles podem causar doenças metabólicas por desregulação endócrina e câncer. Porém, a maioria dos estudos são desenvolvidos sem escolher adequadamente a dose do agrotóxico, utilizando concentrações muito superiores às que são encontradas no meio ambiente. Outro fator que chama atenção nos estudos é que poucos pesquisadores consideram o possível sinergismo, potenciação ou inibição que pode surgir da exposição a uma mistura destes compostos, uma vez que classes diferentes de agrotóxicos podem ser aplicadas nas culturas, como inseticida, fungicida e herbicida (Lukowicz *et al.*, 2018; Sevim *et al.*, 2024).

A partir dos resultados deste estudo com a exposição de animais C57bl/6 a uma mistura de três agrotóxicos utilizados mundialmente (glifosato, imidacloprido e tebuconazol) em baixas doses por um período subcrônico (42 dias), *sugere-se que*:

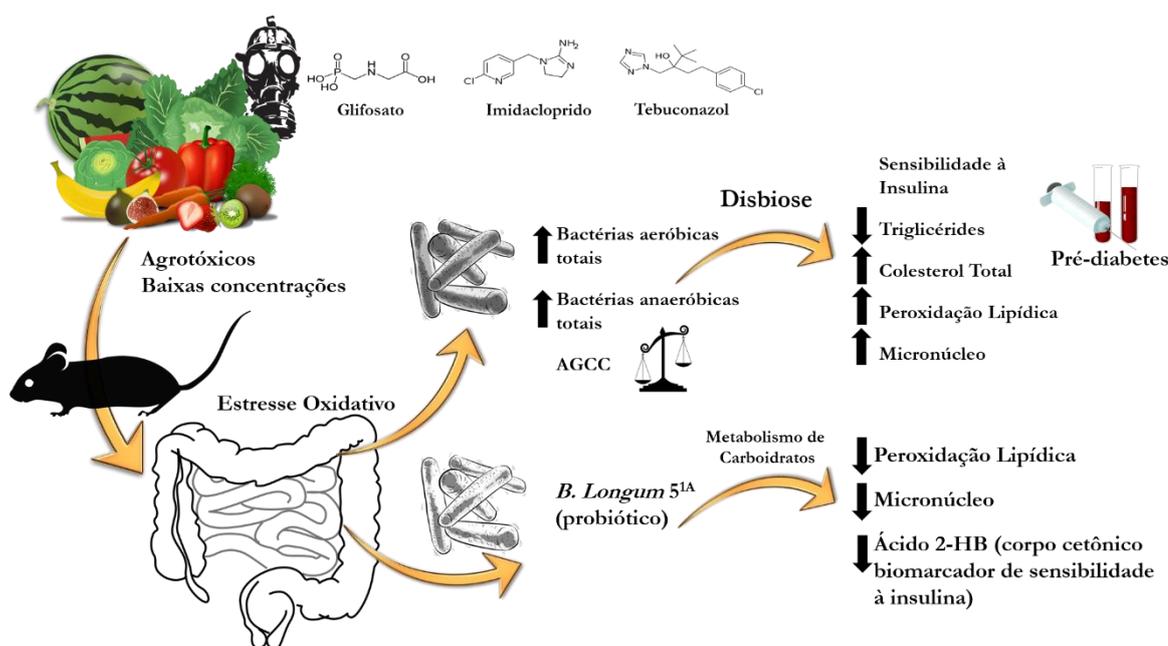
- A mistura causou estresse oxidativo, com presença de peroxidação lipídica e frequência aumentada de micronúcleos (biomarcadores de efeito), sendo genotóxica e, assim, aumentando o risco de desenvolvimento de câncer nos animais expostos;
- A mistura causou disbiose intestinal, com alteração da composição da microbiota e desbalanço na produção de AGCC;
- Os animais expostos apresentaram alterações sub-clínicas nos animais expostos: aumento do colesterol total, diminuição dos triglicérides séricos e presença de resistência à insulina, sem alterar o peso corporal e glicemia jejum nos animais;
- A mistura é desreguladora endócrina por aumentar o colesterol sérico, precursor de hormônios esteroidais; e por causar resistência à insulina, modificando a resposta celular ao hormônio;
- A mistura causou um comprometimento imunológico por reduzir a atividade da mieloperoxidase no baço dos animais expostos;
- A exposição à mistura de agrotóxicos tem assinatura metabólica específica, com modificações nas vias metabólicas da biossíntese e degradação de ácidos graxos; metabolismo da galactose e outras vias metabólicas de carboidratos relacionadas; metabolismo do glioxilato e dicarboxilato; metabolismo de aminoácidos.

Os resultados da modulação da microbiota intestinal pela linhagem probiótica *B. longum* 5^{1A} em camundongos expostos a mistura de agrotóxicos *sugere que*:

- O probiótico utilizou o próprio sistema oxidante para reduzir o estresse oxidativo causado pela exposição aos agrotóxicos, auxiliando na produção de NADPH e regeneração da glutatona para eliminação das EROs, reduzindo a peroxidação lipídica e formação de micronúcleos e, conseqüentemente, prevenindo danos celulares, em via independente à produção de AGCC.
- O probiótico também foi capaz de alterar a assinatura metabólica da exposição, reduzindo a concentração do biomarcador de sensibilidade à insulina e estresse oxidativo ácido 2-hidroxi-butírico (2-HB).

Os principais resultados estão destacados na figura 54.

Figura 54 – Resumo gráfico das conclusões do estudo da exposição subcrônica de camundongos C57bl/6 a mistura de agrotóxicos glifosato, imidacloprido e tebuconazol



Fonte: do autor.

Para finalizar, nenhum dos agrotóxicos deste estudo ultrapassou a NOAEL, a dose que, teoricamente, não deveria causar efeito adverso. Os resultados encontrados reforçam a importância da reavaliação das doses de IDA, dose probabilística derivada da NOAEL que indica segurança alimentar a uma exposição crônica, uma vez que em misturas, agrotóxicos se

comportam de forma diferente, podendo os decisores políticos e as agências relativas estarem subestimando o potencial sinergismo, potenciação ou antagonismo que pode surgir da exposição a uma mistura de produtos químicos, mesmo em doses muito baixas, incluindo o potencial efeito da disbiose causada por estes contaminantes a saúde dos consumidores.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, Dulcinéia Saes Parra; SENA, Karine Cavalcanti Maurício de. Biomarcadores de peroxidação lipídica na aterosclerose. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 749-756, 2008.

ABDEL-HALIM, Khaled Y.; OSMAN, Safaa R. Cytotoxicity and oxidative stress responses of imidacloprid and glyphosate in human prostate epithelial WPM-Y. 1 cell line. **Journal of toxicology**, v. 2020, 2020.

ABDELNUR, Patrícia Verardi. *Metabolômica e espectrometria de massas*. 2011.

ABDEL-RAZIK, Reda K. *et al.* Testicular deficiency associated with exposure to cypermethrin, imidacloprid, and chlorpyrifos in adult rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 87, p. 103724, 2021.

ABRANTES, Fernanda Alves *et al.* Treatment with *Bifidobacterium longum* 51A attenuates intestinal damage and inflammatory response in experimental colitis. **Beneficial microbes**, v. 11, n. 1, p. 47-57, 2020.

AGROFIT, Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: agrofit.agricultura.gov.br. Acesso em 10 janeiro de 2024.

AITBALI, Yassine *et al.* Glyphosate based-herbicide exposure affects gut microbiota, anxiety and depression-like behaviors in mice. **Neurotoxicology and teratology**, v. 67, p. 44-49, 2018.

AKTAR, Wasim; SENGUPTA, Dwaipayan; CHOWDHURY, Ashim. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2009.

ALBUQUERQUE, A. F. *et al.* Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779-787, 2016.

ALEXANDER, James L. *et al.* Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 6, p. 356-365, 2017.

ALSEEKH, Saleh *et al.* Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. **Nature methods**, v. 18, n. 7, p. 747-756, 2021.

ALVAREZ, Analía *et al.* Actinobacteria: current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. **Chemosphere**, v. 166, p. 41-62, 2017.

ALVIM, Tiago Tomiama; DOS REIS MARTINEZ, Claudia Bueno. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 842, p. 85-93, 2019.

AMATO, Angelica Amorim; WHEELER, Hailey Brit; BLUMBERG, Bruce. Obesity and endocrine-disrupting chemicals. **Endocrine connections**, v. 10, n. 2, p. R87-R105, 2021.

AMORIM, Leiliane Coelho André. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 158-170, 2003.

ANDREU-SÁNCHEZ, Oscar *et al.* Acute toxicity and bioconcentration of fungicide tebuconazole in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental toxicology**, v. 27, n. 2, p. 109-116, 2012.

ANDRIOLI, Nancy B. *et al.* Genotoxic effects induced for sub-cytotoxic concentrations of tebuconazole fungicide in HEp-2 cell line. **Chemico-Biological Interactions**, v. 373, p. 110385, 2023.

ANTONELLI, Joseph *et al.* Statistical workflow for feature selection in human metabolomics data. **Metabolites**, v. 9, n. 7, p. 143, 2019.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos, PARA. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Acesso em: janeiro de 2020.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021. Dados Abertos de Monografias de Agrotóxicos. Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiNTU0Y2FhYmItYjM1MC00ODgyLThlYmItMzFkMjI1YWU4MGNkIiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWZzZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVIZGQ4MSJ9>. Acesso em 10 Fevereiro de 2020.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2023. Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos, PARA. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/relatorio-2018-2019-2022> Acesso em 10 de janeiro de 2024.

APEL, Klaus; HIRT, Heribert. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signaling transduction. **Annual review of plant biology**, v. 55, p. 373, 2004.

AQUINO, Sérgio Francisco de; BRANDT, Emanuel Manfred Freire; CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, p. 187-204, 2013.

ARAÚJO, Ana Margarida *et al.* Toxicometabolomics: small molecules to answer big toxicological questions. **Metabolites**, v. 11, n. 10, p. 692, 2021.

ARFAT, Yasir *et al.* Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice. **Toxicology reports**, v. 1, p. 554-561, 2014.

ARMENOVA, Nadya *et al.* Microbial detoxification of residual pesticides in fermented foods: Current status and prospects. **Foods**, v. 12, n. 6, p. 1163, 2023.

ARNHOLD, Jürgen. The dual role of myeloperoxidase in immune response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8057, 2020.

ARNOLD, Paige K.; FINLEY, Lydia WS. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 299, n. 2, 2023.

AYALA, Antonio *et al.* Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.

BADGUJAR, Prarabdh C. *et al.* Immunotoxic effects of imidacloprid following 28 days of oral exposure in BALB/c mice. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 408-418, 2013.

BAGRI, Preeti; KUMAR, Vinod; SIKKA, Anil K. Assessment of imidacloprid-induced mutagenic effects in somatic cells of Swiss albino male mice. **Drug and chemical toxicology**, v. 39, n. 4, p. 412-417, 2016.

BAI, Shahla Hosseini; OGBOURNE, Steven M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 19, p. 18988-19001, 2016.

BAJAJ, Jasmohan S. Alcohol, liver disease and the gut microbiota. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 4, p. 235-246, 2019.

BAJARD, L. *et al.* Endocrine disrupting potential of replacement flame retardants – Review of current knowledge for nuclear receptors associated with reproductive outcomes. **Environment International**, v.153, p. 1-12, 2021.

BALAGUER, Patrick *et al.* Structural and functional evidences for the interactions between nuclear hormone receptors and endocrine disruptors at low doses. **Comptes rendus biologies**, v. 340, n. 9-10, p. 414-420, 2017.

BALI, Yassine Ait *et al.* Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. **Toxicology**, v. 415, p. 18-25, 2019.

BANAEE, Mahdi *et al.* Combined effects of exposure to sub-lethal concentration of the insecticide chlorpyrifos and the herbicide glyphosate on the biochemical changes in the freshwater crayfish *Pontastacus leptodactylus*. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 9, p. 1500-1515, 2020.

BANKS, Eric D. *et al.* Bacterial calcium carbonate precipitation in cave environments: a function of calcium homeostasis. **Geomicrobiology Journal**, v. 27, n. 5, p. 444-454, 2010.

BARBOSA, Ariadne *et al.* Study of muscle fibers of the extensor digitorum longus and soleus muscles of C57BL/6 females exposed to glyphosate during pregnancy and lactation. **Einstein (São Paulo)**, v. 19, 2021.

BASSO, Cristiana; SIQUEIRA, Ana Carolina Fraga; DOS SANTOS RICHARDS, Neila Silvia Pereira. Impactos na saúde humana e no meio ambiente relacionados ao uso de agrotóxicos: Uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e43110817529-e43110817529, 2021.

BAYR, Hülya. Reactive oxygen species. **Critical care medicine**, v. 33, n. 12, p. S498-S501, 2005.

BENEDÉ-UBIETO, Raquel *et al.* Guidelines and considerations for metabolic tolerance tests in mice. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 13, p. 439, 2020.

BENVENGA, Salvatore *et al.* Endocrine disruptors and thyroid autoimmunity. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 34, n. 1, p. 101377, 2020.

BERHEIM, Elise Hughes *et al.* Effects of neonicotinoid insecticides on physiology and reproductive characteristics of captive female and fawn white-tailed deer. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 4534, 2019.

BERNAT, Przemysław *et al.* 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-induced oxidative stress: Metabolome and membrane modifications in *Umbelopsis isabellina*, a herbicide degrader. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0199677, 2018.

BERROUAGUE, Salma *et al.* Efficacy of *Allium sativum* oil to alleviate tebuconazol-induced oxidative stress in the liver of adult rats. **Cellular and Molecular Biology**, v. 65, n. 8, p. 23-31, 2019.

BHARDWAJ, Shipra *et al.* A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: morphological, biochemical and histopathological evaluations. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1185-1190, 2010.

BHASKAR, Rakesh; MOHANTY, Banalata. Pesticides in mixture disrupt metabolic regulation: in silico and in vivo analysis of cumulative toxicity of mancozeb and imidacloprid on body weight of mice. **General and comparative endocrinology**, v. 205, p. 226-234, 2014.

BIOCLIN, 2022-1. Colesterol monoreagente. Disponível em: https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/INSTRUcoes_COLESTEROL_MONOREAGENTE.pdf.

BIOCLIN, 2022-2. Triglicéridos monoreagente. Disponível em: https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/INSTRUcoes_COLESTEROL_MONOREAGENTE.pdf.

- BLAIR, Ian A. Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. **Experimental gerontology**, v. 36, n. 9, p. 1473-1481, 2001.
- BLOT, Nicolas *et al.* Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. **PloS one**, v. 14, n. 4, p. e0215466, 2019.
- BOBERG, Julie *et al.* Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. **Reproductive Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 301-312, 2010.
- BOLOGNESI, Claudia *et al.* Micronuclei and pesticide exposure. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 19-26, 2011.
- BONASSI, Stefano *et al.* The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 728, n. 3, p. 88-97, 2011.
- BONEGIO, Roman GB; SALANT, David J. Doenças glomerulares. Acesso em: 22 de abril de 2024. Disponível: https://www.medicinanet.com.br/m/conteudos/acp-medicine/5274/doencas_glomerulares_%E2%80%93_roman_gb_bonegio_david_j_salant.htm
- 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.
- BYNDLOSS, Mariana X. *et al.* Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. **Science**, v. 357, n. 6351, p. 570-575, 2017.
- BRASIL. Lei N^o lei 14.785/2023, de 27 de dezembro de 2023. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 de dezembro de 2023.
- BRASIL. Portaria MAPA N^o 337, DE 8 DE NOVEMBRO DE 2021. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 de novembro de 2021./11/2021. Edição 210, Seção 1, p. 3.
- BRIANEZI, Gabrielli; CAMARGO, João Lauro Viana de; MIOT, Hélio Amante. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, p. 325-334, 2009.
- ÇAĞLAR, Sinan; KOLANKAYA, Dürdane. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 57-62, 2008.
- CALUMBY, Rodrigo José Nunes *et al.* **Caracterização da microbiota intestinal cultivável de *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae) e determinação da atividade celulolítica.** 2021. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas. Maceió.

CAMINERO, Alberto *et al.* Mechanisms by which gut microorganisms influence food sensitivities. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 7-18, 2019.

CARNEIRO, Fernando Ferreira *et al.* **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. EPSJV/Expressão Popular, 2015.

CARVALHO, Fernando P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and energy security**, v. 6, n. 2, p. 48-60, 2017.

CASTRO, Tássia Flávia Dias *et al.* Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult Danio rerio exposed to tebuconazole-based commercial product. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 62, p. 140-146, 2018.

CHAI, X.; ZENG, S.; XIE, W. Estrogen-Metabolizing Enzymes in Systemic and Local Liver Injuries: A Case Study of Disease–Drug Interaction. In: **Drug Metabolism in Diseases**. Academic Press, 2017. p. 241-255.

CHANDRAN, Divaskara *et al.* Antioxidant Vitamins Attenuate Glyphosate-Induced Development of Type-2 Diabetes Through the Activation of Glycogen Synthase Kinase-3 β and Forkhead Box Protein O-1 in the Liver of Adult Male Rats. **Cureus**, v. 15, n. 12, 2023.

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

CHAUFAN, Gabriela *et al.* Oxidative response and micronucleus centromere assay in HEp-2 cells exposed to fungicide iprodione. **Chemical Research in Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 745-752, 2019.

CIONE, Ana P. *et al.* A new regulatory paradigm for pesticide registration in Brazil: Comments on recent legislative amendments (Law 14.785/2023). **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 20, n. 3, p. 595-597, 2024.

COLLINS, Stephanie L.; PATTERSON, Andrew D. The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 1, p. 19-32, 2020.

COMBARNOUS, Yves. Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) and agriculture: The case of pesticides. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 9-10, p. 406-409, 2017.

CONTE, Federica *et al.* Galactose in human metabolism, glycosylation and congenital metabolic diseases: Time for a closer look. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1865, n. 8, p. 129898, 2021.

CORTESE, Dionatam *et al.* Herbicides in soybean development: productive aspects and physiological quality of seeds. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 17, n. 1, p. 1-6, 2022.

CRUZ, Clênio Silva; RICCI, Mayra Fernanda; VIEIRA, Angélica Thomaz. Gut microbiota modulation as a potential target for the treatment of lung infections. **Frontiers in Pharmacology**, p. 2352, 2021.

CRUZAT, Vinicius Fernandes; PETRY, Éder Ricardo; TIRAPEGUI, Julio. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de medicina do Esporte**, v. 15, p. 392-397, 2009.

CUENCA, Jessika Barrón *et al.* Increased levels of genotoxic damage in a Bolivian agricultural population exposed to mixtures of pesticides. **Science of the Total Environment**, v. 695, p. 133942, 2019.

DA SILVA, Jéssica Gabrielle Vidal *et al.* Comparative genomics and in silico gene evaluation involved in the probiotic potential of *Bifidobacterium longum* 51A. **Gene**, v. 795, p. 145781, 2021.

DALILE, Boushra *et al.* The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 8, p. 461-478, 2019.

DALMOLIN, Suelen Pizzolatto *et al.* Biomarkers of occupational exposure to pesticides: Systematic review of insecticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 75, p. 103304, 2020.

DARBRE, Philippa D. Endocrine disruptors and obesity. **Current obesity reports**, v. 6, n. 1, p. 18-27, 2017.

DE ABREU SILVA, Ana Cecília. **Biomarcadores de contaminação ambiental**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade Fernando Pessoa (Portugal).

DE ARAÚJO-RAMOS, Anderson Tadeu *et al.* Controversies on endocrine and reproductive effects of glyphosate and glyphosate-based herbicides: a mini-review. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 627210, 2021.

DE CASTRO MENDES, Silvana; DE SOUZA, Isaianne Kelly Martins; JÚNIOR, Carlos Eduardo de Oliveira Costa. Teste do Micronúcleo em Células Exfoliativas da Mucosa Bucal Como Ferramenta da Biomonitoração Em Fumantes: Uma Revisão de Literatura. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-PERNAMBUCO**, v. 4, n. 1, p. 53-53, 2018.

DE FREITAS-SILVA, Larisse *et al.* Glyphosate-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* affecting peroxisomal metabolism and triggers activity in the oxidative phase of the pentose phosphate pathway (OxPPP) involved in NADPH generation. **Journal of plant physiology**, v. 218, p. 196-205, 2017.

DE MARIA, Maite *et al.* Endocrine, immune and renal toxicity in male largemouth bass after chronic exposure to glyphosate and Rodeo®. **Aquatic Toxicology**, v. 246, p. 106142, 2022.

DE MORAES, Rodrigo Fracalossi. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Texto para Discussão, 2019.

DE MORAIS, Cássio Resende *et al.* Evaluation of the genotoxicity of neurotoxic insecticides using the micronucleus test in *Tradescantia pallida*. **Chemosphere**, v. 227, p. 371-380, 2019.

DE MOURA, Fernando Rafael *et al.* Effects of glyphosate-based herbicide on pintado da Amazonia: hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 56, p. 241-248, 2017.

DE SOUZA, Leonardo Perez *et al.* Network-based strategies in metabolomics data analysis and interpretation: from molecular networking to biological interpretation. **Expert Review of Proteomics**, v. 17, n. 4, p. 243-255, 2020.

DEMUR, C. *et al.* Dietary exposure to a low dose of pesticides alone or as a mixture: the biological metabolic fingerprint and impact on hematopoiesis. **Toxicology**, v. 308, p. 74-87, 2013.

DEORE, Pushpa *et al.* Non-target impact of imidacloprid residues on wine aroma characteristics assessed by GCxGC-TOF/MS analysis and its residual transformation in vinification by UHPLC-Orbitrap-MS analysis. **Microchemical Journal**, v. 197, p. 109834, 2024a.

DEORE, Pushpa *et al.* Establishing the processing factor and degradation kinetics of hexaconazole residues in vinification and its residual impact on wine quality and aroma characteristics by GCxGC-ToF/MS analysis. **Food Bioscience**, p. 103759, 2024b.

DETINGER, Stephen D. *et al.* Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 139-145, 2011.

DIMACHE, Alina Mihaela *et al.* The role Of High Triglycerides Level In Predicting cognitive impairment: a review of current evidence. **Nutrients**, v. 13, n. 6, p. 2118, 2021.

DJEKKOUN, Narimane *et al.* Chronic oral exposure to pesticides and their consequences on metabolic regulation: Role of the microbiota. **European Journal of Nutrition**, v. 60, n. 8, p. 4131-4149, 2021.

DO, Moon Ho *et al.* High-glucose or-fructose diet cause changes of the gut microbiota and metabolic disorders in mice without body weight change. **Nutrients**, v. 10, n. 6, p. 761, 2018.

DOLAN, Stephen K.; WELCH, Martin. The glyoxylate shunt, 60 years on. **Annual review of microbiology**, v. 72, p. 309-330, 2018.

DONG, Bizhang. A comprehensive review on toxicological mechanisms and transformation products of tebuconazole: Insights on pesticide management. **Science of The Total Environment**, p. 168264, 2023.

DORNELLES, M. F.; OLIVEIRA, G. T. Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 2, p. 1610-1620, 2016.

DORNELLES, Michele Flores; OLIVEIRA, Guendalina Turcato. Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 66, n. 3, p. 415-429, 2014.

DRUM, C. Soil chemistry of pesticides. **USA: PPG Industries, Inn**, 1980.

DURÇO, Guilherme Moreira. Obesidade, firmicutes e bacteroidetes: uma revisão da literatura. Trabalho de conclusão de curso. Faculdade da ciência da educação e saúde. Brasília, 2018.

DUTRA, Bibiana Kaiser *et al.* Effect of roundup®(glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). **Ecotoxicology**, v. 20, n. 1, p. 255-263, 2011.

DUTRA, Lidiane Silva *et al.* Uso de agrotóxicos e mortalidade por câncer em regiões de monoculturas. **Saúde em Debate**, v. 44, n. 127, p. 1018-1035, 2020.

EFSA SCIENTIFIC COMMITTEE. Guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed. **EFSA Journal**, v. 9, n. 12, p. 2438, 2011.

EL-SHENAWY, Nahla S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 379-385, 2009.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Boas práticas agrícolas, 2016.

EPA - U.S. Environmental Protection Agency. Pesticide Science and Assessing Pesticide Risks, 2024. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/defining-pesticide-biomarkers>. Acesso em 10 de janeiro de 2024.

ERGUC, Elif I. *et al.* The Role of Biotransformation in the Activity of Endocrine Disruptors. **Current Drug Metabolism**, v. 22, n. 8, p. 628-644, 2021.

Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd edn, 2014.

EVARISTE, Lauris *et al.* Gut microbiota of aquatic organisms: a key endpoint for ecotoxicological studies. **Environmental pollution**, v. 248, p. 989-999, 2019.

FALCINELLI, Silvia *et al.* Influence of probiotics administration on gut microbiota core: a review on the effects on appetite control, glucose, and lipid metabolism. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 52, p. S50-S56, 2018.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/home/en> .

FARAG, Mohamed A. *et al.* Metabolomics reveals impact of seven functional foods on metabolic pathways in a gut microbiota model. **Journal of Advanced Research**, v. 23, p. 47-59, 2020.

FEITEIRO, J., MARIANA, M., CAIRRÃO, E. Health toxicity effects of brominated flame retardants: From environmental to human exposure. **Environmental Pollution**, v. 285, p. 1-17, 2021.

FENG, Pengya *et al.* A review on gut remediation of selected environmental contaminants: possible roles of probiotics and gut microbiota. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 22, 2018.

FÉNICHEL, Patrick; CHEVALIER, Nicolas. Environmental endocrine disruptors: New diabetogens?. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 9-10, p. 446-452, 2017.

FERNÁNDEZ-VIZCAÍNO, Elena *et al.* Multi-level analysis of exposure to triazole fungicides through treated seed ingestion in the red-legged partridge. **Environmental Research**, v. 189, p. 109928, 2020.

FERNIE, Alisdair R.; CARRARI, Fernando; SWEETLOVE, Lee J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. **Current opinion in plant biology**, v. 7, n. 3, p. 254-261, 2004.

FERRAZ, Gregory Alves *et al.* Efeitos da idade sobre as frequências de micronúcleos e alterações nucleares degenerativas. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 19, p. 627-634, 2016.

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

FESTI, Davide *et al.* Gut microbiota and metabolic syndrome. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 43, p. 16079, 2014.

FIEHN, Oliver. Metabolomics by gas chromatography–mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. **Current protocols in molecular biology**, v. 114, n. 1, p. 30.4. 1-30.4. 32, 2016.

FISPQ – Ficha de informação de segurança de produtos químicos, 2006. Disponível em: https://cloud.cnpqg.embrapa.br/wp-content/igu/fispq/campoexperimental/tebuconazole_fispq.pdf .

FLINT, Harry J. *et al.* The role of the gut microbiota in nutrition and health. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 9, n. 10, p. 577-589, 2012.

FONSECA, J. F. *et al.* Probiotic effect of *Bifidobacterium longum* 51A and *Weissella paramesenteroides* WpK4 on gerbils infected with *Giardia lamblia*. **Journal of applied microbiology**, v. 127, n. 4, p. 1184-1191, 2019.

FORD, B. *et al.* Mapping proteome-wide targets of glyphosate in mice. *Cell Chem Biol* 24 (2): 133–140. 2017.

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

FRANCZYK, Beata *et al.* Is a High HDL-Cholesterol Level Always Beneficial?. **Biomedicines**, v. 9, n. 9, p. 1083, 2021.

FU, Zhenqiang *et al.* Impact of imidacloprid exposure on the biochemical responses, transcriptome, gut microbiota and growth performance of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 424, p. 127513, 2022.

GALLO, Margareth B C. Metaboanalyst Step-by-Step. *Jornal of Immunology Research*. 2022.

GALLOTTI, B. *et al.* Effects of dietary fibre intake in chemotherapy-induced mucositis in murine model. **British Journal of Nutrition**, v. 126, n. 6, p. 853-864, 2021.

GAMBARTE, Paula C. Kandel; WOLANSKY, Marcelo Javier. The gut microbiota as a biomarker for realistic exposures to pesticides: A critical consideration. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 91, p. 107074, 2022.

GANESAN, Shanthi; MCGUIRE, Bailey C.; KEATING, Aileen F. Absence of glyphosate-induced effects on ovarian folliculogenesis and steroidogenesis. **Reproductive Toxicology**, v. 96, p. 156-164, 2020.

GEA, Marta *et al.* Assessment of Five Pesticides as Endocrine-Disrupting Chemicals: Effects on Estrogen Receptors and Aromatase. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, n. 4, p. 1959, 2022.

GHISELLE, G.; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v.30, p.695-706, 2007.

GLINSKI, Donna A. *et al.* Route of exposure influences pesticide body burden and the hepatic metabolome in post-metamorphic leopard frogs. **Science of the Total Environment**, v. 779, p. 146358, 2021.

GLOUX, Karine *et al.* A metagenomic β -glucuronidase uncovers a core adaptive function of the human intestinal microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. supplement_1, p. 4539-4546, 2011.

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.

GOMES, Ellen Carolina Zawoski *et al.* Exposure to glyphosate-based herbicide during early stages of development increases insulin sensitivity and causes liver inflammation in adult mice offspring. **einstein (São Paulo)**, v. 20, 2022.

GONSIOROSKI, Andressa; MOURIKES, Vasiliki E.; FLAWS, Jodi A. Endocrine disruptors in water and their effects on the reproductive system. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 6, p. 1929, 2020.

GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, Manuel A. *et al.* The short-chain fatty acid acetate in body weight control and insulin sensitivity. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1943, 2019.

GORGA, Agostina *et al.* Low Doses of Glyphosate/Roundup Alter Blood–Testis Barrier Integrity in Juvenile Rats. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 615678, 2021.

GRUSZECKA-KOSOWSKA, Agnieszka; AMPATZOGLOU, Antonis; AGUILERA, Margarita. Integration of omics approaches enhances the impact of scientific research in environmental applications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 14, p. 8758, 2022.

GUERRA, Paula VP *et al.* Pediatric functional constipation treatment with Bifidobacterium-containing yogurt: a crossover, double-blind, controlled trial. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 17, n. 34, p. 3916, 2011.

GUERRERO-WYSS, Marion *et al.* D-tagatose is a promising sweetener to control glycaemia: a new functional food. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

GUIMARÃES, JOÃO ROBERTO PENNA DE FREITAS. Disruptores endócrinos no meio ambiente: um problema de saúde. 2019.

GUO, Jingyi *et al.* Genotoxic effects of imidacloprid in human lymphoblastoid TK6 cells. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 2, p. 208-212, 2020.

GURSKI, Cody J.; DITTEL, Bonnie N. Myeloperoxidase as a marker to differentiate mouse monocyte/macrophage subsets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8246, 2022.

HAISER, H. J.; TURNBAUGH, P. J. Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 21–31, 2013.

HAJER, B. E. N. *et al.* Efficacy of essential trace elements supplementation on mineral composition, sperm characteristics, antioxidant status, and genotoxicity in testis of tebuconazole-treated rats. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 33, n. 10, p. 760-770, 2020.

- HALL, Julie M.; GRECO, Callie W. Perturbation of nuclear hormone receptors by endocrine disrupting chemicals: mechanisms and pathological consequences of exposure. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 13, 2019.
- HAMDAOUI, Latifa *et al.* Sub-chronic exposure to Kalach 360 SL–induced damage in rats’ liver and hematological system. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 36, p. 36634-36646, 2019.
- HAN, Byoung Geun *et al.* Markers of glycemic control in the mouse: comparisons of 6-h-and overnight-fasted blood glucoses to Hb A1c. **American journal of physiology-endocrinology and metabolism**, v. 295, n. 4, p. E981-E986, 2008.
- HASSAAN, Mohamed A.; EL NEMR, Ahmed. Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 46, n. 3, p. 207-220, 2020.
- HE, Yuhong *et al.* Hematological effects of glyphosate in mice revealed by traditional toxicology and transcriptome sequencing. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 92, p. 103866, 2022.
- HEDDLE, John A. *et al.* Reflections on the development of micronucleus assays. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 3-10, 2010.
- HEDDLE, John A. *et al.* The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983.
- HEGARDT, Fausto G. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. **Biochemical Journal**, v. 338, n. 3, p. 569-582, 1999.
- HEIANZA, Yoriko *et al.* Gut microbiota metabolites, amino acid metabolites and improvements in insulin sensitivity and glucose metabolism: the POUNDS Lost trial. **Gut**, v. 68, n. 2, p. 263-270, 2019.
- HERMANN, Dietrich; STENZEL, Klaus. FRAC mode-of-action classification and resistance risk of fungicides. **Modern crop protection compounds**, v. 2, p. 589-608, 2019.
- HO, Wan Y.; HARTMANN, Hannelore; LING, Shuo-Chien. Central nervous system cholesterol metabolism in health and disease. **IUBMB life**, 2022.
- HOSSAIN, Tanim Jabid. Functional genomics of the lactic acid bacterium *Limosilactobacillus fermentum* LAB-1: metabolic, probiotic and biotechnological perspectives. **Heliyon**, v. 8, n. 11, 2022.
- HOU, Kaijian *et al.* Microbiota in health and diseases. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 7, n. 1, p. 1-28, 2022.
- IATCU, Camelia Oana; STEEN, Aimee; COVASA, Mihai. Gut microbiota and complications of type-2 diabetes. **Nutrients**, v. 14, n. 1, p. 166, 2021.

IBAMA, GABINETE DA PRESIDÊNCIA; INTERFEDERATIVO, COMITÊ. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2024.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020. **Pesquisa de Orçamentos Familiares, POF**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 de Fevereiro de 2020.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios. 2008. Rio de Janeiro. Brasil. [Disponível na internet: <http://www.ibge.gov.br>, acesso em 20/01/2020.]

ILYUSHINA, Nataliya A. *et al.* Genotoxicity of mixture of imidacloprid, imazalil and tebuconazole. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 1090-1094, 2020.

ILYUSHINA, Nataliya *et al.* Maximum tolerated doses and erythropoiesis effects in the mouse bone marrow by 79 pesticides' technical materials assessed with the micronucleus assay. **Toxicology reports**, v. 6, p. 105-110, 2019.

INCHEM - Internationally peer reviewed Chemical safety information. 2001. Toxicological Evaluations: Imidacloprid. Disponível em: <https://incchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr07.htm> .

INCHEM – Internationally peer reviewed Chemical safety information. 1984. Toxicological Evaluations: Glyphosate. Disponível em: <https://incchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v86pr08.htm> .

INCHEM– Internationally peer reviewed Chemical safety information. 1994. Toxicological Evaluations: Tebuconazole. Disponível em: <https://incchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v94pr10.htm>

INGARAMO, Paola *et al.* Are glyphosate and glyphosate-based herbicides endocrine disruptors that alter female fertility?. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 518, p. 110934, 2020.

IPCS, WHO. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. World Health Organization, Geneva. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67357>, 2002.

IRAC, Comitê de Ação. À resistência de Inseticidas. **Classificação modo de ação de inseticidas. Mogi Mirim**, 2016.

ITURBURU, Fernando G. *et al.* Imidacloprid causes DNA damage in fish: clastogenesis as a mechanism of genotoxicity. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 100, p. 760-764, 2018.

ITURBURU, Fernando G. *et al.* Uptake, distribution in different tissues, and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 36, n. 3, p. 699-708, 2017.

- JAGNE, Jabou; WHITE, Dominique; JEFFERSON, Felicia. Endocrine-disrupting chemicals: adverse effects of bisphenol A and parabens to women's health. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 6, p. 1-10, 2016.
- JELLALI, Rachid *et al.* Investigation of steatosis profiles induced by pesticides using liver organ-on-chip model and omics analysis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 152, p. 112155, 2021.
- JEONG, Jin Young *et al.* Residual Level, Histology, and Blood Biochemistry of Tebuconazole: A Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Pigs. **Food Science of Animal Resources**, v. 42, n. 4, p. 712, 2022.
- JIA, Rui *et al.* Alterations at biochemical, proteomic and transcriptomic levels in liver of tilapia (*Oreochromis niloticus*) under chronic exposure to environmentally relevant level of glyphosate. **Chemosphere**, v. 294, p. 133818, 2022.
- JIANG, Jinhua *et al.* Insights into the combined effects of environmental concentration of difenoconazole and tebuconazole on zebrafish early life stage. **Science of The Total Environment**, v. 830, p. 154687, 2022.
- JIN, Jiali *et al.* Sub-lethal effects of herbicides penoxsulam, imazamox, fluridone and glyphosate on Delta Smelt (*Hypomesus transpacificus*). **Aquatic toxicology**, v. 197, p. 79-88, 2018.
- JOHNSON, Richard J. *et al.* The fructose survival hypothesis for obesity. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 378, n. 1885, p. 20220230, 2023.
- JUGAN, M., LEVI, Y., BLONDEAU, J. Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 939-947, 2010.
- KAHN, Linda G. *et al.* Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v. 8, n. 8, p. 703-718, 2020.
- KALE, Oluwafemi Ezekiel *et al.* The use of combined high-fructose diet and glyphosate to model rats type 2 diabetes symptomatology. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 31, n. 2, p. 126-137, 2021.
- KAŠUBA, Vilena *et al.* The effect of low doses of chlorpyrifos on blood and bone marrow cells in Wistar rats. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 73, n. 3, p. 223-232, 2022.
- KATARIA, Sudhir Kumar *et al.* Cytogenetic and hematological alterations induced by acute oral exposure of imidacloprid in female mice. **Drug and chemical toxicology**, v. 39, n. 1, p. 59-65, 2016.
- KHALIL, Samah R. *et al.* Imidacloprid insecticide exposure induces stress and disrupts glucose homeostasis in male rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 55, p. 165-174, 2017.

KIER, Larry D.; KIRKLAND, David J. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. **Critical reviews in toxicology**, v. 43, n. 4, p. 283-315, 2013.

KIJMANAWAT, Athasit *et al.* Effects of probiotic supplements on insulin resistance in gestational diabetes mellitus: A double-blind randomized controlled trial. **Journal of diabetes investigation**, v. 10, n. 1, p. 163-170, 2019.

KIM, Hye In *et al.* Lactobacillus plantarum LC27 and Bifidobacterium longum LC67 simultaneously alleviate high-fat diet-induced colitis, endotoxemia, liver steatosis, and obesity in mice. **Nutrition research**, v. 67, p. 78-89, 2019.

KIM, Jin Taek; LEE, Hong Kyu. Childhood obesity and endocrine disrupting chemicals. **Annals of pediatric endocrinology & metabolism**, v. 22, n. 4, p. 219, 2017.

KIM, M.J.; PARK, Y.J. Bisphenols and Thyroid Hormone. **Endocrinol Metab**, v.34, p.340-348, 2019.

KIM, Sunhong *et al.* Perspectives on the therapeutic potential of short-chain fatty acid receptors. **BMB reports**, v. 47, n. 3, p. 173, 2014.

KLAESSENS, Simon *et al.* Systemic tryptophan homeostasis. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 9, p. 897929, 2022.

KOEK, Maud M. *et al.* Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 78, n. 4, p. 1272-1281, 2006.

KOEK, Maud M. *et al.* Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. **Metabolomics**, v. 7, p. 307-328, 2011.

KOŁODZIEJCZYK, Aleksandra A.; ZHENG, Danping; ELINAV, Eran. Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 742-753, 2019.

KOUTNIKOVA, Hana *et al.* Impact of bacterial probiotics on obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease related variables: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BMJ open**, v. 9, n. 3, p. e017995, 2019.

KRAWISZ, J. E., P. Sharon, *et al.* Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v.87, n.6, Dec, p.1344-50. 1984.

KRISS, Michael *et al.* Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. **Current opinion in microbiology**, v. 44, p. 34-40, 2018.

KU, Tingting *et al.* Tebuconazole induces liver injury coupled with ROS-mediated hepatic metabolism disorder. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 220, p. 112309, 2021.

KU, Tingting *et al.* Tebuconazole mediates cognitive impairment via the microbe-gut-brain axis (MGBA) in mice. **Environment International**, v. 173, p. 107821, 2023.

- KUBINCOVÁ, P. *et al.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Endocrine Disruption: Role of Testicular Gap Junctional Intercellular Communication and Connexins. **Toxicological Sciences**, v.169, p.70–83, 2019.
- KWON, Hyuk-Cheol *et al.* Tebuconazole fungicide induces lipid accumulation and oxidative stress in HepG2 cells. **Foods**, v. 10, n. 10, p. 2242, 2021.
- LA MERRILL, Michele A. *et al.* Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 45-57, 2020.
- LAFFEL, Lori. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 15, n. 6, p. 412-426, 1999.
- LARSSON, Martin Olof *et al.* Refined assessment and perspectives on the cumulative risk resulting from the dietary exposure to pesticide residues in the Danish population. **Food and chemical toxicology**, v. 111, p. 207-267, 2018.
- LAUFS, Ulrich *et al.* Clinical review on triglycerides. **European heart journal**, v. 41, n. 1, p. 99-109c, 2020.
- LE BIHANIC, Florane *et al.* In vivo micronucleus screening in zebrafish by flow cytometry. **Mutagenesis**, v. 31, n. 6, p. 643-653, 2016.
- LEE, Gun-Hwi; CHOI, Kyung-Chul. Adverse effects of pesticides on the functions of immune system. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 235, p. 108789, 2020.
- LEE, In-Ah *et al.* Bifidobacterium longum HY8004 attenuates TNBS-induced colitis by inhibiting lipid peroxidation in mice. **Inflammation Research**, v. 59, n. 5, p. 359-368, 2010.
- LEI, Shulei *et al.* Alterations in energy/redox metabolism induced by mitochondrial and environmental toxins: a specific role for glucose-6-phosphate-dehydrogenase and the pentose phosphate pathway in paraquat toxicity. **ACS chemical biology**, v. 9, n. 9, p. 2032-2048, 2014.
- LI, Jiao *et al.* Co-exposure of polycarbonate microplastics aggravated the toxic effects of imidacloprid on the liver and gut microbiota in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 101, p. 104194, 2023b.
- LI, Wenxiang *et al.* Association of glyphosate exposure with multiple adverse outcomes and potential mediators. **Chemosphere**, v. 345, p. 140477, 2023.
- LIANG, Fa-Zhan *et al.* A new synthesis of D-lyxose from D-arabinose. **Carbohydrate Research**, v. 526, p. 108782, 2023.
- LIM, P. S. *et al.* Cholesterol homeostasis associated with probiotic supplementation in vivo. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 5, p. 1374-1388, 2020.

- LITVAK, Yael; BYNDLOSS, Mariana X.; BÄUMLER, Andreas J. Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. **Science**, v. 362, n. 6418, p. eaat9076, 2018.
- LIU, Jingbo; YANG, Guangcheng; ZHANG, Hongna. Glyphosate-triggered hepatocyte ferroptosis via suppressing Nrf2/GSH/GPX4 axis exacerbates hepatotoxicity. **Science of The Total Environment**, v. 862, p. 160839, 2023a.
- LIU, Jingkun *et al.* Gut flora-mediated metabolic health, the risk produced by dietary exposure to acetamiprid and tebuconazole. **Foods**, v. 10, n. 4, p. 835, 2021.
- LIU, Mengling *et al.* Maternal exposure to a glyphosate-based herbicide impairs placental development through endoplasmic reticulum stress in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 173, p. 113640, 2023b.
- LIU, Shaoying *et al.* Development of a multiresidue method for endocrine-disrupting pesticides by solid phase extraction and determination by UHPLC-MS/MS from drinking water samples. **Journal of Chromatographic Science**, v. 58, n. 3, p. 195-202, 2020.
- LOPES, Carla Vanessa Alves; ALBUQUERQUE, Guilherme Souza Cavalcanti de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em debate**, v. 42, p. 518-534, 2018.
- LOWRY, Oliver H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUKOWICZ, C. *et al.* Metabolic effects of achronic dietary exposure to a low-dose pesticide cocktail in mice: Sexual dimorphism and role of the constitutive and rostrane receptor. **Environmental Health Perspectives**, v. 126, n. 6, p. 1–18, 2018.
- LUO, Jie; YANG, Hongyuan; SONG, Bao-Liang. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 4, p. 225-245, 2020.
- LUO, Ting; WANG, Xiaoyu; JIN, Yuanxiang. Low concentrations of imidacloprid exposure induced gut toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 241, p. 108972, 2021.
- MA, Xiaoran *et al.* Low dose of carbendazim and tebuconazole: accumulation in tissues and effects on hepatic oxidative stress in mice. **Toxics**, v. 11, n. 4, p. 326, 2023.
- MACFARLANE, Sandra; MACFARLANE, George T. Regulation of short-chain fatty acid production. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 1, p. 67-72, 2003.
- MAFRA, Agnes Cristina Oliveira. Produção de ácido glucônico e xarope de frutose a partir de sacarose catalisada por enzimas em reator airlift. 2013.
- MAGNE, Fabien *et al.* The firmicutes/bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients?. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1474, 2020.

- MAIA, M.L. *et al.* Organochlorine pesticides, brominated flame retardants, synthetic musks and polycyclic aromatic hydrocarbons in shrimps. An overview of occurrence and its implication on human exposure. **Heliyon**, v. 6, p.1-11, 2020.
- MAKKI, Kassem *et al.* The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. **Cell host & microbe**, v. 23, n. 6, p. 705-715, 2018.
- MAÑAS, F. *et al.* Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 3, p. 834-837, 2009a.
- MAÑAS, Fernando *et al.* Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 37-41, 2009b.
- MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação de controle de qualidade analítica**, Controle. Brasília, 2011.
- MARCHI, Giuliano; MARCHI, Edilene Carvalho Santos; GUIMARÃES, Tadeu Graciolli. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. 2008.
- MARROQUI, Laura *et al.* Mitochondria as target of endocrine-disrupting chemicals: implications for type 2 diabetes. **Journal of Endocrinology**, v. 239, n. 2, p. R27-R45, 2018.
- MARSOVA, Maria *et al.* Protective effects of *Lactobacillus fermentum* U-21 against paraquat-induced oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* and mouse models. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1-10, 2020.
- MARTINEZ, Adriana; AL-AHMAD, Abraham Jacob. Effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid on an isogenic model of the human blood-brain barrier. **Toxicology letters**, v. 304, p. 39-49, 2019.
- MARTÍNEZ-ARRANZ, Ibon *et al.* Data in support of enhancing metabolomics research through data mining. **Data in Brief**, v. 3, p. 155-164, 2015.
- MARTINS-GOMES, Carlos *et al.* Glyphosate vs. glyphosate-based herbicides exposure: A review on their toxicity. **Journal of Xenobiotics**, v. 12, n. 1, p. 21-40, 2022.
- MARTY, Mary Sue *et al.* Pronamide: Weight of evidence for potential estrogen, androgen or thyroid effects. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 72, n. 2, p. 405-422, 2015.
- MASTRANGELO, Annalaura *et al.* From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. **Analytica chimica acta**, v. 900, p. 21-35, 2015.
- MATSUZAKI, Rie *et al.* Pesticide exposure and the microbiota-gut-brain axis. **The ISME Journal**, v. 17, n. 8, p. 1153-1166, 2023.

MAZZIOTTA, Chiara *et al.* Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. **Cells**, v. 12, n. 1, p. 184, 2023.

MCINTOSH, Freda M. *et al.* Phylogenetic distribution of genes encoding β -glucuronidase activity in human colonic bacteria and the impact of diet on faecal glycosidase activities. **Environmental microbiology**, v. 14, n. 8, p. 1876-1887, 2012.

MENDES, Viviani; GALVAO, Izabela; VIEIRA, Angelica Thomaz. Mechanisms by which the gut microbiota influences cytokine production and modulates host inflammatory responses. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 39, n. 7, p. 393-409, 2019.

MÉNÉGAUT, Louise *et al.* Inflammation and oxidative stress markers in type 2 diabetes patients with Advanced Carotid atherosclerosis. **Cardiovascular Diabetology**, v. 22, n. 1, p. 248, 2023.

MENG, Zhiyuan *et al.* A common fungicide tebuconazole promotes colitis in mice via regulating gut microbiota. **Environmental Pollution**, v. 292, p. 118477, 2022.

MENG, Zhiyuan *et al.* Gut microbiota: a key factor in the host health effects induced by pesticide exposure?. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 39, p. 10517-10531, 2020.

MERHI, M. *et al.* Gender-linked haematopoietic and metabolic disturbances induced by a pesticide mixture administered at low dose to mice. **Toxicology**, v. 267, n. 1-3, p. 80-90, 2010.

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

MOHAMED, Wafaa H. *et al.* Mutagenic effect of imidacloprid insecticide: The ameliorative effect of pre and post exposure to olive oil. **Journal of food biochemistry**, v. 44, n. 6, p. e13221, 2020.

MORGAN, Ashraf M.; IBRAHIM, Marwa A.; HUSSIEN, Ahmed M. Glycyrrhizic acid modulates the atrazine-induced apoptosis in rabbit spleen. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 34924-34930, 2019.

MOSSA, Abdel-Tawab H. *et al.* Safety of natural insecticides: toxic effects on experimental animals. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

MOTTA, Erick VS; RAYMANN, Kasie; MORAN, Nancy A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 41, p. 10305-10310, 2018.

MZID, Massara *et al.* Chemoprotective role of ethanol extract of *Urtica urens* L. against the toxicity of imidacloprid on endocrine disruption and ovarian morphometric in female rats, GC/MS analysis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 518-527, 2018.

NACANO, Bruno Reis Moreira *et al.* Efeitos da ingestão do herbicida glifosato na função renal de ratos em uma dieta balanceada. **Brazilian Journal of Nephrology**, 2023.

NAGY, Károly *et al.* Micronucleus formation induced by glyphosate and glyphosate-based herbicides in human peripheral white blood cells. **Frontiers in Public Health**, v. 9, p. 639143, 2021.

NANNAN LV, *et al.* Sublethal and lethal effects of the imidacloprid on the metabolic characteristics based on high-throughput non-targeted metabolomics in *Aphis gossypii* Glover. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 212, p. 111969, 2021.

NASCIUTTI, Luiz Eurico *et al.* Histologia do tubo digestório. **ORÍÁ, R. B.; BRITO, ga DE c.(Ed.). Aparelho Digestório: integração básico-clínica. São Paulo: Blucher**, p. 273-314, 2016.

NDONWI, Elvis Ngwa *et al.* Gestational exposure to pesticides induces oxidative stress and lipid peroxidation in offspring that persist at adult age in an animal model. **Toxicological Research**, v. 35, p. 241-248, 2019.

NDONWI, Elvis Ngwa *et al.* Metabolic effects of exposure to pesticides during gestation in female Wistar rats and their offspring: a risk factor for diabetes?. **Toxicological research**, v. 36, p. 249-256, 2020.

NDREPEPA, Gjin. Myeloperoxidase—A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. **Clinica chimica acta**, v. 493, p. 36-51, 2019.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2022.

NIEHE - National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/pesticides/index.cfm>

NIKIFOROVA, V. J. *et al.* Glyoxylate, a new marker metabolite of type 2 diabetes. **J Diabetes Res** 2014; 2014: 685204.

NOLASCO, Daniela Magalhães *et al.* An Exploratory Study of the Metabolite Profiling from Pesticides Exposed Workers. **Metabolites**, v. 13, n. 5, p. 596, 2023.

NOWAK, Karolina *et al.* Parabens and their effects on the endocrine system. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 474, p. 238-251, 2018.

NUNES, Aline *et al.* The use of pesticides in Brazil and the risks linked to human health. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 37885-37904, 2021.

OLIVEIRA, K. J. *et al.* Thyroid function disruptors: from nature to chemicals. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.62, p. 1-19, 2019.

ORTIZ, Pilar *et al.* Impact of cumulative environmental and dietary xenobiotics on human microbiota: risk assessment for one health. **Journal of Xenobiotics**, v. 12, n. 1, p. 56-63, 2022.

OTHMAN, Mahmoud Ben; SAKAMOTO, Kazuichi. Effect of inactivated Bifidobacterium longum intake on obese diabetes model mice (TSOD). **Food Research International**, v. 129, p. 108792, 2020.

OTHMÈNE, Yosra Ben *et al.* Oxidative stress, DNA damage and apoptosis induced by tebuconazole in the kidney of male Wistar rat. **Chemico-Biological Interactions**, v. 330, p. 109114, 2020d.

OTHMÈNE, Yosra Ben *et al.* Tebuconazole induced cardiotoxicity in male adult rat. **Food and chemical toxicology**, v. 137, p. 111134, 2020c.

OTHMÈNE, Yosra Ben *et al.* Tebuconazole induced cytotoxic and genotoxic effects in HCT116 cells through ROS generation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 174, p. 104797, 2021.

OTHMÈNE, Yosra Ben *et al.* Tebuconazole induced oxidative stress and histopathological alterations in adult rat heart. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 170, p. 104671, 2020b.

OTHMÈNE, Yosra Ben *et al.* Tebuconazole induces ROS-dependent cardiac cell toxicity by activating DNA damage and mitochondrial apoptotic pathway. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 204, p. 111040, 2020a.

OTHMÈNE, Yosra Ben *et al.* Triazole fungicide tebuconazole induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress pathway. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 94, p. 103919, 2022.

PACYGA, Diana C.; SATHYANARAYANA, Sheela; STRAKOVSKY, Rita S. Dietary predictors of phthalate and bisphenol exposures in pregnant women. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. 5, p. 803-815, 2019.

PALANIYANDI, Sasikumar Arunachalam *et al.* Probiotic characterization of cholesterol-lowering Lactobacillus fermentum MJM60397. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 12, p. 1161-1172, 2020.

PALAZOGLU, M. & FIEHN, O. Metabolite identification in blood plasma using GC/MS and the Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library. Agilent Technologies Inc. (1-8) 2013.

PÉREZ-IGLESIAS, Juan Manuel *et al.* The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 120-126, 2014.

PERRY, Rachel J. *et al.* Acetate mediates a microbiome–brain– β -cell axis to promote metabolic syndrome. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 213-217, 2016.

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.

POGGIOGALLE, Eleonora; JAMSHED, Humaira; PETERSON, Courtney M. Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans. **Metabolism**, v. 84, p. 11-27, 2018.

PRASAD, Monisha *et al.* Impact of glyphosate on the development of insulin resistance in experimental diabetic rats: role of NF κ B signalling pathways. **Antioxidants**, v. 11, n. 12, p. 2436, 2022.

PRASAD, Sahdeo *et al.* Clastogenic effects of glyphosate in bone marrow cells of Swiss albino mice. **Journal of toxicology**, v. 2009, 2009.

PRISTA, João; UVA, A. de S. A utilização de indicadores biológicos em Saúde Ocupacional. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 6, p. 45-54, 2006.

PRODANOV, Cleber Cristiano; DE FREITAS, Ernani Cesar. **Metodologia do trabalho científico: métodos e técnicas da pesquisa e do trabalho acadêmico-2ª Edição**. Editora Feevale, 2013.

QI, Lei *et al.* Glyphosate based-herbicide disrupts energy metabolism and activates inflammatory response through oxidative stress in mice liver. **Chemosphere**, v. 315, p. 137751, 2023.

QUINTANILHA, Mônica F. *et al.* Bifidobacterium longum subsp. longum 51A attenuates intestinal injury against irinotecan-induced mucositis in mice. **Life Sciences**, v. 289, p. 120243, 2022.

RIBEIRO, Roberto Marques. **Estudo do efeito de diferentes métodos de armazenamento das amostras de fezes para a caracterização da microbiota intestinal, por meio de sequenciamento de nova geração**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RIEG, Carla Elise Heinz *et al.* Perinatal exposure to a glyphosate pesticide formulation induces offspring liver damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 454, p. 116245, 2022.

ROCHA, Bianca Telles *et al.* **Plastificantes na saúde humana: implicações na obesidade**. 2020. Trabalho de conclusão de curso. Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

ROMAN, Pablo *et al.* Microbiota and organophosphates. **Neurotoxicology**, v. 75, p. 200-208, 2019.

- ROUX, A. *et al.* Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 119–135, 2011.
- ROY, Sohini *et al.* Tagatose as a potential nutraceutical: Production, properties, biological roles, and applications. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 11, p. 2699-2709, 2018.
- RUUSKANEN, Suvi *et al.* Glyphosate-based herbicides influence antioxidants, reproductive hormones and gut microbiome but not reproduction: A long-term experiment in an avian model. **Environmental Pollution**, v. 266, p. 115108, 2020.
- SALAMONE, Michael F.; HEDDLE, John A. The bone marrow micronucleus assay: rationale for a revised protocol. In: **Chemical mutagens**. Springer, Boston, MA, 1983. p. 111-149.
- SANDERS, Mary Ellen *et al.* Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 10, p. 605-616, 2019.
- SANDESARA, Pratik B. *et al.* The forgotten lipids: triglycerides, remnant cholesterol, and atherosclerotic cardiovascular disease risk. **Endocrine Reviews**, v. 40, n. 2, p. 537-557, 2019.
- SANTAMARTA, José. A ameaça dos disruptores endócrinos. **Revista Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, Porto Alegre**, v. 2, n. 3, p. 18-29, 2001.
- SANTOS, Spencer S. *et al.* Bifidobacterium longum subsp. longum 51A Attenuates Signs of Inflammation in a Murine Model of Food Allergy. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-11, 2021.
- SAXENA, Ankita; KESARI, V. P. Lack of genotoxic potential of pesticides, spinosad, imidacloprid and neem oil in mice (*Mus musculus*). **Journal of environmental biology**, v. 37, n. 2, p. 291, 2016.
- SEVIM, Cigdem *et al.* Investigation of the miRNA levels changes to acceptable daily intake dose pesticide mixture exposure on rat mesentery and pancreas. **Chemosphere**, v. 349, p. 140712, 2024.
- SHERIF, Moustafa *et al.* Genotoxicity of occupational pesticide exposures among agricultural workers in arab countries: a systematic review and meta-analysis. **Toxics**, v. 11, n. 8, p. 663, 2023.
- SHI, Shuiqin *et al.* Biological characteristics and whole-genome analysis of the potential probiotic, *Lactobacillus reuteri* S5. **Letters in Applied Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 593-603, 2022.
- SINGH, Simranjeet *et al.* Herbicide glyphosate: toxicity and microbial degradation. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 20, p. 7519, 2020.

- SMITH, Lorraine *et al.* Perinatal exposure to a dietary pesticide cocktail does not increase susceptibility to high-fat diet-induced metabolic perturbations at adulthood but modifies urinary and fecal metabolic fingerprints in C57Bl6/J mice. **Environment international**, v. 144, p. 106010, 2020.
- SOTO, Ana M.; SONNENSCHNEIN, Carlos. DDT, endocrine disruption and breast cancer. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 9, p. 507-508, 2015.
- SOUZA, Mirna Maciel Dauriol. Avaliação do efeito de duas espécies de Copaíba em modelo experimental murino de alergia alimentar. 2010.
- SOUZA, T. C. *et al.* In vitro evaluation of Bifidobacterium strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. **Beneficial microbes**, v. 4, n. 2, p. 179-186, 2013.
- ŚREDNICKA, Paulina *et al.* Probiotics as a biological detoxification tool of food chemical contamination: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 153, p. 112306, 2021.
- STIVAKTAKIS, Polychronis D. *et al.* Long-term exposure of rabbits to imidacloprid as quantified in blood induces genotoxic effect. **Chemosphere**, v. 149, p. 108-113, 2016.
- SUN, Quancai *et al.* Imidacloprid promotes high fat diet-induced adiposity and insulin resistance in male C57BL/6J mice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 49, p. 9293-9306, 2016.
- SUN, Quancai *et al.* Imidacloprid promotes high fat diet-induced adiposity in female C57BL/6J mice and enhances adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes via the AMPK α -mediated pathway. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 31, p. 6572-6581, 2017.
- SUN, Xiaoxuan *et al.* Bifidobacterium mediate gut microbiota-remedied intestinal barrier damage caused by cyproconazole in zebrafish (*Danio rerio*). **Science of The Total Environment**, v. 912, p. 169556, 2024.
- SUSSULINI, Alessandra (Ed.). **Metabolomics: from fundamentals to clinical applications**. Springer, 2017.
- SZEW CZYK, Rafał *et al.* Atrazine biodegradation by mycoinsecticide *Metarhizium robertsii*: Insights into its amino acids and lipids profile. **Journal of environmental management**, v. 262, p. 110304, 2020.
- TANG, Bor Luen. Glucose, glycolysis, and neurodegenerative diseases. **Journal of cellular physiology**, v. 235, n. 11, p. 7653-7662, 2020.
- TANG-PÉRONARD, Jeanett Louise *et al.* Endocrine-disrupting chemicals and obesity development in humans: a review. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 8, p. 622-636, 2011.
- TEKELI, Ibrahim Ozan *et al.* Levels of Metals and Organochlorine Pesticides in Kidney, Liver, and Muscle Tissues of Wild Boars (*Sus scrofa*) from Hatay Province, Eastern Mediterranean Region, Turkey. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 106, n. 2, p. 257-263, 2021.

TELLEZ-BAÑUELOS, Martha Cecilia *et al.* Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 105-111, 2009.

TITENKO-HOLLAND, N. *et al.* Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 388, n. 1, p. 85-95, 1997.

TREMBLAY, Frédéric *et al.* Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability. **Diabetes**, v. 54, n. 9, p. 2674-2684, 2005.

TSIAOISSIS, John *et al.* Effects of single and combined toxic exposures on the gut microbiome: Current knowledge and future directions. **Toxicology letters**, v. 312, p. 72-97, 2019.

URSELL, Luke K. *et al.* The intestinal metabolome: an intersection between microbiota and host. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1470-1476, 2014.

VALENTE, Daniel *et al.* Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, p. e2s, 2017.

VAN DEN BERG, Robert A. *et al.* Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC genomics**, v. 7, p. 1-15, 2006.

VARDAVAS, Alexander I. *et al.* The metabolism of imidacloprid by aldehyde oxidase contributes to its clastogenic effect in New Zealand rabbits. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 829, p. 26-32, 2018.

VAROL, Sefer *et al.* Protective effects of L-glutamine against toxicity of deltamethrin in the cerebral tissue. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, p. 1005-1011, 2016.

VELMURUGAN, Ganesan *et al.* Gut microbiota, endocrine-disrupting chemicals, and the diabetes epidemic. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 8, p. 612-625, 2017.

VENETI, Stavroula *et al.* Ketone Bodies in Diabetes Mellitus: Friend or Foe?. **Nutrients**, v. 15, n. 20, p. 4383, 2023.

VERNOCCI, Pamela; DEL CHIERICO, Federica; PUTIGNANI, Lorenza. Gut microbiota profiling: metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1144, 2016.

VIEIRA, A. T. *et al.* Oral treatment with *Bifidobacterium longum* 51A reduced inflammation in a murine experimental model of gout. **Beneficial microbes**, v. 6, n. 6, p. 799-806, 2015.

VIEIRA, Angélica Thomaz; FUKUMORI, Claudio; FERREIRA, Caroline Marcantonio. New insights into therapeutic strategies for gut microbiota modulation in inflammatory diseases. **Clinical & translational immunology**, v. 5, n. 6, p. e87, 2016.

- VILLARREAL-PÉREZ, Jesús Zacarías *et al.* Plasma and urine metabolic profiles are reflective of altered beta-oxidation in non-diabetic obese subjects and patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 6, p. 1-8, 2014.
- WANG, Chung-Yi *et al.* Fast quantification of short-chain fatty acids in rat plasma by gas chromatography. **Journal of food science**, v. 85, n. 6, p. 1932-1938, 2020.
- WANG, Nana *et al.* Alleviation Effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* XLTG11 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **Microorganisms**, v. 9, n. 10, p. 2093, 2021.
- WANG, Yang *et al.* Antioxidant properties of probiotic bacteria. **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 521, 2017.
- WERNER, B. *et al.* Practical use of immunohistochemistry in surgical pathology. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 5, p. 353–364, 2005.
- WILSON III, David M.; THOMPSON, Larry H. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 616, n. 1-2, p. 11-23, 2007.
- WULTSCH, Georg *et al.* Formation of micronuclei and other nuclear anomalies in exfoliated nasal and oral cells: results of a human study with workers in a power plant processing poultry litter. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 216, n. 1, p. 82-87, 2013.
- XIAO, Fei *et al.* Leucine deprivation increases hepatic insulin sensitivity via GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK pathways. **Diabetes**, v. 60, n. 3, p. 746-756, 2011.
- YAN, Sen *et al.* Neonicotinoid insecticides exposure cause amino acid metabolism disorders, lipid accumulation and oxidative stress in ICR mice. **Chemosphere**, v. 246, p. 125661, 2020.
- YANG, Guiling *et al.* Imidacloprid disturbed the gut barrier function and interfered with bile acids metabolism in mice. **Environmental Pollution**, v. 266, p. 115290, 2020.
- YANG, Qin; VIJAYAKUMAR, Archana; KAHN, Barbara B. Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 19, n. 10, p. 654-672, 2018.
- YANG, Jr-Di *et al.* Effects of tebuconazole on cytochrome P450 enzymes, oxidative stress, and endocrine disruption in male rats. **Environmental toxicology**, v. 33, n. 8, p. 899-907, 2018.
- YILMAZ, Bayram *et al.* Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. **Reviews in endocrine and metabolic disorders**, v. 21, n. 1, p. 127-147, 2020.
- YOUNG, Vincent B. The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. **Bmj**, v. 356, 2017.

- YOUSEFI, Morteza *et al.* Protective effects of black seed (*Nigella sativa*) diet supplementation in common carp (*Cyprinus carpio*) against immune depression, oxidative stress and metabolism dysfunction induced by glyphosate. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 109, p. 12-19, 2021.
- YUAN, Xianling *et al.* Gut microbiota: an underestimated and unintended recipient for pesticide-induced toxicity. **Chemosphere**, v. 227, p. 425-434, 2019.
- YUAN, Xianling *et al.* Imidacloprid disrupts the endocrine system by interacting with androgen receptor in male mice. **Science of The Total Environment**, v. 708, p. 135163, 2020.
- YUSA, Vicent; YE, Xiaoyun; CALAFAT, Antonia M. Methods for the determination of biomarkers of exposure to emerging pollutants in human specimens. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 38, p. 129-142, 2012.
- ZHANG, Heng *et al.* A metabolomic study on the gender-dependent effects of maternal exposure to fenvalerate on neurodevelopment in offspring mice. **Science of the total environment**, v. 707, p. 136130, 2020.
- ZHANG, Jia-Le *et al.* Mevalonate pathway and male reproductive aging. **Molecular Reproduction and Development**, v. 90, n. 10-11, p. 774-781, 2023.
- ZHANG, Jingwen *et al.* Melatonin alleviates the deterioration of oocytes and hormonal disorders from mice subjected to glyphosate. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 520, p. 111073, 2021.
- ZHANG, WenJun. Global pesticide use: Profile, trend, cost/benefit and more. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1, 2018.
- ZHANG, WenJun; JIANG, FuBin; OU, JianFeng. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proceedings of the international academy of ecology and environmental sciences**, v. 1, n. 2, p. 125, 2011.
- ZHANG, Y. *et al.* Biological impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. **Environmental Pollution**, v.213, p. 809-824, 2016.
- ZHENG, Yadong *et al.* Probiotics supplementation attenuates inflammation and oxidative stress induced by chronic sleep restriction. **Nutrients**, v. 15, n. 6, p. 1518, 2023.
- ZIMMERMANN, Petra; CURTIS, Nigel. The effect of antibiotics on the composition of the intestinal microbiota-a systematic review. **Journal of Infection**, v. 79, n. 6, p. 471-489, 2019.
- ZMORA, Niv; SUEZ, Jotham; ELINAV, Eran. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 1, p. 35-56, 2019.
- ZUO, Tao *et al.* Urbanization and the gut microbiota in health and inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 7, p. 440-452, 2018.

ANEXOS

Anexo A: Análise Ração comercial Presence® Labina Peletizada Para Ratos, Camundongos e Roedores

Tabela 01: agrotóxicos detectados na amostra

Ingrediente Ativo	Resultado (mg/kg)	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)
Clorpirifós Etil	< LQ	0,005	0,010
HCH Gama (Lindano)	< LQ	0,010	0,020
Pirimifós Metil	0,22	0,005	0,010
Tebuconazole	< LQ	0,005	0,010
Triciclazole	0,01	0,005	0,010
Imidacloprid	< LQ	0,005	0,010
Glifosato	2,00	0,5	1,0

Observação 1: para os demais agrotóxicos pesquisados, o resultado encontrado foi menor que o limite de detecção (< LD)

Tabela 02: agrotóxicos pesquisados na amostra com seus respectivos Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

<p>LD = 0,005 mg/kg e LQ = 0,010 mg/kg – Acefato, Acetamiprido, Aldicarbe, Aldicarbe sulfona, Aldicarbe Sulfóxido, Aletrina/Bioaletrina, Ametrina, Ametotradim, Ametrina, Aminocarbe, Atrazina, Azaconazole, Azinfós-metilico, Azoxistrobina, Benalaxil, Benfuracarb, Bentazona, Bifentrina, Bitertanol, Boscalida, Bromacila, Bromofós Metil, Bupirimate, Buprofezina, Cadusafós, Carbaril, Carbendazim, Carbofurano, Carbofurano-3-hidróxido, Carboxim, Cianazina, Cianofenós, Ciantraniliprole, Ciazofamida, Cimoxanil, Ciprodinil, Ciromazina, Cletodim, Clofentezina, Clomazona, Clorantraniliprole, Clorfenvinfós, Clorfluazurom, Clormequate, Clorimuron Etil, Clorprofam, Clortalonil, Clorpirifós etílico, Clorpirifós-oxon, Clortal-dimetil, Clotianidina, Coumafós, Cresoxim metílico, DDD2,4, DDD4,4, DDE2,4, DDE4,4, DDT2,4, Deltametrina, Diazinona, Diclorofluanid, Dicrotofós, Dietofencarb, Difenconazol, Diflubenzurom, Dimetoato, Dimetomorfe, Diniconazol, Dinotefuram, Diurom, DMST, Dodemorf, Dodine, Emamectina (Benzoato), Epoxiconazol, Espinosade, Espinoteram, Espirodiclofem, Espiromesifem, Espiroxamine, Etiofencarb, Etiofencarb Sulfona, Etiofencarb Sulfóxido, Etiona, Etofemproxi, Etoprofós, Etoxissulfurom, Etrinfós, Famoxadona, Fembuconazol, Fempiroximate, Fempropidim, Fempropimorf, Fenamidona, Fenamifós, Fenamifós Sulfona, Fenamifós Sulfóxido, Fenazaquim, Fenhexamid, Fenotrina, Fenoxicarb, Fentiona, Fention Óxido, Fention Sulfona, Fention Sulfóxido, Fentoato, Fipronil, Flazassulfuron, Flonicamid, Florpirauxifen-Benzil, Fluasifope-butil, Fluazinam, Flubendiamida, Fludioxonil, Flufenoxurom, Fluquinconazol, Fluoxipir-meptílico, Flusilazol, Flutolanil, Flutriafol, Fluxapiroxad, Fomesafem, Forato Sulfona, Forato Sulfóxido, Foransulfurom, Formetanato, Fosfamidona, Fosmete, Fostiazate, Furatiocarbe, Halassulfoton Metil, Haloxifop-metil, Heptenofós, Hexaclorabenzeno, Hexaconazol, Hexazinona, Hexitiazoxi, Imazalil, Imibenconazol, Imidacloprido, Indoxacarbe, Iprovalicarbe, Isofenfós Metil, Isoxaflutole, Lactofem, Linuron, Lufenuron, Malaoxona, Malationa, Mandipropamide, Metalaxil, Metamidofós, Metconazol, Metidationa, Metiocarbe, Metolacolor, Metomil, Metoxifenozida, Metribuzim, Metsulfuron-Metil, Mevinfós, Miclobutanil, Mirex, Molinato, Monocrotofós, Naled, Nitepiram, Nuairimol, Ometoato, Oxadixil, Oxamil, Oxasulfurom, Oxifluorfem, Paclobutrazol, Paraoxon etil, Paraoxon metil, Pencicuroim, Penconazol, Picoxistrobina, Piperonil Butóxido, Piraclostrobin, Pirazofós, Piridabem, Piridafentiona, Piridato, Pirifenoxi, Pirimetanil, Pirmicarbe, Pirimifós etílico, Pirimifós metílico, Piriproxim, Procloraz, Profoxidim, Prometrina, Propamocarbe, Propanil, Propargito, Propiconazol, Propoxur, Quinalfós, Quintozene, Quizalofop-P-etílico, Rotentona, Simazina, Sulfometurom Metil, Sulfotep, Sulfoxaflo, Tebuconazol, Tebufenozida, Tebufemprirade, Tebutiurom, Teflubenzurom, Terbutrina, Tetraclorvinfós, Tetraconazole, Tiabendazole, Tiacloprido, Tiametoxam, Tiobencarbe, Tiodicarbe, Tiofanato metílico, Tolifluanida, Tralkoxidim, Triadimefom, Triadimenol, Triazofós, Triciclazole, Triclorfom, Trifloxistrobina, Triflumizole, Triflorina, Vamidationa e Zoxamida.</p>
<p>LD = 0,010 mg/kg e LQ = 0,020 mg/kg – Abamectina, Acrinatrina, Alacloro, Aldrin, Bromopropilato, Bromuconazol, Ciflutrina, Ciflutrina Beta, Cipermetrina, Cipermetrina Alfa, Cipermetrina Beta, Ciproconazol, Clordano Alfa, Clordano Gama, Clorfenapir, Clorfenson, Clorpirifós Metil, Clortiofós, DDT4,4, Dialate, Dicloran, Diclorvós, Dicofol, Dieldrin, Dinoseb, Dissulfotom, Endossulfam Alfa, Endossulfam Beta, Endossulfam Sulfato, Endrin, Esfenfarelato, Fempropatrina, Fenarimol, Fenitrotriona, Fenfarelato, Flumetrlina, Fosalone, Glufosinato, HCH-Alfa, HCH-Beta, HCH Delta, HCH-Gama (Lindano), Heptacloro, Heptaclor Endo Epóxi, Heptaclor Exo Epóxi, Iprodione, Lambda-Cialotrina, Metamitron, Metoxiclor, Paration Metil, Pendimetalina, Permetrina, Procimidona, Profenofós, Protiofós, Sulfentrazona, Sulfuramid, Temefós, Terbufós, Trifluralina e Vinclozolina</p>
<p>LD = 0,020 mg/kg e LQ = 0,040 mg/kg – Azadiractina, Carbofenotona, Forato, Parationa etílica e Tetradifom.</p>
<p>LD = 0,5 mg/kg e LQ = 1,0 mg/kg – AMPA, Etilenotureia (ETU), Etefom, Glifosato</p>