

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO PESTICIDA METOMIL EM LINFÓCITOS HUMANOS

Sara Caroline Rodrigues de Sousa, Graduanda em Farmácia, UEG/CET, sara.307@aluno.ueg.br
Marya Eduarda Mendes Campos, Graduanda em Farmácia, UEG/CET, maryaeduardamendes16@gmail.com
Cátia Lira do Amaral, Doutora em Toxicologia, UEG/CET catia.amaral@ueg.br

Resumo: O inseticida metomil possui amplo espectro no controle de pragas. É considerado moderadamente tóxico para mamíferos, incluindo seres humanos. É um inseticida neurotóxico do grupo dos carbamatos que inibe a acetilcolinesterase. Quando do uso irregular na agricultura, pode resultar em resíduo em alimentos. Esse estudo investigou a citotoxicidade de formulação comercial contendo metomil em linfócitos humanos isolados a partir de indivíduos saudáveis para testar a hipótese de que resíduo de metomil em alimentos são nocivos a células humanas. As células foram tratadas com metomil (0,05 a 50,0 mM) por 4 horas para estimar a viabilidade celular pelo ensaio com azul de tripan. Houve redução da viabilidade celular nas concentrações de 12,5 e 50,0 mM com concentração efetiva 50% de 6,92 mM. Conclui-se que formulações comerciais contendo metomil podem ser citotóxicas a células de mamíferos, embora as concentrações nocivas estejam acima das concentrações detectadas em plasma humano.

Palavras-chave: viabilidade celular; células primárias; in vitro; agrotóxico; toxicidade

INTRODUÇÃO

O agronegócio é um modelo de produção dependente do uso intensivo de agrotóxicos. Embora a finalidade seja otimizar a produção agrícola, o uso excessivo representa risco para a saúde humana. O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (*PARA*) investigou 270 ingredientes ativos no ciclo 2017/2018 em 14 alimentos de origem vegetal totalizando 4.616 amostras (ANVISA, 2019). O metomil apresentou detecções irregulares em dois alimentos (120 amostras de alface e pimentão) (ANVISA, 2019). Ao observar o total comercializado no Brasil em 2023 o metomil está em 6º lugar (9.160,18 toneladas de produto formulado) (IBAMA, 2024). O metomil pertence a classe dos carbamatos com atividade reversível sobre enzima acetilcolinesterase (TSATSAKIS, A. et al., 2019). Considerando que há detecções irregulares identificadas em resíduos de alimentos brasileiros e alta taxa de comercialização, este trabalho testou a hipótese de que o metomil é capaz de causar danos às células humanas. Para isso, foram utilizadas células isoladas de indivíduos saudáveis como modelo *in vitro* para avaliar os efeitos nocivos do inseticida. A relevância do estudo reside na necessidade de compreender os riscos à saúde associados à exposição ao metomil, que é amplamente utilizado na agricultura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade Estadual de Goiás (CAAE Nº 66860023.1.0000.8113) e assinatura do TCLE, isolou-se linfócitos de cinco doadores saudáveis (3 homens e 2 mulheres) por centrifugação do sangue heparinizado com solução de separação (Ficoll-Paque Plus, GE17-1440-02, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) conforme instruções do fabricante. Os linfócitos foram reconstituídos em RPMI1640 (Gibco, 23400-062, Life Technologies, Paislay, Reino Unido) contendo 20% de soro bovino fetal (SFB, Gibco, 12657-029, Invitrogen, Grand Island, Estados Unidos) sem antibiótico a $2,0 \times 10^6$ células/mL.

Formulação comercial contendo metomil (*S-methyl N-(methylcarbamoyloxy)thioacetimidate*, número CAS 16752-77-5, pureza 21,5% m/v, 215,0 g/L, concentrado solúvel – SL, Metomil 215 SL Nortox, Nortox S.A., Arapongas, Brasil) foi diluída em meio RPMI a 100 mM (76 µL da formulação comercial e 924 µL de RPMI). Obteve-se mais quatro concentrações por diluição seriada 1:4 (75

μL solução e 225 μL *RPMI*). O controle negativo foi *RPMI* sem *SBF* e o controle positivo foi H₂O₂ 0,34% (10 μL H₂O₂ 34% e 990 μL *RPMI*).

O tratamento consistiu na adição de 100 µL das diferentes soluções a 100 µL de suspensão de celular em placa de 96 poços com fundo plano (K12-096, Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) em duplicata. O volume final de cultura foi de 200 µL contendo 200.000 células por poço, $1,0 \times 10^6$ células/mL, 10% de SBF e as seguintes concentrações finais: 50,0; 12,5; 3,12; 0,78; 0,20; 0,05 mM de metomil e H_2O_2 0,0425%. Após incubar a 37°C por 4 horas, estimou-se a citotoxicidade pelo ensaio de exclusão de azul de tripan (PHILLIPS, 1973) em 100 células, diferenciando as viáveis (sem cor) das não viáveis (cor azul). Os resultados foram expressos em % de células viáveis.

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão utilizando o poço como unidade experimental. Com $\alpha = 5\%$, aplicou-se os seguintes testes estatísticos: teste de normalidade Shapiro-Wilk sem transformação logarítmica; teste de Kruskal-Wallis; teste de comparação múltipla de Dunn's para comparar as diferentes condições em relação ao grupo controle negativo. Para estimar a concentração efetiva 50% (EC_{50}), as concentrações (X) foram transformadas pela equação $Y = \log[X]$. No eixo Y, plotou-se o número de células viáveis para linfócitos. Aplicou-se o modelo $\log(\text{agonist})$ vs. $\text{response} - \text{variable slope}$ onde *top* corresponde ao valor de "a", *bottom* corresponde ao valor "d", *HillSlope* corresponde ao valor "b" (SEBAUGH, 2011). Utilizou-se o programa GraphPad Prism (versão 8.0.1, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) para todas as análises estatísticas.

RESULTADOS

A viabilidade celular foi utilizada como triagem de efeitos nocivos, sendo observado citotoxicidade nas concentrações de 12,5 e 50 mM ($p < 0,05$, Figura 1A). Os dados de viabilidade celular foram então plotados em curva concentração resposta (Figura 1B), obtendo-se a EC50 de 6,92 mM para metomil.

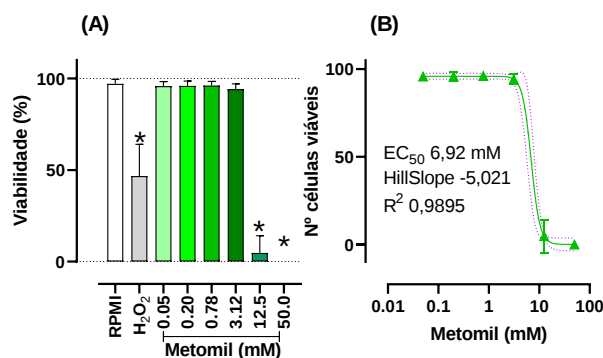


Figura 1 Citotoxicidade de metomil em linfócitos. As células foram tratadas com formulação comercial contendo metomil (Metomil 215 SL Nortox) por 4 horas. (A) Condições de tratamento com diferentes concentrações de metomil (verde), controle negativo (RPMI) ou controle positivo (H_2O_2 0,042%); (B) Curva concentração resposta para viabilidade celular. Cada barra ou ponto representa a média $\pm$ desvio padrão de 6-10 poços provenientes de 5 doadores. Teste de Kruskal Wallis seguido de comparações múltiplas pelo teste de Dunn. * $p < 0,05$ quando comparado com RPMI. Fonte: construído pelos autores utilizando programa GraphPad Prism (versão 8.0.1)

DISCUSSÃO

Nossos dados reportam efeitos nocivos para o metomil. Para facilitar a comparação, realizamos a conversão das concentrações descritas na literatura para mM. As faixas de concentração de metomil testadas no presente estudo foram de 0,05-50,0 mM em linfócitos. A formulação comercial de metomil apresenta-se a 215 g/L (1320 mM). Uma questão foi identificar quais seriam as concentrações plasmáticas de metomil reportadas em humanos ou animais. TSATSAKIS, A. M. et al. (1996) reportam concentrações de metomil no sangue mensuradas em cinco casos de ingestão intencional como 57,0; 35,0; 28,0; 8,0; 5,6 mg/L de sangue

(respectivamente 0,35; 0,22; 0,17; 0,05; 0,03 mM). A exposição transdérmica e inalatória a metomil durante a aplicação na lavoura resultou em 1,6 mg/L (0,01 mM) de metomil no sangue e foi fatal (TSATSAKIS, A. M. et al., 2001). Portanto, nosso estudo inclui as concentrações 0,05 e 0,20 mM que são clinicamente relevantes. É importante enfatizar que a ausência de citotoxicidade observada em concentrações relevantes para a clínica não necessariamente isenta o metomil de efeitos nocivos. Linfócitos tratados com metomil puro ou com formulação técnica apresentaram efeitos clastogênicos nas concentrações de 0,18 mM e 0,25 mM respectivamente (BONATTI et al., 1994). Em linhagem celular V79 de hamster chinês (*Chinese hamster V79 cell lines*), a DL50 foi de 959,57 µg/mL (5,92 mM) para metomil (WANG; CHIOU; CHANG, 1998). Essa concentração foi muito similar à EC50 de 6,92 mM obtida em linfócitos no presente estudo. Por outro lado, metomil reduziu a proliferação celular de células HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) tratadas por 24 horas nas concentrações de 500 e 1000 µM (0,5 e 1,0 mM) com EC50 de 411,2 µM (0,41 mM) (SAQUIB et al., 2021). Aparentemente, as células HUVEC foram mais sensíveis do que células sanguíneas testadas no presente estudo.

CONCLUSÕES

Formulação comercial contendo metomil induziu citotoxicidade em linfócitos humanos em concentrações acima das detectadas no sangue de humanos expostos ao inseticida. Portanto, a resposta citotóxica em linfócitos não é suficiente para explicar os danos celulares em condições reais de exposição quando da ingestão de resíduos em alimentos. Estudos adicionais são necessários para investigar os efeitos cumulativos da exposição prolongada a esses inseticidas. A compreensão desses mecanismos é crucial para avaliar os riscos à saúde humana, considerando não apenas a toxicidade aguda, mas também os possíveis efeitos subletais e de longo prazo associados a exposições repetidas e em baixas concentrações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos produtores por doarem o agrotóxico. C.L.A. recebeu financiamento concedido pela Universidade Estadual de Goiás /Fomento Próprio Pró-Laboratórios (SEI 202200020022736). S.C.R.S. foi bolsista de iniciação científica concedida pela Universidade Estadual de Goiás.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA - Relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. Primeiro ciclo do plano plurianual 2017-2020**. Brasília, 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1>>. Acesso em: 23/mar./25.

BONATTI, S. et al. **Genotoxic effects of the carbamate insecticide methomyl. I. In vitro studies with pure compound and the technical formulation “Lannate 25”**. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 23, n° 4, p. 306–311, 1994. ISSN: 10982280, DOI: 10.1002/em.2850230408.

IBAMA. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil - Boletim 2023 - Vendas por UF - 2023**. Brasília, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/qualidadeambiental/relatorios/2024/2024-12-26_05_vendas_por_uf_agrotoxicos_quimicos_2023.xlsx>. Acesso em: 23/mar./25.

PHILLIPS, H. J. **Dye Exclusion Tests for Cell Viability**. *Tissue Culture* : Elsevier, 1973. p. 406–408. DOI: 10.1016/B978-0-12-427150-0.50101-7.

SAQUIB, Q. et al. **Cytotoxicity and genotoxicity of methomyl, carbaryl, metalaxyl, and pendimethalin in human umbilical vein endothelial cells**. *Journal of Applied Toxicology*, v. 41, nº 5, p. 832–846, 2021. ISSN: 10991263, DOI: 10.1002/jat.4139.

SEBAUGH, J. L. **Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation**. *Pharmaceutical Statistics*, v. 10, nº 2, p. 128–134, 2011. ISSN: 1539-1604, DOI: 10.1002/pst.426.

TSATSAKIS, A. et al. **Genotoxic, cytotoxic, and cytopathological effects in rats exposed for 18 months to a mixture of 13 chemicals in doses below NOAEL levels**. *Toxicology Letters*, v. 316, p. 154–170, 2019. ISSN: 18793169, DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.09.004.

TSATSAKIS, A. M. et al. **Acute poisoning with carbamate pesticides: the Cretan experience**. *Science & Justice*, v. 36, nº 1, p. 35–39, 1996. ISSN: 13550306, DOI: 10.1016/S1355-0306(96)72552-2.

TSATSAKIS, A. M. et al. **Acute Fatal Poisoning by Methomyl Caused by Inhalation and Transdermal Absorption**. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 66, nº 4, p. 415–420, 2001. ISSN: 0007-4861, DOI: 10.1007/s00128-001-0021-2.

WANG, T. C.; CHIOU, C. M.; CHANG, Y. L. **Genetic toxicity of N-methylcarbamate insecticides and their N-nitroso derivatives**. *Mutagenesis*, v. 13, nº 4, p. 405–408, 1998. ISSN: 0267-8357, DOI: 10.1093/mutage/13.4.405.