



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA

Sarana Héren Pereira Ribeiro

EFEITOS ISOLADOS DE CIPERMETRINA E METOMIL NA MICROBIOTA HU-
MANA

Vitória de Santo Antão
2016

Sarana Héren Pereira Ribeiro

EFEITOS ISOLADOS DE CIPERMETRINA E METOMIL NA MICROBIOTA HUMANA

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde e Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Binda

Co-orientadora: Profa. Dra. Idjane Santana

Vitória de Santo Antão

2016

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Ligia F. dos Santos, CRB4-2005

R484e Ribeiro, Sarana Héren Pereira.

Efeitos isolados de cipermetrina e metomil na microbiota humana./ Sarana Héren Pereira Ribeiro. - Vitória de Santo Antão, 2016.

46 folhas; tab., graf., quadro, fig.

Orientador: Alexandre Havt Binda.

Coorientadora: Idjane Santana.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2016.

Inclui referências e anexo.

1. Bactérias. 2. Fungos. 3. Agroquímicos I. Binda, Alexandre Havt (Orientadora). II. Idjane Santana (Coorientadora). III. Título.

579 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-075/2017

Sarana Héren Pereira Ribeiro

EFEITOS ISOLADOS DE CIPERMETRINA E METOMIL EM MICRO-ORGANISMOS DA MICROBIOTA HUMANA

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Aprovado em: 31/03/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Cristiano Aparecido Chagas (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Christine Lamenha Luna Finkler (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Fábio Marcel da Silva Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

A Deus, o autor da vida e quem nos dá a ciência; O grande autor da minha fé!
À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me sustém desde o ventre da minha mãe e me capacita a cada dia.

Meu eterno e querido Pai, toda honra e toda glória sejam dadas a Ti!

Aos meus pais, por terem me ensinado os caminhos do Senhor; por todos os esforços dispensados a mim e à minha formação.

Às minhas irmãs e cunhados, pela prontidão em ajudar, pelo auxílio e incentivo de sempre.

Ao meu marido, por todo amor, carinho e paciência diariamente (indispensáveis em todos os momentos tranquilos ou de tensão).

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (UFPE-CAV), que dispensaram sua ajuda e apoio durante esta trajetória.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), com evidência na pessoa da Professora Lauren, pelo apoio na realização de grande parte dos experimentos, disponibilizando o Lab NB2.

Aos técnicos Isaac e Aldenise, do CETENE, por toda ajuda e prontidão em todos os momentos.

A Danielle Feijó e Diego Leandro, meu sincero reconhecimento pela acolhida, pelo apoio, pela bela caminhada juntos para obtenção dos títulos de mestres e, ainda, pela mais bela parceria juntos nos caminhos da amizade.

Ao Professor Alexandre Havt Binda, meu orientador, por suas ricas contribuições. À Professora Idjane Santana, minha co-orientadora, pelo suporte, apoio, paciência e compreensão ofertados em todo o percurso da obtenção do título de Mestre.

Ao Professor Cristiano Chagas pelas constantes e imensas solicitude e atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela viabilização da pesquisa, através da concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

O Brasil é o maior consumidor de pesticidas. Cipermetrina é um pesticida no grupo dos piretróides, altamente tóxico (classe II). Metomil é um metilcarbamato, extremamente tóxico (classe I). Ambos são credenciados para uso em várias culturas e diversos resíduos de agrotóxicos têm sido encontrados nos alimentos, dos mais variados tipos, no Brasil. Isto levanta o problema que envolve o consumo desenfreado de pesticidas e seus efeitos sobre a microbiota humana. A colonização adequada da microbiota normal impede o adoecimento do organismo, por diversos mecanismos funcionais e de defesa que dependem da atuação de micro-organismos comensais. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos isolados da Cipermetrina e Metomil sobre a microbiota humana. Os testes realizaram-se com bactérias e leveduras comensais, utilizando espécies comuns da microbiota humana (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermond*). Para os testes foram usados métodos de microtitulação em caldo Mueller-Hinton (para bactérias) e caldo Saboreaud (para leveduras), conforme norma técnica da ANVISA. Cipermetrina e Metomil provaram ser capazes de destruir esses micro-organismos. A ênfase é sobre cipermetrina, cujas concentrações bactericida (0,03 mg) e fungicida (0,03 mg) ficaram muito próximas à Ingestão Diária Aceitável (IDA) estabelecida pela ANVISA (0,05 mg/ kg peso). Portanto, os níveis de consumo de cipermetrina estabelecidos como ingestão segura podem gerar riscos para a saúde. Não se exclui o risco do Metomil que, com ação microbicida em concentrações maiores, é igualmente comprometedor, porque as doses bactericidas e fungicidas também se aproximaram de sua IDA.

Palavras-Chave: Bactéria. Fungo. Agrotóxico.

ABSTRACT

Brazil is the largest consumer of pesticides. Cypermethrin is a pesticide in the highly toxic (Class II) pyro-trophic group. Methomyl is an extremely toxic methylcarbamate (class I). Both are accredited for use in several crops and various agrotoxic residues have been found in foods in Brazil. This raises the problem that involves the uncontrolled consumption of pesticides and their effects on a human microbiota. An adequate colonization of the normal microbiota prevents the organism from becoming diseased, through several functional and defense mechanisms that depend on the performance of commensal microorganisms. The objective of this study was to evaluate the isolated effects of Cypermethrin and Methomyl on a human microbiota. The tests were carried out with bacteria and commensal yeasts, using common species of the human microbiota (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermond*). For the tests, microtiter methods were used in Mueller-Hinton broth (for bacteria) and Saboreaud broth (for yeasts), according to the ANVISA technical standard. Cypermethrin and Metomil proved to be capable of destroying these microorganisms. The emphasis is on cypermethrin, whose bactericidal (0.03 mg) and fungicidal (0.03 mg) were very present in the Acceptable Daily Intake (ADI) established by ANVISA (0.05 mg / kg bw). Therefore, the levels of cypermethrin consumption established as safe intake may lead to health risks. The risk of Metomil, which with the bactericidal and fungicidal doses also approached its ADI, is not excluded.

Keywords: Bacteria. Fungus. Pesticide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural de Cipermetrina.	19
Figura 2 - Fórmula estrutural de Metomil.	21
Figura 3 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura de <i>E. coli</i> .	25
Figura 4 - <i>Staphylococcus aureus</i>	26
Figura 5 - Formação de pseudo-hifas por células de <i>C. albicans</i> .	27
Figura 6 - Ação isolada de Cipermetrina e Metomil frente à bactéria Gram positiva <i>S. aureus</i> .	45
Figura 7 - Ação isolada de Cipermetrina e Metomil frente à bactéria Gram positiva <i>E. coli</i> .	45
Figura 8 - Ação isolada de Cipermetrina e Metomil frente a <i>C. albicans</i>	46
Figura 9 - Ação isolada de Cipermetrina e Metomil frente a <i>C. tropicalis</i> .	46
Quadro 1 - Classificação dos agrotóxicos.	19
Quadro 2 – Algumas espécies bacterianas comumente encontradas no corpo humano.	24
Gráfico 1 - Comparação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Cipermetrina para <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> e sua Ingestão Diária Aceitável (IDA).	32
Gráfico 2 - Comparação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Cipermetrina para as espécies de <i>Candida</i> e sua Ingestão Diária Aceitável (IDA).	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima de Cipermetrina e Metomil para espécies bacterianas da microbiota humana pelo método de microtitulação em caldo Mueller-Hinton. 31

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima de Cipermetrina e Metomil para espécies de leveduras da microbiota humana pelo método de microtitulação em caldo Sabouraud. 31

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DL ₅₀	Dose Média Letal
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
IDA	Ingestão Diária Aceitável
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
TTC	Trifeniltetrazólio
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFPEDA	Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1.2 Objetivo	14
1.2.1. Objetivo geral	14
1.2.2. Objetivos específicos	14
1.3 Revisão da Literatura	15
1.3.2 Cipermetrina	19
1.3.3 Metomil	20
1.3.4 A microbiota humana	22
1.3.4.1 Bactérias da microbiota humana	24
1.3.4.2 Fungos da microbiota humana	26
CAPÍTULO 2	29
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	39
ANEXO A – FIGURAS	45

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

É cada vez mais evidente a exigência do mercado consumidor quanto à qualidade, aparência e produtividade de hortaliças e frutas. Mazoyer e Roudart (2010) indicam que o mundo passou pela “Primeira Revolução Agrícola Moderna” em meados dos séculos XIV e XIX, que teve como resultado substituição dos sistemas que trabalhavam na lógica do repouso das terras para ficarem mais férteis (*pousio*), para técnicas mais intensas. Pouco depois, início do século XX, alguns componentes químicos foram descobertos e usados de maneira intensa.

Segundo Graziano da Silva (1981), a agricultura se tornou um “setor subordinado ao capital”. Este fato é a grande preocupação, pois há enorme cobiça de produção em escala industrial e as pragas agrícolas geram muitas perdas e consequentes prejuízos financeiros. Nesta lógica, o Brasil tornou-se um dos maiores produtores de alimentos do mundo. Estima-se que na safra 2023/2024 o Brasil ultrapasse a marca de 250 milhões de toneladas produzidas. (BRASIL, 2014). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2015), o Brasil consome em média 5,2 kg de agrotóxicos por habitante por ano, conquistando assim o primeiro lugar do ranking mundial de consumo de agrotóxicos.

Resultado do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA, 2012) evidenciaram que existem amostras que excedem as quantidades estabelecidas como limite máximo permitido, assim como constatou-se presença de resíduos de substâncias não autorizadas. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, 2013), Associação Brasileira de Saúde coletiva (ABRASCO, 2015) e Instituto Nacional do Câncer (INCA 2015) têm alertado quanto ao risco de desenvolvimento de variados tipos de câncer em consequência do uso indiscriminado de agrotóxicos.

Ainda segundo o INCA (2015), os efeitos maléficos dos agrotóxicos também incluem infertilidade, impotência sexual, abortos, malformações, neurotoxicidade, alterações hormonais, além de efeitos sobre o sistema imunológico. Outro alerta é que os resíduos não encontram-se apenas nos alimentos *in natura*. Incluem-se na lista de preocupações, portanto, alimentos processados pela indústria e que fazem uso de ingredientes como trigo, milho e soja; exemplos deste tipo de alimentos são biscoitos, salgadinhos, pães, cereais matinais, lasanhas, pizzas, e afins. Carnes e leites

de animais podem apresentar resíduos se forem animais que se alimentem de ração com traços de agrotóxicos (INCA, 2015).

Entre tantos alimentos contaminados, há também o leite materno, o que tem gerado inúmeras discussões e preocupações no ramo da saúde humana desde o ano de 2011, quando foi publicado o estudo da pesquisadora Danielly Cristina de Andrade Palma, provando a existência de resíduos de agrotóxicos no leite humano de mães residentes em Lucas do Rio Verde – MT.

Os micro-organismos da nossa microbiota em geral apresentam efeito protetor. Mas, quando transferida de um local para outro do corpo, podem causar infecção. Devido às inúmeras infecções que têm afetado o ser humano, assim como as mortes causadas por elas, os micro-organismos, constantemente, são vistos apenas por sua patogenicidade.

Define-se patogenicidade como “a capacidade de um micro-organismo causar doença”. Os micro-organismos causadores de doenças diferenciam-se dos demais da mesma espécie por expressarem genes codificadores de virulência. Ou seja, alguns aspectos favorecem sua colonização e outros afetam a fisiologia do hospedeiro, resultando no surgimento de sintomatologia que define o estado de adoecimento (VIEIRA, 2009).

Os micro-organismos exercem função fundamental no organismo humano quando há um equilíbrio nesta relação comensal. Pasteur, em 1885, expressou-se de forma a acreditar que sem os micro-organismos a vida seria impossível (TANNOK, 2005). Em experimentação animal com indivíduos chamados *germfree* (livres de bactérias), a teoria de Pasteur não se confirmou, pois os animais sobreviveram. Entretanto, houve variados prejuízos no desenvolvimento da imunidade destes animais. A flora bacteriana intestinal normal protege o hospedeiro contra a instalação de agentes patogênicos. Esse fenômeno de rejeição dos microorganismos exógenos é denominado efeito de eliminação ou de barreira. (ANDRADE et al., 2002).

De acordo com estudos recentes, a microbiota intestinal (cólon) desempenha função vital na saúde humana (TANNOK, 2005). Bactérias intestinais agem em nutrientes e permitem maior aproveitamento intestinal. Acontece com substratos que, ao chegarem ao lúmen do cólon, ainda não foram digeridos. A esse processo dá-se o nome de salvamento energético. Através disto, formam-se os ácidos graxos de cadeia curta. Estes são a principal fonte de energia para as células do cólon e ainda

possuem efeito trófico no epitélio do intestino. Os micro-organismos colonizadores do cólon também desempenham importante papel na síntese de vitamina K (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

As bactérias da microbiota também têm função primordial no intestino humano, impedindo que micro-organismos patogênicos se estabeleçam. O principal mecanismo para que isso ocorra é chamado de “resistência à colonização pelo efeito barreira mecânica”, que se concretiza através da ocupação de locais de adesão celular por parte da microbiota autóctone (TANNOK, 2005). Também há o efeito imunomodulador gerado pelo equilíbrio da microbiota. Ocorre que desde o período neonatal o estabelecimento destes micro-organismos exerce importante papel no desenvolvimento do tecido linfóide do intestino. A microbiota estimula o desenvolvimento do sistema imune e tem boas consequências em quadros de infecções, sejam agudas ou crônicas (YAMASHIRO et al., 2015).

A temática abordada levanta o problema relacionado ao uso de agrotóxicos. Hoje, tem-se o exagero no uso destes produtos para controle de pragas agrícolas, mas não o cuidado necessário com a saúde de quem os aplica e principalmente de quem os consome. Diante disto, a problemática dos efeitos destrutivos dos agrotóxicos à microbiota humana tem importância para ser pesquisada, uma vez que ao gerar danos a estes micro-organismos, causam-se malefícios ao hospedeiro de maneira sistemática, já que se trata de espécies que propiciam equilíbrio nutricional e imunológico ao hospedeiro.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos isolados de Cipermetrina e Metomil em micro-organismos da microbiota humana.

1.2.2. Objetivos específicos

- Verificar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e microbicida de Cipermetrina e Metomil isoladamente frente a espécies de bactérias da microbiota humana;

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e microbicida de Cipermetrina e Metomil isoladamente frente a espécies de *Candida*;

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Agrotóxicos: Histórico de uso, definição e classificação

Histórico de uso

Antes de findar a Segunda Guerra Mundial, algumas grandes empresas, vislumbravam a possibilidade de alta lucratividade com base na indústria agrícola. Isto resultou em investimentos em técnicas para o melhoramento de sementes e, então, para também culminar em grande retorno financeiro. Ao fim da Segunda Guerra, indústrias químicas iniciaram o processo de produção e incentivo ao uso de agrotóxicos de várias classes (herbicidas, fungicidas, inseticidas e outros) (ROSA, 1998).

O uso de agrotóxicos na agricultura teve início propriamente dito na década de 1950, acompanhado de adicionais, como fertilizantes, e outras tecnologias. Tudo isso gerou um amplo aumento na produtividade agrícola, chegando a atingir 250% de aumento de produção agrícola nos Estados Unidos da América (EUA) (WHEELER, 2002). Este fato ficou conhecido como “Revolução verde”, que surgiu embasada numa ideia de altos benefícios sociais, como erradicação da fome em decorrência de menores desperdícios e consequente aumento na oferta de alimentos. Com este fim, passou-se a produzir insumos de várias origens, inclusive química, para atuarem na agricultura. Isto resultou em limites de produção cerca de 30 anos após o início da chamada “revolução verde”, além de identificação dos impactos gerados no meio ambiente (ALBERGONI; PELAEZ, 2007).

Na intenção de melhorar e/ou aumentar a qualidade da produção, é empregado o controle de doenças de plantas. Essas medidas de controle precisam ser economicamente viáveis, tendo um custo de aplicação inferior aos prejuízos causados pela doença (KIMATI e BERGAMIN, 1996; AGRIOS, 1997). São agrupados de diferentes maneiras os métodos de controle para doenças de hortaliças. Patício (2007) aborda-os como convencionais ou alternativos.

Considerando a prática, os métodos convencionais, sobretudo os métodos de controle, utilizam agrotóxicos de agroquímicos, que são amplamente empregados no controle de doenças na parte aérea das plantas, bem como no tratamento de solos e substratos. Essa busca incessante por produtividade está vinculada ao uso de praguicidas. Não obstante, o excesso de agrotóxicos vem gerando sérios danos ao meio ambiente e, também, à saúde humana, no que tange a produtores e consumidores (EHLERS, 1999).

A agricultura, no Brasil, utilizava-se de famosos calendários fitossanitários, que eram distribuídos por vendedores de multinacionais. Eram bastante convincentes e continham orientações que tratavam do uso de agrotóxicos em diferentes estágios do desenvolvimento da planta, estando praguejada ou não. Logo, as autoridades brasileiras permitiram que problemas decorrentes do mau uso de agrotóxicos surgissem no país. Nos anos 60, houve o primeiro caso de repercussão nacional, em que várias pessoas morreram no Estado de São Paulo, por consumirem hortaliças pulverizadas com fungicidas à base de mercúrio (DE MOURA, 2014).

O Brasil ainda é um dos principais consumidores de praguicidas do mundo; perde apenas para os Estados Unidos da América (EUA), que ocupam o segundo lugar e para França e Japão, que lideram juntos os ranking mundial de uso de agrotóxicos. No período compreendido entre 1985 e 1993, o Brasil computou 22.499 casos de intoxicação por praguicidas, com um total de 742 mortes (TAGLIARI, 2005).

A descoberta das propriedades do praguicida Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT), em 1939, revolucionou no controle de pragas. Unindo baixo custo e alta eficiência, passou a ser utilizado no Brasil e no mundo. Em 1945, começa a ser produzido em larga escala e, durante 25 a 30 anos, foi utilizado como praguicida na agricultura (AMATO et al., 2002). O histórico do DDT se assemelha com a história geral dos agrotóxicos (BORGES, 2011). Até a descoberta do DDT, dois tipos de inseticidas eram conhecidos (os produzidos com arsênio e os extraídos de plantas). Os agrotóxicos produzidos com arsênio tinham toxicidade elevada para humanos, além da persistência no meio ambiente. Os que eram extraídos de plantas perdiam rapidamente a sua eficiência (JARDIM, et al., 2009).

O cientista Paul Hermman Müller ganhou o prêmio Nobel da Medicina e Fisiologia pela descoberta do potencial inseticida do DDT. O DDT, na Segunda Guerra Mundial, foi utilizado para combater pulgas. Em 1945, começou ser utilizado como agrotóxico, bem como no combate à malária e ao tifo. Chegou a ser considerado

como algo seguro, passível, inclusive, de ser ingerido. Posteriormente, percebeu-se que a eficácia do DDT estava diminuindo, o que culminou no aumento das doses por parte dos agricultores. Resulta que esta trajetória levou ao aparecimento dos problemas relacionados à toxicidade do produto (BORGES, 2011).

Só em 1962, com a publicação do livro “Primavera Silenciosa”, Rachel Carson (autora) sugere que esteja relacionada ao uso indiscriminado do DDT a redução significativa na população de diversas aves, muitas delas componentes do topo da cadeia alimentar. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), só em 1985 ocorreram 3 milhões de intoxicações agudas por pesticidas, resultando em 220 mil mortes (TAGLIARI, 2005).

Definição

A Lei Federal nº 7.802/89 (regulamentada pelo decreto nº 4.074/2002), em seu artigo 2, inciso 1, conceitua agrotóxico como um

produto e componente de processos físicos, químicos ou biológicos destinado ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Os agrotóxicos podem, basicamente, ser classificados segundo a natureza da praga a ser controlada, quanto ao grupo químico e ainda quanto à toxicidade humana (PERES, 2001; SMIDT, 2001).

Classificação

Quanto à natureza da praga

- I. Inseticidas – utilizados no combate a insetos, inclusive em sua forma de larva.
- II. Fungicidas – combatem fungos patógenos à plantação.
- III. Herbicidas – controlam o crescimento de plantas invasoras.
- IV. Desfoliantes – combatem folhas não desejáveis.
- V. Fumigantes – combatem insetos e bactérias do solo, através de gases.

- VI. Rodenticidas / Raticidas – combatem roedores / ratos.
- VII. Moluscocidas / Molusquicidas – combatem moluscos, especialmente caramujos transmissores da esquistossomose.
- VIII. Nematicidas - têm ação de combater nematoides.
- IX. Acaricidas – Combatem os ácaros.

Quanto ao grupo químico:

- I. Organoclorados – São compostos formados de carbono, com radicais de cloro. Derivam do clorobenzeno, ciclo-hexano ou do ciclodieno. Atualmente, têm uso restrito ou, até mesmo, proibido. O DDT é um exemplo deste grupo.
- II. Organofosforados – Também formados à base de carbono, estes compostos derivam do ácido fosfórico, tiofosfórico ou ditiofosfórico.
- III. Carbamatos – São derivados do ácido carbâmico.
- IV. Piretroides – Estes compostos sintéticos se assemelham estruturalmente à piretrina, substância encontrada nas flores do *Chrysanthemum cinerariifolium*, popularmente conhecida como “flor de crisântemo”.

Quanto à toxicidade humana:

A maioria dos agrotóxicos tem sua toxicidade expressa de acordo com a Dose Média Letal (DL₅₀) por via oral. A representação é feita por meio de miligramas (mg) do produto ativo por quilograma (kg) de peso vivo, capaz de eliminar 50% da população do animal testado. De acordo com a DL₅₀, são tomadas as medidas de segurança cabíveis para reduzir os riscos deste produto frente à saúde humana. (EMBRAPA). De acordo com a resolução 4.074/2002, que regulamenta a Lei Federal dos Agrotóxicos, os agrotóxicos devem receber em seu rótulo marcação com cores indicativas de sua classificação toxicológica.

Diante disto, os agrotóxicos classificam-se:

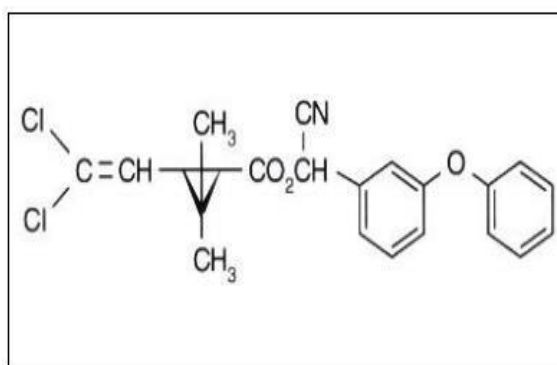
Quadro 1 - Classificação dos agrotóxicos.

Classe I	Extremamente tóxico	Vermelho vivo
Classe II	Altamente tóxico	Amarelo intenso
Classe III	Medianamente tóxico	Azul intenso
Classe IV	Pouco tóxico	Verde intenso

1.3.2 Cipermetrina

Cipermetrina é um agrotóxico do grupo dos piretroides e tem classificação toxicológica II (altamente tóxico) (Figura 1); A Ingestão Diária Aceitável (IDA) deste composto é estabelecida em 0,05 mg/kg p. c. (peso corporal). Sua modalidade de emprego é aplicação foliar em culturas diversas, tais como algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, citros, ervilha, feijão, feijão-vagem, fumo, mandioca, melancia, milho, pepino, repolho, soja e tomate. Também se aplica no solo quando se trata de cultivo de fumo, além de ser aplicado contra formigas (ANVISA, 2010).

Figura 1 - Fórmula estrutural de Cipermetrina.



Fonte: Portal ANVISA.

Ensaio laboratoriais ainda têm evidenciado que estes compostos (piretroides) são bastante tóxicos para alguns organismos, como peixes, abelhas e artrópodes aquáticos, como camarões e lagostas. Assim sendo, há a possibilidade de agirem

em espécies outras à medida que se expõem acidentalmente na aplicação do produto ou mesmo pela ingestão de alimentos contaminados (SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

Piretroides derivam, por via sintética, das piretrinas. Piretrinas consistem em ésteres tóxicos que são isolados de flores de *Chrysanthemum (pyrethrum) cinerariaefolium* (SANTOS; AREAS; REYES, 2007). Ao serem descobertas, as piretrinas foram muito utilizadas, pois apresentavam uma ampla ação diante de vários insetos e baixa toxicidade para mamíferos. Contudo, as piretrinas naturais eram bastante instáveis quando expostas à luz solar e ao ar. Este fato culminava em redução da sua eficácia (CHEN; WANG, 1996).

Com o intuito de serem obtidas substâncias com maior estabilidade que as piretrinas, houve sua mudança estrutural, mas de modo que se mantivesse a eficácia. Logo, surgiram os piretroides sintéticos, que passaram a ser utilizados na agricultura a partir da década de 1970. Para tal, foram incluídos átomos de nitrogênio, enxofre e, também, átomos de halogênios às piretrinas. Isto solucionou o problema que havia com a estabilidade deste composto em sua forma natural. Tais compostos têm ação em insetos, causando um efeito de choque “Know Down”, caracterizado por paralisia imediata e morte (PIMPÃO, 2012).

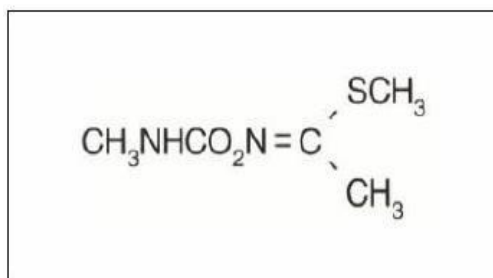
Os piretroides, bem como outros agrotóxicos, podem ser utilizados como padrão no meio ambiente para estudos ecotoxicológicos. Isso se dá por sua contaminação em ar, terra e água. Além disso, provocam efeitos adversos, atingindo desde bactérias até o ser humano (GRISOLIA, 2005). A taxa de envenenamento por piretroides é baixa, mas a ingestão destes compostos por seres humanos pode levar a efeitos cujos sinais e sintomas aparecem em pouco tempo (minutos): Dor de garganta, náuseas, vômitos e dores na região do abdome, além de úlceras bucais, elevação na quantidade de secreções e dificuldade para deglutir. Os efeitos sistêmicos podem aparecer num período compreendido em 4 a 48 horas após o momento de exposição ao agrotóxico. São eles: tonturas, cefaleia e fadiga, que podem evoluir ao nível de coma e convulsões (BRADBERRY et al., 2005).

1.3.3 Metomil

Metomil também é amplamente utilizado como inseticida e acaricida e pertence ao grupo químico Metilcarbamato de oxina, de classe toxicológica I (extremamente tóxico) (Figura 2). Sua IDA é de 0,02 mg/kg p. c. Esse praguicida é utilizado

em aplicação foliar em culturas de algodão, batata, brócolis, couve, milho, repolho, soja, tomate e trigo (ANVISA)

Figura 2 - Fórmula estrutural de Metomil.



Fonte: Portal ANVISA.

Os carbamatos compõem um grupo de inseticidas de destaque por seu amplo uso em todo o planeta. Originam-se das sementes da planta *Physostigma venenosum*, que é naturalmente africana. Essa planta é conhecida popularmente como “Feijão Calabar” e contém um éster metilcarbamato denominado fisostigmina (BARON, 1991). Como principais características, os carbamatos têm alta atividade inseticida, baixa ação residual e, em comparação com os derivados fosforados, têm baixa toxicidade a longo prazo (MÍDIO; SILVA, 1995).

A exposição dérmica a carbamatos se agrava quando o indivíduo está sob temperatura ambiente elevada (CALDAS, et al., 2000). Caldas e seus colaboradores (2000) ainda afirmam que de maneira experimental algumas quantidades consideráveis de carbamatos e/ ou seus metabólitos são encontradas no leite materno de mulheres expostas a estes compostos. E, também, pode-se esperar que haja resíduos destes agrotóxicos em produtos comestíveis se foram “tratados” com este inseticida.

Entre o grupo dos carbamatos, o metomil é um dos mais utilizados. Foi introduzido em 1996 pela Du pont como inseticida com grande poder de alcance. (Du pont, 2008). Utiliza-se metomil como acaricida, controle de insetos e aranhas, tratamento foliar de frutos vegetais e no cultivo de algodão, bem como inseticida de contato (mata em contato direto com as espécies-alvo) e como inseticida sistêmico (é absorvido da aplicação foliar ou aplicação no solo e é transportado para outras porções da planta) (HARTLEY; KIDD, 1993).

Em meio aquoso, o metomil se decompõe de maneira mais rápida sobre aeração; um pouco menos em luz solar ou em meio alcalino (FARRÉ et al., 2002).

Apesar de se conhecer sobre os efeitos dos agrotóxicos, de uma maneira geral na saúde humana, com sintomas que variam de intoxicações leves até lesões sistêmicas, não se sabe qual efeito sobre a microbiota humana, se bacteriostático ou bactericida.

1.3.4 A microbiota humana

Apesar de a grande maioria dos seres humanos perceberem as bactérias como seres potencialmente perigosos, poucas espécies causam o adoecimento do homem. Nos tecidos internos do corpo humano sadio, como sangue, cérebro, músculos e outros, normalmente não há colonização de micro-organismos. Em contrapartida, os tecidos superficiais, como pele e membranas mucosas, constantemente são colonizados por certas espécies microbianas (MISSAGHI et al, 2014).

A colonização do trato digestivo humano ocorre logo em seguida ao nascimento, momento em que deixa de ser estéril (Mc CRACHEN e LORENZ, 2000; NICOLI e VIEIRA, 2004). Um bebê leva de 6 meses a 2 anos para que a microbiota do trato digestivo tenha a mesma função e população que se encontra num adulto (NICOLI e VIEIRA, 2004).

Os micro-organismos componentes da microbiota normal podem receber benefícios do hospedeiro, como suplementação alimentar, meio ambiente estável, temperatura constante, proteção e transporte. Em troca, o hospedeiro (neste caso, o homem) obtém dos micro-organismos alguns benefícios nutricionais, assim como maturação do sistema imunológico e manutenção da permeabilidade da barreira intestinal. O benefício mais importante é a colonização bem adaptada da microbiota normal, que exclui micro-organismos patogênicos (WALLACE et al, 2014).

Há dois estágios pelos quais a microbiota humana passa após a fase de colonização do início da vida: o estágio da vida adulta, em que se encontra mais estável e complexa; e o estágio da vida senescente que, por razões pouco esclarecidas, a microbiota passa por alterações que resultam em menos complexidade e menor estabilidade (OBA et al., 2005).

A microbiota é variável de acordo com idade, sexo, dieta e temperatura. Pode ser autóctone (quando são constantes em um nicho específico) ou alóctone (também conhecida como “transiente”, pois constitui-se de micro-organismos esporádicos e acidentais, que não possuem local anatômico específico). O número de bactérias da microbiota é 10 vezes maior (10^4) que o número de células que formam os órgãos e tecidos de um ser humano adulto (10^3). Mais de 40% das fezes humanas úmidas constituem-se de células microbianas; o peso total da microbiota de um adulto pode atingir 1,2 kg (NICOLI e VIEIRA, 2004).

Como citado anteriormente, os micro-organismos pertencentes à microbiota autóctone têm um certo tropismo tecidual; residem em locais anatômicos específicos, como pele, trato respiratório, orofaringe, cavidade oral, trato gastrointestinal e outros. Ao passo em que se modificam os hábitos alimentares, de forma a atingir o padrão da fase adulta, também a microbiota intestinal é modificada. É evidente a interferência da dieta na microbiota do intestino. O esôfago de um adulto saudável contém microorganismos oriundos da deglutição de saliva e alimentos. No estômago há um número reduzido de micro-organismos, o que se justifica pela alta acidez gástrica que torna o ambiente hostil a esses micro-organismos. Ao se tornar o pH mais alcalino na altura do intestino, há um aumento gradual da microbiota residente (BERG, 1996).

Com o passar do tempo, foram descobertos fatos interessantes quanto às funções da microbiota intestinal. Há uma clara variabilidade na composição da microbiota humana. Mas, apesar disto, o seu potencial de funcionalidade permanece nitidamente estável (MORGAN et al., 2012)

Um adulto humano possui aproximadamente 2 m² de pele recobrindo seu corpo, e a densidade populacional dos micro-organismos da microbiota da pele varia de acordo com a localização (devido à umidade, axilas, virilha e áreas entre os dedos acumulam maior quantidade de bactérias; na maioria das vezes, os micro-organismos da pele são encontrados em superfícies da epiderme e partes superiores dos folículos pilosos). Nesses locais, *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus spp.* são encontradas normalmente. De mesmo modo, *S. epidermidis* são encontradas em densas colônias nas narinas, havendo, também, a presença de *S. aureus*, que corresponde a cerca de 20 % da população geral das narinas. Esta espécie também se

encontra em grande número na orofaringe, acompanhada de *S. epidermidis*. A cavidade oral é amplamente habitada por micro-organismos. As bactérias orais incluem estreptococos, lactobacilos, estafilococos, entre outras (SILVA e NEUFELD, 2006).

1.3.4.1 Bactérias da microbiota humana

As bactérias que compõem a microbiota humana apresentam uma certa preferência / predileção tecidual, o que se conhece por “tropismo tecidual”, conforme pode-se ver no quadro abaixo:

Quadro 2 – Algumas espécies bacterianas comumente encontradas no corpo humano.

BACTÉRIAS	PELE	NARIZ	FARINGE	BOCA	INTESTINOS
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	++
<i>S. epidermidis</i>	++	++	+	++	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+-	+-	+	++

Fonte: Adaptada de Silva e Neufeld, 2006.

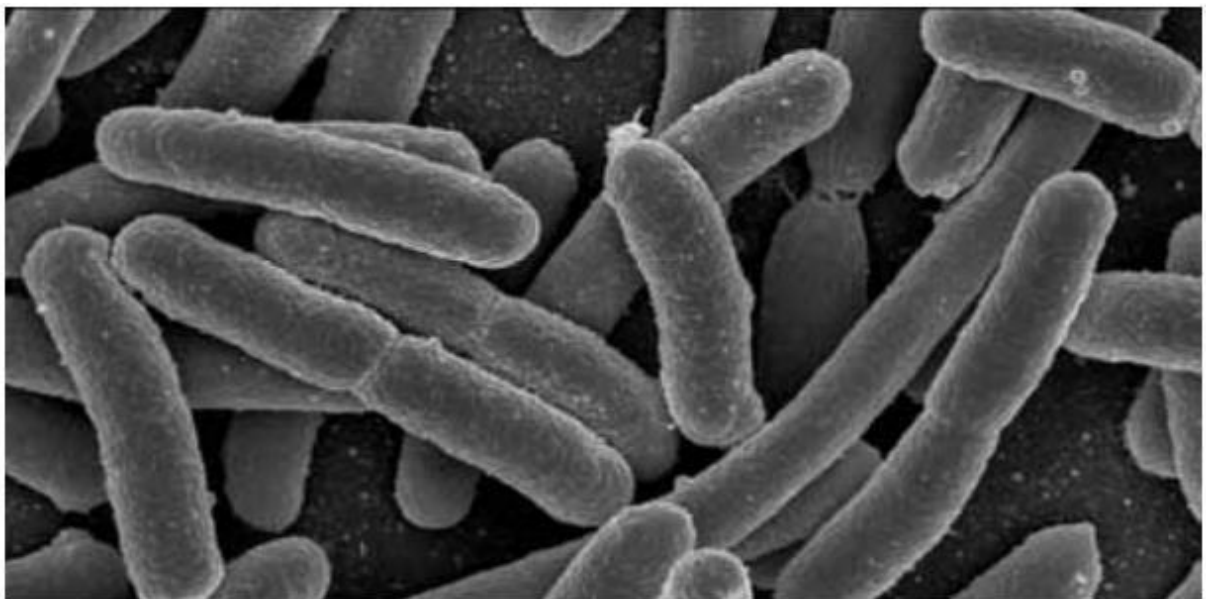
Uma das espécies mais comuns no trato intestinal dos seres humanos é a *Escherichia coli* (Quadro1) e, provavelmente, o micro-organismo mais conhecido no ramo da microbiologia. *E. coli* pertence à família das Enterobacteriaceae e tem reação Gram-negativa. Tem forma de bastonete (Figura 3) e, em condições específicas de ambientes em condições adversas, pode-se perceber uma cápsula formada por polímeros polissacarídicos que consiste numa importante forma de proteção, envolvida na formação de biofilme (TIBA et al., 2009).

Esta espécie é considerada habitante comensal do intestino de seres humanos saudáveis, assim como em inúmeras espécies animais. Entretanto, o desequilíbrio gera uma diversa quantidade de doenças, que podem ser caracterizadas em

simples doenças diarreicas ou até infecções mais severas extra-intestinais (DONNENBERG, 2002). Propõe-se que a origem patogênica de *E. coli* deriva da espécie comensal por um processo de aquisição cromossômica ou virulência extra-cromossomal (OCHMAN et al., 2004).

Escobar-Páramo et al. (2004) apresentaram como resultado de seu estudo que as localizações geográficas interferem na estruturação da população de *E. coli*. Em seu estudo, consideraram 10 populações que foram divididas em 2 grandes grupos, tomando como critério sua localização. Resulta que diferenças significativas entre as duas zonas foram encontradas: os indivíduos de regiões temperadas apresentaram população de *E. coli* significativamente maior em comparação aos de regiões tropicais.

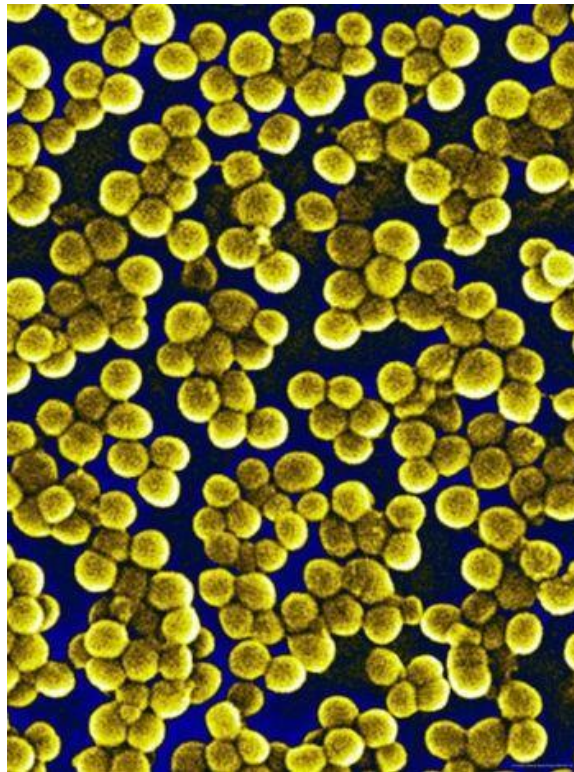
Figura 3 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura de *E. coli*.



Fonte: ALMEIDA-JÚNIOR; COSTA, 2009.

Já as bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos de reação Gram-positiva que podem aparecer isolados, em cadeias curtas, pareados, ou ainda em agrupamentos que muito se assemelham a cachos de uvas (Figura 4). *Staphylococcus* é um gênero pertencente à família *Micrococcaceae*. Desta família, fazem parte cerca de 33 espécies (SANTOS et al., 2007).

Figura 4 - *Staphylococcus aureus*



Fonte: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/>

Estafilococos crescem bem mesmo em condições de alta pressão osmótica e baixa umidade. Isto justifica seu crescimento e sobrevivência nas secreções nasais. Também explica o crescimento de *S. aureus* em alimentos como presunto e outras carnes embutidas (pressão osmótica elevada) ou mesmo em alimentos que têm uma tendência de inibição de outros micro-organismos por sua baixa umidade. É provável que o pigmento amarelo das colônias de *S. aureus* confira proteção quanto aos efeitos solares sobre micro-organismos (SILVA e NEUFELD, 2006).

1.3.4.2 Fungos da microbiota humana

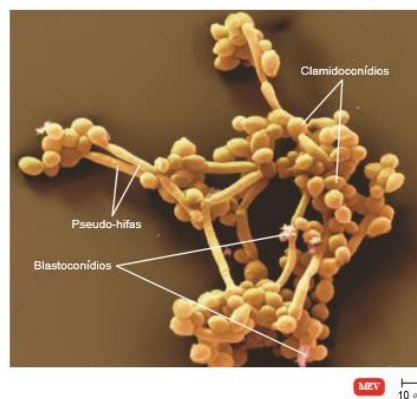
Fungos são classificados como micro-organismos eucariotos e reproduzem através de esporulação assexual ou sexual. Podem ser leveduriformes ou filamentosos e habitam em diversos tipos de substratos, devido a sua variabilidade enzimática (VIEGAS, 2010; TEPARELLO, 2010). O ser humano utiliza fungos como alimento (cogumelo) e para produzir outros alimentos, como pão, além da produção de drogas (álcool e penicilina) (VIEGAS, 2010). Os fungos são quimio-heterotróficos e, portanto,

necessitam de componentes orgânicos como fonte de energia e carbono (MIDGLEY et al., 1998).

Leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, e têm como característica parede celular rígida, organização de núcleo com membrana celular, heterotrofia e reprodução sexuada e assexuada (MEYER et al., 1998).

A porção responsável pela morfologia da célula é a parede celular. As espécies de *Candida* podem se multiplicar por gemulação (dá a forma oval à célula, conhecida como blastóporo ou blastoconídeo, que caracteriza a forma de levedura) ou podem produzir tubos germinativos. Isso faz com que a forma de levedura se converta e gere crescimento de micélio e, assim, produz hifas e pseudo-hifas (CARDOSO, 2004). A figura 5 ilustra essa capacidade inerente às leveduras.

Figura 5 - Formação de pseudo-hifas por células de *C. albicans*.



Fonte: TORTORA et al., 2012.

Este gênero também pode ter a característica de produzir clamidósporos (em condições menos favoráveis ao crescimento), que consistem em estruturas de formato esférico, com uma densa parede celular. Estas estruturas têm sua formação determinada por mudanças de características ambientais, o que significa dizer que conferem à levedura maior adaptação a diferentes nichos ecológicos (CHAPIN et al., 1998; BROWN, 2003).

As *Candidas* são leveduras que, naturalmente, colonizam o homem, ou seja, compõem a microbiota humana. Estão presentes em pele e mucosas do trato digestivo, e aparecem ainda em boca e vagina (SILVA, 2011).

Leveduras do gênero *Candida* podem ser isoladas da genitália de 10 a 55% das mulheres assintomáticas em idade reprodutiva (NETO et al., 1999), sendo *Candida albicans* a espécie mais prevalente (ROSSI et al., 2011). A ampla presença de *Candida* na microbiota vaginal indica sua classificação como “saprófita”. Significa dizer que a presença desta espécie nem sempre está associada a adoecimento. A vagina é um dos locais de maior prevalência destas leveduras. Contudo, há mais probabilidade de que o maior reservatório de espécies de *Candida* seja o trato gastrointestinal, pois encontram-se em 56% das amostras de fezes coletadas ao acaso numa população (NETO et al., 1999).

Em condições adequadas/normais as *Candidas* estão presentes no organismo humano numa relação comensal, ou seja, sem que prejuízos sejam causados à saúde humana (CARDOSO, 2004). Normalmente, 25 a 75% das pessoas saudáveis podem apresentar *Candida* spp. (WILLIAMS et al., 1997). Existem hoje, em média, 200 espécies de leveduras do gênero *Candida*. Pouco mais de 10% são capazes de gerar infecções no ser humano (SILVA, 2011).

Essas alterações envolvem queda de imunidade, que comumente está relacionada a condições adquiridas ou congênitas, assim como podem ser causadas pelo tratamento com fármacos considerados imunossupressores. Também pode ser gerada devido a condições patológicas como diabetes e linfomas. Fatores como agentes citotóxicos, antibióticos de amplo espectro e anticoncepcionais orais tornam o indivíduo mais susceptível a infecções por leveduras do gênero *Candida*, por causarem o desequilíbrio da microbiota (WAGNER e SOHNLE, 1995).

Não foi citado ainda na literatura o estudo dos efeitos microbiostático e microbicida de agrotóxicos sobre a microbiota humana, envolvendo ação sobre fungos e bactérias comensais.

CAPÍTULO 2

Efeitos isolados de Cipermetrina e Metomil na microbiota humana

Isolated effects of Cypermethrin and Methomyl in human microbiota

Sarana Héren Pereira^{1*} – Idjane Santana Oliveira¹ – Gleycielle Alexandre Cavalcante² Diego Leandro Reis da Silva Fernandes¹ – Alexandre Havt Binda³

¹ *Laboratório de Microbiologia e Imunologia / Centro Acadêmico de Vitória (CAV) / UFPE, CEP 55608-680, Vitória de Santo Antão – PE, Brasil*

² *Laboratório de Imunoparasitologia / Aggeu Magalhães*

³ *Universidade Federal do Ceará (UFC)*

*Contato com Autor: sarana_pereira@hotmail.com

Re-sumo

O Brasil é um grande consumidor de substâncias químicas sintéticas na agricultura, os chamados agrotóxicos. Cipermetrina é um pesticida no grupo dos piretróides, altamente tóxico (classe II). Metomil é um metilcarbamat, extremamente tóxico (classe I). Ambos são autorizados para uso em várias culturas como inseticida, sua principal ação. Isto levanta o problema que envolve o consumo de pesticidas e os efeitos sobre a microbiota. A colonização bem adequada da microbiota previne o adoecimento do indivíduo. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos isolados de cipermetrina e Metomil na microbiota humana. Foram utilizadas bactérias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*) e fungos (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*), espécies tipicamente colonizadoras da microbiota humana. A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada pelo método de microdiluição de caldo. Cipermetrina e Metomil provaram ser capazes de destruir microorganismo da microbiota. A ênfase está na cipermetrina, cujas concentrações bactericida e fungicida estão muito próximas da dose estabelecida pela ANVISA como Ingestão Diária Aceitável - IDA (IDA = 0,05 mg / kg de peso corporal). Portanto, os resultados deste estudo evidenciam que as doses estabelecidas como ingestão aceitável e segura de Metomil e, sobretudo Cipermetrina, causam malefícios à saúde no que tange às interferências na microbiota humana, pois destroem os micro-organismos mesmo em baixas concentrações.

Palavras-chave: pesticida, bactericida, fungicida, saúde.

Introdução

Os agrotóxicos são substâncias químicas inorgânicas e sintéticas, utilizadas na agricultura com o propósito de otimizar a produção agrícola, debelando ou dificultando a instalação pragas nas culturas. Seu uso teve início de na década de 1950, acompanhado de adicionais como os fertilizantes e outras tecnologias (Wheeler, 2002). Atualmente o Brasil é o principal consumidor de agrotóxicos no mundo, batendo a marca de 1 milhão de toneladas utilizadas em 2009, seguido por EUA, França e Japão (INCA, 2012).

Dois dos compostos mais utilizados na agricultura são a Cipermetrina (Figura 1) e o Metomil (Figura 2). O primeiro é um agrotóxico do grupo dos piretroides e tem classificação toxicológica II (altamente tóxico), enquanto o segundo utilizado como inseticida e acaricida, pertence ao grupo químico Metilcarbamato de oxina, de classe toxicológica I (extremamente tóxico). No Brasil a Cipermetrina e o Metomil têm indicação de uso em diversas culturas de alimentos diariamente consumidos (Anvisa).

De acordo com o Relatório do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2012) esse modelo de cultura intensivista vem trazendo grandes prejuízos para a saúde dos Brasileiros. Além das intoxicações causadas a quem manuseia esses materiais o consumo exagerado dessas substâncias químicas, que hoje chega aos 5,2kg/ano por habitante, gera uma série de transtornos, entre eles infertilidade, impotência, abortos, malformações, neurotoxicidade, desregulação hormonal, alterações no sistema imunológico, câncer e potencialmente efeitos nocivos sobre o microbiota humana.

Entende-se por microbiota a colonização de estruturas por microorganismos comensais que servem como barreira protetora, além de auxiliar em funções orgânicas essenciais. (ABRASCO, 2015). Sabe-se que a colonização do trato digestivo humano ocorre logo em seguida ao nascimento, momento em que deixa de ser estéril (Mc Crachen e Lorenz, 2000) Os micro-organismos componentes da microbiota normal podem receber benefícios do hospedeiro, como suplementação alimentar, meio ambiente estável, proteção e transporte. Em troca, o hospedeiro (neste caso, o homem) obtém dos micro-organismos alguns benefícios nutricionais, assim como estimulação do desenvolvimento dos tecidos linfóides.

O benefício mais importante é a colonização bem adaptada da microbiota normal, que exclui outros micro-organismos que poderiam causar o adoecimento do indivíduo (Silva e Neufeld, 2006). Nessa perspectiva levanta-se a problemática que envolve o consumo de agrotóxicos e suas repercussões na microbiota humana. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos isolados de Cipermetrina e Metomil na microbiota humana.

Materiais e Métodos

Micro-organismos

Foram utilizadas espécies colonizadoras da microbiota humana, tanto bactérias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*), quanto fungos leveduriformes do gênero *Candida* (*Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermond*). Estes micro-organismos são tipicamente colonizadores da microbiota humana da pele e do intestino, as duas maiores do corpo humano. Todos os micro-organismos foram obtidos da bacterioteca do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e micoteca da mesma instituição (UFPE).

Teste de Microtitulação em caldo Müeller-Hinton para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) para bactérias

Os testes de microdiluição em caldo foram realizados em microplacas de 96 poços, segundo normas CLSI ANVISA (2002; 2003). Foram distribuídos 80 µL de meio de cultura (caldo Müeller-Hinton) nos poços-teste. Em seguida, adicionaram-se 80 µL dos agrotóxicos no primeiro poço da fileira, já contendo meio de cultura. Realizou-se diluição seriada com fator de diluição 1:2. Em seguida, acrescentaram-se aos poçosteste 20 µL da suspensão microbiana. A suspensão de micro-organismos foi preparada em solução salina a 0,9%, usando a escala padrão de Mac Farland correspondente ao tubo 0,5 que contém $1,5 \times 10^8$ ufc/mL. Desta suspensão, foi preparada diluição 1:100 com salina estéril. Para controle de crescimento microbiano, foi utilizado meio de cultura e suspensão microbiana. Como controles de atividade contra os micro-organismos e de esterilidade do meio de cultura, reservaram-se poços contendo apenas meio de cultura; meio de cultura, suspensão microbiana e antibiótico (clorafenicol – 0,005 mg/mL) e para os brancos foram reservados poços contendo meio de cultura e agrotóxico; e apenas agrotóxico. Os testes foram realizados em triplicata e revelados com 30 µL de solução de Resazurina a 0,01% após um período de incubação de 18h a 24h (a depender da espécie bacteriana) à temperatura de 37°C. Cada ensaio microbiano foi realizado em triplicata em eventos individuais e em momentos distintos.

Teste de Microtitulação em caldo Sabouraud para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) para fungos

Os testes de microdiluição em caldo foram realizados em microplacas de 96 poços, segundo normas CLSI ANVISA (2002; 2003). Foram distribuídos 80 µL de meio de cultura (caldo Sabouraud) nos poços-teste. Em seguida, adicionaram-se 80 µL dos agrotóxicos no primeiro poço da fileira, já contendo meio de cultura. Realizou-se diluição seriada com fator de diluição 1:2. Em seguida, acrescentaram-se aos poçosteste 20 µL da suspensão microbiana. A suspensão de micro-organismos foi preparada em solução salina a 0,9%, usando a escala padrão

de Mac Farland correspondente ao tubo 0,5 que contém $1,5 \times 10^8$ ufc/mL. Desta suspensão, foi preparada diluição 1:100 com salina estéril. Para controle de crescimento microbiano, foi utilizado meio de cultura e suspensão microbiana. Como controles de atividade contra os micro-organismos e de esterilidade do meio de cultura, foram reservados poços contendo apenas meio de cultura; meio de cultura, suspensão microbiana e antifúngico (fluconazol – 1 mg/mL), e para os brancos, poços contendo meio de cultura e agrotóxico; e apenas agrotóxico. Os testes foram realizados em triplicata e revelados com 40 µL de Trifeniltetrazólio (TTC) após incubação de 24h à temperatura de 37°C. Cada ensaio microbiano foi realizado em triplicata em eventos individuais e em momentos distintos.

3. RESULTADOS

A atividade antimicrobiana dos agrotóxicos Metomil e Cipermetrina foi observada conforme as tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima de Cipermetrina e Metomil para espécies bacterianas da microbiota humana pelo método de microtitulação em caldo Mueller-Hinton.

CIM (mg)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Cipermetrina	0,03	0,03	0,03
Metomil	0,21	2,1	1,05

O agrotóxico Cipermetrina mostrou-se capaz de destruir bactérias da microbiota mesmo em baixas concentrações, como mostra a tabela 1. Nos ensaios realizados a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,03 mg foi encontrada para as três espécies testadas (*E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis*). Para o agrotóxico Metomil, houve variação entre as espécies quanto às CIMs estabelecidas nos ensaios de microdiluição em caldo. A CIM de metomil para *E. coli* destaca-se como a menor concentração inibitória deste agrotóxico, ficando estabelecida em 0,21 mg.

A tabela 2 dispõe os resultados para as espécies de leveduras (Candidas) testadas.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima de Cipermetrina e Metomil para espécies de leveduras da microbiota humana pelo método de microtitulação em caldo Sabouraud.

CIM (mg)					
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermond</i>
Cipermetrina	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01
Metomil	0,5	0,5	0,5	0,21	0,05

Assim como nos testes com espécies bacterianas, Cipermetrina foi o agrotóxico que atingiu menores concentrações inibitórias para as espécies fúngicas do gênero *Candida*. A espécie mais sensível diante dos agrotóxicos testados foi a *C. guilliermondii*. Mas quando se trata de Cipermetrina houve concentrações baixíssimas (0,01 mg) causando morte das espécies de leveduras da microbiota testadas neste estudo.

DISCUSSÃO

Apesar da grande maioria dos seres humanos perceberem as bactérias como seres potencialmente perigosos, poucas espécies causam doença ao homem. Nos tecidos internos do corpo humano sadio, como sangue, cérebro, músculos e outros, normalmente não há colonização por micro-organismos. Em contrapartida, os tecidos superficiais, como pele e membranas mucosas, constantemente são colonizados por certas espécies microbianas. (Missaghi et al, 2014)

No tegumento, a colonização por microorganismos residentes e transitórios formam a primeira barreira de proteção contra organismos patogênicos diversas espécies e gêneros. A colonização do trato digestivo humano ocorre logo em seguida ao nascimento, momento em que deixa de ser estéril. (Mc Crachen e Lorenz, 2000). Os micro-organismos componentes da microbiota normal podem receber benefícios do hospedeiro, como suplementação alimentar, meio ambiente estável. Em troca, o hospedeiro (neste caso, o homem) obtém dos micro-organismos alguns benefícios nutricionais, como a produção de vitamina K, digestão de celulose, bem como a maturação do sistema imunológico e manutenção da permeabilidade da barreira intestinal.

O benefício mais importante é a colonização bem adaptada da microbiota normal, que exclui micro-organismos patogênicos. (Wallace et al, 2014). Implica dizer que alimentos que ofereçam estes agrotóxicos residuais, mesmo em baixíssimas concentrações, podem gerar risco de dano à saúde do indivíduo que os ingerem.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define a Ingestão Diária Aceitável (IDA) para Cipermetrina em 0,05 mg/kg p. c. (peso corporal). (Anvisa, 2010). Para Metomil, a IDA é 0,02 mg/kg p.c. (IPCS, 2001). O gráfico 1 faz a relação entre as menores CIMs encontradas para Cipermetrina e sua IDA estabelecida pela ANVISA.

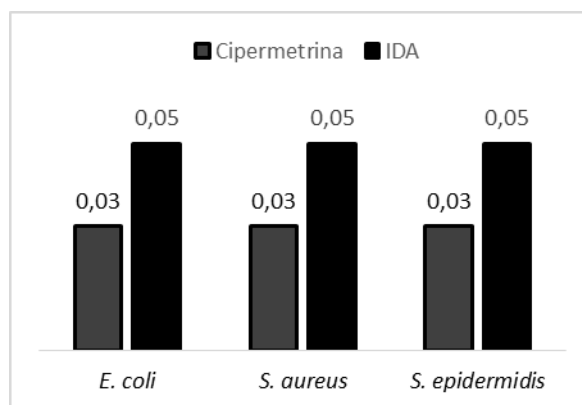


Gráfico 1 - Comparação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Cipermetrina para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e sua Ingestão Diária Aceitável (IDA). Considerar Cipermetrina em mg e IDA em mg/kg p. c.

Nota-se no gráfico que a menor concentração inibitória para as espécies bacterianas testadas neste trabalho está bem próxima ao que é estabelecido como dose segura de ingestão diária para Cipermetrina. Vale salientar que a IDA é estabelecida numa unidade de mg/kg de peso corporal. Contando a ingestão de Cipermetrina aceitável de acordo com a IDA para um indivíduo de 60 kg, resulta que são aceitáveis 3mg de Cipermetrina por dia. Ou seja, a cada 0,03 mg de Cipermetrina ingerido, $1,5 \times 10^5$ ufc de *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis* componentes da microbiota do indivíduo estarão morrendo.

Algo de fundamental importância da simbiose entre hospedeiro (homem) e os micro-organismos que o colonizam é a dependência do ser humano em relação à microbiota. A microbiota intestinal, por exemplo, é de grande valor para nutrição do indivíduo e, conseqüentemente, para a saúde humana. Isso resulta do fato de que o ser humano não é dotado de todos os produtos gênicos de que se precisa para utilizar os nutrientes. Depende, então, do auxílio de produtos genômicos de bactérias colonizadoras do intestino (Fiocchi, 2012).

Além de participar da digestão dos alimentos, a microbiota auxilia o hospedeiro e o protege contra patógenos, também metabolizando algumas drogas e substâncias cancerígenas (Collins, 2009). A microbiota

molda a resposta imunitária, não apenas no trato gastrointestinal, mas, de mesmo modo, a nível sistêmico, modulando a imunidade em estados de saúde e doença (Fiocchi, 2012).

Assim como ocorre com espécies bacterianas, a realidade descrita gera questionamentos e preocupações quando se comparam algumas CIM obtidas neste estudo com o que é estabelecido como dose segura para ingestão destes agrotóxicos (IDA). Nos resultados desta pesquisa, o agrotóxico mais alarmante quanto às concentrações fungicidas em comparação com sua IDA foi também Cipermetrina, conforme gráfico 2.

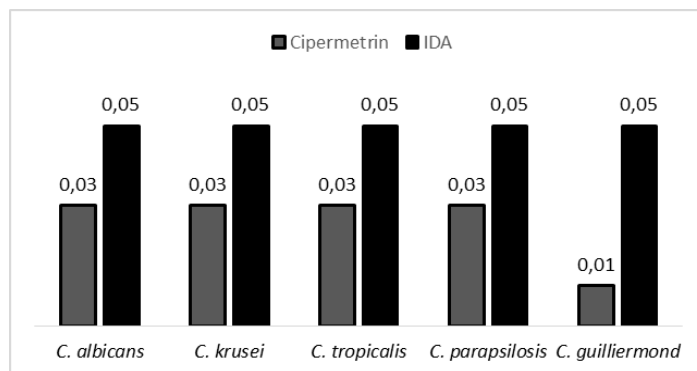


Gráfico 2 - Comparação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Cipermetrina para as espécies de Candida e sua Ingestão Diária Aceitável (IDA). Considerar IDA em mg/kg p. c.

As concentrações fungicidas de Cipermetrina para todas as espécies fúngicas testadas são bem inferiores a sua IDA. Segue-se o mesmo raciocínio que foi tomado para as espécies bacterianas, em que evidencia-se a unidade de medida da IDA (mg/kg p. c.).

Leveduras do gênero *Candida* podem ser isoladas da genitália de 10 a 55% das mulheres assintomáticas em idade reprodutiva (Neto et al., 1999), sendo *Candida albicans* a espécie mais prevalente. (Rossi et al., 2011). A ampla presença de *Candida* na microbiota vaginal indica sua classificação como “saprófita”. Significa dizer que a presença das espécies de *Candida* nem sempre está associada a adoecimento. A vagina é um dos locais de maior prevalência destas leveduras. Contudo, há mais probabilidade de que o maior reservatório de espécies de *Candida* seja o trato gastrointestinal, pois encontram-se *Candida* em 56% das amostras de fezes coletadas ao acaso numa população. (Neto et al., 1999).

Normalmente, 25 a 75% das pessoas saudáveis podem apresentar *Candida* spp. (Williams et al., 1997). Existem hoje, em média, 200 espécies de leveduras do gênero *Candida*. Pouco mais de 10% são capazes de gerar infecções no ser humano. (Silva, 2011).

De maneira unânime, estudiosos relatam acerca da relação que há entre dieta e qualidade da microbiota, com consequente resguardo da função benéfica desses micro-organismos ao homem. Claesson et. al. reafirmam que a microbiota é moldada pela dieta do indivíduo e afeta a saúde. Em seu estudo, relatam que essas diferenças que existem por determinação da dieta em composição da microbiota têm impactos sutis em juvenis e adultos nos países desenvolvidos. Todavia, fica muito mais evidente este fato em pessoas idosas, devido à imunidade comprometida.

Se a qualidade da dieta por si só já é um interferente nas condições de equilíbrio da microbiota do indivíduo, uma dieta rica em alimentos contaminados por agrotóxicos tende a destruir os microorganismos colonizadores naturais do ser humano; micro-organismos estes que, como vimos, exercem um papel fundamental na saúde.

5. CONCLUSÃO

Os níveis de consumo de Cipermetrina e Metomil estabelecidos como ingestão segura podem gerar riscos à saúde, pois mesmo em baixas concentrações, ou mesmo, em concentrações inferiores à IDA, como é o caso de Cipermetrina, têm efeitos deletérios frente a micro-organismos componentes naturais da microbiota humana.

6. REFERENCIAS

ABRASCO, Associação Brasileira de Saúde Coletiva, Dossiê Abrasco, 2015. Disponível em: <http://abrasco.org.br/dossieagrototoxicos> Acesso em: 25/01/2017.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 14/4/2015.

ANVISA Resolução RE nº 2.953 de 28/06/10 (DOU de 05/07/10)

Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., Power, S. E., O'Connor, E. M., Cusack, S., ... & Fitzgerald, G. F. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488(7410), 178-184.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically – M7-A6. 7.ed. CLSI, Wayne: USA, 2003.

CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras - M27-A2. 2. ed. CLSI, Wayne: USA, 2002.

Collins SM, Bercik P. The Relationship Between Intestinal Microbiota and the Central Nervous System in Normal Gastrointestinal Function and Disease. *Gastroenterology* 2009; 136:2009-2014; doi: 10.1053/j.gastro. 2009.01.075.

Fiocchi C, Souza HSP. Microbiota Intestinal: Sua importância e função. *Jornal Brasileiro de Medicina*. 2012 julho/agosto; 100:30-8.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). Toxicological Evaluations: Methomyl (addendum). Pesticides Safety Directorate, United Kingdom (<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr08.htm>), 2001.

INCA- Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva, O Veneno está na Mesa- 2012

McCracken, VJ, Lorenz, RG. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cel Microbiol* v. 3 p. 1-11, 2000.

Neto, A. A.; Hamdan, J. S.; Souza, R. C. Prevalência de Cândida na flora vaginal de mulheres atendidas num serviço de planejamento familiar. *Rev. Bras. Ginecol. Obst.* Vol. 21. N.8. p. 441-445, 1999 *apud* Monif G. Manual de doenças infecciosas em Ginecologia e Obstetrícia. 4ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p.114-32.

Missaghi, B.; Barkema, H. W.; Madsen, K. L.; Ghosh, S. Perturbations of the Human Microbiome as a Contributor to Inflammatory Bowel Disease. *Pathogens*. n.3. p. 510 – 527, 2014.

Silva CHPM, Neufeld PM. Bacteriologia e Micologia: Para o laboratório Clínico. Editora: Revinter. Rio de Janeiro, 2006.

Tagliari PS. Situação atual e perspectivas da agroecologia. *Agroecologia*, 9, 10. Florianópolis, 2005. Wheeler WB. The role of research and regulation in 50 years of pest management in agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.4151-4155, 2002.

Wallace, K.L.; Zheng, L.; Kanazawa, Y.; Shih, D.Q. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20, 6–21.

Williams, D. W.; Potts, A. J.; Wilson, M. J.; Matthews, J. B.; Lewis, M. A. Characterisation of the inflammatory cell infiltrate in chronic hyperplastic candidosis of the oral mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medical*, Singapore, v. 26, n. 2, p. 83-89, 1997.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

É preocupante a realidade descrita neste estudo, pois além de todos os efeitos maléficos de agrotóxicos já comprovados, em relação à saúde humana, evidencia-se mais um: os prejuízos causados à microbiota humana pela ingestão de resíduos de agrotóxicos. De acordo com Fanaro e colaboradores (2003), depois do processo do nascimento e da exposição ao meio ambiente, é a alimentação o principal fator de interferência no desenvolvimento da microbiota intestinal.

Resultados de testes realizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) revelam dados preocupantes quanto aos resultados insatisfatórios (amostras com níveis de resíduos de agrotóxicos acima dos limites máximos estabelecidos por lei, ou ainda aquelas amostras que apresentam resíduos de pesticidas não autorizados). Os dados são alarmantes para culturas de tomate, morango e alface (44,72%, 43,62% e 40% de amostras com resultados insatisfatórios, respectivamente, no ano de 2007). (ANVISA, 2008). Diante destes dados, facilmente percebe-se que o consumidor acaba ingerindo um alto teor de pesticidas, já que os alimentos são comercializados com elevados graus de contaminação, seja por praguicidas de uso autorizado, mas com um percentual de resíduos que indica o uso excessivo do produto, ou contaminação por com agrotóxicos de uso proibido.

O agrotóxico Cipermetrina mostrou-se com enorme poder bactericida e fungicida diante das espécies componentes da microbiota testadas no presente estudo. Diante de todos os micro-organismos utilizados neste estudo, este produto exerceu atividade antimicrobiana em baixíssimas concentrações. Para fins de comparação, tomou-se como base a concentração estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como dose segura, o que se chama de Ingestão Diária Aceitável (IDA). O agrotóxico Metomil foi menos agressivo em relação à Cipermetrina frente a todos os micro-organismos testados, mantendo-se sempre numa Concentração Inibitória Mínima (CIM) acima da CIM de Cipermetrina. Apenas para *Candida guilliermondii* o Metomil teve um poder antimicrobiano em níveis mais alarmantes, se aproximando das CIM de Cipermetrina.

Antibióticos causam alterações transitórias no padrão intestinal em relação à colonização deste órgão. (FANARO et al., 2003). Os prejuízos que isso traz à saúde

humana são inúmeros. Conhecidamente, existem doenças que apareçam em consequência da falta de equilíbrio tanto da microbiota em si, quanto da própria relação entre os microorganismos e o hospedeiro. Diarreia e enterocolite necrosante são exemplos de doenças que aparecem em decorrência do desequilíbrio da flora intestinal. (LIN et al., 2005). De maneira aguda, aparecem gastroenterite e a enterite pseudomembranosa. Em fase crônica, pode ser gerada Doença Inflamatória Intestinal (DII). (BRANDT et al., 2006). A DII não apresenta um agente etiológico específico, entretanto sugere-se que haja relação entre esse mal e o desequilíbrio das bactérias patogênicas e as que compõem a microbiota intestinal. (LINSKENS et al., 2001).

O desequilíbrio da microbiota também acarreta como consequência patológica uma maior predisposição ao desenvolvimento de alergias, o que denomina-se atopia. A microbiota intestinal bem regulada e equilibrada tem capacidade de estímulo da diferenciação dos linfócitos Th1 e Th3, e isto favorece equilíbrio que reduz a propensão às reações alérgicas. (HEYMAN et al., 2002). Em países desenvolvidos é cogitado que existe alteração na regulação do sistema imunológico. Considera-se isso diante do grande aumento da propensão a alergias. (KALLIOMAKI; ISOLAURI, 2003).

Diante disto, vale ressaltar o que está exposto na legislação brasileira acerca de assuntos como o que se evidencia neste estudo. A Constituição Federal, em seu artigo 255 diz que “todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida.” O mesmo artigo da Constituição ressalta que “é dever do poder público e da coletividade defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.” No que tange à saúde, garante-se pela Constituição Federal de 1988 que “a saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos (...).” Não há lei, seja de qualquer instância governamental, que tenha o poder assegurado de ir de encontro com o que está na Constituição Federal. Portanto os danos relacionados ao uso de agrotóxicos devem ser controlados rigorosamente à luz da Constituição. Do contrário, logicamente, a prática ou situação é inconstitucional. Ainda sobre os agrotóxicos, implicitamente, a Constituição dá os trâmites e responsabilidades quanto ao meio ambiente, afirmando que incumbe ao poder público “controlar a produção, a comercialização e o emprego de técnicas, métodos e substâncias que comportem risco para a vida, a qualidade de vida e o meio ambiente.”

A grande questão que envolve o uso de agrotóxicos no mundo atual é que talvez se imagine que não há mais forma de alimentar a população mundial sem o uso de agrotóxicos. Badgley et. al. (2007) evidenciam em seu estudo que é possível a libertação dos agrotóxicos, mantendo produtividade por meio de uma agricultura agroecológica. Eles compararam a produtividade de sistemas como os convencionais, tradicionais e agroecológicos. Concluíram que sistemas agroecológicos têm a capacidade de produzir o suficiente para abastecer a população global. Na mesma pesquisa aponta-se que o mito de que a agricultura agroecológica precisaria de expansão de área de cultivo para suprir as necessidades de abastecimento da população deve ser desfeito, pois comprova-se a eficácia da produção agroecológica mesmo que se mantenham os campos de cultivo atuais, ou seja, para abastecer a população eficientemente com produtos de cultivo agroecológico não haveria necessidade de expansão de área de cultivo. (BADGLEY et. al., 2007).

De acordo com o órgão das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) existe a necessidade clara de substituição da agricultura convencional para a agroecologia. Ainda segundo a FAO, a dualidade do modelo convencional é intrigante, pois produz comida o bastante para suprir as necessidades de todos, mas ainda há 1 bilhão de pessoas no mundo passando fome; a agricultura está mirrada, enquanto o uso de agroquímicos cresce assustadoramente; e, por fim, cresce o número de pessoas com comprometimento nutricional no momento em que as informações acerca do tema da nutrição são cada vez mais acessíveis.

Tudo leva a crer na necessidade extrema de uma ampla reforma na agricultura desde a criação das políticas e programas de governo, a fim de que se alcance uma nova realidade no ramo da agricultura: a prioridade das culturas agroecológicas e da agricultura familiar. (LONDRES, 2011).

A partir dos resultados deste estudo, já elucidados e discutidos, pode-se perceber o nível do risco que o uso de agrotóxicos, mesmo em baixas concentrações, gera à microbiota humana. Este risco está diretamente ligado à alimentação dos seres humanos em geral, desde a fase lactente de bebês de regiões específicas, como já fora discutido que estudos comprovam a presença de resíduos de agrotóxicos no leite materno. Os danos causados à microbiota relacionam-se principalmente à queda de população microbiana comensal. Isto gera um desequilíbrio na microbiota e incontáveis danos à saúde humana, desde aspectos nutricionais até regulação imunológica.

Neste estudo, manteve-se uma base de discussão bastante forma dos valores obtidos como CIMs de Cipermetrina e Metomil para as espécies testadas, em comparação às IDAs estabelecidas pela ANVISA. É gritante o fato de que as IDAs dos respectivos agrotóxicos são superiores às concentrações microbicidas evidenciadas no presente estudo. Sugere-se que haja complementação dos estudos acerca dos efeitos deletérios de agrotóxicos à microbiota humana, pois as consequências são robustas e, muitas vezes, as causas não são percebidas. Vale salientar que as comparações aqui descritas não se configuram mensurações de CIM diante de concentrações utilizadas popularmente na agricultura informal; as comparações descritas neste estudo caracterizam-se em CIM versus IDA, que consiste na concentração descrita como uso seguro em documento regulatório da ANVISA.

A partir destes e de outros resultados complementares, há a necessidade de modificações na legislação que regulamenta o uso de Cipermetrina e Metomil, sobretudo Cipermetrina, pois os danos gerados por essas substâncias são mais numerosos do que os que são identificados em estudos toxicológicos e/ou de genotoxicidade.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. Control of plant diseases. In: AGRIOS, G.N. (Ed.). **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 2005. p.173-221.
- ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.
- ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Gerência Geral de Toxicologia. Brasília, 2008.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 14/4/2015.
- Badgley, C. et al. (2007). Organic agriculture and the global food supply. **Renewable Agriculture and Food Systems**: 22(2); 86-108.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.
- BARON, R. L. Carbamate Inseticides. In: HAYES, W. R.; LAWS, E. R. Handbook of pesticide. **Toxicology**. San Diego: Academic Press. P. 1125 – 1190, 1991.
- BERG, R.D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends in Microbiology**. v. 4, n. 11, 1996, p. 430-435.
- BRADBERRY, S. M.; CAGE, S. A.; PROUDFOOT, A. T.; VALE, J. A. Poisoning due to Pyrethroids. **Toxicological Reviews**, v. 24, n. 2, p. 93-106, 2005.
- BRANDT, K. G.; SAMPAIO, M.; MS CARNEIRO and Miuki, Cristina Jacob Importância da microbiota intestinal. 2006.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2013/2014 a 2023/2024**. Brasília: Mapa/ACS, 2014. 96 p.
- BROWN, A.J.P. Expression of Growth Form-Specific Factors during Morphogenesis in *Candida albicans*. (7): 87-122., 2003.
- CALDAS, L. Q. A. **Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bupiridílicos e piretroides**. Centro de Controle de Intoxicações. Niterói – RJ, 2000.
- CARDOSO, B. C. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos) - Universidade do Minho, Braga.
- CHAFFIN W.L, LÓPEZ-RIBOT J.L., CASANOVA M, GOZALBO D. AND MARTINEZ J.P. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function and Expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 62 (1): 130-180.,1998.

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.

COLLINS, A. R.; OSCOZI, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. REVIEW The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* v. 23, p. 143–151, 2008.

D AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. *Química Nova*, v. 25, n. 6/A, p. 995-1002, 2002.

DA SILVA, m. b. **Determinação do potencial do dano ambiental causado por agrotóxicos utilizados na fruticultura irrigada do platô de Neópolis por análise da microbiota do solo.** 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, 2006.

DE MOURA, R. M. Agrotóxicos: Heróis ou vilões? A face da questão que todos devem saber. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, v. 4, p. 23-49, 2014.

DE ROSSI, T.; LOZOVY, M. A. B.; SILVA, R. V.; ERNANDES, E. V.; GERALDINO, T. H.; COSTA, I. C.; SARIDAKIS, H. O.; WATANABE, M. A. E.; FELIPE, I. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. *Semina: Ciências biológicas e da Saúde*. Londrina. V. 32. N.1. p. 12-28. jan./jun., 2011.

DONNENBERG, M. S. 2002. *Escherichia coli*: virulence mechanisms of a versatile pathogen, **Elsevier Science Academic Press**, San Diego, Calif.

EHLERS, E. **Agricultura sustentável**: origens e perspectivas de um novo paradigma. 2. ed. Guaíba: Agropecuária, 1999.

Encyclopaedia Britannica. 1979. vol. 14, 15^a ed. Pest control. Chicago, p.139-149. FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Nota Conjunta. Disponível em: . Acesso em: 01 de jan. de 2017.

FAO. International Conference on Organic Agriculture and Food Security. Rome 3-6 may 2007. Report. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/012/J9918E.pdf>

FANARO S, CHIERICI R, GUERRINI P, VIGI V. Intestinal microbiota in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr* 2003;441:48-55.

FARRÉ, M. et al. Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. *Anal biochem. Chem.*, v. 373. P. 704 – 709, 2002.

GRAZIANO DA SILVA, J. **Progresso Técnico e Relações de Trabalho na Agricultura**. São Paulo: Hucitec, 1981.

GRISOLIA, C. K. Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2005. 392p.

GROVE, Donald Cooper; RANDALL, William A. **Assay methods of antibiotics**. 1955.

GUARNER, Francisco; MALAGELADA, Juan-R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 512-519, 2003.

HARTLEY, D.; KIDD, H. The agrochemicals handbook. Nottingham, England: Royal Society of Chemistry. 1983. APUD: Pesticide Performance profile (methomyl). **Extension Toxicology Network**, 1993.

HEYNAM M.; MENARD S. Probiotic microorganism: how they affect intestinal pathophysiology. **CMLS** 2002;59: 1151-65.

INCA – Instituto Nacional do Câncer, 2014. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em: 01/02/2017.

INCA. Instituto Nacional do Cancer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Posicionamento do INCA Acerca dos Agrotóxicos. Disponível em: . Acesso em: 20 de abr. de 2016

KALLIOMAKI M.; ISOLAURI E. Role of intestinal flora in the development of allergy. **Curr Opin Allergy Immunol** 2003;3:15-20.

KAWAGUCHI, Satomi et al. Is the Comet Assay a Sensitive Procedure for Detecting Genotoxicity? **Journal Of Nucleic Acids**, [s. L.], p. 1-8. 4 out. 2010

KIMATI, H. & BEGAMIN FILHO, A. Princípios gerais de controle. In: BEGAMIN FILHO, A; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995. p.692-709.

LACAZ, C. da S.; PORTO E.; VACCARI, E. M. H.; MELO, N. T. **Guia para identificação Fungos Actinomicetos Algas de interesse médico**. São Paulo: Editora Sarvier, 1998.

LIN H.C.; SU B.H.; CHEN A.C.; LIN T.W.; TSAI C.H.; YEH T.F.; et al. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth infants. **Pediatrics** 2005;115:1-4.

LINSKENS RK, HUIJSDENS XW, SAVELKOUL PH, VANDERBROUCKE-GRAULS CM, MEUWISSEN SG. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. **Scand J Gastroenterol Suppl** 2001;234:29-40.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 1ª ed. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços em Agricultura alternativa, 2011. 190p.

McCRACKEN, V. J; LORENZ, R.G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. **Cel Microbiol** v. 3 p. 1-11, 2000.

MESQUITA, C. M. **Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos na microbiota do solo. Estudo de caso: Paty do Aferes – RJ.** (2005). 103 f. Mestrado em Ciências da Saúde (Área de concentração: Saneamento ambiental). Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública. Rio de Janeiro.

MIDGLEY, G.; CLAYTON, Y. M.; HAY, R. J. **Diagnóstico em cores: micologia médica.** São Paulo: editora Manole Ltda, 1998.

MÍDIO, A. F.; SILVA, E. S. **Inseticidas – Acaricidas – Organofosforados e Carbamatos.** São Paulo: Ed. Roca Ltda, 1995, 94 p.

MISSAGHI, B.; BARKEMA, H. W.; MADSEN, K. L.; GHOSH, S. Perturbations of the Human Microbiome as a Contributor to Inflammatory Bowel Disease. **Pathogens.** n.3. p. 510 – 527, 2014.

MORGAN, X.C.; TICKLE, T.L.; SOKOL, H.; GEVERS, D.; DEVANEY, K.L.; WARD, D.V.; REYES, J.A.; SHAH, S.A.; LELEIKO, N.; SNAPPER, S.B.; et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. **Genome. Biol.**2012.

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

National Human Genome Research Institute (NIH). Disponível em: <http://www.genome.gov/copyright.cfm>. Acesso em: 26/12/2015.

NEIDHARDT, F. C., INGRAHAM, J. L. e SCHAECHTER, M., Ed. (1990). **Physiology of the bacterial cell - a molecular approach**, Sinauer Associates, Sunderland, USA

NETO, A. A.; HAMDAN, J. S.; SOUZA, R. C. Prevalência de Cândida na flora vaginal de mulheres atendidas num serviço de planejamento familiar. **Rev. Bras. Ginecol. Obst.** Vol. 21. N.8. p. 441-445, 1999 *apud* Monif G. Manual de doenças infecciosas em Ginecologia e Obstetrícia. 4ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p.114-32.

NICOLI, J.R; Vieira, L.Q. Doenças Digestivas. Microbiota Intestinal Normal na Doença e na Saúde Cap. 61 p.1037-1047, 2002.

NUNES, Mônica Vannucci; TAJARA, Eloiza Helena. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Revista de Saúde Pública**, [s. L.], v. 32(4), p.372-383, jun. 1998.

OBA, J.; CUKIER, C.; MAGNONI, D. Probióticos em pediatria. **Nutr Clín**, 2005.

OBE, G. et al. Chromosomal Aberrations: Formation, Identification and Distribution. **Mutation Research**, v. 504(5), p. 17-36, 2004.

OCHMAN, H.; LAWRENCE J. G.; GROISMAN E. A. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature** 405:299–304.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen. **Nature Reviews**. v.7, p. 555-567, 2009.

PALMA, D. C. de A.; Agrotóxicos em leite humano de **mães residentes em Lucas do Rio Verde – MT**. (Dissertação de Mestrado). Cuiabá: UFTM, 2011.

PARA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. **Relatório de Atividades de 2011 e 2012**. Disponível em: . Acesso em: 19 de abr. de 2015.

PIMPÃO, Cláudia Turra. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) - **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária** - Ano IX. n. 18., 2012

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.

ROSA, Antônio Vitor. São Paulo: Atual, 1998.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **J. Bras.Patol. Med. Lab.** v. 43. n. 6. p. 413-423, 2007.

SILVA, H. G. A. **Avaliação Genotóxica dos Pesticidas Metomil e Cipermetrina: Efeitos agudos *in vivo***. 2013. 38 f. Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente. Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Vitória de Santo Antão – PE.

SILVA, H. M. **Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes transplantados de medula óssea**. (2011). 68 f. Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia.

Silva CHPM, Neufeld PM. **Bacteriologia e Micologia: Para o laboratório Clínico**. Editora: Revinter. Rio de Janeiro, 2006.

DA SILVA, JULIANA. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na escola**, v. 2, p. 30-37, 2007.

SIQUEIRA, S. L.; KRUSE, M. H. L. Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. **Rev. Esc. Enferm. USP**. vol. 42. n.3. São Paulo, 2008.

TAGLIARI, P. S. Situação atual e perspectivas da agroecologia. **Agroecologia**, 9, 10. Florianópolis, 2005.

TANNOCK, G.W. 2005. New perceptions of the gut microbiota: Implications for future research. **Gastroenterol. Clin. North Am.** 34(3):361–382. doi:10.1016/j.gtc.2005.05.006

TEPARELLO, R. **Incidência de fungos filamentosos em dinheiro circulante na cidade de Chapecó - SC, Brasil**. 50 p. Monografia de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Comunitária da Região de Chapecó - UNOCHAPECÓ como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, Chapecó, 2010.

TIBA, Monique Ribeiro; NOGUEIRA, Gustavo Prado; LEITE, Domingos da Silva. Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes com cistite. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 58, 2009.

THEISEN, J. **Suscetibilidade de *Staphylococcus epidermidis* à vancomicina, rifampicina, azitromicina e eritromicina**. (2010). 28p. Trabalho de Conclusão de Curso – Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2012.

VIEGAS, C.S. C. **Exposição a fungos dos trabalhadores dos ginásios com piscina**. 318 p. Tese de Doutorado em Saúde Pública na especialidade de Saúde Ambiental e Ocupacional, Escola Nacional de Saude Publica da Universidade de Lisboa, 2010.

VIEIRA, Mônica Aparecida Midolli. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde. São Paulo**, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

WAGNER, D. K.; SOHNLE, P. G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clin. Microbiol. Reviews**. 1995. n.8 v.3 p.317-35.

WALLACE, K.L.; ZHENG, L.; KANAZAWA, Y.; SHIH, D.Q. Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol**. 2014, 20, 6–21.

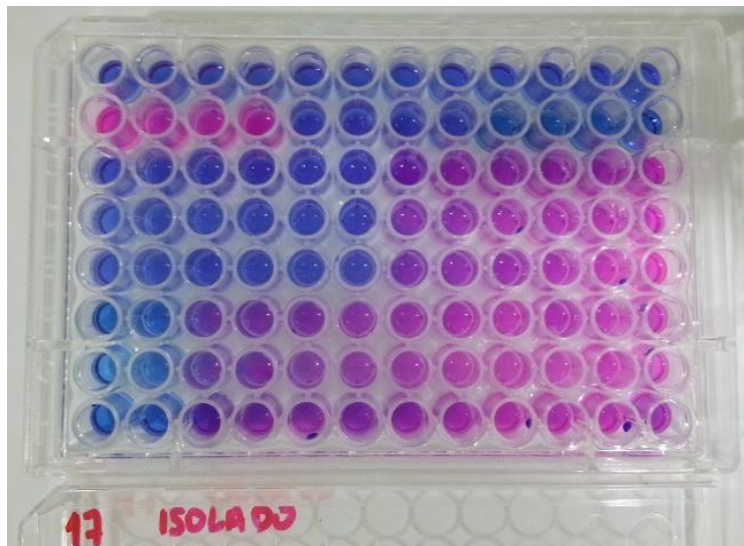
WHEELER, W.B. The role of research and regulation in 50 years of pest management in agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.4151-4155, 2002.

WILLIAMS, D. W.; POTTS, A. J.; WILSON, M. J.; MATTHEWS, J. B.; LEWIS, M. A. Characterisation of the inflammatory cell infiltrate in chronic hyperplastic candidosis of the oral mucosa. **Journal of Oral Pathology & Medical**, Singapore, v. 26, n. 2, p. 8389, 1997.

YAMASHIRO, Yuichiro, Ravinder Nagpal, and Satoru Nagata. "Metabolic Disease: Obesity, Malnutrition, and Intestinal Microbiota." **Journal of Pediatric Biochemistry** 5.02 (2015): 065-070.

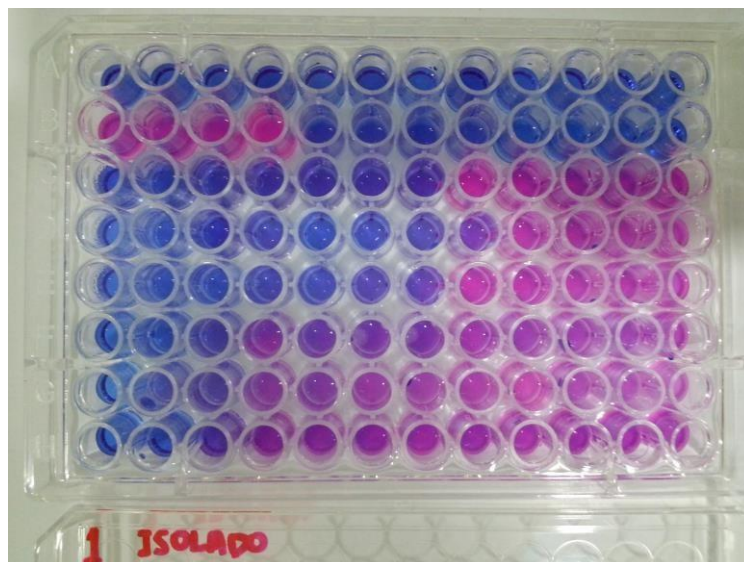
ANEXO A – FIGURAS

Figura 6 - Ação isolada de Cipermetrina e Metomil frente à bactéria Gram positiva *S. aureus*.



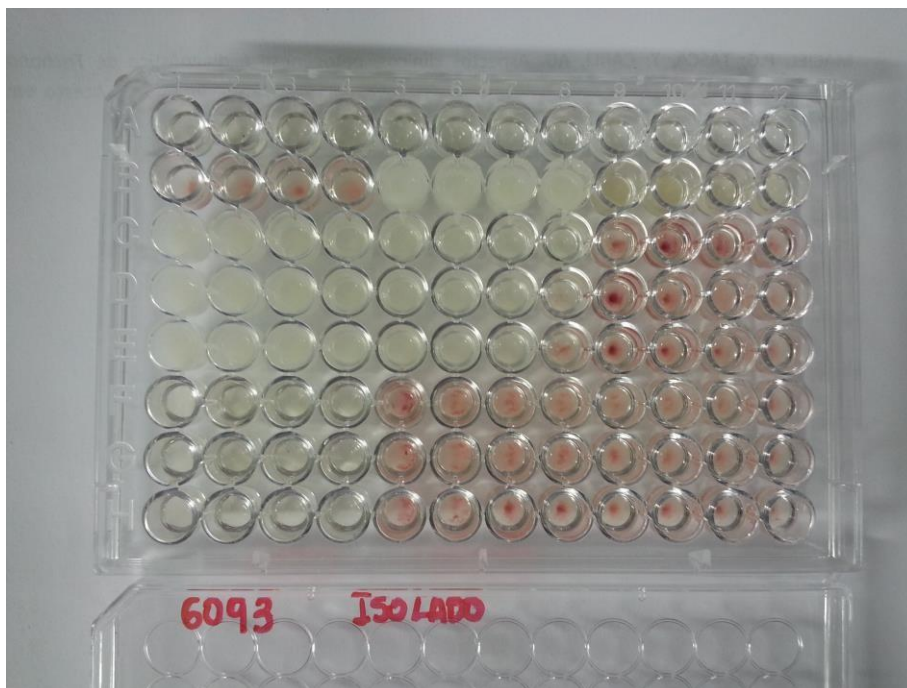
Placa corada com Resazurina 0,01% (Azul: Não houve crescimento microbiano; Rosa: Houve crescimento microbiano). Foto: Autoria própria

Figura 7 - Ação isolada de Cipermetrina e Metomil frente à bactéria Gram positiva *E. coli*.



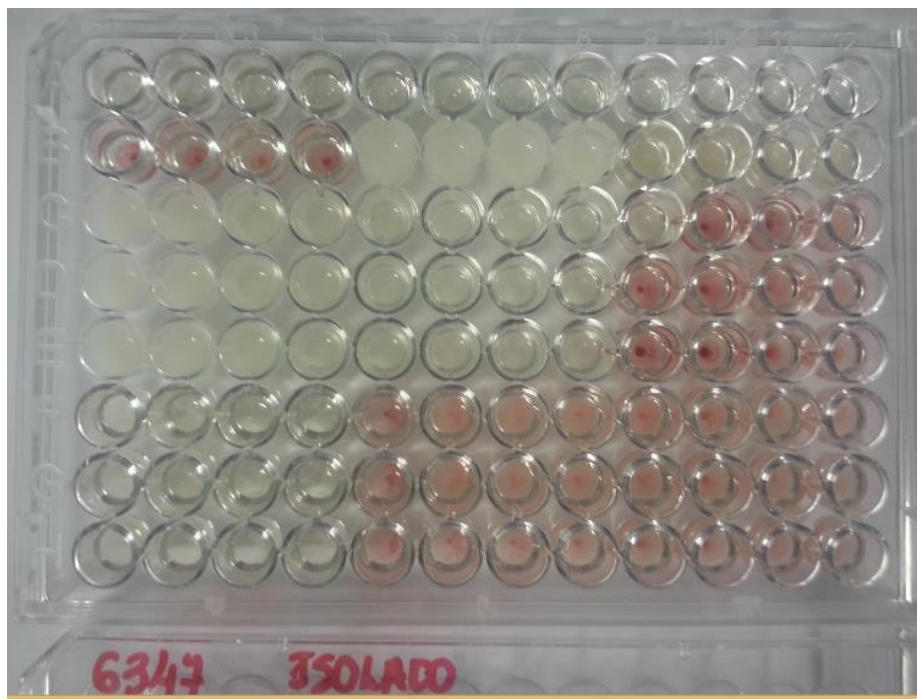
Placa corada com Resazurina 0,01% (Azul: Não houve crescimento microbiano; Rosa: Houve crescimento microbiano). Foto: Autoria própria

Figura 8 - Ação isolada de Cipermetrina e Metomil frente a *C. albicans*



Placa corada com TTC 2% (Incolor: Não houve crescimento microbiano; Cor: Houve crescimento microbiano). Foto: Autoria própria

Figura 9 - Ação isolada de Cipermetrina e Metomil frente a *C. tropicalis*.



Placa corada com TTC 2% (Incolor: Não houve crescimento microbiano; Cor: Houve crescimento microbiano). Foto: Autoria própria.