UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliações cito e ecotoxicológicas dos
fotossensibilizadores fenotiazínicos atualmente utilizados
no tratamento fotodinâmico antimicrobiano**

Gabriela Carvalho Andrade

Ribeirão Preto 2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliações cito e ecotoxicológicas dos
fotossensibilizadores fenotiazínicos atualmente utilizados
no tratamento fotodinâmico antimicrobiano**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração:
Bioagentes e Biotecnologia
Aplicados à Farmácia

Orientada: Gabriela Carvalho
Andrade

Orientador: Prof. Dr. Gilberto
Úbida Leite Braga

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 11/05/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Andrade, Gabriela Carvalho

Avaliações cito e ecotoxicológicas dos fotossensibilizadores fenotiazínicos atualmente utilizados no tratamento fotodinâmico antimicrobiano.

68 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia.

Orientador: Braga, Gilberto Úbida Leite.

1. Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano
2. Fotossensibilizadores Fenotiazínicos,
3. Citotoxicidade,
4. Ecotoxicidade,
5. Risco Ecológico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Gabriela Carvalho Andrade

Título do trabalho: Avaliações cito e ecotoxicológicas dos fotossensibilizadores fenotiazínicos atualmente utilizados no tratamento fotodinâmico antismicrobiano

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração:
Bioagentes e Biotecnologia
Aplicados à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto
Úbida Leite Braga

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho

Aos meus pais, por todo amor, apoio e suporte que me deram ao longo de toda a minha caminhada.

A minha família, por sempre estar presente e me apoiando nos piores e melhores momentos.

E ao meu filho, que é a minha fonte de inspiração e o grande amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

- A DEUS PELA VIDA

- Ao Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga, pela excelente orientação, paciência e por ter me proporcionado um grande amadurecimento pessoal e profissional.
- Aos meus colegas de laboratório Marcelo F. Da Cruz, Pericles Abreu, Fernando Grime pela companhia de jornada, e, em especial ao Guilherme T. P. Brancini, por toda ajuda, conselhos e auxílios na redação da presente dissertação, a quem serei eternamente grata.
- A todo o pessoal do laboratório de toxicologia: Klaus Acaroni, Andréia Ávila, Flavia Abe e também a Professora Danielle Palma de Oliveira, que me ajudaram a conduzir uma grande parte dos experimentos.
- Aos profissionais da CETESB, o gerente Eduardo Savazzi e o Me. André Micas, por terem cedido seu espaço de trabalho e também pela excelente orientação.
- Ao pessoal da UNIFRAN, Professora Denise Crispim e a Dra. Heloisa Nicolella, por toda ajuda e disponibilização para realização dos testes de citotoxicidade.
- Aos colegas que conheci durante esse trajeto, que ficarão pra sempre presentes em meu coração.
- E aos Professores e profissionais com quem tive contato por todo este período, que me ajudaram de diversas maneiras.
- À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro aos estudos.
- O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001

*“Nada do que vivemos tem sentido se não tocarmos o coração das
pessoas.”*

Cora Coralina

*“Quando nao podemos mais mudar uma situação, somos
obrigados a mudar a nós mesmos.”*

Viktor Frankl

Resumo

ANDRADE, G. C. Avaliações cito e ecotoxicológicas dos fotossensibilizadores fenotiazínicos atualmente utilizados no tratamento fotodinâmico antimicrobiano. 2021. 67F. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O uso indiscriminado de antibióticos e antifúngicos e o consequente aumento do número de linhagens resistentes a esses compostos levaram a uma busca por tratamentos alternativos capazes de controlar patógenos resistentes. Nesse cenário, o tratamento fotodinâmico antimicrobiano (TFD) é uma alternativa interessante aos antimicrobianos convencionais. A abordagem baseia-se em três componentes: um fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular. A exposição do FS à luz resulta na produção local de várias espécies reativas de oxigênio, que matam o micro-organismo sem causar danos significativos ao animal ou à planta hospedeira. Nos últimos anos, o TFD foi proposto para o controle de fitopatógenos. Evidentemente, tal uso implicará na aplicação de grandes quantidades de FS no meio ambiente com a consequente contaminação do solo e dos corpos d'água. Portanto, os pré-requisitos essenciais para o uso de TFD no campo são as avaliações de impacto ecotoxicológico e ambiental desses compostos. O objetivo deste estudo é avaliar a citotoxicidade e a ecotoxicidade de FS fenotiazínicos e comparar tais dados com aqueles obtidos para o antifúngico NATIVO 75WG, comumente utilizado no controle de fungos fitopatogênicos. A citotoxicidade foi avaliada em fibroblastos humanos pelo ensaio de XTT, enquanto que a ecotoxicidade foi avaliada por meio da determinação da toxicidade aguda para o microcrustáceo aquático *Daphnia similis* e para embriões do peixe *Danio rerio*. Os FS fenotiazínicos utilizados foram: Azul de Metileno (MB), Novo Azul de Metileno N (NMBN), Azul de Toluidina (TBO) e Dimetil Azul de Metileno (DMMB). Como tratam-se de compostos FS, todas as avaliações foram feitas na presença e na ausência de luz. Nos ensaios de citotoxicidade, o NATIVO foi a substância mais tóxica, com concentração inibitória 50% (IC₅₀) menor do que maior diluição utilizada no ensaio, que foi 10⁻⁸ vezes a concentração do produto utilizada no campo. Em seguida, vieram os FS DMMB, NMBN, TBO e MB, com IC₅₀ de 1,6; 3,8; 10,5 e 122,1 µM, respectivamente, no escuro. A iluminação com luz vermelha reduziu os valores de IC₅₀ para todos os FS. Nos ensaios de ecotoxicidade com *D. similis*, todos os FS foram muito tóxicos tanto no escuro como no claro. Apesar disso, a magnitude desse fenômeno foi diferente dependendo do FS, sendo os valores de concentração efetiva para MB, NMBN, TBO e DMMB de 2,1; 2,0; 2,9 e 0,8 µM, respectivamente. Nesse caso, houve maior toxicidade do DMMB em relação aos demais FS. Os resultados com *D. rerio* mostraram que o FS MB foi tóxico apenas na maior concentração utilizada (100 µM), diferindo dos demais FS. A ecotoxicidade foi expressa pelos valores de concentração letal 50 % (LC₅₀). Para o MB, o valor de LC₅₀ não pode ser calculado devido à baixa mortalidade, sendo, portanto, maior que 100 µM. Para os FS NMBN e TBO, os valores de LC₅₀ no escuro são, respectivamente, 49,8 µM e 40,5 µM. No claro, esses valores diminuíram para 15,4 µM e 31,2 µM. Para o DMMB, novamente não foi possível calcular um valor de LC₅₀, mas esse valor é estimado entre 1 e 10 µM tanto na luz quanto no escuro. Todos os FS foram menos tóxicos quando comparados ao antifúngico NATIVO, que causou morte dos embriões de *D. rerio* mesmo após diluições de 1:1000. Em resumo, pode-se afirmar, baseado nos ensaios de citotoxicidade e de ecotoxicidade, que a ordem crescente de toxicidade dos compostos avaliados é MB < TBO < NMBN < DMMB < NATIVO. Dessa forma, apesar de os FS terem apresentado uma relevante toxicidade, todos eles foram menos tóxicos que o antifúngico amplamente utilizado NATIVO por uma margem considerável. Portanto, o TFD pode e deve ser considerado como método alternativo no controle de patógenos, agora não somente pela menor probabilidade de

seleção de linhagens tolerantes, mas também por sua relativa baixa toxicidade ambiental.

Palavras-chave: Tratamento fotodinâmico antimicrobiano, Fotossensibilizadores fenotiazínicos, Citotoxicidade, Ecotoxicidade, Risco ecológico.

Abstract

ANDRADE, G. C. Cytological and ecotoxicological evaluations of the phenothiazinium photosensitizers currently used in antimicrobial photodynamic treatment. 2021. 67f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The indiscriminate use of antibiotics and antifungal agents as well as the consequential increase of resistance have led to a continuous search for alternative treatments dealing with resistant pathogens. In this context, antimicrobial photodynamic treatment (PDT) has emerged as a promising alternative to conventionally used antimicrobials. PDT is based on three components: a photosensitizer (PS), light, and molecular oxygen. Exposing the PS to light results in the production of reactive oxygen species that inactivate the target microorganism, with little to no damage to the host organism. In the past years, PDT has been proposed as an effective treatment to control phytopathogenic fungi in crop fields. The continuous use of PS will invariably lead to contamination of soil and water. Therefore, it is essential to evaluate the ecotoxicological and environmental impact of PS. This study proposed a cytotoxicity and ecotoxicity assessment of phenothiazinium PS as well as a comparison between them and the currently used antifungal agent NATIVO 75WG, commonly applied to control phytopathogenic fungi. Cytotoxicity was evaluated in human fibroblasts by the XTT assay whereas ecotoxicity was evaluated both in the microcrustacean *Daphnia similis* and in zebrafish embryos (*Danio rerio*). Phenothiazinium PS used were methylene blue (MB), new methylene blue N (NMBN), toluidine blue O (TBO), and dimethyl methylene blue (DMMB). Because PS respond to light, all evaluations were performed both under light and in the dark. In the cytotoxicity assays, NATIVO was the most toxic substance with a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) smaller than the highest dilution evaluated, which was 10⁻⁸ times the concentration used in the field. Compared to NATIVO, all PS tested displayed lower cytotoxicity and IC₅₀ values in the dark for DMMB, NMBN, TBO, and MB were 1.6, 3.8, 10.5 and 122.1 µM, respectively. Illumination with red light resulted in increased toxicity for all PS. In ecotoxicity assays using *D. similis*, all PS were very toxic both under light and in the dark. However, DMMB was the most toxic when compared to NMBN, TBO, and MB. The 50% effective concentration for MB, NMBN, TBO, and DMMB were 2.1, 2.0, 2.9 and 0.8 µM, respectively. Experiments with zebrafish revealed that MB was toxic only at the highest concentration used (100 µM), which was significantly different from the all other PS. Ecotoxicity for zebrafish was expressed by means of the 50% lethal concentration (LC₅₀). For MB, this value could not be calculated due to low mortality and is therefore >100 µM. For NMBN and TBO, calculated LC₅₀ in the dark were 49.8 and 40.5 µM, respectively. Illumination reduced these values to 15.4 and 31.2 µM. For DMMB it was also not possible to calculate LC₅₀, but the estimated value is 1-10 µM both under light and in the dark. All PS were less toxic when compared to NATIVO, for which mortality only ceased for dilutions higher than 1:1000 the initial concentration. It can be said, based on both cyto and ecotoxicological assessments, that toxicity increases in the following order: MB < TBO < NMBN < DMMB < NATIVO. Even though the PS tested presented relevant toxicity, all were less toxic than the currently used antifungal agent NATIVO by a considerable margin. Therefore, PDT can and should be considered a safe and valid alternative to control pathogens, not only because the selection of resistant strains is unlikely, but also because its use poses relatively fewer environmental consequences.

Keywords: Antimicrobial photodynamic treatment, Phenothiazinium photosensitizers, Cytotoxicity, Ecotoxicity, Ecological danger.

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração esquemática do TFDA incluindo diagrama de Jablonski.....	9
Figura 2. Mecanismo de morte celular. Localização do FS em diferentes organelas (mitocôndria, lisossomo, retículo endoplasmático, membrana plasmática, etc.) desempenhando um importante papel no tipo de mecanismo de morte celular.....	10
Figura 3. Núcleo tricíclico comum aos fotossensibilizadores fenotiazínicos.....	11
Figura 4. Estrutura química dos antifúngicos (A) é Trifloxistrobina e (B) Tebuconazol presentes no produto comercial NATIVO 75WG.....	13
Figura 5. Ensaio com o MTT e XTT. O NADH mitocondrial é convertido NAD ⁺ via desidrogenase. Esta reação causa a conversão do sal de tetrazol em cristais de formazan roxo e alaranjado respectivamente.....	17
Figura 6. Estrutura molecular do sal 3-[4,5-brometo de dimetiliazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio.....	18
Figura 7. Estrutura molecular do sal 3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazo-liohidróxido.....	18
Figura 8. Estrutura molecular do corante Vermelho Neutro.....	19
Figura 9. Micrografia de <i>Daphnia similis</i> em estágio adulto.....	21
Figura 10. <i>Danio rerio</i> em estágio adulto.....	23
Figura 11. (A) Embrião de <i>Danio rerio</i> com três dias de fertilização e (B) Larva de <i>D. rerio</i> com seis dias de fertilização.....	23
Figura 12. Equipamento de LEDs utilizado nos ensaios de citotoxicidade.....	27
Figura 13. Emissão Espectral do conjunto de 96 LEDs.....	27
Figura 14. Estrutura química dos FS fenotiazínicos comerciais (A) Azul de Metileno, (B) Novo Azul de Metileno N, (C) Azul de Toluidina e (D) Dimetil Azul de Metileno.....	40
Figura 15. Espectro de absorção no visível dos FSs fenotiazínicos comerciais Azul de	

Metileno (MB), Novo Azul de Metileno N (NMBN), Azul de Toluidina (TBO) e Dimetil Azul de Metileno (DMMB). Os espectros foram obtidos na concentração 10 μ M.....	29
Figura 16. Soluções dos FSs fenotiazínicos comerciais nas concentrações de 100, 10 e 1 μ M, respectivamente, da esquerda para a direita. (A) Azul de Metileno, (B) Novo Azul de Metileno N, (C) Azul de Toluidina e (D) Dimetil Azul de Metileno.....	29
Figura 17. Recipiente de cultivo de <i>Daphnia similis</i>	34
Figura 18. Estufa de armazenamento de <i>Daphnia similis</i>	35
Figura 19. Avaliação da toxicidade dos fotossensibilizadores fenotiazínicos no claro e no escuro utilizando-se o modelo de <i>Daphnia similis</i>	36
Figura 20. Sistema ZEBTEC (Tecniplast, Itália) de cultivo de peixe.....	37
Figura 21. Peixes separados para acasalamento.....	38
Figura 22. Layout do teste de toxicidade aguda com embriões de <i>Danio rerio</i> feito no claro e escuro, seguindo as diretrizes da <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i> (OECD).....	40
Figura 23. Toxicidade do FS MB em embriões <i>Danio rerio</i> . A toxicidade aguda foi avaliada quanto (A) à mortalidade e (B) à capacidade de os peixes sobreviventes inflarem a bexiga natatória. Ambas as avaliações foram realizadas no escuro e no claro. As barras de erro representam o desvio padrão de três experimentos independentes.....	46
Figura 24. Efeitos do FS MB sobre larvas de <i>Danio rerio</i> . (A) Larva do controle negativo mostrando desenvolvimento normal, com bexiga natatória inflada. (B) Bexiga natatória colapsada (não inflada) causada pelo MB em concentração 100 μ M. (C) Escoliose observada na concentração 100 μ M e presença de luz. (D) Edema de saco vitelínico e edema de pericárdio causados por MB em concentração 100 μ M no claro.....	47
Figura 25. Toxicidade do FS NMBN em embriões de <i>Danio rerio</i> . A toxicidade aguda foi avaliada quanto (A) à mortalidade e (B) à capacidade de os peixes sobreviventes inflarem a bexiga natatória. Ambas as avaliações foram realizadas no escuro e no claro. As barras de erro representam o desvio padrão de três experimentos independentes.....	48

- Figura 26.** Análise de LC_{50} para o FS NMBN em embriões de *Danio rerio*. Não há sobreposição dos intervalos de confiança para o tratamento no escuro e na luz, mostrando que esse FS tem efeito deletério maior quando iluminado.....49
- Figura 27.** Toxicidade do FS TBO em embriões de *Danio rerio*. A toxicidade aguda foi avaliada quanto (A) à mortalidade e (B) à capacidade de os peixes sobreviventes inflarem a bexiga natatória. Ambas as avaliações foram realizadas no escuro e no claro. As barras de erro representam o desvio padrão de três experimentos independentes.....50
- Figura 28.** Análise de LC_{50} para o FS TBO em embriões de *Danio rerio*. Há sobreposição dos intervalos de confiança para o tratamento no escuro e na luz, mostrando que a luz não tem efeito sobre a mortalidade.....51
- Figura 29.** Toxicidade do FS DMMB em embriões de *Danio rerio*. A toxicidade aguda foi avaliada quanto (A) à mortalidade e (B) à capacidade de os peixes sobreviventes inflarem a bexiga natatória. Ambas as avaliações foram realizadas no escuro e no claro. As barras de erro representam o desvio padrão de três experimentos independentes.....52
- Figura 30.** Toxicidade do antifúngico NATIVO em embriões de *Danio rerio*. A toxicidade aguda foi avaliada quanto à mortalidade e quanto à capacidade de inflar a bexiga natatória nos peixes sobreviventes. As barras de erro representam o desvio padrão de três experimentos independentes.....53

Lista de Tabelas

Tabela 1. Médias das IC_{50} dos FSs fenotiazínicos comerciais Azul de Metileno, Novo Azul de Metileno, Azul de Toluidina e Dimetil Azul de Metileno para o ensaio colorimétrico XTT com a linhagem GM07492-A de fibroblasto humano. Os valores referem-se a células não expostas ou expostas à luz por períodos de 10 min, 5 min, 1 min e 30 s após o tratamento com os FS. *A primeira letra refere-se à comparação dos diferentes tempos de exposição para um dado fotossensibilizador (comparação horizontal) e a segunda letra refere-se à significância da comparação dos diferentes FSs para um determinado período de tempo (comparação vertical). †O antifúngico NATIVO foi avaliado em diluições seriadas 1:10 da concentração utilizada no campo.....42

Tabela 2. Médias das IC_{50} dos FSs fenotiazínicos comerciais Azul de Metileno, Novo Azul de Metileno, Azul de Toluidina e Dimetil Azul de Metileno para o ensaio colorimétrico MTT com a linhagem GM07492-A de fibroblasto humano. Os valores referem-se a células não expostas ou expostas à luz por períodos de 5 min, 1 min e 30 s após o tratamento com os FS. *A primeira letra refere-se à comparação dos diferentes tempos de exposição para um dado fotossensibilizador (comparação horizontal) e a segunda letra refere-se à significância da comparação dos diferentes FSs para um determinado período de tempo (comparação vertical). †O antifúngico NATIVO foi avaliado em diluições seriadas 1:10 da concentração utilizada no campo.....42

Tabela 3. Médias das IC_{50} dos FSs fenotiazínicos comerciais Azul de Metileno, Novo Azul de Metileno, Azul de Toluidina e Dimetil Azul de Metileno para o ensaio de captação do Vermelho Neutro com a linhagem GM07492-A de fibroblasto humano. Os valores referem-se a células não expostas ou expostas à luz por períodos de 5 min, 1 min e 30 s após o tratamento com os FSs. *A primeira letra refere-se à comparação dos diferentes tempos de exposição para um dado fotossensibilizador (comparação horizontal) e a segunda letra refere-se à significância da comparação dos diferentes FSs para um

determinado período de tempo (comparação vertical). [†]O antifúngico NATIVO foi avaliado em diluições seriadas 1:10 da concentração utilizada no campo.....43

Tabela 4. Média dos valores das EC₅₀ em µM dos FSs fenotiazínicos comerciais Azul de Metileno, Novo Azul de Metileno, Azul de Toluidina e Dimetil Azul de Metileno para imobilidade em *Daphnia similis*. Os experimentos foram conduzidos no escuro e no claro.

*A primeira letra refere-se à significância da comparação das condições de claro e escuro para cada FS (comparação horizontal) e a segunda letra refere-se à significância da comparação dos diferentes FSs (comparação vertical).....44

Tabela 5. Média dos valores das EC₅₀ em mg L⁻¹ dos FSs fenotiazínicos comerciais Azul de Metileno, Novo Azul de Metileno, Azul de Toluidina e Dimetil Azul de Metileno para imobilidade em *Daphnia similis*. Os experimentos foram conduzidos no escuro e no claro.

*A primeira letra refere-se à significância da comparação das condições de claro e escuro para cada FS (comparação horizontal) e a segunda letra refere-se à significância da comparação dos diferentes FSs (comparação vertical).....45

Lista abreviaturas e siglas

ABNT. Associação Brasileira de Normas técnicas
ABRASCO. Associação Brasileira de Saúde Coletiva
ANOVA. Análise da variância
ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CEUA. Comissão de Ética na Utilização de Animais
EC₅₀. Concentração efetiva para 50% dos organismos
CaCl₂. Cloreto de Cálcio
CO₂. Dióxido de Carbono
DMMN. Dimetil Azul de Metileno
DMSO. Dimetilsulfóxido
D. rerio. *Danio rerio*
D. similis. *Daphnia similis*
EDTA. Ácido etilenodiamino tetra-acético
FCFRP-USP. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
FET. Fish embryo acute toxicity
FS. Fotossensibilizador
GHS. Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos
IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IC₅₀. Inibição de crescimento para 50% de células
ISO. Organização Internacional de Padronização
KCl. Cloreto de Potássio
LC₅₀. Concentração letal para 50 % dos organismos
LEDs. “light-emitting diodes”
MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MB. Azul de Metileno
MTT. 3- [4,5-brometo de dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazólio

NADH. Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio

NMBN. Novo Azul de Metileno

OECD. Organization of Economic Cooperation and Development

PBS. Salina tamponada com fosfato (Phosphate buffered saline)

ROS. Espécies reativas de oxigênio

TBO. Azul de Toluidina

TFDA. Tratamento Fotodinâmico

Antimicrobiano

UNIFRAN. Universidade de Franca

XTT. 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide

ZFET. Teste de toxicidade aguda com embriões de zebrafish

cm². Centímetro quadrado

hpf. Horas pós fertilização

J. Joules

L. Litro

mg. Miligrama

mL. Mililitro

mm. Milímetro

mW. mili Watts

min. Minutos

Micrograma µL.

Microlitro µM.

Micromolar nm.

Nanômetro UV.

Ultra violeta

SUMÁRIO

RESUMO.....	.i
ABSTRATC.	.iii
LISTA DE FIGURAS.....	.v
LISTA DE TABELAS.....	.ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.	.xi
1. INTRODUÇÃO.	3
1.1 Utilização de agrotóxicos.....	7
1.2 Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano.....	5
1.3 Fotossensibilizadores.....	10
1.3.1 Fotossensibilizadores fenotiazínicos.....	11
1.4 Antifúngico NATIVO 75WG.....	12
1.5 Aplicação do tratamento fotodinâmico para controle de fitopatógenos.....	13
1.6 Avaliações cito e ecotoxicológica.....	14
1.7 Determinação da citotoxicidade.....	16
1.8 Determinação da toxicidade aguda em <i>Daphnia similis</i>	20
1.9 Determinação da toxicidade aguda em embriões de <i>Danio rerio</i>	21
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Fonte de luz e sespectroradiometria.....	27
3.2 Fotossensibilizadores fenotiazínicos.....	28
3.3 Antifúngico NATIVO 75WG.....	29
3.4 Avaliação da citotoxicidade dos FSs fentiazínicos em fibroblasto humano.....	30
3.4.1 Linhagem celular e condições de cultivo.....	30
3.5 Ensaio de citotoxicidade.....	31
3.5.1 Ensaio de citotoxicidade.....	31
3.6 Ensaio de toxicidade aguda dos FSs fenotiazínicos com <i>D. similis</i>	34
3.6.1 Manutenção das culturas de <i>D. similis</i>	34

3.6.2. Avaliação da toxicidade em <i>D. similis</i>	35
3.7 Avaliações da toxicidade aguda dos FSs fenotiazínicos em embriões <i>D. rerio</i>	37
3.7.1 Manutenção dos peixes adultos, reprodução e coleta de ovos.	37
3.7.2 Ensaio de toxicidade aguda com embriões de <i>D. rerio</i>	38
4. RESULTADOS	41
4.1 Citotoxicidade dos FS fenotiazínicos em fibroblastos humanos	41
4.2 Toxicidade dos FSs fenotiazínicos e do antifúngico NATIVO 75WG para <i>D. similis</i>	44
4.3 Toxicidade dos FS fenotiazínicos e do antifúngico NATIVO 75WG para <i>D. rerio</i>	45
5. DISCUSSÃO.	54
6. CONCLUSÃO.	59
7. REFERÊNCIAS.	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 Utilização de agrotóxicos

A partir da década de 70, visando minimizar as perdas decorrentes das infecções causadas por fitopatógenos, o controle químico de pragas foi intensificado no mundo inteiro. Uma grande variedade de compostos químicos como fungicidas, pesticidas, herbicidas, bactericidas, entre outros, passou a ser utilizada no controle de doenças causadas por micro-organismos em países desenvolvidos e, principalmente, em países em desenvolvimento (World Health Organization Public Health Impacto of Pesticides Used in Agriculture.20p.1990). O uso desses compostos é amplamente difundido devido a seu fácil manejo e rápido resultado. Porém, apesar de suas vantagens, o uso indiscriminado e inapropriado de pesticidas tem levado a seleção de patógenos resistentes e a intoxicação de humanos e animais, além da contaminação de alimentos e do meio ambiente (GHINI, KIMATI, 2000).

De forma geral, os termos agroquímico ou agrotóxico referem-se a uma ampla categoria de pesticidas. Entre eles, incluem-se os herbicidas (utilizados para matar ou suprir o crescimento de plantas), fungicidas (para o controle de fungos), inseticidas (para o controle de insetos), microbicidas (para o controle de micro-organismos como vírus e bactérias), nematicidas (para vermes), entre outros. Esta classe também pode contar com hormônios e outros agentes químicos. Por apresentarem muitas limitações, como por exemplo, toxicidade ambiental, todos os agroquímicos precisam possuir autorização para o uso antes de serem disponibilizados ao mercado consumidor (KHAN, ROY, BENFENATI, 2019).

Os pesticidas, por exemplo, em teoria possuem alta especificidade ao patógeno alvo. Entretanto, na prática, a maior parte desses compostos não é altamente específica e muitos deles são tóxicos para as espécies não alvo. Em seres humanos, esses compostos são responsáveis por diversas reações, podendo causar desde efeitos irritantes na pele até danos nas funções hepática e pulmonar. Eles podem ainda ter ação cancerígena e

neurotóxica, podem atuar como desreguladores endócrinos ou causar toxicidade reprodutiva. Há também uma hipótese de que a exposição a pesticidas seja um fator de risco para o desenvolvimento de doenças degenerativas como Parkinson (COSTA et al., 2008). Inseticidas como organosfosforados e carbamatos são inibidores da enzima acetilcolinesterase (JENSEN et al, 2003; CALDAS; BOON; TRESSOU, 2006). No sistema nervoso, a inibição desta enzima provoca acúmulo do neurotransmissor acetilcolina que pode provocar alterações neurológicas e comportamentais em humanos (FUKOTO, 1990; AHLBOM; FREDRIKSSON; ERIKSSON, 1995; CALDAS; BOON; TRESSOU, 2006).

São considerados grupos de risco expostos a pesticidas os trabalhadores que atuam na produção e transporte, bem como os trabalhadores rurais. Além disso, os pesticidas podem contaminar fontes de água, solo e vegetação e podem causar toxicidade para uma série de outros organismos. Geralmente os inseticidas são considerados a classe de pesticida mais tóxica (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009).

Existem vários métodos para avaliar a exposição acumulativa desses produtos químicos e, em geral, esses métodos avaliam os efeitos individuais de cada composto. Entretanto, a avaliação de risco alimentar é muito mais complexa do que a exposição a um único composto, não sendo possível descartar totalmente efeitos como sinergismo e antagonismo (SEED et al., 1995; BOON; KLAVEREN, 2003; CALDAS; BOON; TRESSOU, 2006).

Quando pensamos em contaminação ambiental por agrotóxicos, dois conceitos precisam estar bem claros: A avaliação e categorização do risco e a identificação do perigo ambiental. A avaliação do risco trata-se de uma análise da probabilidade do aparecimento de efeitos adversos à saúde humana decorrentes da ingestão de alimentos contendo resíduos tóxicos ou afins. Este processo inclui as etapas de identificação do perigo, avaliação dose-resposta (relação entre a concentração administrada e o efeito adverso), a avaliação da exposição (aguda, com período estimado de 24 h, e crônica,

estimada ao longo da vida) e caracterização do risco. A caracterização do risco engloba os processos de avaliações de perigo, dose resposta e de exposição para calcular a viabilidade da ocorrência de efeitos adversos de um ingrediente ativo do agrotóxico, metabólitos e produtos de degradação em um indivíduo ou população, em condições específicas de contaminação. Já a identificação do perigo analisa o tipo e a natureza dos efeitos adversos que um determinado agrotóxico pode causar ao organismo, sistema ou população devido a suas propriedades intrínsecas (Relatório PARA, 2018).

O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) é uma realização do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), que conta com a coordenação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), execução conjunta de órgãos estaduais e municipais de vigilância sanitária, e também com Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN). Seu principal objetivo é fiscalizar resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal, visando diminuir os riscos a saúde provenientes da exposição a esses compostos pela dieta, por meio da avaliação de irregularidades e risco à saúde, partindo do resultado de análises de amostras coletadas em todo território nacional. De acordo com os resultados obtidos na última atualização (2017-2018), 23% dos alimentos testados apresentavam agrotóxicos proibidos ou acima do limite permitido. O pimentão continua sendo o alimento vegetal mais contaminado (em cada dez testados, oito tinham agrotóxicos proibidos - 80%), mas nessa edição, a goiaba destaca-se em segundo lugar, com 42% das amostras testadas com níveis acima do recomendado ou agrotóxicos proibidos. Em seguida, ficaram a cenoura (40%), tomate (35%) e o alface (30%) (Relatório PARA, 2018).

A Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, dispõe sobre pesquisa, produção, experimentação, rotulagem, embalagem, armazenamento, transporte, comercialização, utilização, propaganda comercial, importação e exportação, destino final de resíduos e embalagens, classificação, registro, controle, inspeção e fiscalização de agrotóxicos, componentes e afins (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2021).

De acordo com o decreto nº 4.074/2002, os agrotóxicos, componentes e afins só

poderão ser comercializados em território nacional se obtiverem registro no órgão federal competente, atendendo as exigências dos órgãos federais responsáveis no âmbito da agricultura, da saúde e do meio ambiente. No Brasil, para se obter o registro de um agrotóxico, o produto deve passar pela avaliação de três órgãos do governo federal: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Estes órgãos atuam de modo independente, realizando cada um deles um determinado tipo de avaliação. É de responsabilidade do IBAMA a produção de um dossiê ambiental, que avalia o potencial poluidor do produto. O dossiê agronômico produzido pelo MAPA avalia a eficácia e o potencial de uso na agricultura.

Por fim, a ANVISA produz um dossiê toxicológico, ou seja, o quão tóxico seria esse produto para a população e quais seriam as condições de uso mais seguras. Embora sejam necessários três órgãos federais para a avaliação de um produto, é de responsabilidade do MAPA a aprovação do registro de agrotóxicos no Brasil, sendo que a ANVISA apenas realiza a avaliação toxicológica (ANVISA, 2020).

A agricultura está presente em todo o território brasileiro, e é uma das atividades econômicas mais importantes, em especial para os estados da região Centro-Oeste. O setor conhecido como agronegócio presente nessa região é considerado um dos mais importantes da economia nacional, sendo responsável por cerca de um terço do Produto Interno Bruto (PIB), 36% das exportações e emprega 38% da mão-de-obra. Devido ao crescimento da produção agrícola em escala industrial e a política de redução de perdas em cada safra, ocorreu um aumento bastante significativo do uso de agrotóxicos. Esse modelo produtivo presente no Brasil, contribuiu para que o mercado nacional de agrotóxicos sofresse um rápido crescimento na última década, crescendo mais que o dobro em relação ao mercado global (NETO; LACAZ; PIGNATI, 2014; QUEIROS et al, 2019).

A previsão para 2050 é que a população mundial aumente para 9,7 bilhões, o

que deve ocorrer concomitantemente com a diminuição das terras aráveis. Com isso, a produtividade das plantações tem se tornado uma preocupação. As lavouras estão frequentemente sob ataque de uma gama de agentes patogênicos, normalmente bactérias, fungos e vírus, que afetam negativamente o seu cultivo. (DAS et al, 2019). Esses patógenos são responsáveis por mais de 10 mil doenças diferentes (GIBSON et al, 2011). Os pesticidas químicos convencionais, podem proteger as culturas contra vários patógenos, mas seu uso indiscriminado tem causado problemas de saúde pública e ambientais (DAS et al, 2019; AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009).

No cenário descrito anteriormente, o Tratamento Fotodinâmico vem ganhando espaço como estratégia alternativa para o controle de micro-organismos patogênicos, recebendo o nome de Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano (TFDA) (WAINWRIGHT et al., 2017). O TFDA vem sendo utilizado tanto para o tratamento de infecções superficiais causadas por bactérias e fungos em hospedeiros humanos e animais, como para a descontaminação superficial de embalagens, próteses e equipamentos (HAMBLIN 2016; LUKSIENE et al., 2010). Mais recentemente, o uso do TFDA foi proposto para o controle de fungos e bactéria fitopatogênicos, tanto na pré- como na pós-colheita (JESUS et al., 2018; DE MENEZES et al., 2016; FRACAROLLI et al., 2016; GONZALES et al., 2017; DE MENEZES et al., 2014a,b), para a eliminação de micro-organismos deterioradores de alimentos vegetais, principalmente frutas e legumes (LUKSIENE, BROVKO, 2013; LUKSIENE, ZUKAUSKAS, 2009), e para a inativação de fungos produtores de toxinas presentes em sementes (TEMBA et al., 2016; LUKSIENE et al., 2007).

1.2 Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano

A interação da luz com produtos químicos causando a morte celular é conhecida há mais de 100 anos. Oscar Raab, um estudante de medicina, relatou pela primeira vez este fato durante seus estudos, quando observou que a combinação do corante vermelho de acridina com luz produzia um efeito letal em protozoários. Esse achado é considerado

um acidente porque o experimento foi realizado durante uma tempestade, o que fez com que as condições de luz fossem não usuais. Raab então descobriu que matar o protozoário não era possível somente com a luz, somente com o corante ou ainda quando o corante exposto à luz era posteriormente adicionado a cultura de protozoários. Dessa forma, Raab concluiu que não era a luz em si, mas sim o produto da iluminação do corante, que induzia a morte dos protozoários. (ACKROYD et al., 2001).

Assim sendo, o Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano (TFDA) é constituído por três componentes: um corante sensível à luz e, normalmente, atóxico no escuro, chamado de fotossensibilizador (FS), luz com comprimento de onda adequado a excitação do FS e oxigênio molecular. Individualmente, conforme observado por Raab, esses componentes são normalmente incapazes de causar dano às células. Porém, quando associados, são capazes de inativar micro-organismos. Isso ocorre porque o FS, excitado pela luz, é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), sabidamente causadoras de danos biomoleculares. Uma sucessão de eventos é responsável por esse mecanismo. Inicialmente, o FS interage com fótons de luz e é excitado ao estado singleto, que, por ser muito instável, pode sofrer decaimento por meio da liberação de calor ou emissão de fluorescência. Porém, esse estado singleto pode ainda sofrer relaxamento e originar o estado tripleto excitado, que é mais estável e possui uma meia vida maior quando comparada a do singleto. O estado tripleto excitado pode interagir com o oxigênio molecular por meio de dois processos diferentes: o processo fotoquímico do tipo I, que envolve transferência de elétrons, gerando EROs como o radical superóxido e a hidroxila radicalar e o processo fotoquímico do tipo II, que envolve transferência de energia ao oxigênio molecular, levando à produção de oxigênio singleto (Figura 1). Os produtos de ambas as reações são citotóxicos, capazes de oxidar macromoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, causando a morte celular (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; DAI et al, 2012). Alguns dos principais grupos de fotossensibilizadores utilizados no tratamento fotodinâmico são: ftalocianinas, porfirinas, acridinas e os corantes fenotiazínicos (BARBOSA et al, 2019).

Figura 1 – Ilustração esquemática do TFDA incluindo o diagrama de Jablonski.

Fonte - Modificado de DAI et al., 2012.

A morte celular no TFDA pode ocorrer via apoptose, autofagia ou necrose, dependendo da localização do FS na célula e também da magnitude dos danos causados (Figura 2). Acreditava-se que a localização subcelular do FS em organelas como mitocôndrias, lisossomos e na membrana plasmática exercia um importante papel na morte celular, mas atualmente sabe-se que a concentração do FS, a fluência de luz e a interação FS-luz também influenciam o resultado do tratamento fotodinâmico (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; ACKROYD et al 2001).

Figura 2 – Mecanismo de morte celular. Localização do FS em diferentes organelas (mitocôndria, lisossomo, retículo endoplasmático, membrana plasmática, etc.) desempenhando um papel importante no tipo de mecanismo de morte celular.

Fonte – Modificado de ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016.

1.3 Fotossensibilizadores

Conforme mencionado anteriormente, os FSs desempenham um papel essencial no TFDA. Dessa forma, esses compostos devem possuir características adequadas ao seu uso. Os FSs para aplicação na clínica médica ou odontológica devem, por exemplo, ter um espectro de absorção de luz com pico no visível, de forma a permitir o uso de luz com comprimentos de onda que não sejam por si só danosos. Além disso, devem acumular-se preferencialmente na célula ou no micro-organismo alvo e serem fotoquimicamente eficientes, gerando uma quantidade apreciável de EROs (HAMBLIN; HEIDI, 2016; ACKROYD et al 2001).

No caso de aplicações ambientais para o controle de fitopatógenos, os FSs devem ter reduzida toxicidade ambiental. De maneira geral, os FSs apresentam persistência ambiental reduzida, já que são rapidamente degradados pela radiação solar, perdendo sua atividade fotodinâmica após poucas h de exposição. Essa característica pode aumentar o número de reaplicações do FS necessárias para o controle efetivo de fitopatógenos, mas reduz o risco ambiental desses compostos (DE MENEZES et al., 2014b). Adicionalmente, os FSs fenotiazínicos como o Azul de Metileno (MB) e o Azul de Toluidina (TBO) apresentam baixa toxicidade para humanos, animais e plantas

(WAINWRIGHT et al., 2017; GONZALES et al., 2017; DE MENEZES et al., 2014b) e são utilizados há décadas no diagnóstico e no tratamento de diversas doenças, como, por exemplo, a metahemoglobinemia (WAINWRIGHT et al., 2017; ALBERT et al., 2003).

1.3.1 Fotossensibilizadores fenotiazínicos

Os FSs fenotiazínicos são compostos conhecidos há mais de 100 anos. Estruturalmente, são tricíclicos e contêm nitrogênio e enxofre em sua composição (Figura 3). Essa classe de compostos tornou-se bastante interessante devido a suas várias características químicas e biológicas. Até agora mais de 5 mil derivados fenotiazínicos já foram obtidos e centenas de novos compostos são produzidos todos os anos. São ainda compostos versáteis, sendo a sua atividade biológica modulada por modificações nos substituintes, no esqueleto, ou alterações no sistema de anéis tricíclicos (PLUTA et al., 2011).

Figura 3 – Núcleo tricíclico comum aos fotossensibilizadores fenotiazínicos.

Fonte: modificado de PLUTA; MORAK-MIODAWSKA; MAIGORZATA, 2011.

Esses FSs possuem pico de absorção entre 600 e 660 nm. O MB, por exemplo, tem sido usado há mais de um século em histologia, sendo que em 1930 surgiram os primeiros relatos da sua ação fotodinâmica em bacteriófagos (WAINWRIGHT, 1998). Ele também é utilizado na descontaminação de plasma sanguíneo, sendo pouco tóxico aos tecidos humanos quando usado em concentrações adequadas (BARBOSA et al., 2019). O MB e o TBO são utilizados em processos cirúrgicos em concentrações maiores que as normalmente utilizadas no TFDA sem, contudo, apresentar toxicidade

(WAINWRIGHT, 1998). Assim sendo, os FSs dessa classe possuem diversas características que os tornam interessantes para serem utilizados no TFDA. Algumas dessas características incluem a grande capacidade de causar estresse oxidativo (WAINWRIGHT, 1998; BARBOSA et al, 2019) além de boa afinidade e seletividade pela superfície negativamente carregada das células de fungos e bactérias (GONZALES et al., 2017). Ademais, os fenotiazínicos clássicos, como o MB e o TBO, são muito mais baratos do que a maioria dos fungicidas e antibióticos atualmente utilizados e podem ser sintetizados, com relativa facilidade, em grandes quantidades (DE MENEZES et al., 2014b).

1.4 Antifúngico NATIVO 75WG

O NATIVO 75WG é um antifúngico mesostêmico e sistêmico de amplo espectro dos grupos estrobilurina e triazol, possui uma formulação granular dispersível em água contendo Trifloxistrobina (methyl(E)-methoxyimino-{(E)-a-[a,a,a-trifluoro-m-tolyl)ethylideneaminoxy]-o-tolyl}acetate -10 % m/v) e Tebuconazol ((RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol -20% m/v) (Figura 4). Apresenta propriedades curativas e protetoras para culturas como arroz, cebola, batata, alho, citros, feijão, cevada, milho, soja, trigo, entre outras. Sua atividade fungicida ocorre por meio da inibição da respiração mitocondrial pela inibição do sítio Qo no complexo III (Trifloxistrobina) e pela inibição da desmetilação de esterois (Tebuconazol) (JYOY et al, 2009).

A inevitável presença dos resíduos químicos desse antifúngico nas lavouras é uma preocupação bastante relevante, o que torna obrigatório a avaliação do impacto deste produto para a segurança de consumidores e organismos do meio ambiente (SAHOO, JYOY, BATTU, 2011). Além disto, de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), este antifúngico está classificado, pelos critérios de toxicidade aquática, como muito perigoso ao meio ambiente, se enquadrando na categoria I.

Figura 4 - Estrutura química dos antifúngicos (A) Trifloxistrobina e (B) Tebuconazol presentes no produto comercial NATIVO 75WG.

Fonte: Jyot et al, 2009.

1.5 Aplicação do tratamento fotodinâmico para o controle de fitopatógenos

Diversas espécies de plantas produzem, naturalmente, potentes FSs, como por exemplo, as cumarinas e as furanocumarinas, e utilizam esses compostos na defesa contra predadores e patógenos (FRACAROLLI et al., 2016; DE MENEZES et al., 2014a). Experimentos conduzidos tanto *in vitro* como em plantas, em condições controladas, demonstraram a eficácia do TFDA para inativar bactérias e fungos fitopatogênicos (JESUS et al., 2018; GONZALES et al., 2017; DE MENEZES et al., 2016; FRACAROLLI et al., 2016; DE MENEZES et al., 2014ab). Diversas classes de FSs, incluindo corantes fenotiazínicos comerciais, como o MB, TBO, Novo Azul de Metileno N (NMBN) e Dimetil Azul de Metileno (DMMB) e novos compostos fenotiazínicos ainda não comerciais, como os derivados tetra e pentacíclicos do MB, assim como novos derivados do TBO, têm sido utilizadas com sucesso no TFDA para o controle de patógenos, incluindo fungos fitopatogênicos (GONZALES et al., 2017; DE MENEZES

et al., 2016; DE MENEZES et al., 2014b; WAINWRIGHT et al., 2011).

1.6 Avaliações cito e ecotoxicológica

Caso o TFDA venha a ser utilizado, em larga escala, para o controle de fitopatógenos, é muito provável que resíduos dos FSs aplicados nas culturas-alvo também atinjam outras plantas, o solo e corpos d'água. A introdução de compostos químicos no meio ambiente pela ação humana representa um risco para os seres humanos e para o próprio ambiente (SCHOLZ et al., 2008). Dessa forma, a legislação de diversos países, incluindo o Brasil, exige que testes apropriados sejam feitos para avaliar a toxicidade desses compostos e para permitir que possam ser registrados como antimicrobianos para uso agrícola. Esses testes precisam ser realizados com organismos de vários níveis tróficos e requerem testes com vertebrados, particularmente com peixes (SCHOLZ et al., 2013; SCHOLZ et al., 2008; NAGEL, 2002). Portanto, a avaliação ecotoxicológica e o estudo do risco ambiental desses compostos, por meio de ensaios padronizados e aceitos internacionalmente são pré-requisitos fundamentais para o licenciamento e o uso de FSs fenotiazínicos para o controle de fitopatógenos (JESUS et al., 2018; GONZALES et al., 2017; DE MENEZES et al., 2014b; SCHOLZ et al., 2013).

Diversos modelos biológicos podem ser empregados nas avaliações toxicológicas. Técnicas *in vitro*, baseadas no uso de culturas de diferentes tipos celulares, são usualmente preferíveis para os ensaios iniciais por serem eficientes tanto do ponto de vista de custo como de tempo requerido para a execução (TRUONG et al., 2011). A avaliação da atividade citotóxica de diversos tipos de FSs utilizados no TFDA, incluindo alguns corantes fenotiazínicos, tem sido conduzida com diferentes tipos celulares. O nosso grupo avaliou a toxicidade *in vitro*, tanto no claro como no escuro, dos FSs fenotiazínicos comerciais MB, TBO, NMBN e de um novo derivado pentacíclico do MB denominado S137 em fibroblastos de camundongo (RODRIGUES et al., 2013). A toxicidade relativa dos FSs fenotiazínicos para as células de camundongo exibiu um padrão similar ao

observado para diversas espécies de *Candida* e de fungos filamentosos, como, por exemplo, maior toxicidade no escuro e fototoxicidade dos FSs NMBN e S137 em relação ao MB e TBO (RODRIGUES et al., 2013).

No presente trabalho, nós realizamos a avaliação toxicológica dos diversos FSs fenotiazínicos comerciais e do antifúngico NATIVO 75WG pela avaliação da citotoxicidade desses compostos, tanto no claro como no escuro, em fibroblasto humano. Apesar da inegável utilidade dos estudos de citotoxicidade, nem sempre os seus resultados podem ser diretamente extrapolados para organismos inteiros (HEGER et al., 2018; TRUONG et al., 2011). Desse modo, etapas importantes da avaliação do risco ambiental são as análises da toxicidade aquática e terrestre e da bioacumulação dos agentes químicos de interesse em organismos-modelo (BORI et al., 2016; BUSQUET et al., 2014; MARTINS et al., 2007).

Na determinação da toxicidade aquática, normalmente são avaliados os efeitos das substâncias em organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos: produtores, normalmente algas; consumidores invertebrados, como protozoários ou microcrustáceos; e consumidores vertebrados, como peixes (HEGER et al., 2018; ROCHA et al., 2017; BORI et al., 2016). Inicialmente, são feitos ensaios para avaliar a toxicidade aguda da substância. Entretanto, quando é prevista uma exposição prolongada ou quando existe a indicação de risco, são realizados, posteriormente, os ensaios para avaliar a toxicidade crônica (HEGER et al., 2018).

Nos ensaios para avaliar a toxicidade aguda, normalmente são utilizados microcrustáceos do gênero *Daphnia* e peixes, como *Danio rerio* (HEGER et al., 2018; ROCHA et al., 2017; BORI et al., 2016; BUSQUET et al., 2014; MARTINS et al., 2007). A determinação da toxicidade aguda para peixes faz parte do conjunto de exigências para a determinação do risco ambiental de defensivos agrícolas, biocidas e medicamentos (SCHOLZ et al., 2008).

1.7 Determinação da citotoxicidade

A quantidade de células vivas em uma determinada população é chamada de viabilidade celular e a determinação dessas células metabolicamente ativas é usada como indicador vital da sobrevivência ou da morte em resposta a drogas ou agentes químicos. Ensaios de citotoxicidade e proliferação celular são indicados quando se deseja determinar a resposta das células a uma determinada substância, podendo esta ser considerada citotóxica quando causa morte celular ou citostática quando causa inibição do crescimento. Existem vários métodos para se determinar a citotoxicidade, o efeito citostático e a viabilidade celular de um composto. Ensaios colorimétricos como o MTT (3- [4,5-brometo de dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazólio) e o XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino) carbonil] -2H-tetrazo-liohidróxido) baseiam-se na conversão de sais de tetrazol em cristais de formazan. Essa reação de redução ocorre na mitocôndria por meio de enzimas oxirredutases em células metabolicamente ativas (Figura 5). Esses ensaios são capazes de determinar o número de células viáveis por meio da avaliação da atividade mitocondrial, que está diretamente ligada à quantidade de cristais formados, ou seja, células metabolicamente ativas possuem maior taxa de conversão do sal enquanto que células mortas ou com baixa atividade metabólica possuem níveis menores de conversão (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016).

Figura 5 – Ensaio com o MTT e XTT. O NADH mitocondrial é convertido NAD^+ via desidrogenase. Esta reação causa a conversão do sal de tetrazol em cristais de formazan, que são roxo e alaranjado, respectivamente.

Fonte: Modificado de ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016.

A principal vantagem desses ensaios colorimétricos é a rapidez, pois o substrato não interfere no resultado, permitindo que este seja lido sem etapas de remoção ou lavagem, o que também ajuda a reduzir a variabilidade entre as amostras. Esse método também é econômico, em termos dos custos de reagentes e equipamentos e do uso de mão de obra (MOSMANN, 1983; ROEHM et al, 1991).

Ensaio com o MTT e XTT diferem na natureza do sal formado: para o MTT, o sal é insolúvel em água, precisando ser solubilizado em dimetilsulfóxido ou detergente dodecilsulfato (Figura 6), enquanto que o cristal formado a partir do XTT é solúvel em água, podendo ser solubilizado no próprio meio de cultura, o que o torna mais estável (Figura 7). As concentrações do sal são medidas por meio de um espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços (leitores ELISA) (MOSMANN, 1983; ROEHM et al, 1991; ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016).

Figura 6 – Estrutura molecular do sal 3- [4,5-brometo de dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazólio.

Figura 7 – Estrutura molecular do sal 3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino) carbonil] -2H-tetrazo-liohidróxido.

Os testes de citotoxicidade apresentados possuem, porém, uma limitação: a toxicidade avaliada *in vitro* pode decorer de a sensibilidade celular ser maior do que a observada nos estudos conduzidos com animais, possivelmente em função do contato direto do composto químico com as células e também da ausência dos mecanismos biológicos que atuam como protetores nos órgãos e tecidos, como ocorre nos modelos *in vivo* (LI et al, 2015; LIU et al, 2018)

Outro ensaio bastante utilizado para avaliar a citotoxicidade, é o ensaio de captação do vermelho neutro (NR), que se baseia no uso de um corante catiônico fraco (Figura 8) capaz de atravessar membranas celulares viáveis por meio de difusão passiva não iônica (um mecanismo pelo qual ácidos e bases atravessam membranas lipídicas em uma forma não ionizada), e acumulam-se nos lisossomos por ligações eletrostáticas e hidrofóbicas. A incorporação do corante na célula depende da sua capacidade de manter

o gradiente de pH, um processo dependente da produção de ATP. Em pH fisiológico, o corante apresenta carga próxima a zero, o que permite que ele possa penetrar na membrana celular. Quando ele está no lisossomos, há um gradiente de prótons capaz de manter o pH mais ácido fazendo com que o corante fique carregado, e consequentemente, fique retido dentro da célula. Ao final do processo, o corante é extraído da célula utilizando-se uma solução de etanol acidificado e a leitura da absorbância é feita a 540 nm. A quantidade de células viáveis é proporcional a quantidade de corante retida pelos lisossomos. Este teste segue as diretrizes da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 2004) Guideline 432 (NEMES et al, 1979; BORENFREUND; PUERNER, 1984; REPETTO; DEL PEDO; ZURITA, 2008; ATES et al, 2017).

Figura 8 – Estrutura molecular do corante Vermelho Neutro.

Fibroblastos são células jovens, em plena atividade produtiva e são as células mais comuns do tecido conjuntivo. Têm a capacidade de sintetizar e integrar proteínas estruturais como colágeno e elastina em sua matriz extracelular da maioria dos tecidos mesenquimais. Sua heterogeneidade pode ser considerada de acordo com o seu estágio de desenvolvimento, macroambiente tecidual ou tecido de origem. A identidade celular é determinada tanto por fatores intrínsecos (como, por exemplo, os epigenéticos) como por fatores extrínsecos (como, por exemplo, a sinalização célula-célula). Tecidos conectivos derivados de tecidos mesenquimais como músculos, trato gastrointestinal e pulmão possuem fibroblastos com funções especializadas. Os fibroblastos de medula

óssea possuem a capacidade de diferenciarem-se em várias linhagens, conhecidos como células-tronco mesenquimais ou estromais. Os fibroblastos cardíacos constituem a maior população celular do coração e estão localizados em todo o miocárdio. Em resumo, os fibroblastos constituem uma categoria celular que está relacionada com diferentes funções na formação e manutenção da matriz extracelular em tecidos conjuntivos e desempenham um papel fundamental na coordenação da função de outros tipos celulares dentro do tecido (LYNCH; WATT, 2018).

1.8 Determinação da toxicidade aguda em *Daphnia similis*

O filo dos artrópodes é constituído por mais de um milhão de espécies e os dois grupos mais importantes são os insetos e os crustáceos. Como as larvas aquáticas estão presentes apenas em algumas espécies de insetos, os crustáceos constituem o grupo de invertebrados mais numeroso e, por isso, mais importante nos ecossistemas marinho e de água doce. Além disso, possuem um grande papel nos testes de toxicidade regulamentar e fazem parte do conjunto básico de organismos necessários à avaliação de risco de ambientes aquáticos e terrestres. Os crustáceos planctônicos, como os daphnídeos, estão na base da cadeia alimentar, sendo capazes de filtrar de maneira passiva alimentos, incluindo algas, bactérias e outros aglomerados de partículas, e, em seguida, transferi-los para os próximos níveis da cadeia alimentar aquática, atuando como alimento e fonte de energia para os próximos consumidores, ou seja, são o elo entre os produtores (algas) e os consumidores secundários. A conversão alimentar, que ocorre, por exemplo, entre daphnídeos e peixes, é a relação mais importante na sustentação de uma cadeia alimentar. Por isso, qualquer mudança no ambiente de vida, no desenvolvimento e na reprodução de *Daphnia* pode trazer consequências importantes à comunidade e ao ecossistema (FLAHERTY; DODSON, 2005; BAUN et al., 2008; TAO et al, 2013; TAO et al, 2016).

Organismos do gênero *Daphnia* (Cladocera; Daphniidae), popularmente conhecidos como pulgas d'água, são microcrustáceos planctônicos (1-5 mm) e ubíquos em ambientes de água doce (Figura 9) (SICILIANO et al., 2015). Estão entre os

invertebrados aquáticos mais amplamente escolhidos para a avaliação ecotoxicológica de substâncias químicas por diversas razões importantes: os daphnídeos são particularmente sensíveis a substâncias químicas, são facilmente cultivados e são membros importantes da cadeia alimentar aquática. Adicionalmente, existem genomas de *Daphnia* spp. sequenciados, facilitando a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade das substâncias testadas (SICILIANO et al., 2015; KIM et al., 2015; MARTINS et al., 2007). Testes para avaliar a toxicidade aguda conduzidos com *Daphnia* spp. indicaram que esses organismos respondem a uma grande variedade de compostos químicos com uma sensibilidade maior do que *D. rerio* (MARTINS et al., 2007). Ensaios padronizados para avaliações ecotoxicológicas usando *Daphnia* spp. foram adotados por diversas organizações ambientais internacionais e nacionais, incluindo a *US Environmental Protection Agency*, *American Society for Testing and Materials*, *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e CETESB (ROCHA et al., 2017; MARTINS et al., 2007).

Figura 9 - Micrografia de *Daphnia similis* em estágio adulto.

Fonte – Knie e Lopes, 2004. Hamada, 2008.

1.9 Determinação da toxicidade aguda em embriões de *Danio rerio*

O peixe *D. rerio* (Figura 10), conhecido internacionalmente como zebrafish e no Brasil como paulistinha, é um pequeno ciprinídeo originário da Índia e da região sul da Ásia (EATON; FARLEY, 1974). É um dos mais importantes vertebrados utilizado como

modelo em estudos de genética, biologia do desenvolvimento, neurofisiologia, biomedicina e toxicologia (BUSQUET et al., 2014; SCHOLZ et al., 2013; TRUONG et al., 2011; SCHOLZ et al., 2008).

Além de possuir genoma completamente sequenciado, o zebrafish possui similaridade genética com camundongos e humanos (BARBAZUK et al., 2000). Existem muitos genes humanos homólogos aos genes do zebrafish. (HOWE et al, 2013). *D. rerio* possui uma série de atributos que o torna interessante para o uso experimental: (1) é pequeno (os adultos medem de 3 a 4 cm e as larvas de 1 a 4 mm) e robusto, de modo que é possível manter um grande número de indivíduos de forma fácil e barata no laboratório; (2) o desenvolvimento é rápido e o tempo de geração é muito curto, o desenvolvimento completo leva apenas cerca de três meses; (3) produzem um grande número de descendentes e a reprodução ocorre ao longo de todo o ano; (4) as fêmeas podem desovar a cada 2-3 dias e cada desova pode conter diversas centenas de ovos (SCHOLZ et al., 2008); (5) os ovos são transparentes e grandes (Figura 11, A) em relação aos de outros peixes, possuindo aproximadamente 0,7 mm de diâmetro no momento da fertilização; (6) a fertilização é externa, de modo que os embriões vivos, também transparentes, podem ser monitorados e manipulados ao longo de todo o desenvolvimento embrionário (SCHOLZ et al., 2008). Embrião é a fase de desenvolvimento compreendida entre a fertilização e a eclosão do ovo, que ocorre entre 24 e 72 h após a fertilização (hpf) (SCHOLZ et al., 2008); (7) o desenvolvimento embrionário é rápido: os precursores de todos os órgãos principais se desenvolvem em até 36 hpf e o desenvolvimento continua após a eclosão do ovo, durante o estágio larval (Figura 11, B), que dura até aproximadamente 120 hpf. A larva já busca comida e apresenta comportamento de fuga cinco dias após a fertilização (SPENCE et al., 2008).

Figura 10 - *Danio rerio* em estágio adulto.

Fonte – Foto da autora tirada no Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto – Laboratório de Toxicologia.

Figura 11 – (A) Embrião de *Danio rerio* com três dias de fertilização e (B) larva de *Danio rerio* no sexto dia de fertilização

A

B

A legislação de diversos países desenvolvidos, bem como as comissões responsáveis pelo bem-estar animal e pelo seu uso em pesquisa, têm estimulado a redução e, quando possível, a eliminação do uso de animais, incluindo os utilizados nos ensaios para a avaliação da ecotoxicidade (BUSQUET et al., 2014). Diversas possibilidades vêm sendo discutidas nas últimas décadas para a substituição dos ensaios de toxicidade aguda em peixes. Uma das alternativas consideradas mais promissoras é o uso de embriões de peixes que, inclusive, do ponto de vista regulatório, já substituiu o uso de peixes juvenis e adultos para avaliar a toxicidade aguda de efluentes na Alemanha

(SCHOLZ et al., 2013; SCHOLZ et al., 2008; ISO, 2007). Os ensaios para avaliação da toxicidade aguda com embriões de peixes, particularmente os de *D. rerio*, têm sido continuamente aperfeiçoados nos últimos anos e os seus resultados têm mostrado uma boa correlação com aqueles obtidos nos ensaios com peixes juvenis e adultos (BUSQUET et al., 2014; SCHOLZ et al., 2013; LAMMER et al., 2009; SCHOLZ et al., 2008; NAGEL, 2002).

O embrião de zebrafish é um modelo experimental que une o poder das investigações com animais pluricelulares inteiros (trata-se de um organismo intacto, com mecanismos de homeostase e sinalização intercelular) com a conveniência dos experimentos com culturas celulares (eficiência em termos de custo e tempo e requerimento de uma infraestrutura mínima). Como os estágios do desenvolvimento embrionário de *D. rerio* estão muito bem estabelecidos, é possível identificar alterações morfológicas, fisiológicas, moleculares e neurocomportamentais induzidas por substâncias tóxicas (BUSQUET et al., 2014; SCHOLZ et al., 2013; SCHOLZ et al., 2008).

O tratamento dos embriões é feito em microplacas e volumes mínimos são necessários para a realização dos ensaios (BUSQUET et al., 2014; TRUONG et al., 2011). Adicionalmente, o modelo apresenta alta sensibilidade, já que os estágios iniciais do desenvolvimento são geralmente muito sensíveis a agressões ambientais, devido, em parte, às enormes mudanças na diferenciação celular, proliferação e migração que são requeridas durante a formação dos múltiplos tipos celulares, tecidos e órgãos (BUSQUET et al., 2014; SCHOLZ et al., 2013; SCHOLZ et al., 2008). A alta sensibilidade é extremamente interessante para as avaliações ecotoxicológicas dos FSs, já que são esperadas concentrações baixas e subletais desses compostos nos corpos de água. As perturbações no desenvolvimento dos embriões podem manifestar-se como malformações morfológicas, anormalidades comportamentais ou morte. Numerosos *endpoints* morfológicos, fisiológicos, de desenvolvimento e comportamentais podem ser avaliados de maneira não invasiva devido à transparência dos embriões (TRUONG et al., 2011; BUSQUET et al., 2014; SCHOLZ et al., 2013; SCHOLZ et al., 2008; NAGEL,

2002). Um estudo de validação multi-laboratório do teste de toxicidade aguda com embriões de zebrafish (ZFET, *Zebrafish Embryo Acute Toxicity*), coordenado pela OECD, foi conduzido entre 2008 e 2012. Para avaliar a reprodutibilidade do ensaio, foram testadas 20 substâncias químicas, em cinco concentrações diferentes, em três experimentos independentes, que foram conduzidos em pelo menos três laboratórios (BUSQUET et al., 2014). Quatro *apical endpoints* foram registrados diariamente como indicadores de letalidade: coagulação do embrião, ausência de formação dos somitos, não descolamento da cauda do saco vitelínico e ausência de batimentos cardíacos. Os resultados [valores das concentrações letais para 50% dos embriões (Lethal Concentration, LC₅₀) para 48 e 96 h de exposição mostraram que o ZFET é um método robusto, com uma boa reprodutibilidade intra e interlaboratórios. Os resultados desses experimentos de validação formaram a base para o OECD TG 206 “*Fish embryo acute toxicity (FET) test*” (OECD, 2013), que foi utilizado no presente estudo. O ZFET tem sido utilizado com sucesso para uma grande variedade de compostos, incluindo corantes, com modos de ação, solubilidade, volatilidade e hidrofobicidade diversos (OECD 2013; ROCHA et al., 2017; Abe et al., 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a cito e a ecotoxicidade de FSs fenotiazínicos utilizados no tratamento fotodinâmico antimicrobiano e compará-las com a do antifúngico NATIVO 75WG.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a citotoxicidade *in vitro*, tanto no claro como no escuro, dos FSs fenotiazínicos comerciais MB, NMBN, TBO, DMMB e do antifúngico NATIVO 75WG em fibroblasto humano.
- 2) Avaliar a toxicidade aguda, tanto no claro como no escuro, dos FSs fenotiazínicos comerciais e do antifúngico NATIVO 75WG no microcrustáceo *D. similis*.
- 3) Avaliar a toxicidade, tanto no claro como no escuro, dos FSs fenotiazínicos comerciais e do antifúngico NATIVO 75WG em embriões do peixe *D. rerio*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fonte de luz e espectroradiometria

Durante os experimentos de fotossensibilização, realizados *in vitro*, para avaliação da citotoxicidade dos FSs fenotiazínicos, as amostras foram iluminadas por um conjunto de 96 LEDs (“*light-emitting diode*”) vermelhos, com emissão entre 600 e 660 nm, e irradiância de aproximadamente $13,9 \text{ mW cm}^{-2}$ (integrada entre 400 nm e 700 nm), que se encaixa perfeitamente ao fundo de uma placa de 96 poços. O sistema de iluminação é mostrado na Figura 12. O espectro de emissão dos LEDs foi mostrado anteriormente (DE MENEZES et al. 2014b) e encontra-se reproduzido na Figura 13.

Figura 12 – Equipamento de LEDs utilizado nos ensaios de citotoxicidade.

Figura 13 – Emissão espectral do conjunto de 96 LEDs.

As avaliações espectralradiométricas para a determinação das irradiâncias (em mW cm^{-2}) e das fluências (em J cm^{-2}) ao longo dos experimentos de fotossensibilização foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Luciano Bachmann, do Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

As irradiâncias foram medidas utilizando-se uma sonda de irradiância com sensor de correção cossenoidal (CC-3- UV, Ocean Optics, EUA), rosqueada ao final de uma fibra óptica acoplada a um espectralradiômetro USB4000 (Ocean Optics, EUA). As medidas da irradiância do arranjo de LEDs foram realizadas posicionando-se a sonda dentro de um poço da microplaca de 96 poços (poliestireno, TPP, Suíça), no nível da amostra.

3.2 Fotossensibilizadores fenotiazínicos

Foram avaliados os FSs fenotiazínicos comerciais: (1) Azul de Metileno (*Methylene Blue*, MB), (2) Novo Azul de Metileno N (*New Methylene Blue* N, NMBN), (3) Azul de Toluidina (*Toluidine Blue* O, TBO), (4) Dimetil Azul de Metileno (*Dimethyl Methylene Blue*, DMMB). Todos os FSs comerciais foram comprados da empresa Sigma-Aldrich. As fórmulas estruturais, os espectros de absorção e cor das soluções dos FSs são mostrados nas Figuras 14, 15 e 16 respectivamente.

Figura 14 - Estrutura química dos FSs fenotiazínicos comerciais (A) Azul de Metileno, (B) Novo Azul de Metileno N, (C) Azul de Toluidina e (D) Dimetil Azul de Metileno.

Figura 15 - Espectro de absorção no visível dos FSs fenotiazínicos comerciais Azul de Metileno (MB), Novo Azul de Metileno N (NMBN), Azul de Toluidina (TBO) e Dimetil Azul de Metileno (DMMB). Os espectros foram obtidos na concentração 10 μ M.

Figura 16 – Soluções dos FSs fenotiazínicos comerciais nas concentrações de 100, 10 e 1 μ M, respectivamente, da esquerda para a direita. (A) Azul de Metileno, (B) Novo Azul de Metileno N, (C) Azul de Toluidina e (D) Dimetil Azul de Metileno.

3.3 Antifúngico NATIVO 75WG

Para a avaliação da toxicidade em células, inicialmente foi feita uma solução estoque a partir da diluição usual utilizada em campo (800 mL do produto em 2000 L de água destilada). A partir dessa solução, foram feitas as diluições seriadas 1:10 e as diluições utilizadas estão indicadas nos respectivos experimentos.

Para a avaliação da ecotoxicidade em *D. similis*, utilizou-se somente a maior diluição (10^{-5}), enquanto que os ensaios com *D. rerio* foram realizados com todas as cinco diluições.

3.4 Avaliação da citotoxicidade dos FSs fenotiazínicos em fibroblasto humano

Os ensaios para a avaliação da citotoxicidade com XTT foram realizados com a colaboração da Prof^a. Dr^a. Denise Crispim Tavares, da Universidade de Franca (UNIFRAN).

3.4.1 Linhagem celular e condições de cultivo

A linhagem celular empregada foi a GM07492-A de fibroblasto humano. As células foram estocadas em nitrogênio líquido, em alíquotas de 10^6 células mL^{-1} , em uma solução de congelamento composta por 50% de meio de cultura (HAM F10 + DMEM, 1:1, Sigma-Aldrich), 40 % de soro bovino fetal (Nutricell) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Para a realização dos experimentos, as células foram descongeladas e cultivadas em meio de cultura (HAM F10 + DMEM, 1:1, Sigma-Aldrich), suplementado com soro bovino fetal (Nutricell), $1,2 \text{ g L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e $0,06 \text{ g L}^{-1}$ de penicilina (Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas em monocamadas, em frascos descartáveis de 25 cm^2 de área (Corning), contendo 10 mL de meio de cultura, a $36,5^\circ\text{C}$, em estufa de CO_2 a 5% (Sanyo). A cada dois ou três dias, as células foram subcultivadas usando-se PBS (*Phosphate Buffered Saline*) para lavá-las e tripsina (tripsina – solução de EDTA, Sigma- Aldrich), na proporção 1:5 PBS, para desprendê-las da superfície interna do frasco de cultura. Após o desprendimento das células, 1,5 mL de meio de cultura completo (HAM F10 + DMEM, 1:1, Sigma-Aldrich, suplementado com soro bovino fetal, Nutricell, $1,2 \text{ g L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio - Sigma-Aldrich, $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de estreptomicina, Sigma-Aldrich e $0,06 \text{ g L}^{-1}$ de penicilina, Sigma-Aldrich), foi adicionado ao frasco para a inativação da tripsina, e a mistura foi homogeneizada. Então, uma pequena quantidade de células foi colocada em cultivo em novos frascos com 10 mL de meio de cultura completo, e as células foram incubadas a

36,5 °C. Para a realização dos ensaios, foram utilizadas células entre a quarta e a 14^a passagem.

3.5 Ensaios de citotoxicidade

A citotoxicidade celular foi determinada por meio dos ensaios colorimétricos do XTT, MTT e Vermelho Neutro (NR).

3.5.1 Ensaios de citotoxicidade

Ensaio de citotoxicidade com XTT: A citotoxicidade em células foi determinada por meio de ensaio colorimétrico do XTT (Roche Diagnostics), seguindo-se as orientações do fabricante. Para tanto, foram colocadas 10^4 células em microplacas de 96 poços contendo 100 μ L de meio de cultura (HAM F10 + DMEM, 1:1, Sigma Aldrich), suplementado com 10 % de soro bovino fetal (Nutricell), as células foram tratadas com os fenotiazínicos comerciais MB, NMBN, TBO e DMMB nas concentrações de 1,6, 3,1, 6,3, 12,5, 25, 49,7, 100 e 199 μ M, ou com o antifúngico NATIVO 75WG na concentração aplicada no campo ou diluída (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} e 10^{-8} da concentração aplicada no campo) **Avaliação da toxicidade dos FSs fenotiazínicos no escuro:** Após 25 h, as células tratadas foram incubadas por 24 h em estufa de CO₂ a 5% (Sanyo). **Avaliação da fototoxicidade:** Após a adição dos FSs, as células foram mantidas por 30 min no escuro, em estufa de CO₂ a 5% (Sanyo), e, em seguida, expostas à luz emitida pelo arranjo de LEDs por 0,5, 1, 5 e 10 min. As fluências de luz, ao final de cada período de exposição, foram de 0,42, 0,84, 4,28 e 8,57 J cm², respectivamente. Após a exposição à luz, as células foram incubadas novamente, sob as mesmas condições. Ao final de 24 h, as células foram lavadas com PBS por duas vezes e receberam 100 μ L de meio HAM F10 sem vermelho de fenol (Cultilab) acrescido de 25 μ L de XTT. Após 17 h, foi determinada a absorbância das amostras pelo leitor de multiplacas (Elisa – Asys – UVM 340/Microwin 2000), em um comprimento de onda de

450 nm e um filtro de referência de 620 nm. A viabilidade celular foi expressa em relação às células não tratadas, uma vez que o controle negativo foi definido como 100%. Ainda, a atividade citotóxica foi avaliada usando-se o parâmetro de 50% de inibição da atividade metabólica da linhagem celular (Inhibitory Concentration, IC₅₀).

Ensaio de citotoxicidade com MTT: Os ensaios de citotoxicidade com MTT (Sigma-Aldrich: M5655) foram realizados conforme descrito anteriormente (Mosmann, 1983). As células (5×10^3 células / poço) foram cultivadas em placas de 96 poços em RPMI com 5% de soro bovino fetal, as células foram tratadas com as diluições seriadas dos fenotiazínicos MB, NMBN, TBO com doses iniciais de 100 µM, e DMMB com concentração inicial de 50 µM e com o antifúngico NATIVO na concentração aplicada no campo ou serialmente diluída 1:10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}). **Avaliação da toxicidade no escuro:** para a avaliação da citotoxicidade no escuro, as células foram incubadas por 72 h a 37 °C e 5% CO₂. **Avaliação da fototoxicidade:** após o tratamento com os compostos, as células foram mantidas por 30 min no escuro, em estufa de CO₂ a 5%, e, em seguida, expostas à luz emitida pelo arranjo de LEDs por 0,5, 1 e 5 min. As fluências, ao final de cada período de exposição, foram de 0,42, 0,84, 4,28 J cm², respectivamente. Após incubação, o meio foi cuidadosamente retirado e foram adicionados em cada poço 100 µL de solução de brometo de tiazolil azul de tetrazólio (MTT, 500 µg/mL), as placas foram incubadas por 4 h a 37 °C e 5% CO₂ e os cristais de formazan formados foram diluídos com dimetilsulfóxido (DMSO). A atividade citotóxica foi avaliada usando-se o parâmetro de 50% de inibição do crescimento da linhagem celular (Inhibitory Concentration, IC₅₀).

Ensaio de citotoxicidade com Vermelho Neutro: Os ensaios realizados com Vermelho Neutro (Neutral Red, Sigma-Aldrich: N4638) foram delineados como descrito anteriormente (Borenfreund and Puerner, 1985). Fibroblastos (5×10^3 células / poço) foram cultivados em placas de 96 poços em RPMI com 5% de soro bovino fetal, as células foram tratadas com diluições seriadas dos fenotiazínicos MB, NMBN, TBO

(com concentrações iniciais de 100 μM), DMMB (concentração inicial de 50 μM) e com o fungicida NATIVO na concentração aplicada no campo eduluída (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}). **Avaliação da toxicidade no escuro:** Para a avaliação da citotoxicidade no escuro, as células tratadas foram incubadas por 72 h em estufa a 37 °C e 5% CO_2 . **Avaliação da toxicidade no claro:** após o tratamento com os compostos, as células foram mantidas por 30 min no escuro, em estufa de CO_2 a 5%, e, em seguida, expostas à luz emitida pelo arranjo de LEDs por 0,5, 1 e 5 min. As fluências, ao final de cada período de exposição, foram de 0,42, 0,84 e 4,28 J cm^2 , respectivamente. Após incubação, o meio foi cuidadosamente retirado e foram adicionados aos poços 150 μl de solução de Vermelho Neutro (VN, 50 $\mu\text{g/ml}$). As placas foram incubadas por 2 h a 37 °C e 5% CO_2 . Após a incubação, as células foram lavadas brevemente com solução de fixação (formaldeído 0,5%; CaCl_2 1%), a seguir foi feita a solubilização do Vermelho Neutro com solução de revelação (ácido acético glacial:etanol:água 1:50:49). A absorbância a 450 nm foi determinada por meio do uso de leitor de microplacas ELISA (Sinergy H1 BioTek) a 450 nm e o percentual de citotoxicidade foi calculado em relação ao controle não tratado. A atividade citotóxica foi avaliada usando-se o parâmetro de 50% de inibição em relação a linhagem celular (Inhibitory Concentration, IC_{50}).

Os experimentos foram realizados em triplicata. Controles nos quais as células foram expostas à luz, mas não tratadas com os compostos ou tratadas com DMSO a 25% (controle positivo), foram preparados em paralelo em todos os experimentos. Os resultados foram analisados por análise de variância (One-Way ANOVA) para experimentos inteiramente aleatorizados, com o cálculo da estatística F e de seu respectivo “*P*-value”. Nos casos em que $P < 0,05$, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $P = 0,05$, utilizando-se o programa Graph Pad Prism (Versão 8.0, GraphPad Software).

3.6 Ensaio de toxicidade aguda dos FSs fenotiazínicos com *D. similis*

Os ensaios foram realizados segundo a norma Brasileira “Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera) (ABNT NBR 12713) de 2016. Essa norma especifica um método para a avaliação da toxicidade aguda de amostras líquidas e substâncias químicas solúveis ou dispersas em água, para *D. similis* e *Daphnia magna*. O método consiste na exposição de neonatos do gênero *Daphnia* à amostra (qualitativo) ou a várias concentrações da amostra (quantitativo), durante um período de 48 h. Esses ensaios foram realizados com a colaboração e supervisão do Dr. Eduardo Angelino Savazzi, na Divisão de Laboratório de Ribeirão Preto da CETESB.

3.6.1 Manutenção das culturas de *D. similis*

Para a manutenção das culturas, os organismos foram cultivados em meio de cultivo MS (água reconstituída) segundo as diretrizes da norma ABNT NBR 12713. As matrizes, até 25 organismos por frasco, foram mantidas em recipientes de 1 L (Figura 17) com luminosidade difusa e irradiância de aproximadamente 1000 lux, fotoperíodo claro:escuro de 12:12 h e temperatura de 20 ± 2 °C (Figura 18). Os organismos foram alimentados diariamente com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, que foi fornecida na quantidade de 3×10^6 células por organismo. A troca do meio de cultivo foi realizada duas vezes por semana e os organismos foram mantidos até 28 dias de idade.

Figura 17 – Recipiente de cultivo de *Daphnia similis*.

Fonte - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB).

Figura 18 – Estufa de armazenamento de *Daphnia*.

Fonte - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB).

3.6.2 Avaliação da toxicidade em *D. similis*

A avaliação da toxicidade foi realizada segundo as diretrizes do Procedimento Operacional Padrão número MA-029 Ensaio de Toxicidade Aguda com *D. similis* da Divisão de Laboratório da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Os organismos-teste foram neonatos de *D. similis* com idade entre 6 e 24 h, obtidos por partenogênese, a partir da segunda postura de fêmeas com idade entre 7 e 28 dias, cultivadas como descrito anteriormente. Ensaio com a substância de referência cloreto de potássio (KCl) foram realizados com cada lote de organismos-teste para monitorar a sua sensibilidade. Para cada tratamento foram preparadas quatro replicatas, com cinco organismos cada (vinte no total), que foram expostos às diversas concentrações dos FSs e do antifúngico, por 48 h, em tubos de vidro mantidos a 20 ± 2 °C. Não foi fornecido alimento durante o experimento. Um ensaio preliminar foi realizado para determinar o intervalo de concentrações de cada FS utilizado. Com isso, estabeleceram-se as concentrações de 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5 e 5 μ M para os FSs MB, NMBN, TBO e DMMB. Aos controles foi adicionada apenas a água utilizada para a diluição dos FSs. Os tubos foram mantidos no escuro ou com fotoperíodo de 12:12 h para as avaliações da toxicidade no escuro e da fototoxicidade, respectivamente (Figura 19). A iluminação foi

fornecida por duas lâmpadas Philips TDL de 30 W, durante duas h. Após 48 h o número de indivíduos móveis e imóveis foi contado. Os resultados foram considerados válidos se, ao término do ensaio, a porcentagem dos organismos imóveis no controle for inferior a 10%. O resultado é expresso de forma qualitativa (tóxico ou não tóxico) e quantitativa, por meio da determinação da EC_{50} . Foram realizados três experimentos independentes. Os resultados foram analisados utilizando-se o método de Trimmed Spearman-Kärber para calcular a EC_{50} . Para verificar as diferenças entre os tratamentos com e sem iluminação utilizou-se o teste *t de student*, e para analisar as diferenças entre as médias de tratamento e seus respectivos controles aplicou-se a One-Way ANOVA, utilizando-se o programa Graph Pad Prism (Versão 8.0, GraphPad Software).

Figura 19 – Avaliação da toxicidade dos fotossensibilizadores fenotiazínicos no claro e no escuro utilizando-se o modelo de *Daphnia similis*

3.7 Avaliação da toxicidade aguda dos FSs fenotiazínicos em embriões de *D. rerio*

A avaliação da toxicidade dos FSs fenotiazínicos em embriões de *D. rerio* foi conduzida com a colaboração da Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira. Os protocolos descritos a seguir foram submetidos e aprovados pela Comitê de Ética na Utilização de Animais (Protocolo N° 18.1.496.60.1).

3.7.1 Manutenção dos peixes adultos, reprodução e coleta dos ovos

Os peixes adultos foram mantidos de acordo com o protocolo n° 236 da OECD (OECD, 2013) em um sistema ZEBTEC (Tecniplast, Itália) (Figura 20), utilizando-se água reconstituída e padronizada a 26 ± 1 °C, com fotoperíodo de 14:10 h (claro:escuro), e alimentados duas vezes ao dia com ração comercial Tetramin[®] (Tetra GmbH, Alemanha). Para obtenção dos ovos, os peixes adultos foram dispostos na proporção 2:1 (machos:fêmeas) para o acasalamento (Figura 21). Cerca de 30 min após a desova, os ovos foram coletados, transferidos para uma placa de Petri e lavados com água reconstituída (padrão ISO-7346) diluída (1:5) em água deionizada. Apenas os ovos que atingiram o estágio de blástula ($2\frac{1}{4}$ - $5\frac{1}{4}$ h) foram selecionados para o experimento.

Figura 20 - Sistema ZEBTEC (Tecniplast, Itália) de cultivo de peixe.

Fonte – Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto – Laboratório de toxicologia.

Figura 21 – Peixes separados para acasalamento.

Fonte – Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto – Laboratório de Toxicologia.

3.7.2 Ensaio de toxicidade aguda com embriões de *D. rerio*

Os testes para avaliação da toxicidade aguda com embriões de zebrafish (ZFET) foram conduzidos de acordo com o protocolo nº 236 OECD (OECD, 2013), com pequenas modificações. Ovos recém-fertilizados foram expostos às diferentes concentrações dos FSs MB, NMBN, TBO e DMMB (1, 10, 25, 50 e 100 μM) e a cinco diluições do antifúngico NATIVO 75WG, começando com a diluição do produto que é utilizada para aplicação no campo (800 ml do fungicida para 2000 L de água), em placas de cultura de 24 poços, a 26 ± 1 °C, por um período de 144 h. Para cada tratamento, foram utilizados 20 embriões. O desenvolvimento embrio-larval foi avaliado após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h. Parâmetros de letalidade (coagulação dos óvulos fertilizados, má formação dos somitos, não desprendimento da cauda do embrião e ausência de batimentos cardíacos); de subletalidade (desenvolvimento dos olhos, movimentos espontâneos, pigmentação e edemas) e teratogenicidade (malformação do coração, cauda e defeitos na inflação da bexiga natatória, edemas do pericárdico e saco vitelínico, deformações

esqueléticas e incapacidade de eclosão) foram avaliados e registrados utilizando-se um estereomicroscópio (SMZ-800, Nikon) acoplado a uma câmera digital (Nikon LV-TV, Japão). A distinção entre o desenvolvimento embrionário normal e o alterado foi determinada de acordo com a descrição da embriogênese de *D. rerio* (Kimmel *et al.*, 1995). O layout do teste para avaliação da toxicidade aguda com embriões de zebrafish da OECD é mostrado na Figuras 22.

Ao final do período de exposição, a toxicidade aguda foi determinada com base em um resultado positivo em qualquer uma das observações registradas. A concentração letal (Lethal Concentration, LC_{50}) e concentração efetiva para 50% dos embriões (Effective Concentration, EC_{50}) foram calculadas pelo método Trimmed Spearman-Kärber. Controles negativos, nos quais os embriões foram tratados apenas com a água de diluição, e positivos, nos quais os embriões foram tratados com 3,4-dicloroanilina (4 mg L^{-1}), foram avaliados em todos os experimentos. Todas as placas para avaliação do efeito da luz foram mantidas em estufa com fotoperíodo (14:10 h Claro:Escuro). A iluminação foi fornecida por três lâmpadas Philips TDL de 30 W; as demais foram cobertas com papel alumínio e mantidas na mesma estufa. Foram realizados três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por meio da ANOVA, seguida do teste de Dunnett (nível de significância de 5%) para verificar as diferenças entre as médias dos tratamentos e seus respectivos controles, utilizando-se o programa Graph Pad Prism (Versão 8.0, GraphPad Software).

Figura 22 – Layout dos testes de toxicidade aguda com embriões de zebrafish feitos no claro e escuro, seguindo as diretrizes da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD).

4. RESULTADOS

4.1 Citotoxicidade dos FSs fenotiazínicos em fibroblastos humanos

A toxicidade dos FSs fenotiazínicos comerciais MB, NMBN, TBO e DMMB foi avaliada em células da linhagem GM07492-A de fibroblasto humano por meio dos métodos colorimétrico XTT e MTT e também pelo ensaio de captação do Vermelho Neutro.

No escuro, o FS menos tóxico foi o MB, com IC_{50} de 155,1 μM (Tabela 1) para o XTT, $>50 \mu M$ (Tabela 2) para o MTT e 47 μM para o Vermelho Neutro (Tabela 3). Com toxicidade apenas um pouco maior do que ele estão os FS NMBN e TBO, que apresentaram IC_{50} de 88,3 e 113,7 μM para o XTT, 36 e $>50 \mu M$ para o MTT e 15,5 e 28,7 μM para o Vermelho Neutro respectivamente. Já o DMMB apresentou toxicidade muito maior, com valores de IC_{50} menores que 10 μM em todos os experimentos.

A exposição à luz resultou em aumento da toxicidade do NMBN e TBO, mesmo quando a iluminação foi por apenas 30 s, situação em que ambos chegaram a valores de IC_{50} próximos de 10 μM (Tabela 1). Esse aumento permitiu uma distinção entre eles: o NMBN é sensivelmente mais tóxico do que o TBO quando expostos à luz. No caso do FS menos tóxico, o MB, exposições curtas à luz (30 s e 1 min) causaram apenas um pequeno aumento na toxicidade: valores de IC_{50} foram reduzidos de 155 μM no escuro para 122-123 μM (Tabela 1). Exposições mais longas, por 5 ou 10 min, elevaram a toxicidade consideravelmente, chegando-se a um IC_{50} de 12,7 μM após 10 min de exposição à luz vermelha (Tabela 1). Nessa condição, porém, os outros FSs testados já apresentam IC_{50} menores que a mais baixa concentração testada, ou seja, 1,60 μM .

Finalmente, o antifúngico NATIVO 75WG apresentou citotoxicidade muito elevada tanto no escuro como no claro, sendo mais deletério que qualquer um dos FSs testados (Tabela 1). A maior diluição testada, que representa $1/10^8$ da concentração utilizada no campo, resultou em mortalidade alta o suficiente para impedir um cálculo de

IC₅₀.

Tabela 1 – Médias das IC₅₀ dos FSs fenotiazínicos comerciais Azul de Metileno, Novo Azul de Metileno, Azul de Toluidina e Dimetil Azul de Metileno para o ensaio colorimétrico XTT com a linhagem GM07492-A de fibroblasto humano. Os valores referem-se a células não expostas ou expostas à luz por períodos de 10 min, 5 min, 1 min e 30 s após o tratamento com os FSs.

*A primeira letra refere-se à comparação dos diferentes tempos de exposição para um dado fotossensibilizador (comparação horizontal) e a segunda letra refere-se à significância da comparação dos diferentes FSs para um determinado período de tempo (comparação vertical)

†O antifúngico NATIVO 75WG foi avaliado em diluições seriadas 1:10 da concentração utilizada em campo.

IC ₅₀ (μM)					
Fotossensibilizador	Escuro	10 min	5 min	1 min	30 s
Azul de Metileno	155.1 ± 4.9 ^{Aa}	12.7 ± 0.5 ^D	41.1 ± 1.6 ^C	122.1 ± 3.9 ^{Ba}	123.2 ± 2.0 ^{Ba}
Novo Azul de Metileno	88.3 ± 2.5 ^{Ab}	< 1.60	< 1.60	3.8 ± 0.2 ^{Cc}	6.4 ± 0.2 ^{Bc}
Azul de Toluidina	113.7 ± 0.8 ^{Ab}	< 1.60	< 1.60	10.5 ± 0.4 ^{Bb}	12.3 ± 0.1 ^{Bb}
Dimetil Azul de Metileno	6.6 ± 0.2 ^{Ac}	< 1.60	< 1.60	3.5 ± 0.1 ^{Ac}	7.1 ± 0.8 ^{Ac}
NATIVO†	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸

Tabela 2 – Médias das IC₅₀ dos FSs fenotiazínicos comerciais Azul de Metileno, Novo Azul de Metileno, Azul de Toluidina e Dimetil Azul de Metileno para o ensaio colorimétrico MTT com a linhagem GM07492-A de fibroblasto humano. Os valores referem-se a células não expostas ou expostas à luz por períodos de 5 min, 1 min e 30 s após o tratamento com os FSs.

*A primeira letra refere-se à comparação dos diferentes tempos de exposição para um dado fotossensibilizador (comparação horizontal) e a segunda letra refere-se à significância da comparação dos diferentes FSs para um determinado período de tempo (comparação vertical).

†O antifúngico NATIVO 75WG foi avaliado em diluições seriadas 1:10 da concentração

utilizada no campo.

IC₅₀ (μM)				
Fotossensibilizador	Escuro	5 min	1 min	30 s
Azul de Metileno	> 50	65.1 ± 1.7 ^{A,a}	108.8 ± 49.4 ^{A,a}	104.9 ± 50.0 ^{A,a}
Novo Azul de Metileno	36.6 ± 15.9 ^{A,a}	0.55 ± 0.49 ^{B,b}	> 20	> 20
Azul de Toluidina	> 50	12.4 ± 0.2 ^a	> 20	> 20
Dimetil Azul de Metileno	6.9 ± 4.0 ^{A,a}	< 0.31	0.50 ± 0.22 ^{B,b}	0.62 ± 0.27 ^{B,b}
NATIVO†	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸

Tabela 3 – Médias das IC₅₀ dos FSs fenotiazínicos comerciais Azul de Metileno, Novo Azul de Metileno, Azul de Toluidina e Dimetil Azul de Metileno para o ensaio de captação do Vermelho Neutro com a linhagem GM07492-A de fibroblasto humano. Os valores referem-se a células não expostas ou expostas à luz por períodos de 5 min, 1 min e 30 s após o tratamento com os FSs.

*A primeira letra refere-se à comparação dos diferentes tempos de exposição para um dado fotossensibilizador (comparação horizontal) e a segunda letra refere-se à significância da comparação dos diferentes FSs para um determinado período de tempo (comparação vertical).

†O antifúngico NATIVO 75WG foi avaliado em diluições seriadas 1:10 da concentração utilizada em campo.

IC₅₀ (μM)				
Fotossensibilizador	Escuro	5 min	1 min	30 s
Azul de Metileno	47.0 ± 7.1 ^{A,a}	19.7 ± 13.9 ^{A,a}	55.5 ± 14.6 ^{A,a}	75.8 ± 40.6 ^{A,a}
Novo Azul de Metileno	15.5 ± 6.5 ^{A,a}	< 1.6	< 1.6	6.1 ± 6.0 ^{A,b}
Azul de toluidina	28.7 ± 20.5 ^{A,a}	2.6 ± 0.5 ^{A,a}	13.8 ± 9.6 ^{A,a}	8.7 ± 4.3 ^{A,a}
Dimetil Azul de Metileno	2.3 ± 0.7 ^b	< 0.31	< 0.31	< 0.31
NATIVO†	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸

4.2 Toxicidade dos FSs fenotiazínicos e do antifúngico NATIVO 75WG para *D. similis*

O teste de toxicidade aguda dos FSs MB, NMBN, TBO e DMMB foi realizado com *D. similis* de acordo com a norma Brasileira “Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera) (ABNT NBR 12713) de 2016.

O DMMB, previamente caracterizado como o FS mais tóxico nos ensaios de citotoxicidade, mostrou-se o FS mais tóxico também no ensaio com *D. similis* (Tabela 4 e Tabela 5). Os outros FSs apresentaram toxicidade semelhante. Vale mencionar também que, no ensaio com *D. similis*, a presença ou a ausência de luz não apresentou qualquer efeito na a mobilidade dos neonatos: os valores de EC₅₀ foram iguais para todos os FSs nas duas condições (Tabela 4 e Tabela 5). O antifúngico NATIVO 75WG causou a morte de 100% dos indivíduos em todas as diluições utilizadas.

Tabela 4 – Média dos valores das EC₅₀ em µM dos FSs fenotiazínicos comerciais Azul de Metileno, Novo Azul de Metileno, Azul de Toluidina e Dimetil Azul de Metileno para imobilidade em *Daphnia similis*. Os experimentos foram conduzidos no escuro e no claro.

*A primeira letra refere-se à significância da comparação das condições de claro e escuro para cada FS (comparação horizontal) e a segunda letra refere-se à significância da comparação dos diferentes FSs (comparação vertical)

EC ₅₀ (µM)		
Fotossensibilizador	Escuro	Luz
Azul de Metileno (MB)	2,2 ± 0,2 ^{A,a*}	2,1 ± 0,6 ^{A,a}
Novo Azul de Metileno (NMBN)	2,01 ± 0,04 ^{A,a}	2,0 ± 0,4 ^{A,a}
Azul de Toluidina O (TBO)	2,6 ± 0,5 ^{A,a}	2,9 ± 0,1 ^{A,a}
Dimetil Azul de Metileno (DMMB)	1,0 ± 0,4 ^{A,b}	0,8 ± 0,3 ^{A,b}

Tabela 5 – Média dos valores das EC₅₀ em mg L⁻¹ dos FSs fenotiazínicos comerciais Azul de Metileno, Novo Azul de Metileno, Azul de Toluidina e Dimetil Azul de Metileno para imobilidade em *Daphnia similis*. Os experimentos foram conduzidos no escuro e no claro.

*A primeira letra refere-se à significância da comparação das condições de claro e escuro para cada FS (comparação horizontal) e a segunda letra refere-se à significância da comparação dos diferentes FSs (comparação vertical).

EC ₅₀ (mg L ⁻¹)		
Fotossensibilizador	Escuro	Luz
Azul de Metileno (MB)	0,82 ± 0,07 ^{A,a*}	0,8 ± 0,2 ^{A,a}
Novo Azul de Metileno (NMBN)	0,84 ± 0,02 ^{A,a}	0,8 ± 0,2 ^{A,a}
Azul de Toluidina O (TBO)	0,8 ± 0,2 ^{A,a}	0,89 ± 0,03 ^{A,a}
Dimetil Azul de Metileno (DMMB)	0,4 ± 0,2 ^{A,b}	0,3 ± 0,1 ^{A,b}

4.3 Toxicidade dos FSs fenotiazínicos e do antifúngico NATIVO 75WG para *D. rerio*

rerio

O teste de toxicidade aguda dos FSs MB, NMBN, TBO e DMMB e do antifúngico NATIVO 75WG em embriões de zebrafish (*Fish Embryo Toxicity* - FET) foram conduzidos de acordo com o protocolo nº 236 da OECD (OECD, 2013), com pequenas modificações.

Os embriões do controle negativo apresentaram desenvolvimento regular com pouca ou nenhuma mortalidade. Os que foram expostos ao 3,4-dicloroanilina a 4 mg L⁻¹ (controle positivo) apresentaram mortalidade superior a 30%, conforme recomendado pela OECD 236.

O MB não aumentou a mortalidade dos embriões de *D. rerio*, indicando a baixa toxicidade desse FS (Figura 23A). Além disso, problemas para inflar a bexiga natatória

só foram observados na alta concentração de 100 μM (Figura 23B). Em ambos os casos, não houve diferença entre a mortalidade na presença ou ausência de luz. Além disso, foram observadas larvas com escoliose e edemas no saco vitelínico e pericárdio, porém somente na concentração de 100 μM e somente no claro (Figura 24).

Figura 23 – Toxicidade do FS MB em embriões *Danio rerio*. A toxicidade aguda foi avaliada quanto (A) à mortalidade e (B) à capacidade dos peixes sobreviventes de inflar a bexiga natatória. Ambas as avaliações foram realizadas no escuro e no claro. As barras de erro representam o desvio padrão de três experimentos independentes.

Figura 24 – Efeitos do FS MB sobre as larvas de *Danio rerio*. **(A)** Larva do controle negativo mostrando desenvolvimento normal, com bexiga natatória inflada. **(B)** Bexiga natatória colapsada (não inflada) causada pelo MB em concentração de 100 μ M. **(C)** Escoliose observada na concentração de 100 μ M e presença de luz. **(D)** Edema de saco vitelínico e edema de pericárdio causados por MB em concentração de 100 μ M no claro.

No caso do NMBN, foi possível observar diferenças entre os regimes de claro e de escuro. Uma mortalidade significativa só foi observada com 50 μ M no escuro, mas essa concentração foi menor (25 μ M) na presença de luz (Figura 25A). De forma semelhante, defeitos na bexiga natatória só foram observados com 25 μ M no escuro, mas a uma concentração de apenas 10 μ M no claro (Figura 25B). Os valores de LC_{50} foram de 49,8 μ M no escuro e 15,4 μ M no claro, o que resultou em diferença significativa entre os dois tratamentos (Figura 26).

Figura 25 – Toxicidade do FS NMBN em embriões de *Danio rerio*. A toxicidade aguda foi avaliada quanto (A) à mortalidade e (B) à capacidade dos peixes sobreviventes de inflarem a bexiga natatória. Ambas as avaliações foram realizadas no escuro e no claro. As barras de erro representam o desvio padrão de três experimentos independentes.

Figura 26 – Análise de LC_{50} para o FS NMBN em embriões de *Danio rerio*. Não há sobreposição dos intervalos de confiança para o tratamento no escuro e na luz, mostrando que esse FS tem efeito deletério maior quando iluminado.

Para o FS TBO, a presença de luz não aumentou a mortalidade (Figura 27A). Apesar disso, defeitos para inflar a bexiga natatória foram observados somente no claro (Figura 27B). Conforme esperado, não houve diferença significativa entre os valores de LC_{50} para escuro e claro, que foram, respectivamente, 40,5 μM e 31,2 μM (Figura 28).

Figura 27 – Toxicidade do FS TBO em embriões de *Danio rerio*. A toxicidade aguda foi avaliada quanto (A) à mortalidade e (B) à capacidade dos peixes sobreviventes inflarem a bexiga natatória. Ambas as avaliações foram realizadas no escuro e no claro. As barras de erro representam o desvio padrão de três experimentos independentes.

Figura 28 – Análise de LC_{50} para o FS TBO em embriões de *Danio rerio*. Há sobreposição dos intervalos de confiança para o tratamento no escuro e na luz, mostrando que a luz não tem efeito sobre a mortalidade.

Os resultados anteriores, obtidos nos ensaios de citotoxicidade celular e toxicidade em *D. similis*, permitiriam supor que o DMMB se mostraria novamente o FS mais tóxico para *D. rerio*. De fato, concentrações de apenas 10 μM foram capazes de matar 100% dos embriões (Figura 29A). A única concentração desse FS com baixa toxicidade foi a de 1 μM , na qual não se observou mortalidade ou defeitos na bexiga natatória (Figura 29B).

Figura 29 – Toxicidade do FS DMMB em embriões de *Danio rerio*. A toxicidade aguda foi avaliada quanto (A) à mortalidade e (B) à capacidade dos peixes sobreviventes inflarem a bexiga natatória. Ambas as avaliações foram realizadas no escuro e no claro. As barras de erro representam o desvio padrão de três experimentos independentes.

Por fim, o antifúngico NATIVO 75WG causou 100% de mortalidade, mesmo quando diluído 1.000 vezes (Figura 30). Somente diluições de 10.000 vezes ou maiores foram capazes de impedir a morte e os defeitos na bexiga natatória.

Figura 30 – Toxicidade do antifúngico NATIVO 75WG em embriões de *Danio rerio*. A toxicidade aguda foi avaliada quanto à mortalidade e quanto à capacidade de inflar a bexiga natatória nos peixes sobreviventes. As barras de erro representam o desvio padrão de três experimentos independentes.

5. DISCUSSÃO

Apesar de diversos experimentos *in vitro* e *in planta* terem mostrado o potencial do TFDA para o controle de fitopatógenos, até o momento não existe nenhum FS licenciado para esse fim pelas agências regulatórias (JESUS et al., 2018; GONZALES et al., 2017; DE MENEZES et al., 2014b). Um dos requisitos para o uso do TFDA no campo é a avaliação da toxicidade dos FSs utilizados. Esses ensaios, que são requeridos pelas agências regulatórias, normalmente são conduzidos com organismos de diferentes níveis tróficos, como produtores e consumidores, e que ocupam diferentes nichos ecológicos.

Por conveniência, os ensaios iniciais de toxicidade normalmente são conduzidos com culturas celulares. Entretanto, esses ensaios tem uma série de limitações e ensaios complementares com organismos também são também necessários. Dessa forma, no presente estudo, foram conduzidos ensaios de toxicidade, tanto com uma linhagem celular de fibroblasto humano, como também com o microcrustáceo *D. similis* e com embriões do peixe *D. rerio*, que são, respectivamente, modelos invertebrado e vertebrado bem estabelecidos para estudos de ecotoxicidade (HEGER *et al.*, 2018; ROCHA et al., 2017; BORI et al., 2016).

Os ensaios de citotoxicidade dos FSs fenotiazínicos foram realizados utilizando-se células da linhagem GM07492-A de fibroblasto humano. Foi avaliada tanto a toxicidade dos diferentes FSs no escuro como o efeito da luz avaliado em diferentes períodos de exposição (de 30 segundos a 10 min). O efeito dos diferentes tratamentos no metabolismo celular foi avaliado por meio do ensaio colorimétrico de XTT, MTT e Vermelho Neutro. A toxicidade no escuro dos diferentes FSs diferiu de maneira significativa, sendo que o FS mais tóxico foi o DMMB, com toxicidade no escuro bem acima de NMBN, TBO e MB, este último o menos tóxico de todos. De maneira geral, a exposição à luz aumentou a toxicidade dos FSs, porém a magnitude desse fenômeno foi diferente dependendo do FS: NMBN e TBO tiveram um aumento abrupto da

toxicidade com apenas 30s de exposição enquanto que o MB precisou de exposições maiores. Para efeito comparativo, a toxicidade do MB após 10 min de exposição é comparável àquela do TBO após apenas 30s. Isso mostra que a toxidade ambiental desses FSs pode diferir extensamente a depender da ocorrência ou não de iluminação e do tempo de exposição, que é um fator importante para o TFDA. Com o aumento do tempo de exposição, de uma maneira singular para cada FS, ocorreu também um aumento da citotoxicidade, fato que também foi notado na avaliação *in vitro* de formas tripomastigotas e amastigotas do protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da Doença de Chagas, tratadas com MB e TBO e expostas ao TFD (BARBOSA et al, 2019). Este fato também pode estar relacionado com as características dos fenotiazínicos, que apresentam cinética de incorporação rápida devido às suas características como hidrofobicidade, baixo peso molecular e carga positiva, promovendo sua passagem através da membrana celular. Curiosamente, o FS DMMB apresentou apenas pequena variação de toxicidade após exposição à luz. Isso pode ter ocorrido porque sua toxicidade no escuro já é muito alta quando comparada as dos outros FSs.

Essa comparação entre os FSs revelou que o MB é de fato o composto menos tóxico nos ensaios com fibroblastos: seus valores de IC_{50} estão acima de 100 μ M mesmo após 1 minuto de exposição à luz vermelha. Além disso, não foi possível obter valores menores do que 10 μ M, mesmo com 10 min de iluminação.

Apesar da grande divergência de toxicidade dos FSs, é importante ressaltar que qualquer um deles se mostrou menos tóxico às células do queo antifúngico NATIVO 75WG é uma mistura de dois antifúngicos utilizada no campo para controle de fitopatógenos. Mesmo diluições de 10^{-8} do NATIVO 75WG mostraram-se muito tóxicas para as células.

A toxicidade dos diferentes FSs, tanto no claro como no escuro, também foi avaliada no modelo invertebrado *D. similis*. Os ensaios foram realizados por meio do teste de toxicidade aguda e obedeceram à norma Brasileira “Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera) (ABNT

NBR 12713) de 2016. Nesse teste, foi determinada a concentração efetiva de cada FS capaz de causar a imobilidade de 50% dos crustáceos. Por desempenhar um importante papel no ecossistema aquático, sendo crucial como intermediária entre produtores e consumidores, o desequilíbrio na comunidade destes organismos pode desencadear respostas em nível de comunidade ou até mesmo ecossistema (NASSER; LYNCH, 2016; CHEN et al, 2019). Todos os FSs foram muito tóxicos para *D. similis*, tanto no escuro, como no claro, com valores de EC₅₀ de 1-3 µM. Apesar dessa semelhança entre eles, o DMMB foi, novamente, o FS mais tóxico. Nos ensaios de *D. similis*, não foi observado qualquer efeito da luz sobre a toxicidade. Esse resultado está de acordo com a hipótese, levantada anteriormente, de que o efeito da luz pode não ser observável quando a toxicidade no escuro já é muito alta.

Novamente, o antifúngico NATIVO 75WG mostrou-se muito tóxico, causando a morte de 100% dos indivíduos em todas as concentrações testadas e impedindo, assim, a obtenção de um valor de EC₅₀.

Por fim, a toxicidade dos FSs e do antifúngico NATIVO 75WG foi avaliada no modelo vertebrado *D. rerio*. Para esses experimentos, a fertilização dos ovos, a temperatura da água, a taxa de eclosão dos grupos controle e a sobrevivência dos embriões passaram nos critérios de validade da OECD (OECD, 2013). Esse experimento permite uma avaliação da toxicidade em dois níveis: no primeiro, avalia-se a mortalidade embrionária induzida pelos compostos testados, onde a coagulação do embrião é o efeito letal mais encontrado (SILVA et al, 2017); e, no segundo, avalia-se a capacidade dos peixes eclodidos (sobreviventes) inflarem a bexiga natatória.

Quanto à mortalidade, mais uma vez, os resultados mostraram que o MB foi o FS menos tóxico, com mortalidade zero para os embriões mesmo na maior concentração avaliada (100 µM) e esse resultado manteve-se mesmo quando o experimento foi realizado no claro. O DMMB mostrou-se novamente o FS mais tóxico (Figura 28), sendo que apenas a concentração de 1 µM foi segura para os peixes. Os experimentos com *D. rerio* também mostraram, conforme observado com fibroblastos, que existe uma

toxicidade ligeiramente maior do NMBN sobre o TBO.

A toxicidade de compostos para *D. rerio* pode ser avaliada não só pela mortalidade, mas também pelos efeitos negativos observados nas larvas sobreviventes. Um desses efeitos negativos diz respeito à capacidade dos peixes inflarem a bexiga natatória. A bexiga natatória é um órgão interno vascularizado que está presente em quase todos os teleósteos, e tem como função controlar a flutuabilidade e os movimentos locomotores. A bexiga natatória apresentou-se normal para os embriões do grupo controle: após a eclosão, as larvas nadaram normalmente. Uma bexiga inflada possui um formato oval, transparente e é preenchida por gás, quando não está inflada apresenta um formato de linha preta sendo facilmente observada ao microscópio (LI et al, 2011). Os embriões expostos aos FSs MB, NMBN e TBO apresentaram ausência de capacidade de inflar a bexiga natatória em algum nível. Para o MB, essa incapacidade foi observada apenas na concentração mais alta, de 100 μM , enquanto que, para os FSs NMBN e TBO, essa anormalidade foi observada já em concentrações menores. A incapacidade de inflar a bexiga natatória foi dependente da concentração e do fotossensibilizador. Esse fenômeno já foi observado na avaliação de produtos químicos que contêm ingredientes farmacêuticos ativos, pesticidas, metais, compostos aromáticos ou anilinas cloradas (HORIE et al, 2017).

A análise conjunta dos resultados mostrou que *Daphnia* foi mais sensível aos FSs fenotiazínicos do que os embriões de *D. rerio*. A maior sensibilidade de *Daphnia* em relação aos embriões de *D. rerio* já havia sido observada na análise de poluentes industriais utilizando cinco modelos biológicos de quatro níveis tróficos diferentes: *Allibrio fischeri* (uma bactéria marinha, representando os decompositores), *Chlorella vulgaris* (uma alga, representando os produtores), *Daphnia magna* (representando os consumidores primários) e duas linhagens de células de peixes (representando os consumidores secundários) (REPETTO et al, 2019). Isso reforça a importância da utilização de diferentes organismos nas avaliações ecotoxicológicas.

Os FSs e o antifúngico NATIVO 75WG foram classificados de acordo com

a classificação de toxicidade aquática de substâncias estabelecida pelo Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS, 2017), realizada utilizando organismos modelo como peixe, crustáceos e algas. Para *D. similis*, os quatro FSs fenotiazínicos avaliados (Tabela 5) e o fungicida NATIVO 75WG enquadram-se na categoria aguda 1, que é a de maior toxicidade. Nessa categoria, encontram-se substâncias que são extremamente tóxicas em uma concentração menor ou igual a 1 mg L^{-1} . Para *D. rerio*, os resultados são mais complexos. Para o FS MB, como não houve mortalidade mínima de 50% dos embriões, o mesmo foi classificado na categoria 3. Na categoria 3, enquadram-se as substâncias prejudiciais à vida aquática, que apresentam valores de toxicidade entre 10 mg L^{-1} e 100 mg L^{-1} . No caso do FS DMMB, apesar de ter ocorrido mortalidade acima de 50%, os valores de LC_{50} ficam prejudicados porque a mortalidade variou de 0% a 100% entre a menor concentração e a seguinte. Desse o modo, o composto foi classificado, na categoria 1. Os demais FSs (NMBN e TBO) foram classificados na categoria 2 quando iluminados e na categoria 3 quando no escuro.¹ Já na categoria 2, que é intermediária, enquadram-se substâncias tóxicas para a vida aquática, com toxicidade maior que 1 mg L^{-1} e igual ou menor que 10 mg L^{-1} . Nossos resultados mostram que há uma diferença na categorização de substâncias entre os ensaios realizados com invertebrados (*D. similis*) e vertebrados (*D. rerio*). Esta diferença na classificação das substâncias entre invertebrados e vertebrados também foi observada na comparação e investigação da toxicidade de inseticidas organofosforados avaliados em *D. magna* e nos peixes *Oreochromis niloticus* e *Hyphessobrycon eques*. Nesse caso, os crustáceos mostraram-se cem vezes mais susceptíveis aos inseticidas do que os peixes, sendo as substâncias classificadas em categorias distintas (ABE et al, 2019).

6. CONCLUSÃO

Analizados conjuntamente, os resultados mostram que a ordem de toxicidade dos compostos avaliados é, em ordem crescente, MB < TBO < NMBN < DMMB < NATIVO 75WG. Assim sendo, conclui-se que, apesar de haver riscos associados ao uso dos FSs para controle de pragas, tal risco ambiental é bastante reduzido se comparado ao risco do antifúngico NATIVO 75WG, que é comumente utilizado para controle de fungos fitopatogênicos. Portanto, o TFDA pode e deve ser considerado como método alternativo para o controle de patógenos, agora não somente pela menor probabilidade de seleção de linhagens tolerantes, mas também por seu baixo perigo ambiental.

7. REFERÊNCIAS

ABE, F. R.; MACHADO, A. A.; COLEONE, A. C.; DA CRUZ, C.; MACHADO-NETO,

J. G. Toxicity of Diflubenzuron and Temephos on Freshwater Fishes: Ecotoxicological Assays with *Oreochromis niloticus* and *Hyphessobrycon eques*. *Water Air Soil Pollut.*(230):77: 1-10.2019.

ABE, F. R.; MENDONÇA, J. N.; MORAES, L. A. B.; de OLIVEIRA, G. A. R.; GRAVATO, C.; SOARES, A. M. V. M., DE OLIVEIRA, D. P. Toxicological and behavioral responses as a tool to assess the effects of natural and synthetic dyes on zebrafish early life. *Chemosphere*.178:282-290.2017.

ABE, F. R. Avaliação ecogenotoxicológica de corante natural extraído de micro-organismo. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em toxicologia para obtenção do título de Doutor em Ciências. P.146.2017.

ABRAMENKO, N. B.; DEMIDOVA, T. B.; ABKHALIMOV, E. V.; ERSHOV, B. G.; KRYSANOV, E. Y.; KUSTOV, L. M. Ecotoxicity of different-shaped silver nanoparticles: Case of zebrafish embryos. *Journal of Hazardous Materials*.347:89-94. 2018.

ACKROUD, R.; KELTY.; BROWN, N.; REED, M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*.75:656-66.2001.

ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Citotoxicity Assays. *Current*

Pharmaceutical Biotechnology.17:1213-1221.2016.

AHLBOM, J., FREDRIKSSON, A., ERIKSSON, P. Exposure to an organophosphate (DFP) during a defined period in neonatal life induces permanent changes in brain muscarinic receptors and behavior in adult mice. Brain Res.677:13–19.1995.

Aktar, M.W.; Sengupta, D.; Chowdhury, A. Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. Interdiscip. Toxicol.2(1):1-12. 2009

ALBERT, M.; LESSIM, M. S.; GILCHRIST, B. Methilene Blue: Dangerous dye for neonates. J. Pediatr. Surg.38:1244-1245.2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. P.56.2015.

ATES, G.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V.; RODRIGUES, R. M. Assaying Cellular Viability Using the Natural Red Uptake Assay. Methods in Molecular Biology.1601:19-26.2017.

AYSUN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y.2016. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. Current Pharmaceutical Biotechnolgy .17:1213-1221.2016.

BARBAZUK, W. B.; KORF, I.; KADAVI, C. et al. The Syntenic Relationship of the Zebrafish and Human Genomes. Genome Research. 10:1351-1358.2000.

BARBOSA, A. F.; SANTOS, I. P.; SANTOS, G. M. P., BASTOS, T. M.; ROCHA, V. P. C.; MEIRA, C. S.; SOARES, M. B. P.; PITTA, I. R.; PINHEIRO, A. L. B. Anti-

Trypanosoma cruzi effect of the photodynamic antiparasitic chemotherapy using phenothiazine derivatives as photosensitizers. *Lasers in Medical Science*.35:79-85. 2019.

Bayer Crop Science- Tebuconazole www.bayercropscience.com.

BAUN, A.; HARTMANN, N. B.; GRIEGER, K.; KUSK, K. O. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology*.17:387-395.2008.

BOON, P.E., KLAVEREN, J.D., 2003. Cumulative exposure to acetylcholinesterase inhibiting compounds in the Dutch population and young children. *RIKILT–Institute of Food Safety*.03:1-31.2003.

BORI, J.; VALLES, B.; ORTEGA, L.; RIVA, M. C. Bioassays with terrestrial and aquatic species as monitoring tools of hydrocarbon degradation. *Environ. Sci. and Pollut. Res.* 23:18694-18703.2016.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR90). *J Tissue Cult Methods*.9(1):7–9.1984.

BUSQUET et al. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*69: 496-511.2014.

CÁCERES, E. C. Interspecific Variation in the Abundance, Production, and Emergence of Daphnia Diapausing Eggs. *Ecology*.79(5):1699-1710.1998.

CALDAS, E. D.; BOON, P. E.; TRESSOU, J. Probabilistic assessment of the cumulative acute exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Brazilian diet. *Toxicology*.222:132-142.2006.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Programa estatístico para ensaios com *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*. Procedimento Operacional Padrão número AP-016. Divisão de Laboratório de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.2017.

CHEN, H.; GU, X.; ZENG, Q; MAO, Z. Acute and Chronic Toxicity of Carbamazepine on the Release fo Chitobiase, Molting, and Reproduction on *Dapnia similis*. In. J. Environ. Res. Public Health.16,209:1-12.2019.

COSTA, G. C.; GIORDANO, G.; GUIZZETTI, M.; VITALONE, A. 2008. Neurotoxicity

of pesticides: a brief review. *Frontiers in Bioscience*.13:1240-1249.2008.

DAS, K.; DATTA, K.; KARMAKAR, S.; DARRA, S. K. Antimicrobial Peptides - Small but Mighty Weapons for Plants to Fight Phytopathogens.26:720-742.2019.

DE MENEZES, H. D.; PEREIRA, A. C.; BRANCINI, G. T. P.; de LEÃO, H. C.; N. S.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BACHMANN, L.; WAINWRIGHT, M.; BASTOS, J.

K.;BRAGA, G, U. L. Furocoumarins and coumarins photoinactivate *Colletotrichum acutatum* and *Aspergillus nidulans* fungi under solar radiation, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*.131:74-83.2014a.

DE MENEZES, H. D.; RODRIGUES, G. B.; TEIXEIRA, S. P.; MASSOLA Jr, N. S.; BACHAMM, L.; WAINWRIGHT, M.; BRAGA, G. U. L. In vitro photodynamic inactivation of the plant-pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with novel phenothiazinium photosensitizers. *Appl. and Environ. Microbiol*.80:1553-1560.2014b.

DE MENEZES, H. D.; TONANI, L.; BACHMANN, L.; WAINWRIGHT M.; BRAGA, G. U. L.; VON ZESKA KRESS, M. R. Photodynamic treatment with phenothiazinium photosensitizers kills both ungerminated and germinated microconidia of the pathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium solani*. J. Photochem. Photobiol.164:1-12.2016.

EATON, R. C.; FARLEY, R. D. Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the laboratory. Copeia.1:195-209.1974.

FLAHERTY, C.M.; DODSON, S.I. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. Chemosphere.2:200–207.2005.

FRACAROLLI, L.; RODRIGUES, G. B.; PEREIRA, A. C.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; SILVA-JUNIOR, G. J.; BACHMANN, L.; WAINWRIGHT, M.; BASTOS, J. K.; BRAGA, G. U. L. Inactivation of plant-pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum* with natural plant-produced photosensitizers under solar radiation. J. Photochem. Photobiol B Biol.162:402-411.2016.

FUKOTO, T.R., Mechanism of action of organophosphorous and carbamate insecticides, Environ. Health Perspect.87:245-254.1990.

GIBSON, D.M.; KING, B.C.; HAYES, M.L.; BERGSTROM, G.C. Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. Curr. Opin. Microbiol.14(3):264-270.2011.

GONZALES, J. C.; BRANCINI, G. T. P.; RODRIGUES G. B.; SILVA-JUNIOR, G. J.; BACHMANN, L.; WAINWRIGHT M.; BRAGA, G. U. L. Photodynamic inactivation of conidia of the fungus *Colletotrichum abscissum* on *Citrus sinensis* plants with methylene blue under solar radiation. J. Photochem. Photobiol.176:54-61.2017.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.78.2000.

HOWE et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*.496:498-503.2013.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr. Opin. Microbiol*.33:67-73.2016.

HEGER, S.; DU, M.; BAUER, K.; SCHAFFER, A.; HOLLERT, H. Comparative ecotoxicity of potential biofuels to water flea (*Daphnia magna*), zebrafish (*Danio rerio*) and Chinese hamster (*Cricetulus griseus*) V79 cells. *Sci. Total Environ*.631-632:216-222.2018.

HEIDI, A.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J*.473:347-364.2016.

ISO. International Standard Water quality – determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.2007.

IL LEE, B.; SUH, Y. S.; CHUNG, Y. J.; YU, K.; PARK, C. B. Shedding Light on Alzheimer's β -Amyloidosis: Photosensitized Methylene Blue Inhibits Self-Assembly of β -Amyloid Peptides and Disintegrates Their Aggregates. *Scientific Reports*.7:1-10.

JENSEN, A.F., PETERSEN, A., GRANBY, K., 2003. Cumulative risk assessment of the intake of organophosphorus and carbamates pesticides in the Danish diet. *Food Addit. Contamin.*20:776–785.2003.

JESUS, V.; MARTINS, D.; BRANCO, T.; VALÉRIO, N.; NEVES, M. G. P. M. S.; FAUSTINO, M. A. F.; Reis, L.; BARREAL, E.; GALLEGGO, P. P.; ALMEIDA, A.
Aninsight into the photodynamic approach versus copper formulations in the control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwi plants. *Photochem. Photobiol. Sci.*17:180-191.2018.

JESUS, V. P. S.; RAIEIRO, L.; LEMES, G. M.; BHATTAACHARJEE, T. T.; JÚNIOR, P. C.; CASTILHO, M. L. Nanoparticles of methylene blue enhance photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.*23:212-217.2018.

JYOT, G.; ARORA, P. K.; SAHOO, S. K.; SINGH, B. Persistence of Trifloxystobin and Tebuconazole on Grape Leaves, Grape Berries and Soil. *Bull Environ Contam Toxicol.* 84:305-3010. 2010.

KHAN, M. P.; ROY, K. ; BENFENATI, E. Chemometric modeling of *Daphnia* magnatoxicity of agrochemicals. *Chemosphere.*224:470-479.2019.

KIM, H. J.; KOEDRITH, P.; SEO, Y. R. Ecotoxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of environmental chemical toxicity using aquatic invertebrate,

Daphnia model organism. *Int. J. Mol. Sci.*16:12261-12287.2015.

KIMMEL, C. D. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*203: 253-310.1995.

LAMMER, E.; CARR, G. J.; WENDLER, K. et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol.*149:196-209.2009.

LI, J.; LIANG, Y.; ZHANG, X.; LU, J.; Z. J.; RUAN, T.; ZHOU, Q.; JIANG, G. Impaired

Gas Bladder Inflation in Zebrafish exposed to a Novel Heterocyclic Brominated Flame Retardant Tris(2,3-dibromopropyl) Isocyanurate. *Environ. Sci. Technol.*45:9750-9757.2011.

LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomed Rep.*3:617-620.

LIU, X.; RODEHEAVER, P. D.; WHITE, J. C.; WRIGHT, A. M.; WALKER, L.M. A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. *Regulatory toxicology and Pharmacology.*95:24-32.2018.

LUKSIENE, Z.; DANILCENKO, H.; TARASEVICIENE, Z.; ANUSEVICIUS, Z.;
LUKSIENE, Z.; BUCHOVEC, I.; PASKEVICIUTE, E. Inactivation of several strains of *Listeria monocytogenes* attached to the surface of packing material by Na-chlorophyllin-based photosensitization. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*101:326-331.2010.

LUKSIENE, Z.; BROVKO, L. Antibacterial photosensitization-based treatment for food safety. *Food Eng. Rev.*5:185-199.2013.

LUKSIENE, Z.; ZUKAUSKAS, A. Prospects of photosensitization in control of pathogenic and harmful micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.*107:1415-14244.2009.

LYNCH, M; WATT, F. M. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *The Journal of Clinical Investigation.*128(1):26-25.2018.

MAROZIENE, A.; NIVINSKAS, H. et al. New approach to the fungal decontamination of wheat used for wheat sprouts: Effects of aminolevulinic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 116:153-1558.2007.

MARTINS, J.; TELES, L. O.; VASCONCELOS, V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environmental International.*33:414-425.2007.

MIYAKAWA, H.; Sato, t.; SONG, Y.; TOLLEFSEN, K. E.; IGUCHI, T. Ecdysteroid and juvenile hormone biosynthesis, receptors and their signaling in the freshwater microcrustacean *Daphnia*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.*184: 62-68.2018.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods.*65:55-63.1983.

NAGEL R. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 19, Suppl.1/02:38-48.2002.

NEMES, Z., DIETZ, R. & LUTH, J.B. The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia*.35:1475–1476.1979.

NASSER, F.; LYNCH, I. Secreted protein eco-corona mediates uptake and impacts of polystyrene nanoparticles on *Daphnia magna*. *Jornal of Proteomics*.137:45-51.2016.

NETO, E. N.; LACAZ, F. A. C.; PIGNATI, W. A. Health surveillance and agribusiness: the impact of pesticides on health and the environment. *Danger ahead!Ciencia e Saúde coletiva*.19(12):4709-4718.2014.

OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 203. Fish, Acute Toxicity Test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.1992.

OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, 236. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.2013.

PLUTA, K.; MORAK-MIODAWSKA, B.; MA1GORZATA, J. Recent progress in biological activities of synthesized phenothiazines. *European Journal of Medicinal Chemistry*.46:3179-3189.2011.

Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Relatório de de Amostras Analisadas no período de 2017-2018. Gerência Geral de Toxicologia.Dezembro de 2019.

QUEIROZ, P. R.; LIMA, K. C.; OLIVEIRA, T. C.; SANTOS, M. M.; JACOB, J. F.; DE OLIVEIRA, A. M. B. M. Notifiable Diseases Information System and human poisoning by pesticides in Brazil.*Rev. Bras. Epidemiol*.22:1-10.2019.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*.3(7):1125-1131.2008.

ROCHA, O. P.; CESILA, C. A.; CHRISTOVAM, E. M.; BARROS, S. B. M.; ZANONI, M. V. B.; DE OLOVEIRA, D. P. Ecotoxicological risk assessment of the “Acid Black 210” dye. *Toxicology*.376:113-119.2017.

ROEHM, N. W.; RODGERS, G. H.; HATFIELD, S. M.; GLASEBROOK, A. L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*.142:257-265.1991.

RODRIGUES, G. B.; DIAS-BARUFFI, M.; HOLMAN, N.; WAINWRIGHT, M., BRAGA, G. U. L. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* species and mouse fibroblasts with phenothiazinium photosensitisers and red light. *Photodiagnosis Photodyn. Ther*.10:141-149.2013.

SAHOO, S. K.; JYOT, G.; BATTU, R.S. Dissipation Kinetics of Trifloxystrobin and Tebuconazole on Chili and Soil. *Bull Environ Contam Toxicol*.88:368-371.2012.

SEED, J., BROWN, R.P., OLIN, S.S., FORAN, J.A. Chemical mixtures: current risk assessment methodologies and future directions. *Reg.Toxicol. Pharmacol*.22:74–96.1995.

SILVA et al. Ecotoxicity of water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds to zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Chemosphere*.185:178-182.2017.

SCHOLZ, S.; FISHER, S.; GÜNDEL U.; KÜSTER, E.; LUCKENBACH, T.;

VOELKER, D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment-applications beyond acute toxicity testing. *Environ. Sci. Pollut. Res.*15:3944-404.2008.

SCHOLZ, S.; SELA, E.; BLAHA, L. et al. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*67:506-530.2013.

SICILIANO, A.; GESUELE, R.; PAGANO, G.; GUIDA, M. 2015. How daphnia (Cladocera) assays may be used as bioindicators of health effects? *Biodivers. Endanger Species.*S1:005.2015.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behavior and ecology of zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.*83:13-34.2008.

STOECKEL, J. A.; GONZÁLEZ, M. J.; ORIS, J. T.; KOVACH, M. J.; MACE, K. M. Atrazine and increased male production by *Daphnia*: the importance of combining field and laboratory approaches. *Environmental Toxicology and Chemistry.*24:2352-2360. 2008.

TEMBA, B. A.; FLETCHER, M. T.; FOX, G. P.; HARVE. J. J.; SULTANBAWA, Y. Inactivation of *Aspergillus flavus* spores by curcumin-mediated photosensitization. *Food Contr.* 59:708-713.2016.

TIANHONG, D.; FUCHS, B. B.; COLEMAN, J. J.; PRATES, R. A.; ASTRAKAS, C.; DENIS, T. G. S.; RIBEIRO, M. S.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, R. R.; TEGOS, G. P. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Frontiers in microbiology.*3:1-16.2012.

TAO, X.; HE, Y.; FORTNER, J. D. CHEN., Y.; HUGHES, J. B. Effects of aqueous stable fullerene nanocrystal (nC60) on copper (trace necessary nutrient metal): Enhanced toxicity and accumulation of copper in *Daphnia magna*. *Chemosphere*.92:1245-1252.2013.

TAO, X; LI, C; ZHANG, B.; HE, Y. Effects of aqueous stable fullerene nanocrystals (nC60) on the food conversion from *Daphnia magna* to *Danio rerio* in a simplified freshwater food chain. *Chemosphere*.145:157-162.2016.

TRUONG, L.; HARPER, S. L.; TANGUAY, R. L. Evaluation of embryotoxicity using zebrafish model. *Methods in Molecular Biology*.691:271-279.2011.

WAINWRIGHT, M. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.42:13-28.1998.

WAINWRIGHT, M.; MAISCH, T.; NONELL, S.; PLAETZER, K.; ALMEIDA, A.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Photoantimicrobials – are we afraid of the light? *Lancet Infect. Dis*.17:e49-e55.2017.

WAINWRIGHT, M., MEEGAN, K., LOUGHRAN, C. Phenothiazinium photosensitisers IX. Tetra- and pentacyclic derivatives as photoantimicrobial agents. *Dyes and Pigments* 91:1-5.2011.

World Health Organization. Public health impact of pesticides used in agriculture. Geneva: World Health Organization. 129.1990.

WUERS, M.; HUEBNER, E.; HUEBNER, J. The morphology of the male reproductive system, spermatogenesis and the spermatozoon of *Daphnia magna* (Crustacea:

Branchiopoda). Journal of morphology.278(11):1536-1550.2017.

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao> - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Atualizado em 05/04/2021 11h03.