



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CÎNCIA DE ALIMENTOS

Mônica Alessandra Teixeira dos Santos

*Efeito da pectina e da celulose na toxicidade de inseticidas piretróides
sobre parâmetros eletrocardiográficos e morfológicos em ratos Wistar machos
recém desmamados*

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para
obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos – Área de
Toxicologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Miguel A. Areas

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Sa59e	<p>Santos, Mônica Alessandra Teixeira dos Efeito da pectina e da celulose na toxicidade de inseticidas piretróides sobre parâmetros eletrocardiográficos e morfológicos em ratos Wistar machos recém desmamados / Mônica Alessandra Teixeira dos Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientador: Miguel Arcanjo Áreas Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.</p> <p>1. Piretróides. 2. Eletrocardiograma. 3. Fibras. 4. Histologia. 5. CG-DCE. 6. Rato. I. Áreas, Miguel Arcanjo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(ckn/fea)</p>
-------	---

Titulo em inglês: Effect of pectin and cellulose in the toxicity of pyrethroids insecticides in electrocardiographics and morphologicals parameters in male weaning Wistar rats

Palavras-chave em inglês (Keywords): Pyrethroids, Eelectrocardiogram, Fibers, Histology, GC-ECD, Rats

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Miguel Arcanjo Áreas

Sílvia Amélia Verdiani Tfouni

Marili Villa Nova Rodrigues

Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Gláucia Maria Pastore

João Ernesto de Carvalho

Programa de Pós-Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas
(Orientador)

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(Membro)

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
(Membro)

Profa. Dra. Maria Cristina Gomes Marcondes
(Membro)

Dra. Marilí Villa Nova Rodrigues
(Membro)

Dra. Sílvia Amélia Verdiani Tfouni
(Membro)

Agradecimentos

- Ao CNPq pela concessão da bolsa e verba de bancada, suporte financeiro que possibilitou minha total dedicação à pesquisa para realização e divulgação deste trabalho.
- À banca examinadora que prontamente aceitou participar deste projeto, ainda que na sua finalização. Agradeço pela revisão final, sugestões e pela oportunidade de aprender um pouco mais.
- Ao departamento de Ciência de Alimentos, em particular ao laboratório de toxicologia de alimentos, pela oportunidade de cursar doutorado numa das mais conceituadas universidades do país.
- Ao CPQBA, em particular à doutora Marili, por ter possibilitado a execução da etapa analítica da minha tese. Agradeço por me orientar e, sobretudo, por acreditar que eu poderia aprender e gostar do que eu estava fazendo. Obrigada por dedicar muito do seu tempo a este trabalho, que foi finalizado devido a seu empenho em me ajudar.
- Às minhas amigas e colegas da Unicamp pelos sorrisos que me dedicaram, pela convivência e apoio nos momentos não muito felizes. Agradeço por fazerem parte da história da minha vida. Em especial, agradeço à Camila, Sílvia Helena, Flávia e Elede.
- Às minha amigas que não estão na Unicamp, agradeço a preocupação, atenção que me dedicaram durante esses anos de doutorado e, principalmente, agradeço a compreensão por muitas vezes estar ausente e distante de vocês.
- Às minhas ajudantes Mônica Cabrini, Hellen e Angélica. Cada uma, ao seu tempo, deixou sua contribuição física e intelectual, além de muitos sorrisos, que faziam o trabalho parecer diversão.
- Ao meu esposo Paulo Sérgio pelos finais de semana em que deixou seu descanso para me ajudar com os animais, tornando o trabalho menos pesado e os dias mais curtos. Agradeço, ainda, o suporte financeiro que possibilitou a finalização deste trabalho e a realização de alguns sonhos.

- Ao meu pai Durval por ser meu maior fã e acreditar no meu sucesso. À Sueli por fazer de mim uma verdadeira filha. Aos meus irmãos Eric e Matheus, simplesmente por existirem na minha vida.

- À minha mãe Selma pelos muitos ensinamentos que me deixou. Sei que me assiste de onde está.

- Ao meu médico Dr. Cristoph e à minha terapeuta Dra. Sílvia pela ajuda no restabelecimento da minha saúde, sem a qual a realização deste projeto seria infinitamente difícil.

- Ao pequeno Sancho pela constante companhia e amor incondicional.

Agradecimento Especial

Professor Miguel,

Sei que você merece muito mais que essas palavras, mas no momento é o modo que encontrei para te agradecer por esses anos que trabalhamos juntos. Agradeço pela orientação dedicada onde horas do seu tempo foram dispensadas na realização dos ensaios biológicos e discussões de resultados. Por vezes saímos tarde, cansados do trabalho e com fome, mas seu bom humor, alto astral e confiança superavam todo desconforto e me encorajavam a continuar.

Sem sua orientação, esse trabalho não teria sido possível. Certamente um outro projeto teria sido realizado, mas eu não teria a sorte de aprender o que você me ensinou. Aprender a viver melhor e a confiar mais em mim, assim como você sempre fez. Ensinou-me que é preciso ser mais paciente e tolerante, embora raramente consiga aplicar estes ensinamentos. Aprender, sobretudo, que as coisas acontecem a seu tempo, que é preciso sempre ter perseverança. Agradeço por você ter sido mais que um professor, mas um amigo e, muitas vezes, um pai que aconselha e consola nos momentos de desespero.

Por fim, quero agradecer por me mostrar o quanto um professor pode ser bom e, mais uma vez, confirmar minha vocação. Sou grata pela oportunidade de ter sido sua orientada, aluna e amiga.

Dedicatória

Aos animais experimentais, que nascem com o destino de salvar nossas vidas. A cada trabalho concluído, uma nova etapa no desenvolvimento científico é conquistada. Aos ratos que morreram para realização deste trabalho, meu respeito sincero.

Sumário

Resumo Geral	1
Summary	3
Introdução e Objetivos	5
Referências Bibliográficas	9
Capítulo 1 – Piretróides – Uma visão geral	11
Resumo.....	12
Introdução.....	12
Piretróides – aspectos gerais e vantagens do uso.....	14
Propriedades físico-químicas.....	15
Exposição.....	18
Toxicocinética.....	20
Efeitos toxicológicos.....	22
Determinação de resíduos.....	26
Considerações finais.....	31
Referências bibliográficas.....	32
Capítulo 2 – Ação cardiotoxicidade de piretróides sob exposição aguda	40
Resumo.....	40
Abstract.....	41
Introdução.....	41
Metodologia.....	44
Resultados e discussão.....	46
Conclusão.....	48
Referências bibliográficas.....	49
Capítulo 3 – Protective effect of some dietary fibers on the pyrethroids cardiotoxic action	52
Abstract.....	52

Introduction.....	53
Materials and methods.....	56
Results.....	58
Discussion.....	60
Conclusion.....	64
References.....	68
Capítulo 4 – Deltametrina e permetrina induzem alterações histológicas em fígados de ratos.....	74
Resumo.....	74
Summary.....	75
Introdução.....	76
Material e métodos.....	78
Resultados.....	79
Discussão.....	80
Conclusões.....	87
Referências bibliográficas.....	87
Capítulo 5 – Determination of deltamethrin and permethrin by GC-ECD in liver and heart of subchronic oral exposed Wistar rats.....	90
Abstract.....	90
Introduction.....	91
Materials and methods.....	94
Results and discuss.....	99
Conclusions.....	102
References.....	102
Conclusões Gerais.....	105
Anexos – Resumos publicados em congressos.....	107

Resumo Geral

Ratos Wistar recém desmamados foram expostos, por via oral, a deltametrina e permetrina para avaliação dos efeitos cardiotoxicos assim como o provável efeito protetor de fibras alimentares sobre a ação desses piretróides. O trabalho teve como objetivos específicos à avaliação eletrocardiográfica, o estudo histológico do fígado e coração e a determinação de resíduos no coração e fígado dos animais experimentais. Para tanto, o trabalho foi dividido em três partes: 1) Ensaio agudo, 2) Ensaio subcrônico, 3) Ensaio subcrônico + administração de fibras. Na primeira fase do experimento, os animais receberam doses equivalentes à 1/2 DL50, 1/5 DL50 e 1/10 DL50 de permetrina e deltametrina em dose única, com o objetivo de se determinar a menor dose onde se observa efeito agudo (LOAEL). Durante o ensaio biológico, os inseticidas foram administrados por gavagem com a utilização de óleo de milho (5 mL/kg) como veículo. Os animais do grupo controle receberam apenas óleo de milho, nas mesmas condições. Após a realização dos eletrocardiogramas (ECG) constatou-se que administração de 1/10 DL50 de permetrina e deltametrina foi a melhor dose para a realização do ensaio subcrônico de 28 dias. Durante o ensaio subcrônico, os piretróides foram administrados, diariamente, nas mesmas condições do ensaio agudo tendo sido verificado no ECG dos animais experimentais efeito cronotrópico negativo, prolongamento do intervalo PR e do complexo QRS, sugerindo retardo na condução dos estímulos dos átrios para os ventrículos. Além disso, o prolongamento dos intervalos QT e QTc indicaram retardo no processo de despolarização e repolarização ventricular, sugerindo risco de morte súbita. O complexo QRS apresentou maior prolongamento somente nos animais que

receberam a deltametrina. Na terceira fase do experimento, foi avaliado o possível efeito protetor da pectina (fibra solúvel) e da celulose (fibra insolúvel), sobre a ação cardiotoxicidade dos piretróides, com a utilização da dose testada no ensaio subcrônico. A pectina se mostrou eficiente na redução dos efeitos tóxicos observados, já que sua presença aumentou a frequência cardíaca e reduziu o intervalo PR, QT e QTc além do complexo QRS. A ingestão de celulose não alterou o quadro de toxicidade observado nos animais submetidos às substâncias testadas. Após o término dos ensaios subcrônicos, o coração e o fígado foram retirados dos animais experimentais para a avaliação histológica. O coração dos animais não apresentou alterações histológicas após a exposição a ambos os piretróides, no entanto, os fígados dos ratos que ingeriram deltametrina apresentaram células inflamatórias, hepatócitos irregulares, alterações citoplasmáticas, núcleo condensado e nucléolo indefinido. A exposição oral a permetrina induziu as mesmas alterações histológicas observadas nos fígados expostos a deltametrina, com exceção de infiltrações inflamatórias. A administração de pectina na dieta reduziu todas as alterações histológicas observadas anteriormente. No entanto, a celulose não se mostrou eficaz na proteção dos tecidos contra os efeitos histológicos dos piretróides estudados. Ao final do ensaio de toxicidade subcrônica, os resíduos de deltametrina e permetrina foram determinados no fígado e coração através do desenvolvimento/validação de método por cromatografia gasosa acoplada ao detector de captura de elétrons, não tendo sido detectada a presença destes resíduos nos tecidos estudados (LD < 0.9/0.2 para deltametrina e LD < 1/0.2 para permetrina em fígado e coração, respectivamente).

Summary

The study was conducted on male weaning Wistar rats. They were exposed, by gavage, to deltamethrin and permethrin and the carditoxic effects of the pyrethroids and protective effects of dietary fibres were determined. The purposes of this study were the electrocardiographic evaluation, the histopathological study of the liver and heart and the residues determination in heart and liver of the rats. For that, this work was divided in three parts: 1) Acute exposure, 2) Subchronic exposure, 3) Subchronic exposure + dietary fibres. In the first step, the animals were exposed to LD₅₀, 1/2 LD₅₀, 1/5 LD₅₀ and 1/10 LD₅₀ of permethrin and deltamethrin to determine the lowest (LOAEL) dose which the acute effect could be observed. The insecticides were administered in corn oil (5 ml/kg), intragastrically, in a single dose. Parallel studies were conducted in a control group that received only corn oil. The ECG records showed that 1/10 LD₅₀ dose of permethrin and deltamethrin was the best dose for the conduction of subchronic assay. The experimental groups received the pyrethroids once a day for 28 days, in the same conditions of the first study. The subchronic poisoning resulted in negative chronotropism, prolongation of the PR interval and QRS complex, suggesting decrease of the stimulus from the atriums to ventricles. Besides, the prolongation of QT and QTc intervals indicated a decrease of the depolarization and repolarization processes suggesting sudden cardiac death. The QRS complex prolongation appeared only in the animals that received deltamethrin. In the third phase, the possible protective effects of pectin (soluble fiber) and cellulose (insoluble fiber) on pyrethroids cardiotoxicity were evaluated. For this study, 1/10 LD₅₀ dose was utilized. Pectin increased the heart rate and decreased

the PR, QT and QTc intervals and QRS complex, showing be efficient in reducing the cardiotoxicity. The ingestion of cellulose did not change the effects in heart observed in experimental animals. After the subchronic exposition, the heart and liver were taken in order to evaluate histologic changes. No changes were observed in the hearts of the rats exposed to both of pyrethroids. However, the liver of the animals exposed to deltamethrin showed inflammatory cells, irregular hepatocytes, cytoplasmatic changes, condensed nucleus and indefinite nucleolus. The permethrin induced the same histological changes observed in the livers exposed to the deltamethrin, exception of the inflammatory infiltrations. The pectin in the diet reduced all the histological changes previously observed and the cellulose did not efficient in the protection of the studied tissues. In the end of the subchronic essay, the tissue residues levels of permethrin and deltamethrin in heart and liver were estimated by gas chromatography with electron-capture detection. Residues of permethrin and deltamethrin were not observed in the studied tissues. (LOD < 0.9/0.2 for deltamethrin and LOD < 1.0/0.2 for permethrin in liver and heart, respectively).

Introdução e Objetivos

Dentre as doenças crônicas degenerativas não transmissíveis, as doenças cardiovasculares são responsáveis pela maior taxa de mortalidade em indivíduos da maioria dos países ocidentais. São várias as causas atribuídas ao aumento da incidência de doenças cardíacas e certamente estão envolvidos aspectos da dieta.

Algumas substâncias, naturalmente presentes ou adicionadas aos alimentos, podem aumentar o risco do desenvolvimento de alterações cardiovasculares, quando ingeridas por longos períodos. Os agrotóxicos, por exemplo, são facilmente encontrados em muitos alimentos que chegam à mesa da população. São substâncias largamente utilizadas no controle de pragas e doenças das lavouras garantindo uma produção agrícola em larga escala. No entanto, a utilização inadequada de defensivos agrícolas e a desobediência aos períodos de carência propiciam a ocorrência de resíduos destas substâncias nos alimentos acima do limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido podendo ser altamente tóxicos ao atingirem espécies consideradas não-alvo.

Os piretróides constituem uma classe de inseticidas bastante utilizados na agricultura, pois apresentam baixa toxicidade em mamíferos, persistem pouco tempo no ambiente, são efetivos contra um largo espectro de insetos e tendem a exibir baixo desenvolvimento de resistência nos insetos (revisado por Soderlund et al., 2002). Conseqüentemente, os piretróides têm sido mais aceitos do que outros inseticidas com maior persistência e toxicidade. No entanto, em alguns casos, a utilização de piretróides tem aumentado os riscos à pássaros e/ou mamíferos (Valentine, 1990; Ripley et al., 2001; Nasuti et al., 2003). Dessa forma, os piretróides

podem agir em outras espécies expostas acidentalmente durante a aplicação do produto ou ingestão de alimentos contaminados. Vários autores têm estudado a permanência de resíduos de agrotóxicos em diversas culturas (Dejonckheere et al., 1982; Cabras et al., 1988; Sances et al., 1992; Ripley et al., 2001). É esperado que baixos teores de resíduos sejam encontrados nos alimentos, desde que a quantidade do produto recomendada para utilização em cada cultura seja obedecida. No entanto, a natureza destes compostos sugere que seus resíduos podem ser degradados lentamente (Ripley et al., 2001), sugerindo que a exposição aos piretróides pela população ocorra principalmente através de resíduos da dieta (Heudorf e Angerer, 2001).

Assim como nos insetos, os piretróides exercem nos vertebrados uma potente ação sobre os canais de sódio neural, interferindo na sua abertura e fechamento, prolongando o tempo de entrada dos íons Na^+ para o interior da célula (Narahashi, 1996; Spencer et al., 2001; De la Cerda et al., 2002).

Os impulsos nervosos caracterizam-se como uma alteração na diferença de potencial elétrico através da membrana do neurônio, alteração esta que se propaga ao longo do mesmo. A interação de substâncias químicas com proteínas presentes na membrana do neurônio promove uma alteração na configuração espacial nas proteínas associadas ao transporte de Na^+ através da membrana. Assim, a entrada seqüencial de Na^+ é seguida de uma saída seqüencial de íons K^+ , processo fundamental para a geração do potencial de ação (Zanetti, 2007).

Os inseticidas piretróides (deltametrina, cipermetrina, etc.) se ligam à proteína associada ao canal de Na^+ , impedindo o seu fechamento. Como consequência, o

neurônio não consegue voltar à condição de repouso e, portanto, ocorre um bloqueio na transmissão de impulsos nervosos, induzindo o efeito “*knock down*” ou de rápida paralisia nos insetos. Os mecanismos envolvidos na transmissão de impulsos nervosos em insetos são muito semelhantes àqueles operantes em mamíferos, aves e peixes. Por isso, muitos inseticidas neurotóxicos são tóxicos também a esses organismos não-alvo, incluindo, os seres humanos (Zanetti, 2007).

Assim como no sistema nervoso, o coração possui canais iônicos presentes tanto nas membranas das células auto-excitáveis como nas células contráteis (Spencer et al., 2001). O potencial de ação cardíaco se inicia pelo influxo de sódio na membrana das células que constituem o nodo sino-atrial (SA), propagando-se, pelo feixe inter-nodal, ao nodo atrio-ventricular (AV), feixe de his e fibras de purkinje excitando, dessa forma, as células contráteis atriais e ventriculares.

Por outro lado, sabe-se que alguns tipos de fibras alimentares se caracterizam por remover substâncias do trato gastrointestinal ou atrasar sua absorção. Epidemiologicamente, a ingestão elevada de fibras alimentares está associada com a diminuição de mortes por doenças cardiovasculares decorrentes da ingestão de substâncias presentes na dieta (Anderson et al., 1990).

Diante do importante papel na prevenção de doenças cardíacas atribuídas às fibras alimentares e da significativa utilização dos piretróides na produção agrícola, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o efeito cardiotóxico de piretróides de uso permitido no Brasil, assim como o provável efeito protetor de fibras alimentares em relação a esses efeitos, utilizando ratos Wistar recém desmamados.

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar o efeito da administração aguda e sub-crônica dos piretróides permetrina e deltametrina sobre parâmetros eletrocardiográficos em ratos Wistar recém desmamados.
2. Avaliar o efeito de fibras alimentares (pectina/fibra solúvel e celulose/fibra insolúvel) sobre parâmetros eletrocardiográficos dos animais submetidos à administração subcrônica de permetrina e deltametrina.
3. Avaliar aspectos morfológicos no fígado e coração dos animais submetidos aos ensaios subcrônicos
4. Desenvolver e validar um método analítico para quantificação de deltametrina e permetrina utilizando cromatografia gasosa acoplada ao detector de captura de elétrons.
5. Determinar a presença de resíduos de piretróides no fígado e coração dos animais submetidos aos ensaios subcrônicos.

Referências Bibliografia

Anderson J.W., Deakins D.A., Floore T.L., Smith B.M., Whitis S.E. 1990. Dietary fiber and coronary heart disease. *Critical reviews in food science and nutrition* 29(2):95-147.

Cabras P, Meloni M, Manca MR, Pirisi FM, Cabitza F, Cubeddu M. Pesticide residues in lettuce. 1. Influence of the cultivar. *J. Agric. Food Chem* 1988; 36: 92-95.

De la Cerda E, Navarro-Polanco RA, Sánchez-Chapula JA. Modulation of cardiac action potential and underlying ionic currents by the pyrethroid insecticide deltamethrin. *Arch Med Res* 2002; 33: 448-454.

Dejonckheere W, Verstraeten R, Steurbaut W, Melkebeke G, Kips RH. Permethrin and deltamethrin residues on lettuce. *Pestic Sci* 1982, 13:351-356.

Heudorf U, Angerer J. Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. *Environ Health Perspect* 2001, 109 (3): 213-217.

Narahashi T. Neuronal ion channel as the target sites of insecticides. *Pharmacol Toxicol* 1996, 79 (1): 1-14.

Nasuti C, Cantalamessa F, Falcioni G, Gabbianelli R. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. *Toxicology* 2003, 191 (2-3): 233-244.

Ripley BD, Ritcey GM, Harris CR, Denommé MA, Brow PD. Pyrethroid insecticide residues on vegetable crops. *Pest Manag Sci* 2001,57 (8):683-687.

Sances FV, Toscano NC, Gaston LK. Minimization of pesticide residue on head lettuce: within-head residuedistribution of selected insecticides. *J Econ Entomol* 1992, 85: 203-207.

Spencer CI, Yuill KH, Borg JJ, Hancox JC, Kozlowski RZ. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 2001, 298 (3): 1067-1082.

Valentine WM. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990, 20 (2): p.375-382.

Zanetti, R. Transmissão de impulsos nervosos e modo de ação de inseticidas.

Notas de Aula. Departamento de Entomologia. Universidade Federal de Lavras.

www.den.ufla.br/Professores/Ronald/Disciplinas/Notas%20Aula/impulso%20nervosos.o.PDF. Acessado em 07/10/2007.

CAPÍTULO 1

Piretróides – Uma visão geral

Mônica Alessandra Teixeira dos SANTOS^{*};

Felix Guillermo Reyes REYES^{*}

Miguel Arcanjo AREAS^{}**

^{*} Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, 80, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 13083-862, Campinas/SP; E-mail:

monicas@fea.unicamp.br

^{**} Departamento de Fisiologia de Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas/SP.

(Artigo enviado para publicação na revista ALIMENTOS E NUTRIÇÃO)

RESUMO: nos últimos 50 anos, os inseticidas vêm sendo utilizados na agricultura brasileira para o controle e combate de pragas, garantindo o suprimento de alimentos para uma população em constante crescimento. Os inseticidas piretróides surgiram como alternativa àqueles de maior potencial tóxico aos mamíferos e ao meio ambiente, sendo, atualmente, utilizados como domissanitários e no combate de insetos vetores de doenças, proporcionando, assim, um maior risco à população aos efeitos adversos que essas substâncias podem causar. Considerando que os piretróides pertencem à classe de inseticida mais utilizada no mundo, o presente artigo visa relacionar os principais aspectos e vantagens de seu uso no controle geral de insetos, os riscos à saúde que envolve a exposição dessas substâncias por indivíduos não alvos e aspectos analíticos na determinação de seus resíduos em diferentes matrizes.

PALAVRAS-CHAVE: Inseticidas piretróides, vantagens de uso, efeitos adversos, resíduos, cromatografia.

Introdução

O uso de inseticidas é considerado importante e indispensável para o aumento da produtividade das áreas destinadas à agricultura, já que os insetos são grandes responsáveis pelas perdas verificadas durante a produção de alimentos. Os inseticidas são também utilizados na pecuária, em domicílios e em programas de saúde pública.

Evitar perdas na agricultura e garantir alimentos em quantidade e qualidade adequados para uma população em plena expansão tem sido o grande desafio de especialistas de todo o mundo. Fato que contribuiu para a classificação do Brasil como o 3º. maior consumidor de agrotóxicos no mundo e o primeiro no âmbito da

América Latina⁵. O uso de agrotóxicos no Brasil alcançou, no ano de 2005, o patamar de produção e comercialização de, aproximadamente, 400 mil toneladas⁴⁶.

Muitos agrotóxicos têm seu uso proibido devido a sua elevada toxicidade em mamíferos e/ou persistência no ambiente. Os organoclorados, grupo pioneiro dos praguicidas sintéticos, tiveram seu uso agrícola proibido no Brasil desde 1985, sendo somente autorizados em campanhas de saúde pública (Portaria nº. 329 de 02/09/85 do Ministério da Agricultura). Como conseqüência, as indústrias agroquímicas vêm trabalhando na síntese e formulação de moléculas que sofram degradação, desaparecendo no ambiente em pouco tempo³⁸. Assim, os piretróides tiveram seu uso difundido como alternativa aos organoclorados, muito persistentes no ambiente, e aos carbamatos e organofosforados que são muito tóxicos, especialmente ao sistema nervoso central.

Os piretróides são, atualmente, os inseticidas mais utilizados, pois apresentam baixa toxicidade em mamíferos, baixo impacto ambiental, são efetivos contra um largo espectro de insetos e são necessárias baixas quantidades para exercerem sua ação. No entanto, em alguns casos, a utilização de piretróides tem aumentado os riscos à pássaros e/ou mamíferos^{42, 45, 56}. Ainda, ensaios laboratoriais demonstraram que os piretróides são muito tóxicos para peixes, abelhas e artrópodes aquáticos, tais como lagostas e camarões²³. Dessa forma, podem agir em outras espécies expostas acidentalmente durante a aplicação do produto ou ingestão de alimentos contaminados.

Vários autores têm estudado a permanência de resíduos de agrotóxicos em diversas culturas^{12, 17, 45, 47}. Assim, com a aplicação de baixos teores de inseticidas

nos alimentos, é esperado que se encontrem baixos teores de resíduos; embora a natureza destes compostos sugira que os resíduos podem ser degradados lentamente⁴⁵. Considera-se que a exposição aos piretróides pela população ocorra principalmente através de seus resíduos nos alimentos²⁵. Diante desse fato, o controle dos resíduos de piretróides nos alimentos é de extrema importância para a observância do Limite Máximo de Resíduos (LMR), assim como do período de carência, estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Agricultura.

Neste contexto, esta revisão visa fornecer informações para o desenvolvimento de novos estudos que relacionem os danos causados a indivíduos não alvo após a exposição à inseticidas piretróides

Piretróides – aspectos gerais e vantagens do uso

Os piretróides são os derivados sintéticos das piretrinas, ésteres tóxicos isolados das flores das espécies de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas^{42, 53, 56}. As piretrinas foram utilizadas como inseticidas durante muitos anos, devido a sua ação sob uma vasta variedade de insetos e à baixa toxicidade em mamíferos, quando em circunstâncias de uso adequado. Entretanto, as piretrinas naturais apresentam grande instabilidade à luz solar e ao ar, o que diminui a sua eficácia no controle de pragas da agricultura e de outros insetos¹⁴.

O uso dos piretróides sintéticos na agricultura iniciou-se na década de 70 após mudança estrutural introduzida nas piretrinas, para modificar a estrutura química com o intuito de se obter substâncias com maior estabilidade e potencial inseticida.

Assim, a inclusão de átomos de nitrogênio, enxofre e elementos halogênicos às piretrinas solucionou os problemas de estabilidade relacionados às substâncias naturais, enquanto manteve relativamente baixa a toxicidade aguda em mamíferos^{25, 52}. Com isso, os piretróides tiveram seu uso aumentado e, conseqüentemente, organismos não alvos foram mais expostos aos seus efeitos tóxicos⁵⁶. Entretanto, cabe mencionar que apesar de serem moléculas pouco polares não se acumulam em tecidos animais.

Os piretróides agem nos insetos com rapidez causando paralisia imediata e mortalidade, efeito de choque denominado “Knock down”⁵⁵.

As substâncias deltametrina, permetrina e cipermetrina (Figura 1) são alguns exemplos de piretróides utilizados no controle dos insetos das lavouras²³. A deltametrina é o piretróide mais tóxico para vertebrados dentre todos os conhecidos até o momento. O uso da deltametrina é excepcionalmente interessante já que foi obtida do isolamento de apenas um isômero (o mais ativo, D-cis). Normalmente, os piretróides são usados como misturas de dois ou mais isômeros².

Propriedades físico-químicas

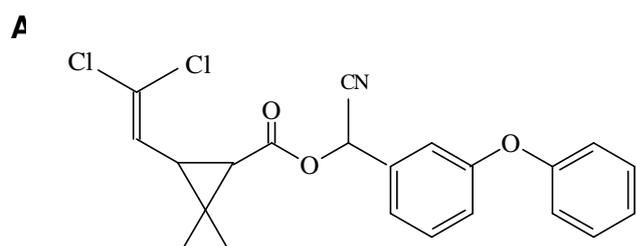
Os piretróides ocorrem naturalmente como mistura de formas estereoisoméricas, assim, assumiu-se que combinando todas as informações estereoisoméricas dentro de uma única categoria, todas as propriedades do piretróide estariam reunidas.

A atividade biológica dos piretróides é dependente da estrutura química e configuração estérica. A toxicidade da mistura racêmica varia com a razão *cis/trans* e com as características do veículo usado. Os isômeros *cis* demonstram uma

toxicidade mais elevada em relação ao *trans* e o carregador não polar aumenta a toxicidade de ambos isômeros^{28, 52,56}. Assim, diferenças nas estruturas químicas de inseticidas (Figura 1) são importantes para a sua toxicidade.

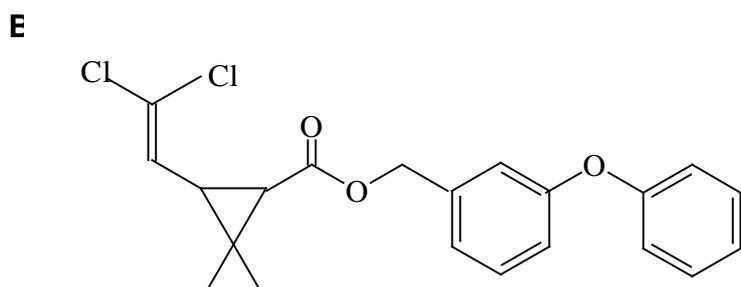
A sensibilidade à luz varia entre os vários tipos de piretróides. Em água, a ciflutrina e a tralometrina apresentam vida média de 0,67 e 2,5 dias, respectivamente. A lambda-cialotrina, esfenvalerato, deltametrina, permetrina e cipermetrina não são tão sensíveis e apresentam vida média variando entre 17 e 110 dias. A bifentrina e a fenproprina mostraram a menor sensibilidade a luz, com vida média de 400 e 600 dias, respectivamente. Em solução aquosa, os piretróides tendem a ser estáveis em pH ácido e neutro, mas tornam-se crescentemente susceptíveis a hidrólise em valores de pH além do neutro. As exceções em alto pH são a bifentrina e fenvalerato, consideradas estáveis e a permetrina, que apresenta vida média de 240 dias³¹.

Com o intuito de determinar as taxas de dissipação nas plantas, alguns piretróides foram utilizados no tratamento foliar de vários vegetais. Em geral, os resíduos de permetrina, cipermetrina e deltametrina apresentaram declínio nas suas taxas de resíduos atingindo concentrações aceitáveis, dentro do intervalo pré-colheita ideal⁴⁵.



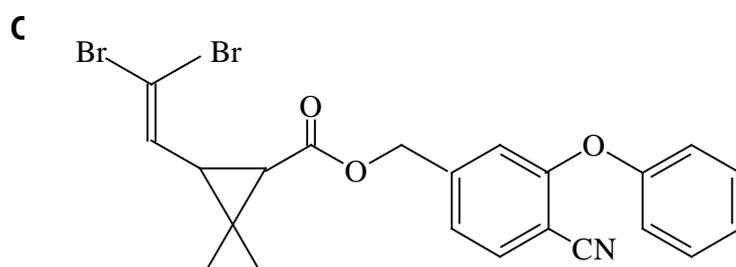
Cipermetrina

[(RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS; 1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate] - 2 isômeros



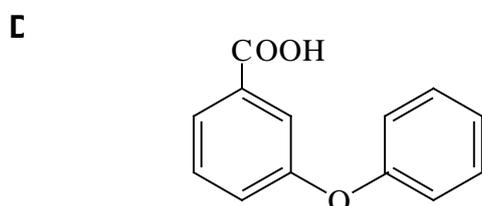
Permetrina

[3-fenoxibenzil (1RS, 3RS, 1RS, 3SR 1-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato] – 4 isômeros.



Deltametrina

[(S)- α -ciano-3 fenoxibenzil (1R, 3R)-3-(2,2 dibromovinil)-2,2 dimetilciclopropanocarboxilato] – 1 isômero.



Ácido 3-fenoxibenzóico – metabólito da deltametrina e permetrina

FIGURA 1 – Estrutura química dos piretróides **A** cipermetrina **B** permetrina, **C** deltametrina, e **D** metabólito.

Exposição

Nos últimos sete anos, a ANVISA vem monitorando através do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), os teores de agrotóxicos em alguns tipos de alimentos consumidos diariamente pela população brasileira. Este programa mostra a importância da verificação da qualidade do alimento em relação à presença de agrotóxicos.

A exposição aos piretróides pela população ocorre principalmente via resíduos presentes nos alimentos^{25, 48}.

A ingestão ou inalação de pó contaminado pode ser observada após o uso de inseticidas no interior de domicílios ou durante a aplicação do produto nas lavouras. No entanto, devido a sua baixa volatilidade, os piretróides não são detectados nas residências ou o são apenas em baixas concentrações²⁵. Na lavoura, a exposição por inalação ocorre devido a ausência de equipamentos de proteção individual ou seu uso inadequado. Os aplicadores despreparados estão também expostos à contaminação tópica durante o manuseio negligente do produto, além dos riscos de contaminações acidentais. Além dos aplicadores de campo, o vasto uso dos piretróides expõe aos seus possíveis efeitos tóxicos, os trabalhadores encarregados da produção e o ecossistema⁵⁸.

A quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem oferecer risco apreciável para a saúde humana (IDA)⁵ permite avaliar o risco da ingestão de resíduos de agrotóxicos em alimentos. A IDA, determinada para cada ingrediente ativo de agrotóxico, é estabelecida com base em estudos sobre as propriedades físico-químicas, metabólicas, farmacológicas e toxicológicas dos

agrotóxicos, advindas dos estudos conduzidos com animais de laboratórios, e realizados com procedimentos reconhecidos em nível internacional²⁷.

A partir dos valores de IDA é possível o estabelecimento dos limites máximos de resíduos (LMR) encontrados nos alimentos. Entende-se por LMR a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em mg do ingrediente ativo por kg de alimento⁵.

Os valores de IDA de alguns piretróides de uso permitido no Brasil e seus limites máximos de resíduo encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 Ingestão diária aceitável (IDA) e Limites máximos de resíduos (LMR)

Piretróide	IDA (mg.kg⁻¹.p.c.)	LMR (mg.kg⁻¹)
Permetrina	0,05	0,01-0,5
Cipermetrina	0,05	0,02-0,1
Lambda-cialotrina	0,05	0,02-2,0
Fenpropatrina	0,03	0,01-2,0
Bifentrina	0,02	0,02-0,7
Deltametrina	0,01	0,05-1,0
Beta-cipermetrina	0,01	0,05-0,5

Fonte - ANVISA⁵

Toxicocinética

Os piretróides são rapidamente e extensivamente absorvidos pelo trato gastrointestinal após a administração oral e pelo trato respiratório através da inalação de pó ou spray. Entretanto, são fracamente absorvidos pela pele intacta e apresentam ação mais rápida em solvente polar quando comparado à água^{28, 52}. Todavia, alterações bioquímicas e histopatológicas verificadas em várias regiões do cérebro de ratas, após a exposição dérmica a uma mistura de clorpirifós (organofosforado) e cipermetrina³², comprovaram a absorção desses inseticidas pela pele.

Após a administração de uma dose oral única, os piretróides são rapidamente absorvidos e distribuídos por todo o corpo⁵². Este comportamento foi comprovado pelo estudo do balanço e retenção de cipermetrina nos tecidos de ratos através da utilização de marcadores (¹⁴C). O trabalho foi desenvolvido após a administração oral de cipermetrina em doses que variaram de 1 a 5 mg/kg. Um dia após a administração das doses foi verificada radioatividade residual, em ordem decrescente, no tecido adiposo, fígado, rim, sangue, músculo e cérebro, variando de 1-2 µg/g no tecido adiposo a 0,005-0,024 µg/g no cérebro. Os níveis de resíduos diminuíram rapidamente em todos os tecidos, com exceção do tecido adiposo¹⁵. Na ingestão da dose única, a maioria dos piretróides é rapidamente excretada pela urina e fezes. Geralmente, em mamíferos, mais de 90% da dose é excretada no período de uma semana após exposição⁵². Estudo realizado em ratos¹⁵ demonstrou que a cipermetrina é rapidamente e principalmente eliminada pela urina, com exceção de uma pequena porção do isômero *cis* que, após atingir o tecido adiposo, foi eliminado

com uma meia vida de 12 dias. Segundo os autores, a rápida eliminação do inseticida pelos animais é devida, primeiramente, à clivagem eficiente da ligação éster proporcionando aumento dos metabólitos polares, os quais serão oxidados e conjugados antes da excreção. Na administração oral de doses diárias, os piretróides atingem níveis estáveis nos tecidos internos em poucos dias. Esses níveis persistem durante todo o período de dosagem e decrescem quando a exposição cessa⁵².

Estudo realizado em homens estabeleceu uma comparação entre a recuperação de metabólitos urinários e a via de administração da cipermetrina. Os resultados mostraram que a via oral de administração proporcionou uma absorção maior que a dérmica, com valores médios de 36% e 1,2% da dose administrada, respectivamente. Foi possível verificar que, aproximadamente, 72% dos metabólitos eliminados pela urina foram excretados em 72 horas após a administração oral da cipermetrina, enquanto que o pico de excreção foi atingido entre 12 e 36 horas após a exposição dérmica⁵⁹.

Os compostos 1R, *trans* apresentam baixa toxicidade em mamíferos devido à rápida hidrólise por esterases hepáticas⁵². O estudo da retenção tecidual de cipermetrina realizado por Crawford et al.¹⁵, demonstrou que os resíduos derivados dos isômeros *cis* foram encontrados no tecido adiposo em níveis mais elevados do que aqueles derivados dos isômeros *trans*. Segundo os autores, é possível que a hidrólise da ligação éster ocorra no tecido adiposo, catalisada por uma lipase, e esta hidrólise pode ter ocorrido mais rapidamente com o isômero *trans*.

A exposição aos piretróides ocorre simultaneamente com outros agentes químicos ambientais ou farmacêuticos. Assim, é necessário considerar a

possibilidade dos piretróides compartilharem efeitos tóxicos e mecanismos com outras substâncias quimicamente e funcionalmente não relacionadas.

Em resumo, os piretróides são biotransformados rapidamente no organismo de mamíferos, principalmente no fígado. A reação inicial de detoxificação é a hidrólise da ligação éster, seguida por reações de hidroxilação através do sistema enzimático Citocromo P₄₅₀ e reações de conjugação. A biotransformação resulta na formação de compostos mais polares, o que facilita sua excreção pela urina.

Efeitos toxicológicos

Os efeitos da intoxicação por piretróides estão relacionados à sua estrutura química. Os inseticidas sintéticos podem ser estruturalmente divididos em dois grupos segundo a ausência (tipo I) ou presença (tipo II) de um grupo ciano (CN) na porção fenoxibenzil^{33, 42, 57}. Os piretróides do tipo I parecem agir principalmente nos nervos periféricos causando a Síndrome do Envenenamento tipo I ou “Síndrome T”, caracterizada por induzir, em ratos, tremores por todo corpo, comportamento agressivo, aumento da sensibilidade aos estímulos externos, hiperexcitabilidade, ataxia e convulsões. Em mamíferos não roedores causa paralisia progressiva. Os piretróides tipo II agem preferencialmente no sistema nervoso central induzindo a Síndrome da Coreoatetose tipo II ou “Síndrome CS” cujos sintomas de intoxicação são hipersensibilidade, salivação abundante, agitação das mãos ou patas anteriores, movimentos de escavar e tremores periódicos que podem evoluir à coreoatetose e, em alguns casos, à movimentos clônicos repetitivos^{13, 41, 53, 57}.

Assim como nos insetos, os piretróides exercem nos vertebrados um efeito significativo sobre os canais de sódio neural, interferindo na sua abertura e fechamento, prolongando o tempo de entrada dos íons Na^+ para o interior da célula¹⁶
^{41, 53}, efeito semelhante ao observado nas intoxicações por DDT. Os mamíferos possuem vários canais de sódio de formato semelhante que variam em suas propriedades biofísicas e farmacológicas, incluindo a sensibilidade aos diferentes piretróides^{41, 52, 53}.

Em concentrações relativamente altas, os piretróides do tipo II agem sobre o complexo receptor inotrópico do ácido γ -aminobutírico (GABA), ou seja, ligam-se aos receptores do GABA bloqueando os canais de cloro e sua ativação. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) de vertebrados e a ausência de inibição sináptica leva a uma hiperexcitabilidade do SNC^{9, 37, 56}.

Em condições normais, o neurotransmissor GABA se liga ao receptor GABA_A estimulando a abertura dos canais de Cl^- permitindo o influxo de cargas negativas (íons Cl^-) para o interior do citoplasma, tornando o potencial de membrana neural mais negativo. Em seguida, verifica-se um efeito repressor dos disparos dos impulsos nervosos e do influxo contínuo de Cl^- para o interior da célula⁵⁷.

Além dos efeitos neurológicos, freqüentemente são detectadas manifestações cardiovasculares após a exposição dos indivíduos a estes compostos¹⁶. Algumas das mais freqüentes manifestações cardiovasculares ocorridas durante intoxicações por inseticidas piretróides, organoclorados e organofosforados, são as variações eletrocardiográficas tais como o prolongamento do intervalo Q-T e arritmias

cardíacas do tipo *Torsade de Pointes* (TdP)³⁶. Estes efeitos podem ser explicados pelo aumento da duração do potencial de ação induzido pelos inseticidas¹⁶.

Os canais de sódio cardíacos são proteínas responsáveis pelo rápido curso ascendente do potencial de ação e rápida propagação do impulso nervoso através do tecido cardíaco. Assim, sua função é central na origem de arritmias cardíacas⁷. Entretanto, apesar da importância dos canais de sódio cardíaco, pesquisas que relacionem interações dos canais de sódio com piretróides ainda são escassas^{16, 53}. Um estudo realizado com miócitos ventriculares de gatos concluiu que a deltametrina aumentou a duração do potencial de ação e produziu mudanças cinéticas no canal de sódio cardíaco, semelhantes às induzidas por piretróides no canal de sódio da membrana nervosa¹⁶.

Alterações histopatológicas também são atribuídas às intoxicações por piretróides. Latuszynska et al.³² verificaram leves alterações histopatológicas no cérebro de ratas após três semanas da aplicação dérmica de cipermetrina e clorpirifós. Observou-se um aumento da densidade do citoplasma das células do córtex cerebral, camada CA 1 do hipocampo, área hilo dentata, neurócitos do núcleo do tálamo e das células de Purkinje do cerebelo. Os autores verificaram que as alterações histológicas persistiram por mais de três semanas após o final do período experimental.

Alguns agrotóxicos podem causar câncer e a literatura científica também apresenta trabalhos sobre a mutagenicidade dessas substâncias. Os riscos da ocorrência desses efeitos adversos dependem da estrutura molecular do composto, da dose e da intensidade de exposição²³.

Para a avaliação mutagênica da deltametrina em ratos, Shukla & Taneja⁵¹ utilizaram o teste de dominância letal, importante medida de genotoxicidade. Os resultados sugeriram que a deltametrina apresentou baixo ou nenhum potencial genotóxico em células germinativas dos animais experimentais. Em outros estudos, a deltametrina também apresentou resultados negativos em *Salmonella typhimurium*, células V79 (fibroblastos utilizados em estudos de toxicidade) de hamster chinês, células de medula óssea de camundongos e no ensaio letal dominante ligado ao sexo em camundongos. No entanto, em outro experimento realizado em ratos, a deltametrina induziu aberrações cromossômicas e micronúcleos (Chauhan et al., 1997; Gandhi et al., 1995; Agarwal et al., 1994, citados por Grizolia, 2005)²³. O potencial mutagênico de cada piretróide depende de sua estrutura molecular, intensidade de exposição e velocidade de degradação. Como possuem meia-vida curta no ambiente, não bioacumulam e têm pouca mobilidade, esses inseticidas apresentam potencial genotóxico bastante diminuído²³.

Quanto à carcinogenicidade, poucos relatos são encontrados na literatura para que se possa chegar a alguma conclusão sobre a ação dos piretróides. Shukla et al.⁵⁰ verificaram que a deltametrina não demonstrou ser um promotor, mas apenas um iniciador de neoplasmas em camundongos, mas advertem a ausência de estudos a longo prazo da promoção carcinogênica.

Efeitos no sistema reprodutivo (teratogenicidade) foram verificados em ratas prenhes tratadas com diferentes doses (1; 2,5 e 5 mg.kg⁻¹.p.c.) de deltametrina¹. Foi observada uma maior incidência de mortes embrionárias precoces nos animais tratados com o inseticida em relação ao grupo controle. A deltametrina causou nos

fetos retardamento no crescimento, hipoplasia dos pulmões, dilatação da pelve renal, além de aumento no peso da placenta.

A suscetibilidade de um organismo a agentes químicos pode variar segundo a idade. As crianças são particularmente vulneráveis à exposição aos agentes químicos presentes no ambiente devido a suas características fisiológicas – demandam mais água e alimentos do que os adultos³⁹. Estudos demonstraram que ratos recém-nascidos são sensíveis aos piretróides, e esta sensibilidade é maior quanto menor for a idade do animal^{13, 49}. Os casos mais severos de envenenamento por piretróides foram relatados em crianças, sugerindo a ocorrência de uma ineficiente hidrólise dos ésteres piretrum nesses indivíduos²⁴.

O fígado e os rins, principais órgãos de biotransformação e excreção de substâncias tóxicas, são os alvos mais freqüentemente afetados pelos inseticidas piretróides³⁵.

Determinação de resíduos

A determinação de resíduos de pesticidas é tradicionalmente realizada por meio de técnicas cromatográficas devido a facilidade de separação, identificação e quantificação das substâncias presentes na amostra, com a utilização de detectores específicos^{21, 22}.

A cromatografia a gás (CG) é ainda a técnica mais utilizada na determinação de resíduos de piretróides devido a seu baixo custo e conveniência³⁴. Apesar da alta sensibilidade do método, a CG requer grande volume de amostra (3-15 mL) e longo tempo de preparo da amostra e de corrida cromatográfica (60-70 minutos)¹⁸. A

injeção de grande volume de amostra promove o alargamento dos picos e podem saturar a coluna cromatográfica e o detector. No entanto, os injetores utilizados para cromatografia gasosa de alta resolução são dotados de dispositivos para divisão de amostra, de modo que apenas uma fração do volume injetado chega à coluna.

Embora não existam sistemas específicos de detecção para piretróides, aqueles que possuem átomos de halogênios em suas moléculas são sensíveis ao detector por captura de elétrons (ECD). Assim, métodos de derivatização foram desenvolvidos para aumentar a volatilidade e detectabilidade das moléculas ausentes de átomos de halogênios. O detector por ionização em chama (FID) também pode ser usado para detecção de piretróides não halogenados, entretanto, não apresenta sensibilidade suficiente para análise de resíduos¹⁴.

Geralmente, o método de detecção deve ter alta sensibilidade com uma ou duas ordens de magnitude de sensibilidade maior que o limite máximo de resíduo estabelecido (LMR) para o composto de interesse. Devido à baixa toxicidade crônica, o LMR da maioria dos piretróides é estabelecido como vários níveis de mg kg^{-1} ¹⁴.

A utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na determinação de resíduos de piretróides é ainda limitada, no entanto, tem sido utilizada na determinação de resíduos em amostras biológicas como urina³³, plasma sanguíneo e tecido de animais experimentais^{3, 18, 29} além de alimentos, como vegetais, frutas^{3, 6, 21, 22}, grãos¹¹ e leite⁸.

A CLAE permite a determinação de compostos não voláteis e termo-lábeis e, além disso, o método não requer a perfeita limpeza (*clean-up*) das amostras, como acontece no emprego do CG-ECD¹⁴.

Porém, para a análise de resíduos por CLAE é necessário o uso de detectores seletivos que confirmam alta sensibilidade ao método como o detector de fluorescência, que pode ter sua detectabilidade aumentada através de reações de derivatização, e o detector seletivo de massas³⁴.

O espectrômetro de massas acoplado ao CG possui a habilidade de quantificar e confirmar a identidade de agrotóxicos presentes em amostras complexas em pequenas quantidades²². O detector seletivo de massas (MS) é extremamente importante na análise de resíduos de agrotóxicos devido a sua alta detectabilidade podendo ser utilizado para a identificação precisa de um composto desconhecido com base na sua massa molecular, fórmula empírica e fragmentação do analito⁴⁰. O espectro de massas do agrotóxico pode ser obtido com apenas nanogramas do composto, conseqüentemente, as informações estruturais são provenientes de quantidades mínimas de amostra.

O uso do detector seletivo de massas em tandem (MS/MS) proporciona alta detectabilidade e excepcional capacidade de evitar interferentes no espectro²². Uma prévia separação cromatográfica dos compostos da mistura de interesse aumenta a seletividade e os limites de detecção da técnica tandem MS/MS. Assim, segundo Bonne et al.¹⁰, o sistema CG-MS/MS permite uma melhor seletividade que o GC-MS ou tandem MS/MS, especialmente em amostras complexas.

Ainda pouco utilizado devido ao seu alto custo de aquisição, o cromatógrafo líquido acoplado a um analisador de massas de tempo de voo [(LC-MS-(ToF)] tem sua aplicação relatada na literatura para identificação e, em poucos casos,

quantificação de agrotóxicos em vegetais e amostras ambientais, como água e sedimentos^{20, 30}.

O LC-MS-(ToF) é considerado uma importante ferramenta para detecção, identificação e confirmação da identidade de compostos desconhecidos, tais como agrotóxicos, produtos farmacêuticos e surfactantes, além de seus metabólitos e produtos de transformação³⁰. O alto poder de resolução do MS-ToF permite a obtenção de medidas exatas de massas moleculares pequenas, além da boa diferenciação entre espécies isobáricas¹⁰. Na prática, a medida de massa dentro dos limites de 2 mDa proporciona uma pequena lista de elementos a ser considerada na identificação de um composto²⁰.

O detector QToF-MS combina a simplicidade do quadrupolo e a alta eficiência do analisador de massas de tempo de voo. A grande diferença entre o QToF e o ToF é a capacidade do primeiro em determinar massas exatas de fragmentos de íons³⁰.

Embora equipamentos híbridos como o (LC-(Q)ToF-MS) possam ser uma boa alternativa para a determinação de massas exatas, sua aplicação ainda é pouco relatada na literatura²⁶, principalmente na determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes biológicas, como observado no pequeno número de referências publicadas^{19, 20, 26}.

A utilização de LC-MS-MS para análise de substâncias tóxicas em alimentos foi avaliada por Núñez et al.⁴³. Os autores selecionaram os trabalhos de maior relevância entre os anos 2000 e 2005 e em nenhum deles foi relatada a utilização do (LC-(Q)ToF-MS) para determinação de agrotóxicos. Todas as substâncias citadas

pelos autores foram determinadas utilizando analisadores de massas dos tipos triplo quadrupolo e íon trap, específicos para a quantificação de resíduos nas amostras.

A grande complexidade das matrizes biológicas e a presença das substâncias de interesse em baixas concentrações requerem a utilização de técnicas de extração e/ou pré-concentração para que a determinação dos componentes se torne possível. O objetivo final é a obtenção de uma sub-fração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, com o intuito de se obter uma separação cromatográfica livre de interferentes⁴⁴.

Atualmente, a extração em fase sólida (SPE) é uma das melhores e mais empregadas ferramentas para a extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas⁴⁴.

A extração de piretrinas e piretróides, compostos não polares e não sistêmicos em plantas, é mais simples do que a extração de outros pesticidas, como organofosforados e carbamatos. O solvente e o método utilizado dependerão da natureza da matriz analisada¹⁴.

Segundo Chen e Wang¹⁴, amostras de tecido animal que possuem elevado teor de lípidos são homogeneizadas com uma mistura binária de acetona-hexano ou dietil éter na presença de sulfato de sódio anidro, proporcionando a extração de piretróides, além de uma grande variedade de outros compostos lipofílicos.

A determinação de deltametrina em fígado, rins e cérebro por Kim et al.²⁸, foi realizada após homogeneização dos tecidos na presença de acetonitrila em água destilada. Uma alíquota do homogenado foi injetada diretamente na coluna

eliminando a etapa de evaporação permitindo a análise de várias amostras no mesmo dia.

Considerações finais

O uso de inseticidas é indispensável para o aumento da produtividade na agricultura, sendo também utilizados na pecuária, em programas de saúde pública e como domissanitários. Os piretróides são, atualmente, os inseticidas mais utilizados por apresentarem baixa toxicidade aguda em mamíferos e a não persistência no ambiente. No entanto, apesar das vantagens apresentadas pelos piretróides em relação a outros inseticidas, os mesmos cuidados devem ser tomados para sua utilização, já que podem exercer nos vertebrados efeitos neuro e cardiotoxicos.

A ANVISA tem monitorado os teores de agrotóxicos em alguns tipos de alimentos, já que a dieta é considerada a principal fonte de exposição dos piretróides pela população.

Neste contexto, diferentes técnicas cromatográficas têm sido utilizadas para a determinação e quantificação de resíduos de piretróides em várias matrizes, sendo que a cromatografia a gás ainda é a técnica mais utilizada. Embora não existam sistemas específicos de detecção para piretróides, as moléculas halogenadas são sensíveis ao detector por captura de elétrons.

SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Pyrethroids – A review. Alim. Nutr., Araraquara.

ABSTRACT: Along of many years, the insecticides have been used in the control and combat of agricultural insects, supplying food to a rapid growth population. The pyrethroids appeared as an alternative of the higher toxicity insecticides for the mammalian and environment. Thus, the pyrethroids are used for indoor pest control as well as in public health programmes, which can increase the population exposure of the adverse effects of the pyrethroids. Considering the pyrethroids are the most used insecticide in the world, this review focus the main aspects and advantages of the use of pyrethroids in the general control of insects, the risks of nontarget organisms exposition and the determination of pyrethroids residues on different samples.

KEYWORDS: Pyrethroids insecticides use advantages, adverse effects, residues, chromatography.

Referências bibliográficas

1 ABDEL-KHALIK, M. N.; HANAFY, M. S. M.; ABDELAZIZ, M. I. Studies on the teratogenic effects of deltamethrin in rats. Dtsch Tierarztl Wochenschr, v.100, n.4, p.142-143, 1993.

2 ABEAS – Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior, Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitopatologia. Proteção de Plantas, Modulo 4 – Controle de pragas agrícolas. 2003.

3 ANADON, A. et al. Toxicokinetics of lambda-cyhalothrin in rats. Toxicol Lett., v.165, n.1, p.47-56, 2006.

4 ANGIONI, A. et al. Residues and half-life times of pyrethrins on peaches after field treatments. J. Agric. Food. Chem., v.53, n.10, p.4059-4063, 2005.

5 ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/> . Acesso em: 03 fev. 2007; 25 jan. 2008

6 BAKER, P. G; BOTTOMLEY, P. Determination of residues of synthetic pyrethroids in fruit and vegetables by gas-liquid and high-performance liquid chromatography. Analyst., v.107, n.1271, p.206-212, 1982.

7 BALSER, J. R. Structure and function of the cardiac sodium channels. Cardiovasc. Res., v.42, p.327-338, 1999.

8 BISSACOT, D. Z; VASSILIEFF, I. HPLC determination of flumethrin, deltamethrin, cypermethrin and cyhalothrin residues in the milk and blood of lactating dairy cows. J. Anal. Toxicol., v.21, n.5, p.397-402, 1997.

9 BLOOMQUIST, J. R. Insecticides: Chemistries and Characteristics. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>. Acessado em 05/fev/2007.

10 BONNE, D. et al. Mass Spectrometry-Mass Spectrometry. Disponível em <http://www.cpe.fr/ciufolini/msms.htm#intro>. Acessado em 28/jul/2006.

- 11 BOTTOMLEY, P; BAKER, P. G. Multi-residue of organochlorine, organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in grain by gas-liquid and high-performance liquid chromatography. *Analyst.*, v.109, n.1, p.85-90.1984.
- 12 CABRAS, P. et al. Pesticide residues in lettuce. 1. Influence of the cultivar. *J. Agric. Food Chem.*, v.36, p.92-95. 1988.
- 13 CANTALAMESSA, F. Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin, and cypermethrin in neonatal and adult rats. *Arch. Toxicol.*, v.67, p.510-513. 1993.
- 14 CHEN, Z.; WANG. Y. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. *J. Chromatogr. A.*, v.754, p.367-395. 1996.
- 15 CRAWFORD, M. J.; CROUCHER, A; HUTSON, D. H. Metabolism of cis- and trans- cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. *J. Agric. Food Chem.*, v.29, n.1, p.130-135. 1981.
- 16 DE LA CERDA, E.; NAVARRO-POLANCO R. A; SÁNCHEZ-CHAPULA, J. A. Modulation of cardiac action potential and underlying ionic currents by the pyrethroid insecticide deltamethrin. *Arch. Med. Res.*, v.33, p.448-454. 2002.
- 17 DEJONCKHEERE, W. et al. Permethrin and deltamethrin residues on lettuce. *Pestic. Sci.*, v.13, p.351-356. 1982.
- 18 DING, Y. et al. Determination of deltamethrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid in male rat plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, v.810, p.221-227. 2004.

19 FERRER, I.; GARCÍA-REYES J. F.; FERNANDEZ-ALBA, A. Identification and quantitation of pesticides in vegetables by liquid chromatography time-of flight mass spectrometry. *Trends Analyt. Chem.*, v 24, n.7, p.671-682. 2005.

20 FERRER, I.; THURMAN, E. M. Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants. *Trends Analyt. Chem.*, v.22, n.10, p.750-756. 2003.

21 GALLI, A. et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. *Quim. Nova*; v.29, n.1, p.105-112. 2006.

22 GARRIDO FRENICH, A. et al. Determination of multiclass pesticides in food commodities by pressurized liquid extraction using GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Anal Bioanal. Chem.*, v.383, p.1106-1118. 2005.

23 GRISOLIA, C. K. *Agrotóxicos – Mutações, Câncer e Reprodução*. Brasília: Editora Universidade de Brasília; 2005. 392p.

24 HAYES, W. J. Pesticides derived from plants and other organisms. Hayes WJ (ed) In: *Pesticides studied in man*. Baltimore: Williamson and Williamson, 1982. p.75-111.

25 HEUDORF, U., ANGERER, J. Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. *Environ Health Perspect.*, v.109, n.3, p.213-217. 2001.

26 IBÁÑEZ, M. et al.. Use of liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry in the elucidation of transformation products and metabolites of pesticides. Diazinon as a case study. *Anal. Bioanal. Chem.*, v.384, p.448-457. 2006.

- 27 INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Nota considerações sobre o tema Imrs de agrotóxicos no mercosul. http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pdf/atas/coord_nacionais/AnexoX.pdf. Acessado em 25/jan/2008.
- 28 IPCS. International Programme on Chemical Safety - inchem. <http://www.inchem.org> . Acessado em 16/mar/2002.
- 29 KIM, K. B. et al. Rapid determination of the synthetic pyrethroid insecticide, deltamethrin, in rat plasma and tissues by HPLC. J. Chromatogr. B, v.835, p.141-148. 2006.
- 30 LACORTE, S.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. Mass Spectrom. Rev. 2006. Disponível em http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/112649740/main.html.ftx_abs. Acessado em 12/set/2006.
- 31 LASKOWSKI, D. A. Physical and chemical properties of pyrethroids. Rev Environ Contam. Toxicol., v.174, p.49-170. 2002.
- 32 LATUSZYNSKA, J. et al. Neurotoxic effect of dermally applied chlorpyrifos and cypermethrin. Reversibility of changes. Ann. Agric. Environ. Med., v.10, p.197-201. 2003.
- 33 LEÓN-GONZÁLEZ, M. E. et al. Rapid análisis of pyrethroids in whole urine by high-performance liquid chromatography using a monolithic column and off-line preconcentration in a restricted access material cartridge. Anal. Bioanal. Chem., v.382, p.527-531. 2005.

34 LÓPEZ-LÓPEZ, T. et al. Determination of pyrethroids in vegetables by HPLC using continuous on-line post-elution photoirradiation with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta.*, v.447, p.101-111. 2001.

35 LU, F. C. A review of the acceptable daily intakes of pesticides assessed by WHO. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v.21, n.3, p.352-364. 1995.

36 LUDOMIRSKY, A. et al. Q-T prolongation and polymorphous (“torsade de pointes”) ventricular arrhythmias associated with organophosphorus insecticide poisoning. *Am. J. Cardiol.*, v.49, p.1654-1658. 1982.

37 MANNA, S. et al. Neuropharmacological effects of deltamethrin in rats. *J. Vet. Sci.*, v.7, n.2, p.133-136. 2004.

38 Matéria do Informativo Meio Ambiente e Agricultura - EMBRAPA-ano XIV nº 54 set/out 2005. Disponível em: http://www.cnpma.embrapa.br/informativo/mostra_informativo.php3?id=359. Acessado em 03/fev/2007.

39 MELLO-DA-SILVA, C. A.; FRUCHTENGARTEN, L. Riscos químicos ambientais à saúde da criança. *J. Pediatr.*, v.81, n.5 (supl), p.S205-S211. 2005.

40 MUSZKAT, L.; AHARONSON, N. In: ZWEIG G, SHERMA J. (editors) *Analytical methods for pesticides and plant growth regulators*. New York: Academic Press; 1986. 96p.

41 NARAHASHI, T. Neuronal ion channel as the target sites of insecticides. *Pharmacol. Toxicol.*, v.79, n.1, p.1-14. 1996.

42 NASUTI, C. CANTALAMESSA F, FALCIONI G, GABBIANELLI R. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. *Toxicology*, v.191, n.2-3, p.233-244. 2003.

43 NÚÑEZ, O., MOYANO, E., GALCERAN MT. LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. *Trends Analyt. Chem.*, v.24, n.7, p.683-703. 2005.

44 QUEIROZ, S. C. N., COLLINS, C. H, JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim. Nova*, v.24, n.1, p.68-76. 2001.

45 RIPLEY, B. D. et al. Pyrethroid insecticide residues on vegetable crops. *Pest. Manag. Sci.*, v.57, n.8, p.683-687. 2001.

46 ROCHA, D. C. C. Ambiente em Foco. Disponível em: <http://www.ambienteemfoco.com.br/?cat=45>. Acessado em 04/ fev/ 2007.

47 SANCES, F. V, TOSCANO, N. C, GASTON, L. K. Minimization of pesticide residue on head lettuce: within-head residuedistribution of selected insecticides. *J. Econ. Entomol.*, v.85, p.203-207. 1992.

48 SCHETTGEN, T. et al. Pyrethroid exposure of the general population – is this due to diet? *Toxicol. Lett.*, v.134, p.141-145. 2002.

49 SHEETS, L. P. et al. Age-dependent differences in the susceptibility of rats to deltamethrin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.126, p.186-190. 1994.

50 SHUKLA, Y.; ARORA, A. SINGH, A. Tumourigenic studies on deltamethrin in Swiss albino mice. *Toxicology*, v.163, n.1, p.1-9. 2001.

- 51 SHUKLA, Y.; TANEJA, P. Mutagenic evaluation of deltamethrin using rodent dominant lethal assay. *Mutat. Res.*, v.467, n.2, p.119-127. 2000.
- 52 SODERLUND, D. M. et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, v.171, n.1, p.3-59. 2002.
- 53 SPENCER, C. L. et al. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.298, n.3, p.1067-1082. 2001.
- 54 STALEY, K. J. Wrong-Way Chloride Transport: Is It a Treatable Cause of Some Intractable Seizures? *Epilepsy Curr.*, v.6, n.4, p.124–127. 2006.
- 55 SUCEN - Superintendência de controle de endemias. Disponível em <http://www.sucen.sp.gov.br/docstec/seguranca/cap12cla.pdf>. Acessado em 04/fev/2007.
- 56 VALENTINE, W. M. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.20, n.2, p.375-382. 1990.
- 57 VERSCHOYLE, R. D, ALDRIDGE, W. N. Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Arch. Toxicol.*, v.45, p.325-329. 1980.
- 58 VIRAN, R. et al. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol Environ Saf.*, v.55, p.82-85. 2003.
- 59 WOOLLEN, B. H. et al. The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica*, v.22, n.88, p.983-991. 1992.

CAPÍTULO 2

Ação cardiotóxica de piretróides em ratos Wistar recém desmamados sob exposição aguda

M. A. T. SANTOS, F. G. R. REYES, M. A. AREAS

Resumo

Os piretróides são inseticidas comprovadamente neurotóxicos e, como nos insetos, agem nos vertebrados nos canais de sódio neural, interferindo na sua abertura e fechamento e prolongando o tempo de entrada dos íons Na^+ para o interior da célula. Assim como no sistema nervoso, os miócitos cardíacos possuem canais de sódio cuja função é central na origem de arritmias cardíacas. Existe uma grande dependência da idade do indivíduo em relação à toxicidade aguda de um composto e, pouca informação tem sido encontrada sobre a cardiotoxicidade de piretróides em indivíduos jovens. Este trabalho investigou a menor dose de deltametrina e permetrina administrada a animais recém desmamados onde os menores efeitos cardiotóxicos pudessem ser observados, objetivando, assim, a escolha da dose experimental a ser usada em ensaios subcrônicos. Para tanto, diferentes doses (1/2, 1/5 e 1/10 DL50) de permetrina e deltametrina foram administradas, via oral, a ratos Wistar recém desmamados, em dose única. Após a execução dos eletrocardiogramas verificou-se que a dose de 1/10 DL50 foi a que menos alterou os parâmetros eletrocardiográficos avaliados, sendo assim, a melhor escolha para o desenvolvimento de trabalhos futuros de toxicidade subcrônica.

Abstract

Pyrethroids insecticides are neurotoxins. In mammals and insects they interact with the sodium ions transportation system through the cellular membrane. Cardiac myocytes are also rich in sodium channels where the function is important to the origin of cardiac arrhythmias. There is a large age dependence to the acute toxicity of pyrethroids and researches into its interactions with cardiotoxicity has been almost entirely lacking. This study examined the lower dose of permethrin and deltamethrin administered to neonatal rats where the lower effects in heart could be observed. For this, different doses (1/2, 1/5 e 1/10 LD50) of permethrin and deltamethrin were administered, by gavage, for neonatal Wistar rats, in simple dose. The ECG showed that 1/10 LD50 dose changed a little the electrocardiographic parameters and can be selected for use in future sub chronic toxicity studies.

Introdução

Os piretróides são conhecidos pela sua alta capacidade inseticida enquanto sua toxicidade aguda para mamíferos é considerada baixa (Tos-Luty et al., 2001). No entanto, em altas doses, os piretróides são comprovadamente neurotóxicos, sendo que de maneira semelhante aos insetos, agem nos axônios do sistema nervoso central (SNC) e periférico de mamíferos interferindo no transporte de íons Na^+ através da membrana celular (Verschoyle e Aldridge, 1980; Valentine, 1990; Narahashi, 1996). Cabe mencionar que, assim como o tecido nervoso, os miócitos cardíacos possuem canais de sódio (Spencer et al., 2001), proteínas responsáveis pelo rápido curso ascendente do potencial de ação e rápida propagação do impulso

nervoso através do tecido cardíaco. Assim, sua função é central na origem de arritmias cardíacas (Shukla, 2000). Algumas das mais freqüentes manifestações cardiovasculares ocorridas durante intoxicações por agrotóxicos são as variações eletrocardiográficas tais como o prolongamento do intervalo Q-T e arritmias cardíacas do tipo *Torsade de Pointes* (TdP) (Ludomirsky, 1982). Estes efeitos podem ser explicados pelo aumento da duração do potencial de ação induzido pelos inseticidas (De la Cerda, 2002).

A deltametrina é considerada o piretróide mais tóxico para vertebrados e seu efeito no SNC depende da rota e do veículo de administração (Pham et al., 1984). Quando administrada através de um veículo não aquoso, a toxicidade oral aguda da deltametrina varia de alta a moderada com valores de DL50 de 19-34 mg/kg/pc em camundongos e 31-139 mg/kg/pc em ratos. Entretanto, em água, a deltametrina é muito menos tóxica apresentando valores de DL50 que excedem 5000 mg/kg/pc em ratos.

Além do veículo de administração, a DL50 da permetrina varia segundo a razão isomérica *cis:trans*. De modo geral, os isômeros *cis* são mais tóxicos e apolares e influenciam no aumento da toxicidade de ambos os isômeros. Assim, quando a mistura racêmica da permetrina é administrada com óleo de milho sua DL50 oral para ratos machos é de 430 mg/kg/pc e para as fêmeas é de 470 mg/kg/pc (IPCS, 1990).

Sinais de intoxicação aguda por permetrina aparecem após 2 horas da administração da substância e incluem tremores (síndrome T), descordenação,

hiperatividade, prostração e paralisia (Verschoyle e Aldridge, 1980; IPCS, 1990; Narahashi, 1996).

Os sinais clínicos de envenenamento por deltametrina incluem salivação, convulsões, hipersensibilidade, tremores que podem progredir à coreatetose, paralisia e morte (Verschoyle e Aldridge, 1980; IPCS, 1990; Cantalamessa, 1993; Narahashi, 1996).

Pouca informação tem sido disponibilizada na literatura sobre os efeitos toxicológicos dos piretróides em animais jovens (Eriksson e Nordberg, 1990; Cantalamessa, 1993; Husain et al., 1994; Sheets et al., 1994). Os piretróides podem ser transferidos de mãe para filhos através do leite (Kavlock et al., 1979) e assim, promover efeitos neurotóxicos se ingeridos em concentrações suficientes (Eriksson e Nordberg, 1990). Além disso, muitos compostos tóxicos podem, facilmente, atravessar a membrana placentária expondo e comprometendo o desenvolvimento fetal (Mello-da-Silva e Fruchtengarten, 2005).

Segundo Cantalamessa (1993), ratos recém nascidos são mais sensíveis a toxicidade dos piretróides, provavelmente devido ao desenvolvimento incompleto do sistema enzimático responsável pelas reações de biotransformação dos piretróides no fígado.

Para avaliar a toxicidade aguda e fornecer uma base para o estabelecimento de uma dose para estudos de toxicidade subcrônica da permetrina e deltametrina sobre a função eletrocardiográfica, realizou-se um experimento de toxicidade aguda com dose simples. A execução do ensaio agudo permite a avaliação estimativa e

preliminar das propriedades tóxicas da substância teste, fornecendo informações acerca dos riscos para a saúde resultantes de uma exposição de curta duração.

Neste contexto, este estudo foi conduzido com o objetivo de investigar a menor dose de deltametrina e permetrina administrada a animais recém desmamados onde o dano sobre a função elétrica do coração pudesse, ainda, ser observado.

Metodologia

Ensaio biológico

Setenta ratos Wistar machos, recém desmamados (21 dias), provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) foram alojados em gaiolas individuais no biotério da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Os procedimentos foram autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (Protocolo 721-2). Os animais receberam dieta comercial Labina e a água *ad libitum* durante o período de adaptação (sete dias), permanecendo em jejum na noite anterior ao dia do experimento. Os animais foram divididos em sete grupos segundo seus pesos médios: a) grupo controle; b) 1/2 DL50 (235,5 mg/kg) de permetrina; c) 1/5 DL50 (94,2 mg/kg) de permetrina; d) 1/10 (47,1 mg/kg) DL50 de permetrina; e) 1/2 DL50 (5,5 mg/kg) de deltametrina; f) 1/5 DL50 (2,2 mg/kg) de deltametrina; g) 1/10 DL50 (1,1 mg/kg) de deltametrina. Os piretróides foram dissolvidas em óleo de milho e administradas oralmente (5 mL/kg), em dose única. Os ratos do grupo controle receberam óleo de milho nas mesmas condições correspondentes aos grupos

experimentais. Os valores da DL50 para ratos de 21 dias foram baseados nos estudos realizados por Cantalamessa (1993) e Sheets et al. (1994).

Perfil eletrocardiográfico

O eletrocardiograma é a técnica mais utilizada para auxiliar no diagnóstico de doenças cardíacas. É simples, segura, reprodutiva e muito usada devido o seu baixo custo. É de extrema importância no diagnóstico, não invasivo, de arritmias, distúrbios de condução e isquemias coronárias (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2003).

Para a avaliação do perfil eletrocardiográfico, os ratos foram anestesiados com barbiturato de sódio ($0,05 \text{ mg g}^{-1}$) injetado intraperitonealmente e colocados em posição supino. O eletrocardiograma (ECG) foi realizado com fixação subcutânea de eletrodos em equipamento computadorizado (Heart Ware Systems) considerando-se as seis derivações periféricas.

Inseticidas utilizados

A permetrina e a deltametrina foram selecionados pela grande utilização e por representarem grupos distintos de piretróides classificados como Tipo I e Tipo II, respectivamente. A deltametrina [(S)-ciano-3-fenoxibenzil (1R)-cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato] (pureza: 90,2%) foi gentilmente cedida pela Bayer CropScience e a permetrina [3- fenoxibenzil (1RS)-cis, trans-3-(2,2-diclorovinil) 2,2-dimetilciclopropanocarboxilato] (pureza: 97,44%) foi sintetizada pela FMC Agricultural Products.

Resultados e discussão

Durante os ensaios agudos, a administração de 1/2 DL50 de permetrina levou a óbito 60% dos animais, enquanto a mesma dose de deltametrina foi responsável pela morte de 50% dos ratos experimentais. Foi possível observar sintomas de neurotoxicidade em ambos os grupos, sendo que os animais expostos a permetrina apresentaram sensibilidade aos estímulos externos, hiperatividade, tremores e movimentos descoordenados dos membros inferiores. Com exceção da hipersensibilidade, que foi observada em animais com intoxicação por piretróides tipo II, o comportamento dos animais expostos a permetrina foi também observado por Verhoye e Aldridge (1980) e Narahashi (1996). Os animais que ingeriram deltametrina apresentaram tremores, salivação profusa, convulsões e apatia, corroborando com as informações encontradas no IPCS (1990) e Narahashi (1996).

Os parâmetros analisados pelo ECG foram: intervalo PR, definido como o tempo de despolarização do átrio (intervalo entre o ápice da onda P e onda Q – início do complexo QRS); duração do complexo QRS, definido como o tempo de despolarização ventricular; intervalo QT, definido como a sístole elétrica ventricular e QTc, intervalo QT corrigido pela frequência cardíaca, segundo a equação de Bazett: $QTc = QT(s)/RR(s) \leq 1/2$.

Os resultados expostos na tabela 1 revelam que a administração de permetrina e deltametrina promove distúrbios elétricos cardíacos nos animais experimentais, provavelmente devido ao efeito inibitório nos canais de sódio.

Os animais tratados com as diferentes doses de piretróides (1/2, 1/5 e 1/10 DL50) não apresentaram diferenças significativas em relação aos valores da

frequência cardíaca (FC), mas mostraram-se com a FC, significativamente, diminuídas em relação ao grupo controle (cronotropismo negativo).

Tabela 1: Parâmetros eletrocardiográficos em ratos Wistar recém desmamados expostos a 1/10 DL50 de permetrina e deltametrina, expressos pela frequência cardíaca (FC), intervalo PR, duração do complexo QRS e intervalos QT e QTc.

Grupos	FC (bpm)	PR (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	QTc (ms)
C	365,3 ± 30,4 a	46,0 ± 5,8 a	19,6 ± 2,6 a	42,2 ± 6,3 a	40,3 ± 4,6 a
D1/2	224,4 ± 39,5 b	60,5 ± 6,6 b	34,7 ± 4,4 b	57,0 ± 8,0 b	54,2 ± 6,8 b
D1/5	282,5 ± 25,7 b	59,3 ± 4,8 b	31,1 ± 6,4 b	54,8 ± 7,0 b	43,2 ± 6,1 a
D1/10	284,4 ± 46,7 b	51,1 ± 9,3 a	28,6 ± 4,8 a	47,5 ± 4,8 a	41,6 ± 4,4 a
P1/2	244,4 ± 39,9 b	65,8 ± 8,0 b	30,5 ± 8,0 b	64,5 ± 6,5 b	53,2 ± 8,5 b
P1/5	253,3 ± 53,0 b	65,0 ± 7,4 b	32,0 ± 9,0 b	52,8 ± 9,3 a	40,3 ± 8,1 a
P1/10	289,6 ± 61,2 b	59,3 ± 7,3 b	27,8 ± 8,7 a	50,2 ± 9,2 a	36,6 ± 7,3 a

*Valores expressos em média ± desvio padrão

**Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O prolongamento do intervalo PR foi observado em todos os grupos experimentais com exceção de 1/10 DL50 de deltametrina, que apresentou resultado semelhante ao encontrado no grupo controle. A diminuição da condução dos estímulos elétricos do átrio para o ventrículo é responsável pelo dromotropismo negativo (aumento do intervalo PR). Em geral, o intervalo PR diminui com o aumento da frequência cardíaca e aumenta com a sua queda (Guyton and Hall, 2002).

O ECG também identificou prolongamento do complexo QRS após a administração de 1/5 e 1/10 DL50 de ambos os piretróides, sugerindo retardo na condução do impulso conseqüente a alterações na despolarização e repolarização ventricular. Além disso, observou-se prolongamento significativo do intervalo QT nos ECGs dos animais submetidos a 1/2 DL50 e 1/5 DL50 de deltametrina e 1/2 DL50 de permetrina. Já o intervalo QT corrigido pela FC apresentou prolongamento significativo apenas após a ingestão de 1/2 DL50. Os intervalos QT e QTc são responsáveis pela representação de todos os fenômenos elétricos ventriculares e seus prolongamentos sugerem risco de morte súbita.

Por fim, foi possível observar uma forte tendência dos valores relatados à dose de 1/10 DL50 a apresentarem-se mais próximos daqueles encontrados nos animais controle, ainda que não se caracterize uma condição de dose-resposta.

Conclusão

Os resultados revelaram que a ingestão da menor dose testada de permetrina e deltametrina, correspondente a 1/10 DL50, foi a que menos alterou os parâmetros eletrocardiográficos e, portanto, é a melhor escolha para a condução de ensaios subcrônicos.

Referências bibliografia

Cantalamessa, F. Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin, and cypermethrin in neonatal and adult rats. Arch. Toxicol 1993; 67: 510-513.

De La Cerda, E.; Navarro-Polanco R. A; Sánchez-Chapula, J. A. Modulation of cardiac action potential and underlying ionic currents by the pyrethroid insecticide deltamethrin. Arch. Med. Res., v.33, p.448-454. 2002.

Eriksson P., Nordberg A. 1990. Effects of two pyrethroids, bioallethrin and deltamethrin, on subpopulations of muscarinic and nicotinic receptors in the neonatal mouse brain. Toxicology and Applied Pharmacology 102, 456-463.

Husain R., Malaviya M., Seth P.K., Husain R. Effect of deltamethrin on regional brain polyamines and behaviour in young rats. Pharmacology and Toxicology 1994; 74, 211-215.

IPCS. International Programme on Chemical Safety - inchem. <http://www.inchem.org>
Acessado em 28/nov/2007.

Kavlock R., Chernoff N., Baron R., Linder R., Rogers E., Carver B. 1979. Toxicity studies with decamethrin, a synthetic pyrethroid insecticide. Journal of environmental pathology and toxicology 2, 751-765.

Ludomirsky A. et al. Q-T prolongation and polymorphous (“torsade de pointes”) ventricular arrhythmias associated with organophosphorus insecticide poisoning. *Am. J. Cardiol* 1982; 49: 1654-1658.

Mello-da-Silva CA, Fruchtengarten L. Riscos químicos ambientais à saúde da criança. *J. Pediatr* 2005, 81 (5 supl): S205-S211.

Narahashi, T. Neuronal ion channel as the target sites of insecticides. *Pharmacol. Toxicol* 1996; 79 (1): 1-14.

Pham HC, Navarro-Delmas C, Pham HC, Clavel P, van Haverbeke G, Cheav SL. Toxicological studies of deltamethrin. *Int J Tissue React* 1984;6(2):127-33.

Spencer, C. L. et al. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 2001; 298 (3): 1067-1082.

Sheets LP, Doherty JD, Law MW, Reiter LW, Crofton KM. Age-dependent differences in the susceptibility of rats to deltamethrin. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1994; 126: 186-190.

Shukla Y; Taneja P. Mutagenic evaluation of deltamethrin using rodent dominant lethal assay. *Mutat. Res* 2000, 467 (2):119-127.

Toś-Luty S, Haratym-Maj A, Latuszyńska J, Obuchowska-Przebirowska D, Tokarska-Rodak M. Oral toxicity of deltamethrin and fenvalerate in Swiss mice. *Ann Agric Environ Med* 2001;8(2):245-54.

Valentine, W. M. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract* 1990; 20 (2): 375-382.

Verschoye, R. D, Aldridge, W. N. Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Arch. Toxicol* 1980; 45: 325-329.

CAPÍTULO 3

Protective effect of some dietary fibers on permethrin and deltamethrin cardiotoxic action

M. A. T. SANTOS^{*}, M. A. AREAS^{}, F. G. R. REYES^{*}**

Abstract

Pyrethroids insecticides act mainly on the neuronal sodium channels, inducing persistent and steady-state sodium current at depolarized membrane potential. Cardiac myocytes are also rich in sodium channels and cardiovascular manifestations can accompany pyrethroids exposure, which may be serious and fatal. On the other hand, dietary fibers may promote protective effects against diseases by reducing the gastrointestinal absorption of toxic substances. In this work, the effects of pectin and cellulose on deltamethrin and permethrin cardiac action were studied in Wistar rats considering electrocardiographic parameters. The results showed that the permethrin and deltamethrin are cardiotoxic, probably because of inhibitory effect on sodium channel. Pectin protected the heart from the toxic effects caused by these insecticides, reducing the risk of sudden death.

Keywords: pyrethroids, dietary fiber, electrocardiogram, rats.

Introduction

Pyrethroids are known to be neurotoxins that act slowing the closing of the sodium channels of neurons resulting in repetitive discharges or a longer depolarization after each action potential, depending of the pyrethroid type (Valentine, 1990; Shafer et al., 2005). It has been well established that the sodium channel of the nerve membrane is the major target site of both type I and II pyrethroids (De la Cerda et al., 2002). Besides the neuronal tissue, there is also a specific cardiac sodium channel isoform, which exhibits distinct voltage-dependent kinetic properties and pharmacology (Balsler, 1999).

Sodium channels are cardiac transmembrane proteins responsible for the rapid upstroke of the cardiac potential, and the rapid impulse conduction through cardiac tissue (Balsler, 1999). As the cardiac myocytes are rich in sodium channels, the pyrethroids insecticides can lead toxic cardiovascular effects in exposed animals.

Some of the most frequent cardiovascular manifestations during pesticide toxicity are electrocardiographic changes, prolongation of Q-T interval (long Q-T acquired syndrome) and cardiac arrhythmia of torsade-de-pointes type (Ludomirsky et al., 1982) that could be explained by increase of action potential duration induced by insecticides (De la Cerda et al., 2002). Type I pyrethroid tefluthrin and the type II pyrethroids fenpropathrin and α -cypermethrin prolonged action potentials and evoked afterdepolarizations in ventricular myocytes of isolated perfused rat hearts. The time course of sodium current was also prolonged by the insecticides (Spencer et al., 2001).

According to De la Cerda et al. (2002), type II pyrethroid deltamethrin significantly increased ventricular action potential in cardiac sodium channel similar to those induced by pyrethroids on sodium channel of nerve membrane.

In addition, little information is available regarding toxicological and physiological effects of pyrethroids in young experimental animals (Eriksson and Nordberg, 1990; Cantalamessa, 1993; Husain et al., 1994; Sheets et al., 1994). Although pyrethroids possess low acute toxicity and are rapidly metabolized in mammals, they might be transferred from mother to offspring via the milk (Kavlock et al., 1979). In this case, these compounds may cause neurotoxic adverse effects if they reach the nervous system in enough concentration (Eriksson and Nordberg, 1990). Many compounds may cross the placenta easily resulting in exposition risks of chemical agents during the fetal development (Mello-da-Silva and Fruchtengarten, 2005).

According to Cantalamessa (1993), neonatal rats are more sensitive to pyrethroid toxicity, maybe because of the incomplete development of the enzymes, which catalyze the pyrethroids biotransformation in the liver. The neonatal exposition of pyrethroids changes the affinity of nicotinic receptors in the brain altering, therefore, the activity of the neurotransmitters. Lactation's mice exposed to the pyrethroids insecticides remained in adults the changes observed in cholinergic receptors.

The exposition of pyrethroids by the general population happens mainly via residues in the diet (Heudorf and Angerer, 2001; Schettgen et al, 2002). There is a concern that the widespread use of pyrethroids increases the risk of them entering the food chain by contaminated food (Akre and MacNeil, 2006).

On the other hand, dietary fibers may bind to various substances such as naturally compounds or toxins and contaminants present in foods and in the environment (Omaye et al., 1983; Ta et al., 1999; Hermansen et al., 2003; Adachi et al., 2003; Kimura et al., 2004). Apparently, the contaminants are adsorbed onto the dietary fiber and to bacteria, which increase in density when some forms of fiber are added to the diet, and this increases fecal elimination (Kimura et al., 2004).

According to Kimura et al. (2002), dietary supplementation with different sources of fibers (cellulose, lactosucrose, polydextrose, indigestible dextrin, inulin) increased fecal excretion of mirex pesticide and methylmercury. Still, the use of various types of fiber did not decrease accumulation of polychlorinated biphenyls (Arochlor 1254) in mice but suggest that combinations of soluble and insoluble fiber can promote it excretion (Kimura et al., 2004).

Consequently, due to the fact that pyrethroids insecticides are widely used in agriculture, as an ectoparasiticide in animals, inside the houses and in public health programs, the population is susceptible for the intoxication effects caused by the chronic exposition of pyrethroids (Valentine, 1990, Manna et al., 2006).

Dietary fiber has showed protective effects against a range of chronic diseases including coronary heart disease, a major cardiovascular disease and serious health problem (Hermansen et al., 2003).

In this context, the objective of the present study was to investigate the effects of pectin and cellulose on cardiac effects of pyrethroids type I, permethrin, and type II, deltamethrin, in weanling rats.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Standard deltamethrin [(S)-ciano-3-fenoxibenzil (1R)-cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato] (purity, 90.2%), provided by Bayer CropScience and permethrin [3-fenoxibenzil (1RS)-cis, trans-3-(2,2-diclorovinil) 2,2-dimetilciclopropanocarboxilato] (purity, 97.44%), purchased from FMC, were used in this study.

2.2 Fibers

Purified fiber sources were used in order to eliminate possible interference with other constituents that are present in whole fiber sources. Microcel (cellulose, type 3E-200) was kindly donated by Blanver Farmoquímica Ltda (Itapevi, SP, Brazil) and pectin was purchased from CP Kelco S.A. (Limeira, SP, Brazil).

2.3 Animals and treatment

Seven groups of 20 male Wistar rats, 4 weeks old, obtained from CEMIB-UNICAMP (Centro de Bioterismo - State University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil), were used. The protocol was approved by the UNICAMP Institutional Committee for Ethics in Animal Research (Protocol 721-2), which follows the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

These animals were housed in individual cages under conditions of controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), humidity (60-70%), and artificial lighting (12-h light/12 h dark, lights on at 7:00 a.m), with free access to commercial food (Labina, Purina®) and

water. They were randomly selected based on their body weight and maintained in adaptation period of 7 days before the beginning of the experiments.

The pyrethroids were suitably diluted with commercial corn oil and administered orally (5 mL) by gavage, as one single dose, daily for 30 days. The experimental groups received 47.1 mg/kg b.w./day of permethrin and 1.1 mg/kg b.w./day of deltamethrin corresponding to 1/10 of LD50 (Santos, 2008). For that, body mass of individual rat was recorded each two days and the insecticides solutions remade. The diet of fibers experimental groups were added by 5% of pectin or 5% of cellulose, as described below. In addition, the commercial diet has already 5% of cellulose in its formulation. All the seven treatments used in this work are described below:

Group I (control): corn oil + commercial diet

Group II: permethrin + commercial diet

Group III: deltamethrin + commercial diet

Group IV: permethrin + 5% pectin in the commercial diet

Group V: permethrin + 5% cellulose in the commercial diet

Group VI: deltamethrin + 5% pectin in the commercial diet

Group VII: deltamethrin + 5% cellulose in the commercial diet

2.4 Electrocardiograms

Electrocardiogram is the most used technique for helping cardiac diseases diagnostic. It is simple, safe, reproductive and very used because of its low cost. It's extremely important for non-invasive diagnosis of arrhythmias, conduction disturbance and coronary ischemias. (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2003).

After the experimental period, the animals were anesthetized with intraperitoneal injection of sodium barbital (50 mg/kg b.w) that does not produce significant cardiovascular effects in hypnotic doses. The animals were put down in the supine position and electrodes were placed subcutaneously using limb leads. Electrocardiograms were obtained using a computerized electrocardiographic system considering standard ECG derivation (I, II, III, aVR, aVL, aVF). The ECG registers were used to record the heart rate, the intensity and interval of the waves. ECG parameters were viewed, graded, and enumerated manually by one investigator and subsequently verified by a second. Investigators were blinded as to the exposure status of each rat until after the analyses were completed. Representative ECG recordings are shown in Figure 1.

2.5 Statistical analysis

All results were expressed by mean \pm standard deviation. Statistical significance was evaluated by ANOVA and Tukey *t* test using GRAPH PAD-Prisma-3.0. Differences were considered significant at $p < 0,05$.

3. Results

3.1 Heart rate

The pyrethroids decreased the heart beat rate and the cellulose in the diet did not contribute for the increase of heart rate (HR) to normal values (figure 2). The pectin was effective in the prevention of the negative chronotropism only in the group that

received permethrin. Even without significant difference, was possible to observe the tendency of the increase of the HR in deltamethrin group.

3.2 PR interval

The administration of pyrethroids to the experimental animals increased the PR interval (Figure 3) with consequent reduction of the rate of atrioventricular conduction of electrical impulse. The pectin did not interfere in reducing of the PR interval in the deltamethrin group. However, there was a tendency of the electrical impulse conduction shows values closer to the control group. On the other hand, the addition of pectin in the diet decreased the effect of permethrin in the PR interval, showing results similar to the control group. Cellulose in the diet did not prevent the increase in PR interval of the animals fed with pyrethroids.

3.3 QRS complex

There was a significant increase in the duration of QRS complex in all pyrethroids groups compared with the control group (figure 4). The pectin in the diet decreased, significantly, the duration of QRS complex only in permethrin group, but there was a tendency of deltamethrin shows values similar of those observed in control group. The cellulose did not prevent the heart against the increase of QRS complex.

3.4 QT and QTc intervals

The QT (figure 5) and QTc (figure 6) intervals were significantly larger in all the treated rats and the cellulose in the diet didn't reduce this prolongation.

On the other hand, the pectin decreased the prolongation of the intervals QT and QTc in the groups fed with permethrin and decreased the interval QTc in the animals fed with deltamethrin.

4. Discussion

Pyrethroids (i.e permethrin) are rapidly absorbed, distributed and excreted in mammalian species following oral administration. Mills and Mullane (1976) found in rats, approximately 80% of the administered permethrin in urine and faeces within 48 hours. Following administration permethrin orally the uptake into blood is rapid with a peak level observed at 1.5 to 10 hours after dosing. The half-life in blood following a single acute oral administration is approximately 7 hours (Bratt et al., 1977).

Pyrethroids are frequently used in agriculture, and their effects on the heart are not conclusive. In our study, there was no mortality recorded over the course of experimental period. Signs of hypersensitivity and tremors were observed during the early stages of the study due, probably, to the toxic effects on nervous system. We investigated the effect of permethrin and deltamethrin on the rat heart using electrocardiogram technique and observed apparent toxic effects on the cardiac electric properties.

Time intervals measured and analyzed in the ECG were PR interval, defined as the time of atrium despolarization (interval between the apex of the P wave and the Q wave - beginning of the QRS complex), QRS complex duration, defined as the time of ventricular despolarization, QT interval, defined as the time of ventricular despolarization and repolarization, including ventricular electric systole, and QTc

defined as the QT interval corrected for the heart rate by means of Bazett's equation:

$$QT_c = QT(s) / \sqrt{RR(s)} \leq 1/2.$$

The ECG registers of the rats change with the technique used for recording, anesthetic agent, position of the animal during the registration, characteristics of the amplifier, speed and amplitude of the register, as well as age, weight, sex and the way of animal containment.

The anatomical orientation of the rat heart is similar in the man. The right and left ventricles are in anterior and posterior position, respectively. Thus, the initial activation strength of the cardiac muscles moves from left to right. However, they have low amplitude and, depending of the heart position, they are responsible for the acute way of the Q wave. On the other hand, the activation vector of ventricle apex goes from right to left and from up to down, supported by the higher amplitude of the R wave in all derivations, which be negative in aVR. The last part of the rat heart to be activated is the base of left ventricle, represented by the invariable presence of one S wave, with low amplitude, in all derivations. The repolarization process of the ventricles is formed by two components. In contrast of the repolarization model of the human ventricle, the first component is very fast, and the top of the T wave is written during the first 50% of the total wave duration. In this way, the ST segment shows extremely short or lack, evidencing that ventricle repolarization begins even before the end of the despolarization.

The negative chronotropism (decrease of the heart beat or bradycardia) can be attributed by a slow electric atrio-ventricle conduction, probably because of the inhibitors effects on the sodium channels in the membrane of cardiac conduction

system cells or in the autonomic nervous system, therefore the sinoatrial node receives modulations of the simpatic and para simpatic systems, with direct consequences on the heart rate (Matthew, 1995). The reduction in the heart rate is consistent with prolongation of the total contraction time, and it is know that, when the heart rate decreases, the complete cardiac cycle is prolonged (Guyton and Hall, 1996). The decreased electric stimulus conduction from the atrium to ventricle is responsible of the negative dromotropism (increase of PR interval). In general, the PR interval decreases with the increase of the heart rate and the other way around.

These results are according to the study of Coskun et al. (2004). They observed that pyrethroids might cause alterations in the rhythmic characteristics of the heart by decreasing amplitude of the P wave and the QRS complex, and in the heart rate on electrocardiogram in cypermethrin-inhalated frogs, a type II pyrethroid.

The QRS complex and the QT interval prolongation may be explained by increase of action potential duration induced by insecticides (De la Cerda, 2002). Clinical and animal data support the hypothesis that acquired forms of long Q-T syndrome resulting from prolonged repolarization lead to early after depolarization and triggered arrhythmias (Surawicz, 1989). A prolonged QT interval has been associated with cardiac arrhythmia and sudden death in humans (Goldberg et al, 1991).

According to Ta et al. (1999), dietary fiber may bind to pesticides lowering the absorption of these substances from the gastrointestinal tract. The binding of pesticides to various purified fibre is determinate by the nature and the level of fibre.

In the present study, the presence of pectin in diet lowered the most of electrophysiological changes in the animals treated with the studied pyrethroids. The only exception was the heart rate, maybe because deltamethrin is the most toxic pyrethroid for vertebrates (Phan et al., 1984) and can difficult the total benefic action of the pectin. However, the results showed a great tendency of heart rate reaching the control values with the consumption of pectin by the rats. The gelling and viscosity properties of pectin may delay or decrease the digestion and absorption of diet lipids and/or increasing the bile acids fecal excretion (Topping, 1991; Schneeman, 1987) by decreasing of intestinal contents and motility or increasing the unstirred water layer, creating a physical barrier to nutrient absorption (reviewed by Anderson et al., 1990). As pyrethroids are hydrophobic substances and were solved in oil, the same mechanism may also be applied. This is in accordance with Chadwick et al. (1978), who reported that rats fed high pectin diets excreted significantly more lindane insecticide in feces than those fed a low-fibre diet. Unlike the pectin, 5% of cellulose in the diet had no capacity to avoid the cardiotoxic effects observed in the experimental rats. Different types of fiber are distinguished by their differing physiological properties and systemic effects (Anderson et al., 1990). According to the authors, insoluble fiber decreases intestinal transit time and increases fecal bulk altering the gastrointestinal function, but not lower serum cholesterol. As the liquid application with pyrethroids was in the form of emulsion consisting of corn oil, the cellulose could not avoid its absorption by the intestine.

5. Conclusion

In conclusion, the electrical activity of heart was affected by permethrin and deltamethrin, and was associated with negative chronotropism and dromotropism, prolonged QRS complex and QT and QTc intervals. In deltamethrin poisoning greater intensity of changes was observed in animals.

The effect of pectin in the protection capacity for permethrin and deltamethrin was significant in all heart electric changes. The toxicity of these insecticides in the electrical activity were little or not influenced by the ingestion of cellulose.

There is limited literature investigating the interactions between fibre and pesticides, thus, further studies should take into account the nature of digestive material in the gastrointestinal tract to understand the effects of pesticides in the body.

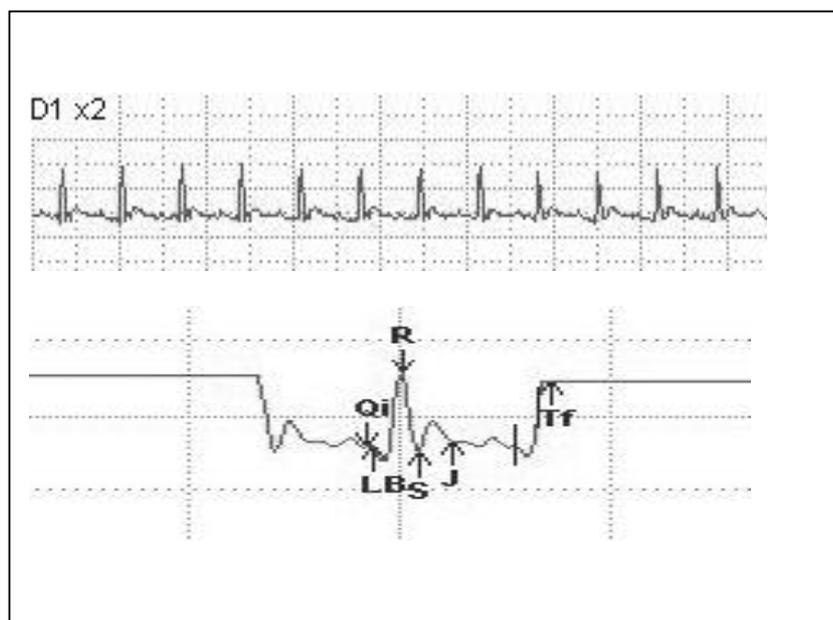


Figure 1. Representative ECG recording, D1 derivation of control group.

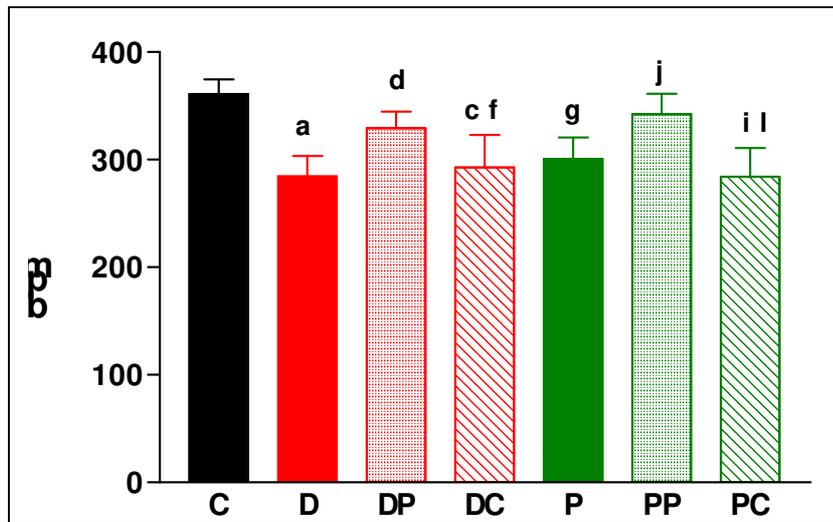


Figure 2. Heart rate of experimental groups. Values expressed by mean \pm sd. Groups: C (control), D (deltamethrin), DP (deltamethrin + pectin), DC (deltamethrin + cellulose), P (permethrin), PP (permethrin + pectin), PC (permethrin + cellulose); $p < 0,05$ to: a (CxD), b (CxDP), c (CxDC), d (DxD), e (DxDC), f (DPxDC), g (CxP), h (CxPP), i (CxPC), j (PxPP), k (PxPC), l (PPxPC); $n = 20$.

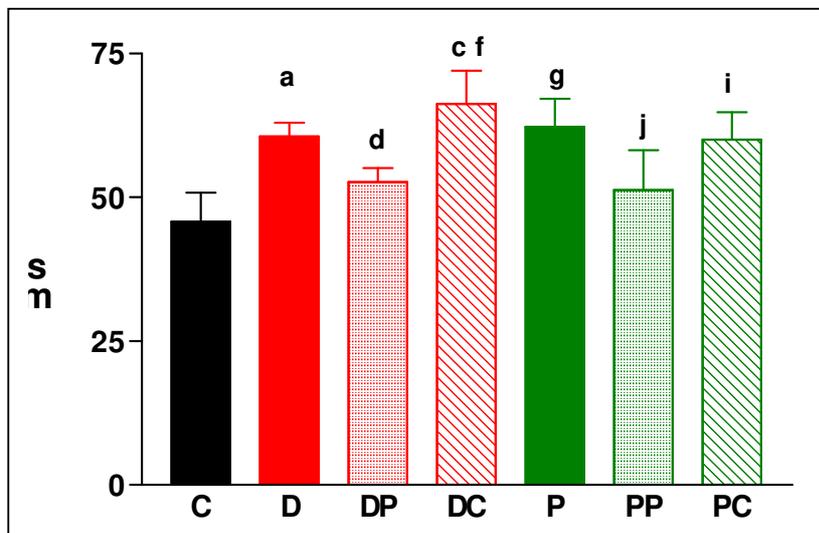


Figure 3. PR interval of experimental groups. Values expressed by mean \pm sd. Groups: C (control), D (deltamethrin), DP (deltamethrin + pectin), DC (deltamethrin + cellulose), P (permethrin), PP (permethrin + pectin), PC (permethrin + cellulose); $p < 0,05$ to: a (CxD), b (CxDP), c (CxDC), d (DxD), e (DxDC), f (DPxDC), g (CxP), h (CxPP), i (CxPC), j (PxPP), k (PxPC), l (PPxPC); ms: milliseconds; $n = 20$.

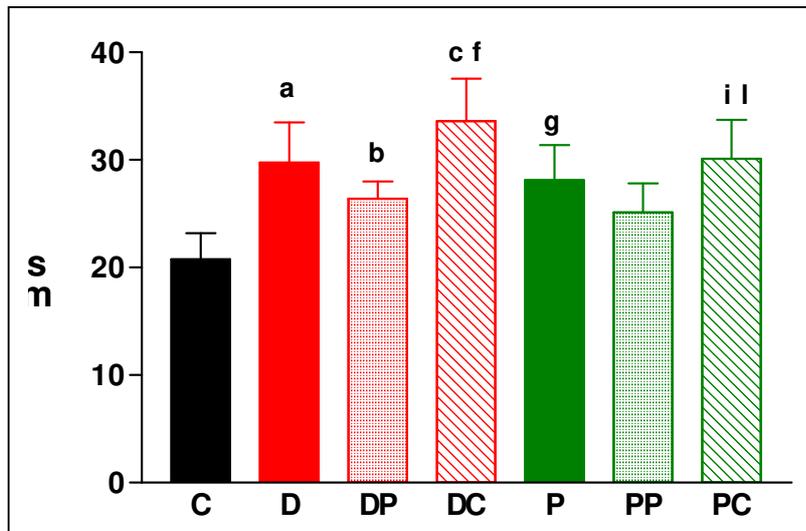


Figure 4. QRS complex duration of experimental groups. Values expressed by mean \pm sd. Groups: C (control), D (deltamethrin), DP (deltamethrin + pectin), DC (deltamethrin + cellulose), P (permethrin), PP (permethrin + pectin), PC (permethrin + cellulose); $p < 0,05$ to: a (CxD), b (CxDP), c (CxDC), d (DxD), e (DxDC), f (DPxDC), g (CxP), h (CxPP), i (CxPC), j (PxPP), k (PxPC), l (PPxPC); ms: milliseconds; $n = 20$.

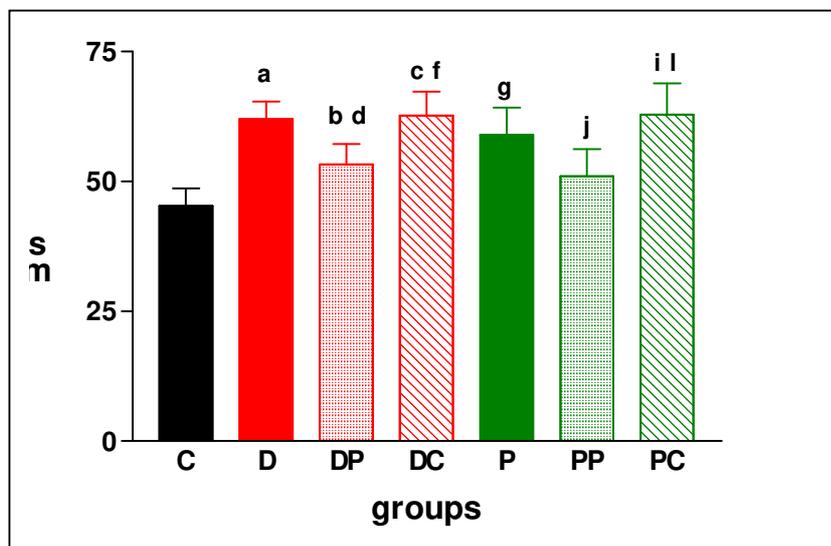


Figure 5. QT interval of experimental groups. Values expressed by mean \pm sd. Groups: C (control), D (deltamethrin), DP (deltamethrin + pectin), DC (deltamethrin + cellulose), P (permethrin), PP (permethrin + pectin), PC (permethrin + cellulose); $p < 0,05$ to: a (CxD), b (CxDP), c (CxDC), d (DxD), e (DxDC), f (DPxDC), g (CxP), h (CxPP), i (CxPC), j (PxPP), k (PxPC), l (PPxPC); ms: milliseconds; $n = 20$.

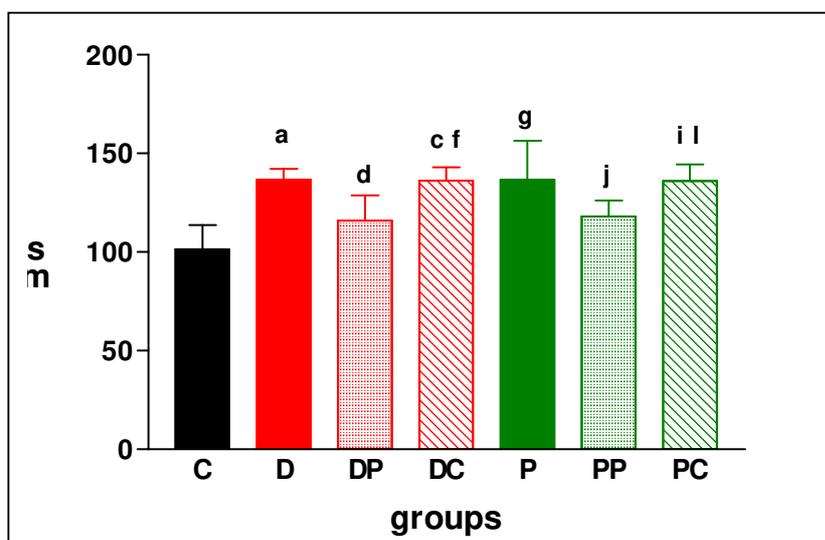


Figure 6. QTc interval of experimental groups. Values expressed by mean \pm sd. Groups: C (control), D (deltamethrin), DP (deltamethrin + pectin), DC (deltamethrin + cellulose), P (permethrin), PP (permethrin + pectin), PC (permethrin + cellulose); $p < 0,05$ to: a (CxD), b (CxDP), c (CxDC), d (DxD), e (DxDC), f (DPxDC), g (CxP), h (CxPP), i (CxPC), j (PxPP), k (PxPC), l (PPxPC); ms: milliseconds; $n = 20$.

Acknowledgements

The authors are thankful to Blanver Farmoquímica and CP Kelco for providing the fibers used in this work, and also thank to Bayer CropScience for donating the deltamethrin. They express gratitude to the Laboratory of Post Harvest from the Department of Agricultural Engineer, State University of Campinas, for helping prepare the diets. Finally, M.A.T.Santos thanks for the PhD scholarship given for this study by Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

5. References

Akre CJ, MacNeil JD. 2006. Determination of eight synthetic pyrethroids in bovine fat by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of AOAC International* 89 (5): 1425-1431

Adachi A, Yatani Y, Okano T. 2003. Efficiency of wheat bran for removal of organochlorine compounds and benzene from solution. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71, 375-378.

Anderson JW., Deakins DA., Floore T.L., Smith B.M., Whitis S.E. 1990. Dietary fiber and coronary heart disease. *Critical reviews in food science and nutrition* 29(2):95-147.

Balser JR. 1999. Structure and function of the cardiac sodium channels. *Cardiovascular Research* 42, 327-338.

Bazett HC. 1920. An analysis of the time-relationship of electro-cardiograms. *Heart* 7, 353-370.

Bratt H, Mills IH, Slade M. PP557: Tissue Retention in the Rat. Unpublished ICI Central Toxicology Lab. 1977.

Cantalamesa F. 1993. Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin, and cypermethrin in neonatal and adults rats. *Archives of Toxicology* 67, 510-513.

Chadwick RW., Copeland MF., Chadwick CJ. 1978. Enhanced pesticide metabolism, a previously unreported effect of dietary fibre in mammals. *Food and Cosmetics Toxicology* 16: 217-225.

Coskun B, Çomelekoglu U, Polat A, Kaymaz FF. Evaluation of the toxic effects of cypermethrin inhalation on the frog heart. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004; 57: 220-225.

De La Cerda E.; Navarro-Polanco RA., Sánchez-Chapula JA. 2002. Modulation of cardiac action potential and underlying ionic currents by the pyrethroid insecticide deltamethrin. *Archives of Medical Research* 33: 448-454.

Eriksson P, Nordberg A. 1990. Effects of two pyrethroids, bioallethrin and deltamethrin, on subpopulations of muscarinic and nicotinic receptors in the neonatal mouse brain. *Toxicology and Applied Pharmacology* 102, 456-463.

Goldberg RJ., Bengtson J, Chen ZY., Anderson KM., Locati E, Levy D. 1991. Duration of the QT interval and total and cardiovascular mortality in healthy persons (The Framingham Heart Study experience). *American Journal of Cardiology*, 67: 55-58.

Guyton AC., Hall JE. Textbook of Medical Physiology, WB. Saunders Company, Philadelphia, p. 107-148. 1996

Hermansen K, Dinesen B, Hoie LH, Morgenstern E, Gruenwald J. 2003. Effects of soy and other natural products on LDL:HDL ratio and other lipid parameters: a literature review. *Advances in Therapy* 20 (1), 50-78.

Heudorf U, Angerer J. 2001. Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. *Environmental Health Perspectives*. 109 (3): 213-217.

Husain R, Malaviya M, Seth PK., Husain R. 1994. Effect of deltamethrin on regional brain polyamines and behaviour in young rats. *Pharmacology and Toxicology* 74, 211-215.

Kavlock R, Chernoff N, Baron R, Linder R, Rogers E, Carver B. 1979. Toxicity studies with decamethrin, a synthetic pyrethroid insecticide. *Journal of environmental pathology and toxicology* 2, 751-765.

Kimura Y, Nagata Y, Bryant CW, Buddington RK. 2002. Nondigestible oligosaccharides do not increase accumulation of lipid soluble environmental contaminants by mice. *The Journal of Nutrition* 132, 80-87.

Kimura Y, Nagata Y, Buddington RK. 2004. Some dietary fibers increase elimination of orally administered polychlorinated but not that of retinol in mice. *The Journal of Nutrition* 134, 135-142.

Ludomirsky A, Klein HO., Sarelli P, Becker B, Hoffman S, Taitelman U, Barzilai J, Lang R, Disegni E, Kaplinsky E. 1982. Q-T prolongation and polymorphous ("torsade de pointes") ventricular arrhythmias associated with organophosphorus insecticide poisoning. *The American Journal of Cardiology* 49, 1654-1658.

Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK., Dey S. 2004. Neuropharmacological effects of deltamethrin in rats. *Journal of Veterinary Science* 7 (2), 133-136.

Matthew NL: Time dependency of the autonomic interactions that regulate heart rate and rhythm. In: Zipes DP and Jalife J(Eds.): *Cardiac Electrophysiology. From Cell to Bedside*. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1995, p 454-459.

Mello-da-Silva CA., Fruchtengarten L. 2005. Riscos químicos ambientais à saúde da criança. *Jornal de Pediatria* 81 (5), S205-S211.

Omaye ST., Chow FI, Betschart AA. 1983. In vitro interactions between dietary fibre and ¹⁴C-vitamin D or ¹⁴C-vitamin E. *Journal of Food Science* 48, 260-261.

Pham HC., Navarro-Delmasure C, Pham HC., Clavel P, Van Haverbeke G, Cheav SL. 1984. Toxicological studies of deltamethrin. *International Journal of Tissue Reactions* 6(2):127-33.

Santos MAT. Efeito da pectina e da celulose na toxicidade de inseticidas piretróides sobre parâmetros eletrocardiográficos e morfológicos em ratos Wistar machos recém desmamados. Campinas, 2008. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM. 2005. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environmental Health Perspectives* 113 (2), 123-136.

Schettgen T. et al. 2002. Pyrethroid exposure of the general population – is this due to diet? *Toxicology Letters* 134:141-145.

Sheets LP, Doherty J.D., Law M.W., Reiter L.W., Crofton K.M. 1994. Age-dependent differences in the susceptibility of rats to deltamethrin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 126, 186-190.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2003. Diretriz de interpretação de eletrocardiograma de repouso. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 80 (2). www.scielo.br/pdf/v80s2/a01v80s2.pdf Acessado em 10/11/2006.

Spencer CI, Yuill KH, Borg JJ, Hancox JC, Kozlowski RZ. 2001. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298 (3), 1067-1082.

Surawicz B. 1989. Electrophysiologic substrate of torsades de pointes: dispersion of repolarization of early after depolarization? *Journal of the American College of Cardiology* 14, 172-184.

Ta CA, Zee JA., Desrosiers T, Marin J, Lavallois P, Ayote P, Poirier G. 1999. Binding capacity of various fibre to pesticide residues under simulated gastrointestinal conditions. *Food and Chemical Toxicology* 37, 1147-1151.

Topping DL. 1991. Soluble fiber polysaccharides: effects on plasma cholesterol and colonic fermentation. *Nutrition Reviews* 49, 195-203.

Valentine WM. 1990. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 20 (2), 375-382.

CAPÍTULO 4

Deltametrina e Permetrina induzem alterações histológicas em fígado de ratos

Mônica A. T. dos Santos, Felix G. R. Reyes, Miguel A. Areas

Resumo

Estudos histológicos podem ajudar a estabelecer uma relação entre a exposição a um xenobiótico e efeitos prejudiciais ao organismo. Alterações teciduais têm sido verificadas em animais experimentais após a ingestão contínua de pesticidas, entre eles os piretróides. Permetrina e deltametrina são piretróides muito utilizados na agricultura e não raramente presentes em alimentos na forma de resíduos. Assim, é provável que a ingestão crônica dessas substâncias possa causar danos aos tecidos atingidos. Por outro lado, as fibras alimentares podem ligar-se a vários compostos e exercer um efeito protetor no trato gastrointestinal através da adsorção de xenobióticos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar prováveis alterações histológicas no fígado e coração induzidas pela ingestão de permetrina e deltametrina em ratos, e estudar se fibras alimentares possuem efeito protetor. Ratos Wistar machos foram submetidos, diariamente, a doses de permetrina (47,1 mg/kg/p.c.) e deltametrina (1,1 mg/kg/p.c.) correspondentes a 1/10 DL50 durante 28 dias. Após o período experimental os animais foram sacrificados, sendo que o fígado e o coração foram removidos para estudo histológico. Os resultados mostraram a presença de alterações hepáticas características de processo inflamatório nos

animais submetidos a ambos inseticidas. Além disso, não se observaram alterações cardíacas significativas nos animais estudados. Por outro lado, dentre os tipos de fibras alimentares avaliados, somente a pectina reduziu as alterações histológicas hepáticas.

Summary

Histopathological studies can help to establish a relationship between the exposition to a xenobiotic and the manifestation of adverse effects. Changes in tissues have been verified in experimental animals after the continuous pesticide ingestion. The permethrin and deltamethrin are pyrethroids used in agriculture and frequently are found as residues in foods. Thus, it is possible that the chronic ingestion of these substances can cause some damage in tissues. In the other hand, dietary fibers may bind with many compounds and exert a protective effect in the digestive tract by adsorbing xenobiotics. The objective of the present work was to verify the histological changes in liver and hearts caused by oral administration of permethrin and deltamethrin in rats, and to evaluate the possible protective effect of the fibers.

The experimental groups received 47.1 mg/kg b.w./day of permethrin and 1.1 mg/kg b.w./day of deltamethrin corresponding to 1/10 of LD50 during 28 days. The animals were sacrificed and their liver and heart were studied. Histological changes were observed in the liver of the animals submitted to both insecticides. No changes were observed in the heart muscle. The pectin ingestion reduced the histologic changes observed in the liver showing a protective effect against the pyrethroids.

Introdução

Permetrina e deltametrina são piretróides sintéticos com potente ação inseticida e um vasto campo de atuação, ao mesmo tempo em que apresentam baixa toxicidade aguda para mamíferos. No entanto, a administração de piretróides em doses repetidas resulta em efeitos tóxicos em animais experimentais. Está bem estabelecida a ação dos piretróides sobre os canais de sódio neural (1-3). Pesquisas realizadas por Luty et al. (4); Luty et al. (5); Coskun et al. (6); Manna et al. (7); Sakar et al. (8) e Velmurugan et al. (9) demonstraram que o contato com esses compostos levam, ainda, à alterações histológicas em diferentes espécies animais. Grajeda-Cota et al. (10) verificaram, ainda, que a cipermetrina alterou o metabolismo da glutatona em hepatócitos de ratos, reduzindo a capacidade anti-oxidante nesse tecido.

Estudos histológicos envolvendo a ação de piretróides estão concentrados em órgãos específicos, como cérebro, fígado, rins e pulmões. Poucos relatos são encontrados na literatura sobre a ação de piretróides, administrados por via oral, e prováveis alterações histológicas em coração de mamíferos.

Por outro lado, as fibras alimentares exercem vários efeitos fisiológicos no trato gastrointestinal, dependendo das propriedades físicas e químicas de cada tipo de fibra. Enquanto as fibras solúveis produzem seus efeitos na porção superior do tubo digestivo, atrasando o esvaziamento gástrico, a assimilação de nutrientes e aumentando o tempo de trânsito intestinal, as insolúveis agem, sobretudo, no intestino grosso, promovendo aumento do volume fecal e diminuindo o tempo de

trânsito intestinal, reduzindo o tempo de contato de substâncias agressivas com a mucosa do cólon.

Estudos têm demonstrado a capacidade de fibras alimentares em ligar-se a agrotóxicos (11, 12). A fibra exerce seu efeito protetor no trato digestivo através da adsorção dessas substâncias, diminuindo, assim, sua absorção, favorecendo a excreção pelas fezes (12). De fato, desde 1978, Chadwick et al. (13) observaram que ratos alimentados com dietas ricas em pectina excretavam, significativamente, mais inseticida lindano pelas fezes que aqueles animais alimentados com dieta com baixo teor de fibra.

Apesar do interesse de pesquisadores, ainda são poucos os estudos que associam as fibras alimentares e a ingestão crônica de agrotóxicos. Estudos *in vitro* evidenciaram que as fibras são capazes de diminuir, substancialmente, a absorção de agrotóxicos no trato gastrointestinal (12). Além disso, segundo Smith-Barbaro et al. (14), as fibras exercem suas funções protetoras no trato digestivo, através da adsorção de xenobióticos favorecendo sua excreção pelas fezes.

O objetivo deste estudo foi avaliar possíveis alterações histológicas que possam caracterizar a toxicidade da deltametrina e permetrina no coração e no fígado de ratos Wistar recém desmamados, assim como verificar se as fibras alimentares pectina (solúvel) e celulose (insolúvel) apresentam efeito protetor contra essas prováveis alterações.

Material e métodos

Ratos Wistar machos, recém desmamados (21 dias), provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) foram alojados em gaiolas individuais no biotério da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Os procedimentos foram autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (Protocolo 721-2). Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em temperatura de 22°C com ciclos de 12 horas claro/escuro. Após sete dias de adaptação, os 60 animais foram distribuídos em três grupos (20 animais/grupo): a) grupo controle – gavagem com 5 mL de óleo de milho; b) grupo 1 - gavagem com 5 mL da solução composta por 1/10 DL50 de permetrina (47,1 mg/kg/pc) e óleo de milho; c) grupo 2 - gavagem com 5 mL da solução composta por 1/10 DL50 de deltametrina (1,1 mg/kg/pc) e óleo de milho. A dose (1/10 DL50) dos piretróides utilizada neste trabalho foi escolhida com base em estudos anteriores realizados por Santos (15). Os animais receberam dieta comercial Labina e a água foi fornecida *ad libitum*. Os animais foram pesados periodicamente com o objetivo de adequar as doses dos inseticidas a serem administrados.

Numa segunda etapa, pectina e celulose foram adicionadas à dieta dos animais com o intuito de descrever possíveis efeitos benéficos sobre a ação tóxica dos piretróides, caso observado alguma alteração histológica nos órgãos estudados. Para tanto, a dieta foi moída e acrescida de 5% das fibras a serem testadas. Durante essa fase, utilizou-se igualmente 20 animais por grupo, nas mesmas condições oferecidas no primeiro ensaio: a) grupo permetrina + dieta celulose; b) grupo

permetrina + dieta pectina; c) grupo deltametrina + dieta celulose; d) grupo deltametrina + dieta pectina.

Após 28 dias de experimento os animais foram mortos, sendo retirados o fígado e o coração para análise histológica. Os órgãos foram fixados em Bouin com inclusão em parafina e os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para visualização em microscópio ótico.

As dimensões e aspectos celulares foram avaliados utilizando-se do software Image Pro Plus após captura da imagem com microscópio Leica em aumento de 100x.

Inseticidas utilizados

A permetrina e deltametrina foram selecionados pela grande utilização e por representarem grupos distintos de piretróides classificados como Tipo I e Tipo II, respectivamente. A deltametrina [(S)-ciano-3-fenoxibenzil (1R)-cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilcyclopropanocarboxylato] foi gentilmente cedida pela Bayer CropScience e a permetrina [3- fenoxibenzil (1RS)-cis, trans-3-(2,2-diclorovinil) 2,2-dimetilcyclopropanocarboxilato] foi sintetizada pela FMC Agricultural Products.

Resultados

As análises histológicas do fígado dos animais controle (Fig. 1A) mostraram hepatócitos íntegros com um ou dois núcleos (a), citoplasma normal, células de Küpffer (b) localizadas entre os hepatócitos e sinusóides (c). Os animais tratados com deltametrina (Figs. 1 B,C) apresentaram células inflamatórias, áreas com

infiltração linfocitária próximos de veia hepática (d); hepatócitos aparentemente aumentados com alterações citoplasmáticas (granulações) com um ou dois núcleos de formas e tamanhos irregulares (e); inclusões lipídicas (f); células de Küpffer (g). A permetrina causou nos fígados dos animais as mesmas alterações encontradas naqueles submetidos à deltametrina. No entanto, não foram observadas infiltrações inflamatórias (Fig. 1E). Os animais que ingeriram pectina (Figs. 1 D,F) mantiveram seus hepatócitos aparentemente aumentados, mas com redução das alterações observadas nos grupos 1 B,C, E.

A adição de celulose na dieta não atenuou as alterações hepáticas induzidas pelos piretróides estudados (Figura 1- G e H).

Os músculos cardíacos (Figura 2) de todos os grupos experimentais apresentaram núcleos com formas irregulares, localizados no centro da célula e espaços entre as fibras, características típicas de um coração normal. Os núcleos localizados fora das fibras cardíacas pertencem às células endoteliais e fibroblastos. Nas figuras é possível observar as ramificações das fibras cardíacas. Discos intercalares marcam as junções intercelulares entre as células do músculo cardíaco. Não se observaram alterações decorrentes da administração dos piretróides nesse tecido.

O fígado e o coração dos ratos submetidos à ingestão de piretróides não apresentaram alterações de tamanho e peso quando comparados aos órgãos dos animais do grupo controle.

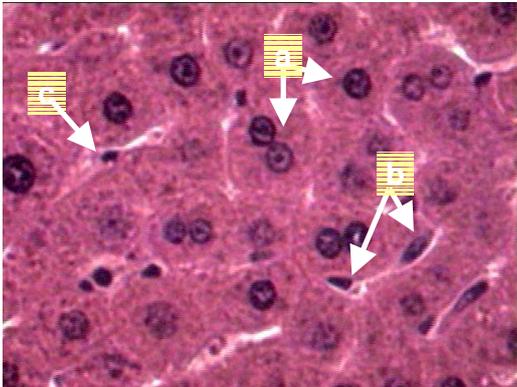
Discussão

Os danos provocados pelos piretróides no coração de mamíferos não são totalmente conhecidos e a utilização de técnicas histológicas podem auxiliar no estudo do comportamento de substâncias químicas sobre órgãos específicos.

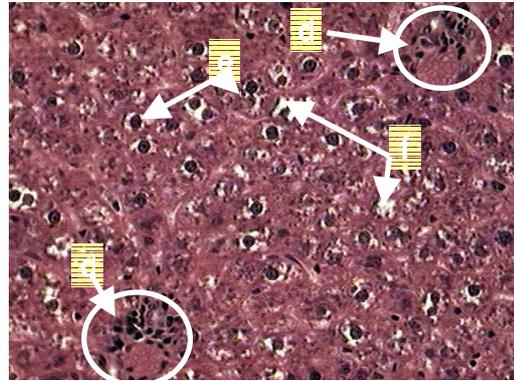
A análise histológica realizada neste estudo nos permitiu verificar que a ingestão de baixas doses de permetrina e deltametrina não causou alterações morfológicas no músculo cardíaco de ratos. Nossos resultados são corroborados por Luty et al. (4), Luty et al. (5) que também não observaram alterações no tecido cardíaco de camundongos.

Entretanto, substâncias químicas afetam seletivamente o coração. Os efeitos podem ser unicamente funcionais conservando-se, apenas, enquanto houver exposição do indivíduo ao composto. Além disso, a magnitude do efeito e o risco de irreversibilidade dependem da dose e duração da exposição à substância química (16).

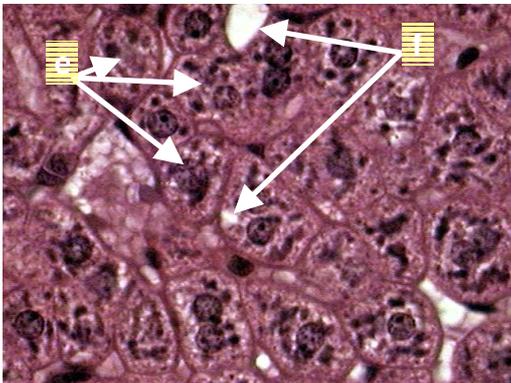
A. Controle



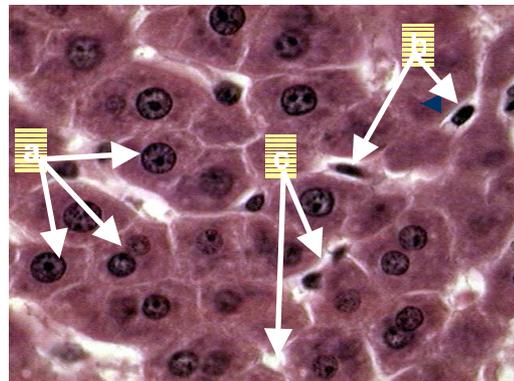
B. Deltametrina



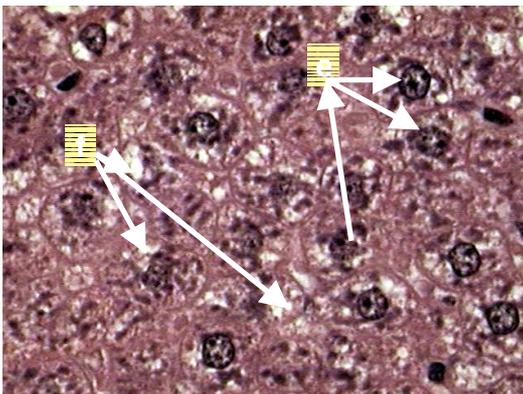
C. Deltametrina



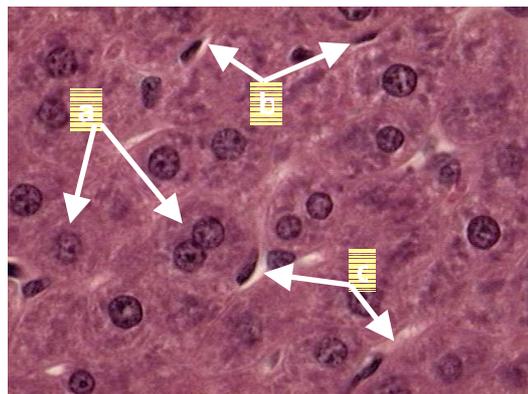
D. Deltametrina + Pectina



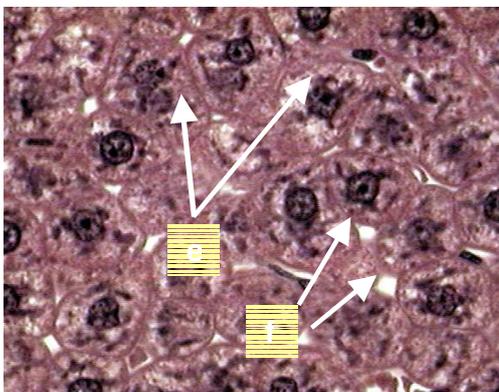
E. Permetrina



F. Permetrina + Pectina



G. Deltametrina + Celulose



H. Permetrina + Celulose

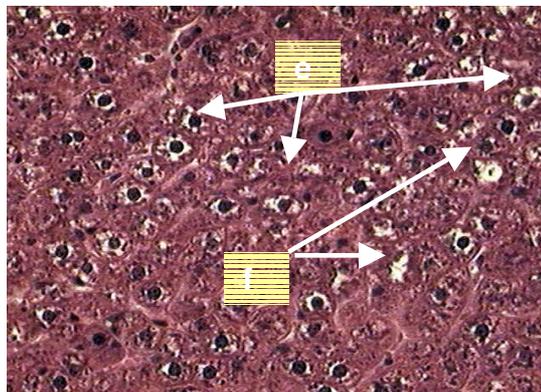
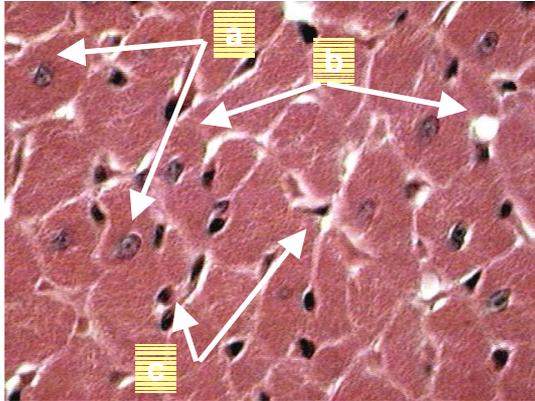
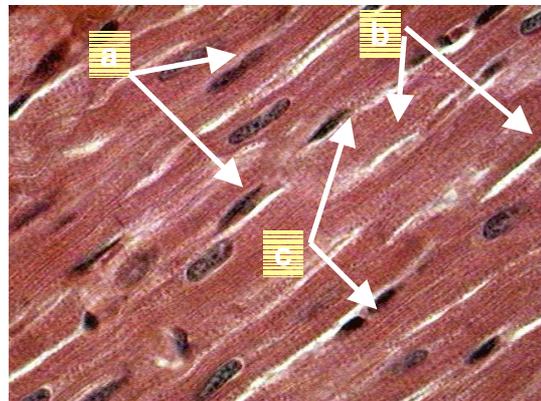


Figura 1 – Cortes transversais de fígado de ratos submetidos, por 28 dias, à administração oral de permetrina, deltametrina e dieta enriquecida com fibras. Podem ser observados: hepatócitos íntegros com um ou dois núcleos (**a**); citoplasma normal com células de Kúpffer (**b**) localizadas entre os hepatócitos e sinusóides (**c**); células inflamatórias, áreas com infiltração linfocitária próximos de veia hepática (**d**); hepatócitos aumentados com alterações citoplasmáticas (granulações) com um ou dois núcleos de formas e tamanhos irregulares (**e**); inclusões lipídicas (**f**). **A** - H.E (100X); **B,C,E** - H.E (B 40X); (C,E 100X); **D,F** - H.E (100X); **G** - HE (100X); **H** - HE (40X).

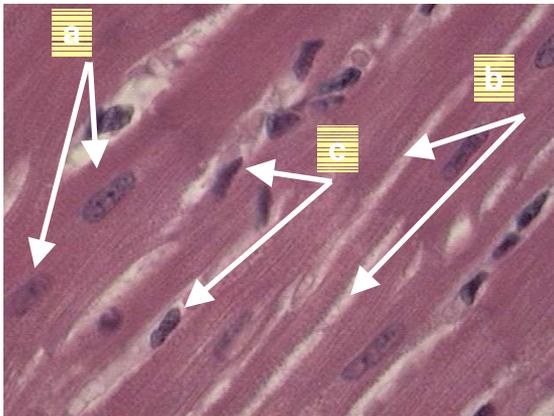
A. Controle



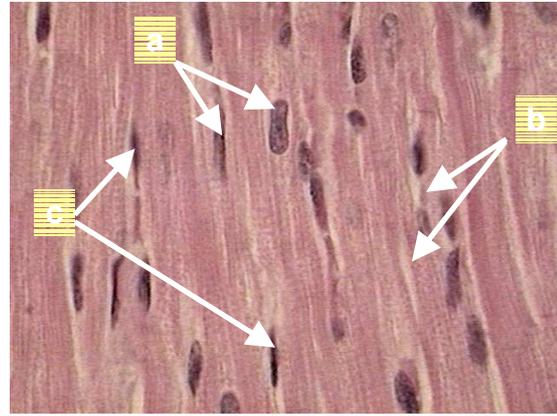
B. Controle



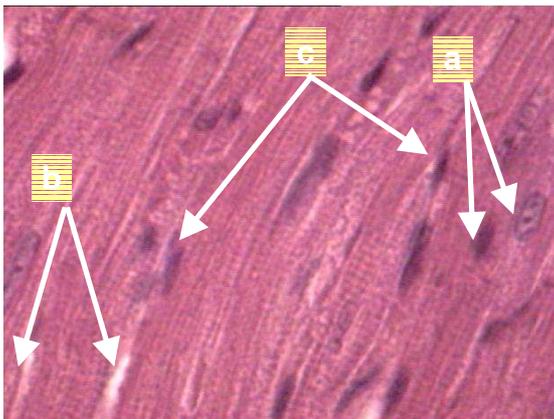
C. Deltametrina



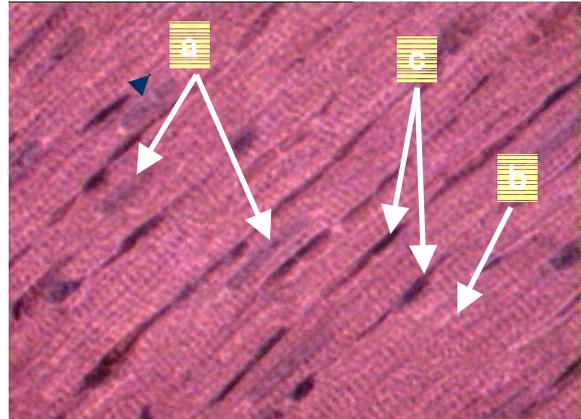
D. Deltametrina + Pectina



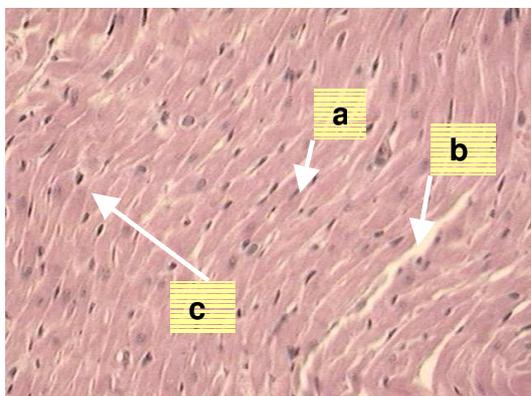
E. Permetrina



F. Permetrina + Pectina



G. Deltametrina + Celulose



H. Permetrina + Celulose

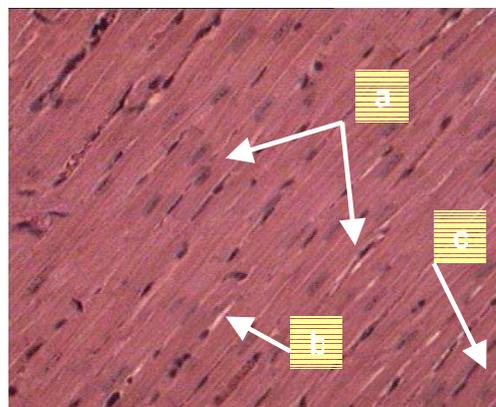


Figura 2 – Tecido Cardíaco de animais submetidos, por 28 dias, a administração oral de permetrina, deltametrina e dieta enriquecida com fibras. Corte transversal do ventrículo esquerdo de ratos Wistar. **A** - H.E. (40X) e cortes longitudinais **B,C,D,E,F** H.E (100X) **G e H** (40X), .Núcleos com formas irregulares, localizados no centro da célula (**a**) e espaços entre as fibras (**b**), características típicas de um coração normal. Os núcleos localizados fora das fibras cardíacas pertencem às células endoteliais e fibroblastos (**c**). Discos intercalares marcam as junções intercelulares entre as células do músculo cardíaco.

Ao contrário do observado no coração, o fígado dos animais tratados com piretróides apresentou alterações histológicas visíveis à microscopia óptica, principalmente após a administração de deltametrina. Alterações histológicas semelhantes foram observadas por Luty et al., (5) após a administração de 1/10 DL50 de deltametrina e fenvalerato em camundongos, durante 28 dias. A análise histológica de animais expostos a doses de 1/2 e 1/5 DL50 de α -cipermetrina indicaram a presença de numerosas infiltrações linfocitárias no tecido hepático (Luty

et al. (4). No trabalho realizado por Manna et al. (7) a ingestão de α -cipermetrina por ratos Wistar produziu congestão, hemorragias e ruptura de sinusóides em tecido hepático. Luty et al. (17) também verificaram alterações histológicas no fígado de ratos Wistar após a administração dérmica de altas doses de α -cipermetrina (1/2 DL50). Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Mani et al. (18), que verificaram no fígado de animais expostos, por inalação, ao piretróide fenvalerato, alterações degenerativas lipídicas nas áreas centrolobulares e centrais. Além disso, os autores verificaram hepatomegalia, edemas e aumento da atividade de enzimas, indicativo da disfunção hepática. Segundo Parker et al. (19) a hepatomegalia e/ou hipertrofia são, frequentemente, causadas pela indução do sistema monooxigenase microsomal do fígado dos ratos.

As alterações hepáticas observadas são consistentes em classificar o fígado como o principal órgão envolvido na biotransformação de xenobióticos.

A fibra solúvel pectina misturada à dieta dos ratos contribuiu para a diminuição dos efeitos hepatotóxicos. De fato, a administração de pectina reduziu a presença de inclusões lipídicas, assim como, de granulações citoplasmáticas evidentes nos animais submetidos à administração isolada dos piretróides testados devido, provavelmente, a sua capacidade de adsorver compostos tóxicos. Nossos resultados são corroborados por Ta et al. (12), os quais verificaram que a pectina apresenta alta capacidade de adsorção de diversos tipos de inseticidas.

Por outro lado, a celulose foi menos eficaz que a pectina em reduzir as alterações induzidas pelos piretróides devido, provavelmente, a sua menor capacidade de adsorção.

Conclusões

Os resultados indicam um importante potencial hepatotóxico em ratos após a ingestão subcrônica dos piretróides estudados. A adição de pectina na dieta reduziu todas as alterações histológicas observadas nos grupos alimentados apenas com a dieta comercial. Não foram observadas alterações no tecido cardíaco. Assim, é possível concluir que uma dieta rica em pectina pode contribuir na redução da ação hepatotóxica da deltametrina e permetrina devido, provavelmente, à capacidade de adsorção dos piretróides pelas fibras solúveis. Novos estudos são necessários para complementar os resultados obtidos neste trabalho. Enfim, a histologia mostrou-se um método coadjuvante eficaz no estudo de xenobióticos.

Referências bibliográficas

1. Narahashi, T. Neuronal ion channel as the target sites of insecticides. *Pharmacol Toxicol* 1996; 79 (1): 1-14.
2. Spencer CL, Yuill KH, Borg JJ, Hancox JC., Kozlowski RZ. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001; 298 (3): 1067-1082.
3. De La Cerda E, Navarro-Polanco RA, Sánchez-Chapula J A. Modulation of cardiac action potential and underlying ionic currents by the pyrethroid insecticide deltamethrin. *Arch Med Res* 2002; 33: 448-454.

4. Luty S, Latuszynska J, Obuchowska-Przebirowska D, Tokarska M, Haratym-Maj A. Subacute toxicity of orally applied alpha-cypermethrin in swiss mice. *Ann Agric Environ Med* 2000; 7: 33-41.
5. Luty S, Haratym-Maj A, Latuszynska J, Obuchowska-Przebirowska D, Tokarska-Rodak M. Oral toxicity of deltamethrin and fenvalerate in swiss mice. *Ann Agric Environ Med* 2001; 8: 245-254.
6. Coskun B, Çomelekoglu U, Polat A, Kaymaz FF. Evaluation of the toxic effects of cypermethrin inhalation on the frog heart. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004; 57: 220-225.
7. Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK, Dey S. Neuropharmacological effects of deltamethrin in rats. *J Vet Sci* 2006; 7 (2): 133-136.
8. Sarkar B, Chatterjee A, Adhikari S, Ayyappan S. Carbofuran- and cypermethrin-induced histopathological alterations in the liver of *Labeo rohita* (Hamilton) and its recovery. *J Appl Ichthyol* 2005; 21: 131-135.
9. Velmurugan B, Selvanayagam M, Cengiz EI, Unlu E. The effects of fenvalerate on different tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala*. *J Environ Sci Health B* 2007; 42(2):157-63.
10. Grajeda-Cota P, Ramírez-Mares MV, Mejía EG. Vitamin C protects against in vitro cytotoxicity of cypermethrin in rat hepatocytes. *Toxicology in vitro* 2004; 18: 13-19.
11. Indira M, Kurup PA. Effect of blackgram fibre on toxic effects of organophosphorus insecticides. *Indian J Exp Biol* 1980; 18: 1529-1530.
12. Ta et al. Binding capacity of various fibre to pesticide residues under simulated gastrointestinal conditions. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 1147-1151.

13. Chadwick RW, Copeland MF, Chadwick CJ. Enhanced pesticide metabolism, a previously unreported effect of dietary fibre in mammals. *Food Cosmet Toxicol* 1978;16: 217-225.
14. Smith-Barbaro P, Hanson D, Reddy BS. Carcinogen binding to various types of dietary fibre. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67: 495-497.
15. Santos MAT. Efeito da pectina e da celulose na toxicidade de inseticidas piretróides sobre parâmetros eletrocardiográficos e morfológicos em ratos Wistar machos recém desmamados. Campinas, 2008. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
16. Hanig JP, Herman EH. Toxic responses of the heart and vascular system. In: Amdur MO, Daull J, Curtis (Eds.), *Casarett and Daull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill, Pergamon, Toronto, 1991. 430-461.
17. Luty et al. Toxicity of dermally applied alpha-cypermethrin in rats. *Ann Agric Environ Med* 1998;5(2):109-16.
18. Mani et al. Hepatotoxic alterations induced by subchronic exposure of rats to formulated fenvalerate (20% EC) by nose only inhalation. *Biomed Environ Sci* 2004; 17: 309314.
19. Parker CM, Wimberly HC, Lam AS, Gardiner TH, Van Gelder GA. Subchronic feeding study of decarboxy fenvalerate in rats. *J Toxicol Environ Health* 1986; 18: 77-90.

CAPÍTULO 5

Determination of deltamethrin and permethrin in liver and heart of subchronic oral exposed Wistar rats

Santos, M.A.T., Rodrigues, M. V. N., Reyes, F.G.R., Áreas, M.A.

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the residues of the pyrethroids permethrin and deltamethrin in liver and heart of Wistar rats exposed by gavage at 1/10 level of the corresponding LD 50 of the pyrethroids, during 28 days. The effect of the presence of pectin and cellulose at 5% level in the diet was also evaluated. For this purpose, a gas chromatography electron capture (GC-ECD) method of analysis was implemented and in-house validated. The analytes were extracted from the matrices with acetonitrile using an Ultra-Turrax system. For the clean-up step a florisil column was used. The extracts were analyzed by GC-ECD using a HP-5 megabore column. For permethrin the limits of quantification (LOQ) were $1 \mu\text{g g}^{-1}$ and $0.2 \mu\text{g g}^{-1}$ and for deltamethrin $0.9 \mu\text{g g}^{-1}$ and $0.2 \mu\text{g g}^{-1}$ for liver and heart, respectively. None of the samples analyzed presented pyrethroids residue. These results indicate that permethrin and deltamethrin do not accumulate in the liver and heart of the animals.

Keywords: pyrethroid insecticides; tissues, residue, GC-ECD, permethrin, deltamethrin

1. Introduction

Pyrethroid pesticides are used in agriculture to control insects on vegetables, fruits and field crops; in public health to control diseases caused by vectors, as well as in veterinary products against ectoparasites. Also, they are not persistent in the environment and tend to exhibit slow development of insect resistance (Soderlund et al., 2002). In general, pyrethroids are more effective against a wider range of insect pests and have much lower mammal-to-insect ratio than their organochlorine, organophosphate and carbamate counterparts (Léon-González, et al., 2005). Nevertheless, the widespread use of these insecticides have lead to an increase exposure of workers and the ecosystem (Viran et al., 2003), increasing the risk of them entering the food chain throughout the meet (Akre and MacNeil, 2006), as well as by the residues in fruits, vegetables and water (Kumari et al., 2006).

The acute neurotoxicity of pyrethroids has been well characterized in several reviews (Soderlund, et al., 2002; Narahashi, 1996; Valentine, 1990). However, even though cardiovascular manifestations frequently accompany exposure to these compounds (Spencer, 2001; De la Cerda et al., 2002) there are few studies regarding their cardiotoxicity. On the other hand, the liver is the primary organ for metabolism, detoxification of xenobiotics and excretion of harmful substances (Sarkar et al., 2005). Also, histological changes, such as congestion, hemorrhages and disruption of sinusoids as well as residue levels were found in liver of rats after oral exposure to repeated doses of alfa-cypermethrin (Manna et al., 2004). According to the authors, the bioaccumulation of the pyrethroids in the liver obviously brings about the observed histopathological effects. In this context, the determination of the residues

of pyrethroids in target tissues contributes with the understanding of the compound toxicity on those tissues.

The chemical structures of some types of pyrethroids are shown in Fig. 1.

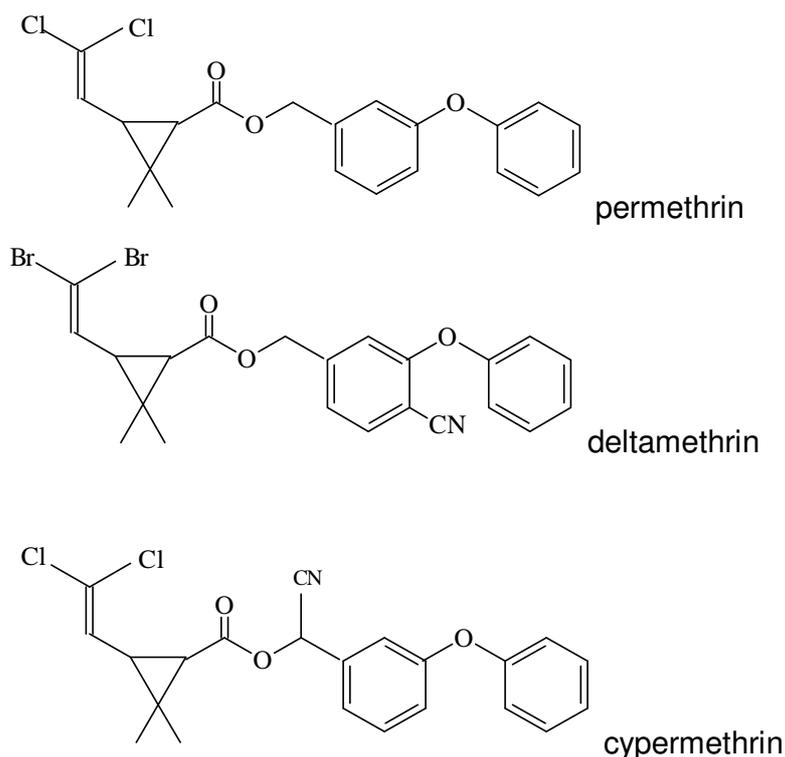


Figure 1. Chemical structures of permethrin, deltamethrin and cypermethrin.

Generally, the pesticides residues in different samples are determined using chromatographic methods. Pyrethroids have been determined mainly by gas chromatography (GC), and although there is a lack of pyrethroid specific detection systems, the electron-capture detection (ECD) is most frequently selected for the determination of pyrethroid residue analysis being most suitable for the determination

of those pyrethroid which possess the chloro group (cypermethrin, permethrin), fluoro group (cyhalothrin), bromo group (deltamethrin) or chloro and fluoro groups (fluvinate) in their structure. Methods of derivatization have been also developed to introduce a sensitive group in the pyrethroids which have not a halogen atom in their molecule (allethrin, resmethrin, phenothrin, tetramethrin) (Chen and Wang, 1996). Recently, GC-ECD was used to determine residues of pyrethroids in bovine fat (Akre and MacNeil, 2006) and brain, lungs, liver, heart and kidney of rats (Manna et al., 2004).

It has been reported that diet supplementation with dietary fibers shown to decrease the toxicity caused by food carcinogens and organophosphorus pesticides (Ta et al., 1999). Dietary fiber may potentially lower the absorption of pesticides from the gastrointestinal tract (GIT), and the binding of pesticides to the fibers is determined by the nature and the level of the fiber (Ta et al., 1999). Also, various organic and inorganic chemicals are possibly bound to dietary fiber in the GIT and quickly excreted in stool (Ikegami et al., 1994; Sera et al., 2005).

The pyrethroids are organic and lipophilic molecules that are absorbed through the gut and act in many parts of the body. Their neurotoxicity is well established but reports on tissue residue level are few evaluated. Besides, our previous studies showed a cardiotoxic effects in rats after repeated daily oral administration of permethrin and deltamethrin. Therefore, investigation of residues level of pyrethroids in target tissues provides a basis for better understanding their properties.

The main objective of this work was to determine the residues of permethrin and deltamethrin in liver and heart of Wistar rats submitted to a sub-chronic (28 days)

pyrethroid oral exposure. Information on the interactions between dietary fibers and pyrethroids are rather scarce, then the effect of the presence in the diet of pectin and cellulose in the residue levels of the pyrethroids in the liver and heart was also evaluated.

2. Materials and methods

2.1 Biological Assay

2.1.1 Chemicals

Standard deltamethrin [(S)-ciano-3-fenoxibenzil (1R)-cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato] (purity, 90.2%), provided by Bayer CropScience and permethrin [3- fenoxibenzil (1RS)-cis, trans-3-(2,2-diclorovinil) 2,2-dimetilciclopropanocarboxilato] (purity, 97.44%), purchased from FMC, were used in this study.

Purified fiber sources were used in order to eliminate possible interference with other constituents that are present in whole fiber sources. Microcel (cellulose, type 3E-200) was kindly donated by Blanver Farmoquímica Ltda (Itapevi, SP, Brazil) and pectin was purchased from CP Kelco S.A. (Limeira, SP, Brazil).

2.1.2 Animals and treatment

Seven groups of 20 male Wistar rats, 4 weeks old, obtained from the Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, State University of Campinas (CEMIB, UNICAMP), Campinas, SP, Brazil were used. The protocol was approved by the UNICAMP Institutional Committee for Ethics in Animal Research (Protocol 721-2),

which follows the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

The animals were housed in individual cages under conditions of controlled temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity (60-70%), and artificial lighting (12-h light/12 h dark, lights on at 7:00 a.m), with free access to commercial food (Labina, Purina®) and water. They were randomly selected based on their body weight and maintained in adaptation period of 7 days before the beginning of the experiments.

The test substances were suitably diluted with commercial corn oil and orally administered (5 mL) by gavage, as one single dose, daily for 28 days. The experimental groups received 47.1 mg/kg b.w./day of permethrin and 1.1 mg/kg b.w./day of deltamethrin corresponding to 1/10 of LD50, dose previously study by Santos (2008). For this purpose, body mass of individual rat was recorded every two days and the insecticides solutions remade. The dietary fiber (pectin and cellulose) was added to the commercial feed at 5 % (w/w) In addition, the commercial diet has already 5% (w/w) of cellulose in its formulation. All the treatments used are described below:

Group I (control): corn oil + commercial diet

Group II: permethrin + commercial diet

Group III: deltamethrin + commercial diet

Group IV: permethrin + commercial diet added of pectin

Group V: permethrin + commercial diet added of cellulose

Group VI: deltamethrin + commercial diet added of pectin

Group VII: deltamethrin + commercial diet added of cellulose

24 hours after the last day of the experiment, the animals were sacrificed and the liver and heart were removed and stored in nitrogen liquid.

2.2 Analytical Assay

2.1.1 Chemicals

Analytical standards of deltamethrin (purity: 99%), permethrin (purity: 98%) and cypermethrin (purity: 91.5%, internal standard) were purchased from Sigma-Aldrich. HPLC-grade solvents (acetonitrile, methanol, hexane and ethyl acetate) were obtained from Fisher Scientific. Anhydrous sodium sulfate reagent grade and florisil (60-100 mesh) were used.

2.1.2 Preparation of stock and standard solutions

Individual deltamethrin, permethrin and cypermethrin stock solutions were prepared in acetonitrile to give a final concentration of 800 µg/mL. Mixture standard solutions were prepared by 1:10 dilution of deltamethrin and permethrin stock solutions in acetonitrile (standard mix 1) and used to spike blank samples.

2.1.3 Analytical curves

Analytical curves were obtained by linear regression. The concentration of the standards is represented in line x and the ration between analyte area and internal standard area is represented in line y. The analyte areas were expressed by the mixture of their isomers.

Liver Calibration standards for rat liver were prepared by spiking 2.0 g of homogenized (Ultra-Turrax system) blank liver with 100, 200, 400, 600 and 800 μL of standard mix 1 (concentration levels 1.18; 2.35; 4.70; 7.06; 9.41 $\mu\text{g/g}$ for permethrin and 0.90; 1.80; 3.61; 5.41; 7.22 $\mu\text{g/g}$ for deltamethrin) and 10 μL of internal standard solution (cypermethrin 80 $\mu\text{g/mL}$). All the spiked liver standards were then extracted from the liver using the extraction procedure further described.

Heart Calibration standards for rat heart were prepared by spiking the homogenized (Ultra-Turrax system) whole blank heart (1.0 g) with 10, 20, 30, 40 and 50 μL of standard mix 1 (concentration levels 0.235; 0.470; 0.706; 0.941 and 1.18 $\mu\text{g/g}$ for permethrin and 0.180; 0.361; 0.541; 0.722 and 0.902 $\mu\text{g/g}$ for deltamethrin) and 10 μL of internal standard solution (cypermethrin 80 $\mu\text{g/mL}$). All the spiked heart standards were then extracted from the matrix using the extraction procedure further described.

2.1.4 Chromatographic system

For the pyrethroids determination a Varian GC 3400 series (Varian, USA) was used equipped with a HP-5 megabore column 30 m x 0.53 mm x 2.65 μm (Hewlett Packard, USA), and an electron capture detector (Varian) was used. The nitrogen carrier gas rate was 10 mL min^{-1} ; make-up nitrogen, 20 mL/min , injector temperature, 270 $^{\circ}\text{C}$; detector temperature, 300 $^{\circ}\text{C}$. The column temperature program was as follows: initial 250 $^{\circ}\text{C}$, 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 270 $^{\circ}\text{C}$ and hold for 30 min., injection volume was 1 μL .

2.1.5 Extraction procedure

Liver In a 50 mL centrifuge tube, 2.0 g of triturated rat liver, 10 μ L of internal standard solution and 15 mL of acetonitrile were combined and homogenized twice in an Ultra-Turrax system for 1 minute, and centrifuged at 3000 rpm for 6 min. The supernatant was dried in rotary evaporator. The residue was suspended in 5 mL of hexane and applied to a florisil column.

Heart In a 15 mL centrifuge tube, whole rat heart (approximately 1.0 g), 10 μ L of internal standard solution and 5 mL of acetonitrile were combined and homogenized twice in an Ultra-Turrax system for 1 minute and centrifuged at 3000 rpm for 6 min. The supernatant was dried in a vacuum evaporator. The residue was suspended in 5 mL of hexane and applied in a florisil column.

Samples clean up. The 5 mL florisil column (75 x 13 mm) was packed successively with 1.0 g florisil (60-100 mesh) and 2.5 g of anhydrous sodium sulfate. The packed column was fitted on SPE vacuum manifold (Alltech, Deerfield, IL, USA). The column was conditioned with 6 mL hexane and not allowed to dry. The sample extract (5 mL) was applied to the column and the analytes were eluted with 15 mL hexane-ethyl acetate (95:5 v/v). The eluate was concentrated until the dryness of the solvent under a vacuum and diluted with methanol to a volume of 5.0 mL (liver) and 1.0 mL (heart). A 1 μ L volume was injected manually into the GC-ECD.

2.1.6 Validation procedure

After establishing the extraction conditions, the CG-ECD method was firstly checked with respect to linearity, precision, accuracy, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD). For this evaluation the mixture of permethrin, deltamethrin and internal standard (cypermethrin) was used. The precision (repeatability), expressed as relative standard derivation (%RSD) of GC-ECD method were obtained using the analysis of six independent samples with $0.94 \mu\text{g g}^{-1}$ permethrin and $0.72 \mu\text{g g}^{-1}$ deltamethrin. The accuracy was evaluated through recovery test by the analysis of spiked liver and heart samples with permethrin and deltamethrin at two different levels.

The LOD was considered as the lowest concentration of the analyte ($S/N = 3$) and the limit of quantification (LOQ) was determined as the lowest concentration of the analyte that yields a signal-to-noise ratio of 10:1.

3. Results and discussion

3.1 Validation results

For method validation, blank rat hearts and blank rat livers were obtained in Toxicological Laboratory of CPQBA-UNICAMP.

The developed method was adapted from Akre and MacNeeil (2006) that determined eight types of pyrethroid in bovine fat using GC-ECD. However, the authors verified lower values of LOD / LOQ for permethrin and deltamethrin, respectively ($7.74 \pm 4.64 \mu\text{g.kg}^{-1}$ / $25.80 \pm 15.47 \mu\text{g.kg}^{-1}$ and $14.38 \pm 6.49 \mu\text{g.kg}^{-1}$ /

47.95 ± 21.63 µg.kg⁻¹) than that reported in our study (Table 1). The discrepancy between the results may be explained by the difference in the matrices constituents.

Table1. Parameters of validation of the GC-ECD method to determinate permethrin and deltamethrin in liver and heart of rats.

Validation Parameters	Permethrin		Deltamethrin	
	Liver	Heart	Liver	Heart
Linear range (µg mL ⁻¹)	0.47-3.76	0.24-1.18	0.36-2.89	0.18-0.90
Correlation coefficient (r ²)	0.9970	0.9991	0.9985	0.9989
LOD (µg g ⁻¹)	0.7	0.1	0.5	0.1
LOQ (µg g ⁻¹)	1.0	0.2	0.9	0.2
Precision (RSD, n=6)	8.8 % (4.70 µg/g) 20 % (1.18 µg/g)	9.5 % (2.35 µg/g) 13 % (0.24 µg/g)	5.1 % (3.61 µg/g) 24 % (0.90 µg/g)	14 % (1.80 µg/g) 20 % (0.18 µg/g)
Accuracy (n=6)	99,0% (fortification 4.7 µg/g, RSD= 9.3%)	102% (fortification 2.4 µg/g, RSD = 8.8%)	97,7% (fortification 3.6 µg/g, RSD= 5.2%)	99.5% (fortification 1.8 µg/g, RSD =3.5%)

The liver showed more interferents in the determination of both pyrethroids than that observed in the heart. Thus, it was necessary a higher dilute of the liver final extract leading a high values of LOQ and LOD when compared with the heart.

As presented in table 1, during the determination of permethrin, the precision of the method showed %RSD lower than 10% for 4.7 e 2.3 µg/g fortifications in liver and heart, respectively. Also, during the determination of deltamethrin the %RSD was lower than 10% in liver (fortification=5.1 µg/g). The value of RSD increases (13-24%) when the LOQ values of the method are used for the fortifications.

The calibration curves were linear in the concentration range tested. The correlation coefficients (r^2) were higher than 0.99 for the both pyrethroids.

3.2 Pyrethroids residues

The levels of pyrethroids daily oral administration for 28 days were not detected (below of detection limits – LOD). The results show that permethrin and deltamethrin didn't accumulate in the liver and heart of the animals that is in agreement with previous study (Kaneko et al., 1988). As reported by Hieder et al. (2001), deltamethrin is rapidly absorbed by the gastrointestinal tract when administered orally and quickly biotransformed in the liver of the mammals through the oxidation reaction and ester cleavage. The initial detoxification reaction is the cleavage of ester bond, probably by esterases, followed by hydroxylation reaction catalyzed by cytochrome P-450 and others conjugation reactions (Hieder et al., 2001). Deltamethrin is metabolized and its metabolites excreted over a period of days in rats (Anand et al., 2006).

Even with the electrocardiographic changes observed in the pyrethroids ingestion (Spencer et al., 2001; De la Cerda et al., 2002, Santos, 2008) no detectable residues were found in the heart of rats submitted an ingestion of 47.1 mg.kg^{-1} and 1.1 mg.kg^{-1} b.w/day of permethrin and deltamethrin, respectively.

Although Manna et al. (2004) have reported residues of α -cypermethrin in different tissues, including liver ($0.07 \pm 0.01 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$) and heart ($0.21 \pm 0.01 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$), their study didn't show the results of validation with the values of LOD and LOQ.

Since it was not possible to detect residues of pyrethroids in the tissues of the experimental rats the supplementation of the diet with cellulose and pectin didn't affect the results of this study.

4. Conclusions

The present study didn't detect residues of permethrin and deltamethrin in liver and heart samples because of the limitations of the method. The use of ECD detector requires an important step of clean up, as the electrophilic compounds are very sensitive. On the other hand, the liver has many interferents that difficult the high concentration of the extract in the equipment.

5. References

Akre CJ, MacNeil JD. 2006. Determination of eight synthetic pyrethroids in bovine fat by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of AOAC International* 89 (5): 1425-1431.

Anand SS, Bruckner JV, Haines W.T, Muralidhara S, Fisher JW, Padilla S. 2006. Characterization of deltamethrin metabolism by rat plasma and liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212: 156-166.

Chen Z-M, Wang Y-H 1996. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. *Journal of Chromatography A* 754: 367-395.

De La Cerda E, Navarro-Polanco RA, Sánchez-Chapula JA 2002. Modulation of cardiac action potential and underlying ionic currents by the pyrethroid insecticide deltamethrin. *Archives of Medical Research* 33: 448-454.

Hieder AF, Hirsch-Ernst KI, Bauer D, Kahl GF, Desel H 2001. Induction of cytochrome P450 2B1 by pyrethroids in primary rat hepatocyte cultures. *Biochemical Pharmacology* 62: 71-79.

Ikegami S, Umegaki K, Kawashima Y, Ichikawa T 1994. Viscous indigestible polysaccharides reduce accumulation of pentachlorobenzene in rats. *The Journal of Nutrition* 124(5): 754-760.

Kumari B, Madan VK, Kathpal TS 2006. Monitoring of pesticide residues in fruits. *Environmental Monitoring and Assessment* 123: 407-412.

León-González, ME. Plaza-Arroyo M, Pérez-Arribas LV, Polo-Díez LM. 2005. Rapid analysis of pyrethroids in whole urine by high-performance liquid chromatography using a monolithic column and off-line preconcentration in a restricted access material cartridge. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382: 527-531.

Manna S., Bhattacharyya D., Mandal T.K., Dey S. 2004. Neuropharmacological effects of deltamethrin in rats. *Journal of Veterinary Science* 7 (2), 133-136.

Narahashi T. 1996. Neuronal ion channel as the target sites of insecticides. *Pharmacology and Toxicology* 79 (1), 1-14.

Santos MAT. Efeito da pectina e da celulose na toxicidade de inseticidas piretróides sobre parâmetros eletrocardiográficos e morfológicos em ratos Wistar machos recém desmamados. Campinas, 2008. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Sarkar B, Chatterjee A, Adhikari S, Ayyappan S. Carbofuran- and cypermethrin-induced histopathological alterations in the liver of *Labeo rohita* (Hamilton) and its recovery. *Journal of applied ichthyology* 2005; 21: 131-135.

Sera N, Morita K, Nagasoe M, Tokieda H, Kitaura T, Tokiwa H 2005. Binding effect of polychlorinated compounds and environmental carcinogens on rice bran fiber. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16: 50-58.

Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171 (1):3-59.

Spencer CL, Yuill KH, Borg JJ, Hancox JC., Kozlowski RZ. 2001. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298 (3): 1067-1082.

56 Valentine, WM. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. 1990. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 20 (2):375-382.

Viran R, Erkoç FU, Polat H, Koçak O. 2003. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55: 82-85.

Ta CA., Zee JA., Desrosiers, T, Marin J, Lavallois P., Ayote P, Poirier G. 1999. Binding capacity of various fibre to pesticide residues under simulated gastrointestinal conditions. *Food and Chemical Toxicology* 37, 1147-1151.

Conclusões Gerais

Através do presente estudo pôde-se verificar que a ingestão diária dos inseticidas piretróides permetrina e deltametrina, durante 28 dias, levou ao aparecimento de alterações eletrocardiográficas nos animais experimentais em todos os parâmetros analisados. A adição de pectina na dieta foi efetiva na redução de grande parte das alterações elétricas do coração, no entanto, a celulose se mostrou ineficaz na proteção do organismo contra os efeitos cardiotoxicos atribuídos aos piretróides estudados.

Estudos morfológicos mostraram que o coração dos animais expostos aos piretróides manteve-se saudável, no entanto, o fígado, principal órgão de biotransformação de xenobióticos, apresentou alterações visíveis à microscopia ótica, principalmente após a administração de deltametrina. Também neste estudo, a fibra solúvel pectina misturada à dieta dos animais contribuiu para a diminuição dos efeitos hepatotóxicos. Assim, apesar das alterações hepáticas, o coração não se mostrou afetado morfológicamente sugerindo que os piretróides estudados agem, principalmente, na função elétrica do coração.

A determinação de resíduos de piretróides no fígado e coração dos animais experimentais tornou-se importante para a conclusão final deste trabalho. As fibras alimentares também foram utilizadas neste estudo, já que as informações entre a capacidade protetora das fibras em relação aos agrotóxicos são, ainda, bastantes escassas.

Os resultados revelaram que, apesar dos efeitos eletrocardiotóxicos verificados nos animais experimentais, não foi possível detectar resíduos de permetrina e deltametrina no coração dos ratos pelo método utilizado neste trabalho. Os piretróides administrados diariamente aos ratos também não foram detectados no fígado, já que a técnica apresenta algumas limitações.

A pectina fornecida junto com a dieta apresentou resultados satisfatórios na diminuição dos efeitos tóxicos causados no coração e fígado dos animais expostos a permetrina e deltametrina. No entanto, a fibra insolúvel celulose não reduziu as alterações cardíacas e hepáticas observadas nos ratos.

Devido à importância do uso de inseticidas no contexto agrícola e as vantagens atribuídas ao consumo de fibras, o presente trabalho contribui para aprimorar o conhecimento científico da ação dessas substâncias no organismo, estendendo novas descobertas em benefício da população.

Diante da escassez de dados que correlacionem os agrotóxicos e o consumo diário de fibras dietéticas, e com o intuito de melhorar ou prevenir danos à saúde humana, sugere-se a realização de estudos complementares.

Anexos: Resumos publicados em congressos

AÇÃO DOS INSETICIDAS PIRETRÓIDES PERMETRINA E DELTAMETRINA SOBRE PARÂMETROS ELETROCARDIOGRÁFICOS DE RATOS WISTAR JOVENS.

SANTOS, M. A. T. *; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Ciência de Alimentos - FEA, UNICAMP; Fisiologia e Biofísica - IB, UNICAMP.

Introdução: Os piretróides são inseticidas neurotóxicos que alteram o tempo de abertura dos canais de sódio durante a despolarização da membrana neural. Pouco se sabe sobre o efeito destes inseticidas sobre as propriedades eletrofisiológicas do músculo cardíaco. No entanto, pesquisas sugerem que alguns piretróides apresentam potencial arritmogênico em coração de mamíferos, uma vez que as células cardíacas são também ricas em canais de sódio e podem apresentar mecanismo de ação semelhante àquele observado nas células das membranas nervosas.

Objetivos: Avaliar o efeito dos inseticidas piretróides, permetrina e deltametrina, sobre parâmetros eletrocardiográficos de ratos jovens, em ensaio de exposição subcrônica.

Metodologia: Foram utilizados ratos Wistar machos, de 21 dias, divididos em três grupos de 20 animais. Após período de adaptação de 07 dias os grupos experimentais receberam 47,1 mg/kg/pc de permetrina (Grupo B) e 1,1 mg/kg/pc de deltametrina (Grupo C), valores correspondentes a 1/10 da DL50. Os piretróides dissolvidos em óleo de milho foram administrados aos animais por gavagem na dose de 0,5 ml, uma vez ao dia durante, 28 dias. Estudos paralelos foram conduzidos com um grupo controle (Grupo A) que recebeu apenas óleo de milho, nas mesmas condições que os outros grupos experimentais. Todos os animais receberam dieta comercial e água *ad libitum*. Após 28 dias, os animais foram anestesiados com barbiturato de sódio (50 mg/kg/pc) injetado intraperitonealmente permanecendo em posição supino para o registro eletrocardiográfico. O eletrocardiograma (ECG) foi realizado com fixação subcutânea de eletrodos em equipamento computadorizado (Heart Ware Systems) considerando-se as seis derivações periféricas (I, II, III, aVR, aVL, aVF).

Resultados: Com relação ao ECG, os inseticidas promoveram efeito cronotrópico negativo, prolongamento do intervalo PR e do complexo QRS, sugerindo retardo na

condução dos estímulos dos átrios para os ventrículos. Além disso, o prolongamento dos intervalos QT e QTc indicaram retardo no processo de despolarização e repolarização ventricular sugerindo risco de morte súbita. O complexo QRS apresentou maior prolongamento somente nos animais que receberam deltametrina. **Conclusão:** Os resultados experimentais indicam que os piretróides permetrina e deltametrina apresentaram efeitos cardiotoxícos caracterizados por alterações eletrocardiográficas de risco de morte súbita.

Apoio Financeiro: CNPq

PROTECTING CAPACITY OF PECTIN TO PYRETHROIDS ORALLY ADMINISTERED IN HISTOLOGICAL CHANGES. SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Food Science Department – Food Engineering Faculty, UNICAMP, Physiology and Biophysics Department – Biological Institute, UNICAMP

Introduction: Pyrethroids insecticides are neurotoxicants that exerts potent actions on neuronal sodium channels thereby causing symptoms of poisoning in animals. Studies observed that pyrethroids cause histological changes from animals poised with cronical and subcronical doses. However, few investigators studied the relationship between fiber consumption and the histological changes. Pectin soluble fiber has showed protective effects against a range of chronic diseases.

Objectives: This study aims to investigate whether pectin protects the heart and liver tissues of rats submitted to permethrin and deltamethrin orally administered.

Methods: Three groups of 20 male Wistar rats, 4 weeks, were used in this experiment. After the adaptation period of 7 days, the experimental groups received 47.1 mg/kg b.m of permethrin and 1.1 mg/kg b.m of deltamethrin, values corresponding of the 1/10 LD50. The insecticides were dissolved in corn oil and administered orally (5 ml/kg) via gavage, as one single dose. Rats serving as control received 5 ml/kg b.m of corn oil in the same manner. The control animals were fed with commercial diet and the experimental groups received diets added with 5% of pectin. The groups were watered *ad libitum*. The heart and liver for histological studies were taken 28 days after the experiment. For light microscopy, the material was embedded in paraffin and 6 µm thick sections were stained with hematoxylin and eosin.

Results: The heart histological analysis of all animals groups showed complete cells, central and irregular nucleus, characteristics of normal myocytes. The muscles fibers have normal transversal striations and no changes were observed .in nucleus and intercaled discs. The liver of control rats showed complete hepatocytes with one or two regular nucleus, normal cytoplasm and Kupffer cells localized between hepatocytes and sinusoids. In the liver of rats exposed a deltamethrin, inflammatory cells infiltrations were present around the hepatic veins. Irregular hepatocytes, cytoplasmatic changes and irregular granular and condensed nucleus with indefinite nucleolus could be observed. The liver histological analysis of permethrin group showed the same aspects as

deltamethrin group, except the inflammatory infiltrations. However, the pectin in the diet reduced all the histological changes observed in the groups fed only with commercial diet. Apparently, the reduction of cytoplasmatic changes from pectin diet showed highest in deltamethrin group.

Conclusion: No changes were noted in the heart tissue. The diet enriched with pectin did a protect effect against hepatotoxic action of the pirethroids studied.

Acknowledgements CNPq

EFFECT OF PECTIN IN ELETROCARDIOGRAPHICS CHANGES INDUCED BY PERMETHRIN AND DELTAMETHRIN IN WISTAR RATS. SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Food Science Department – Food Engineering Faculty, UNICAMP, Physiology and Biophysic Department – Biological Institute, UNICAMP.

Introduction: Pyrethroids insecticides modify neuronal and cardiac sodium channels, inducing persistent, steady-state sodium current at depolarized membrane potential. Researches suggest that some pyrethroids have arrhythmogenic potential in mammalian heart because cardiac myocytes are also rich in sodium channels. On the other hand, pectin fiber can reduce the gastrointestinal absorption of nutrients and toxic substances.

Objectives: Investigate effects of pectin on permethrin and deltamethrin action, considering rats' eletrocardiographics parameters.

Methods: Three groups of 20 male Wistar rats, 4 weeks, were used in this experiment. After the adaptation period of 7 days, the experimental groups received 47.1 mg/kg b.m of permethrin and 1.1 mg/kg b.m of deltamethrin, values corresponding of the 1/10 LD50. The insecticides were dissolved in corn oil and administered orally (5 ml/kg) via gavage, as one single dose. Rats serving as control received 5 ml/kg b.m of corn oil in the same manner. The control animals were fed with commercial diet and the experimental groups received diets added with 5% of pectin. The groups were watered *ad libitum*. After 28 days, the animals were anesthetized with intraperitoneal injection of sodium barbiturate (50 mg/kg b.m). The animals were placed in the supine position, with the legs gently extended; electrodes were placed subcutaneously for the eletrocardiographics register, recorded using Heart Ware Systems Equipament and considering standard ECG derivation (I, II, III, aVR, aVL, aVF). **Results:** The insecticides decreased the heart rate and prolonging of PR interval, QRS complex and QT and QTc intervals. **Conclusion:** The results showed that permethrin and deltamethrin are cardiotoxics, maybe because of the inhibitory effects in sodium channels that are responsible of the negative chronotropism and decrease the atrium to ventricle electric stimulus conduction, besides the ventricular polarization and depolarization. The pectin protected the heart of the toxic effects provoked by these insecticides, reducing the subit death risk.

Acknowledgements CNPq

COMPARISON OF PROTECTIVE EFFECTS OF PECTIN AND CELLULOSE IN ELECTROCARDIOGRAPHICS CHANGES INDUCED BY PYRETHROIDS IN WISTAR RATS

M.A.T. Santos¹, M.A. Areas², F.G.R. Reyes¹

1FEA, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil

2IB, UNICAMP, Campinas SP, Brazil

Email: monicas@fea.unicamp.br

Pyrethroids act primarily on the neuronal sodium channels, inducing persistent and steady-state sodium current at depolarized membrane potential. Cardiac myocytes are rich in sodium channels and cardiovascular manifestations can accompany pyrethroids exposure. This work studied the effects of pectin and cellulose on pyrethroids action, considering electrocardiographic parameters. Five groups of 10 male Wistar rats, 4 weeks old, were used. After the adaptation period (7 days), the experimental groups received 47.1 mg/kg b.w/day of permethrin and 1.1 mg/kg b.w/day of deltamethrin corresponding to 1/10 of LD50. The insecticides were dissolved in corn oil and administered orally (5mL) by gavage. Rats serving as control received 5 mL of corn oil. All animals had free access to commercial food and water. The experimental groups were fed with diet added of 5% of pectin or 5% of cellulose. After 28 days, the animals were anesthetized with intraperitoneal injection of sodium barbiturate (50 mg/kg b.w). The animals were placed in the supine position and electrodes were placed subcutaneously in the limbs for the electrocardiographic registration. The insecticides showed to be cardiotoxic, probably because of inhibitory effect on sodium channels, which are responsible for the negative chronotropism, decreasing the atrium to ventricle electric stimulus conduction and the ventricular polarization and depolarization. Pectin, but not cellulose, showed a protective action of the heart against the toxic effects induced by the pyrethroids.

Acknowledgements CNPq