

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS SOBRE A CITOTOXICIDADE E O
POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EM CÉLULAS HEPÁTICAS
HUMANAS

Felipe Dreher Pacola

Instituto de Biotecnologia – IBTEC
Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Agosto – 2026

Felipe Dreher Pacola

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS SOBRE A CITOTOXICIDADE E O
POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EM CÉLULAS HEPÁTICAS
HUMANAS

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Joyce Ferreira da Costa Guerra
Co. Orientador: Prof. Vinícius Marques Arruda

Instituto de Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de curso apresentado
como requisito para a aprovação na disciplina
Trabalho de Conclusão de Curso do
Curso de Biotecnologia - Bacharelado da
Universidade Federal de Uberlândia.

Área de concentração: Ciências da Saúde e
biotecnologia

Uberlândia - MG

Agosto - 2026

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

P121 2026	Pacola, Felipe Dreher, 2003- EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS SOBRE A CITOTOXICIDADE E O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EM CÉLULAS HEPÁTICAS HUMANAS [recurso eletrônico] / Felipe Dreher Pacola. - 2026. Orientadora: Joyce Ferreira da Costa Guerra. Coorientador: Vinícius Marques Arruda. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Biotecnologia. Modo de acesso: Internet. Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Biotecnologia. I. Guerra, Joyce Ferreira da Costa, 1976-, (Orient.). II. Arruda, Vinícius Marques, 1999-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Biotecnologia. IV. Título. CDU: 60
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

Felipe Dreher Pacola

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS SOBRE A CITOTOXICIDADE E O
POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EM CÉLULAS HEPÁTICAS
HUMANAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Uberlândia
como requisito parcial para obtenção do título
de bacharel em biotecnologia

Área de concentração: Ciências da
Saúde e biotecnologia

Uberlândia, 07 de agosto de 2026

Banca Examinadora:

MSc. Gislaine Gonçalves Rocha, IBTEC, UFU

Prof. Dr. Allisson Benatti Justino, IBTEC, UFU

Prof^a. Dr^a. Joyce Ferreira da Costa Guerra

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Joyce Ferreira da Costa Guerra, e ao meu Co. Orientador, Prof. Vinícius Marques Arruda, agradeço por terem sido guias importantes nesta etapa da minha formação. Cada orientação, correção e incentivo contribuiu não apenas para a construção deste trabalho, mas também para o meu amadurecimento como estudante, pesquisador e pessoa. Levo comigo os aprendizados, o exemplo de dedicação e de amor a profissão. Gratidão por todo apoio recebido.

Aos meus pais, à minha irmã e à minha família, por caminharem ao meu lado em todas as minhas decisões e por serem o grande espelho da minha vida. Este trabalho e toda minha trajetória na graduação carregam um pouco dos esforços, renúncias e sacrifícios que pude observar em cada um de vocês, dia após dia. Nada disso teria o mesmo sentido sem o amor, o apoio e a presença de vocês, que sempre foram minha base nos momentos de dúvida e minha força nos momentos de dificuldade. Obrigado por acreditarem em mim, por me incentivarem a seguir em frente e por fazerem parte de cada conquista até aqui. Iremos por mais, sempre.

A todos meus amigos e principalmente aos amigos da “República Gnômica”. Por me mostrarem uma outra visão da faculdade. Entre risadas, brincadeiras, conversas e momentos compartilhados, vocês tornaram dias difíceis e maçantes mais leves. Sou grato por cada vivência, por cada história construída e por terem feito parte dessa caminhada de uma maneira tão especial. Parte desta conquista também pertence a vocês.

A todos os amigos da graduação e aos colegas de laboratório, agradeço pela parceria, pelo companheirismo e por todos os momentos divididos ao longo dessa trajetória. Cada conversa, ajuda, troca de conhecimento e incentivo tornou essa caminhada mais rica e menos solitária. Levo comigo não apenas o aprendizado acadêmico, mas também as amizades e memórias construída durante esses anos.

Aos professores com quem tive contato durante minha jornada de estudo, agradeço por cada ensinamento e contribuição para minha formação. Cada aula, conselho e experiência compartilhada foi importante para o meu crescimento. A trajetória até aqui também foi construída a partir do conhecimento transmitido por cada um de vocês.

A Universidade Federal de Uberlândia, agradeço pela oportunidade de formação, pelo ensino público de qualidade e por ter sido espaço de aprendizado, amadurecimento e transformação. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), agradeço o apoio concedido à pesquisa, que contribuiu para realização deste trabalho e para minha formação científica.

Por fim, agradeço por toda força da fé que me sustentou nesta jornada, ao acreditar que a senhora nunca deixou de olhar por mim e por nossa família. À minha avó Angela Mara, deixo um beijo cheio de saudade, com todo amor do seu neto.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) – Processo nº APQ-04809-25 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 405751/2023-0.

RESUMO

O uso intensivo de pesticidas na agricultura moderna tem aumentado nas últimas décadas, impulsionado pela crescente demanda por alimentos e pela necessidade de controle de pragas e doenças em culturas de grande importância econômica. No entanto, a exposição humana a esses compostos, especialmente por resíduos presentes em alimentos e no ambiente, tem despertado preocupação devido aos seus potenciais efeitos tóxicos. O fígado torna-se um dos principais órgãos-alvo dessa toxicidade por defensivos agrícolas, uma vez que exerce papel central na biotransformação e detoxificação desses compostos. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos fungicidas dimetomorfe (DIM) e fenpropimorfe (FEN) sobre a viabilidade e a atividade metabólica celular, e o potencial de membrana mitocondrial em células hepáticas humanas das linhagens HepG2 e LX-2. As células foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações dos fungicidas e submetidas aos ensaios de Sulforrodamina B (SRB), Alamar Blue e tetrametilrodamina etil éster (TMRE). Após 24 horas, o DIM, na concentração de 300 μ M, reduziu significativamente a viabilidade e a atividade metabólica das células HepG2 e LX-2, enquanto o FEN reduziu a viabilidade das células LX-2 em 1 μ M. Alterações no potencial de membrana mitocondrial também foram observadas, com redução nas células HepG2 expostas ao DIM e ao FEN e aumento da fluorescência de TMRE nas células LX-2, evidenciando respostas mitocondriais dependentes da concentração e da linhagem celular. Esses achados contribuem para a compreensão dos mecanismos celulares associados à toxicidade desses fungicidas e reforçam a importância de estudos *in vitro* para subsidiar futuras avaliações de riscos relacionadas à exposição humana a pesticidas.

Palavras-chave: dimetomorfe; disfunção mitocondrial; fenpropimorfe; HepG2; LX-2.

ABSTRACT

The intensive use of pesticides in modern agriculture has increased in recent decades, driven by the growing demand for food and the need to control pests and diseases in crops of great economic importance. However, human exposure to these compounds, especially through residues present in food and the environment, has raised concerns due to their potential toxic effects. The liver is one of the main target organs of toxicity caused by agricultural pesticides, as it plays a central role in the biotransformation and detoxification of these compounds. In this context, this study aimed to evaluate the effects of the fungicides dimethomorph (DIM) and fenpropimorph (FEN) on cell viability, metabolic activity, and mitochondrial membrane potential in human hepatic cells lines HepG2 and LX-2. The cells were treated for 24 hours with different concentrations of the fungicides and subjected to Sulforhodamine B (SRB), Alamar Blue and tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) assays. After 24 hours of exposure, DIM at 300 μ M significantly reduced cell viability and metabolic activity in both HepG2 and LX-2 cells, whereas FEN reduced LX-2 cell viability at 1 μ M. Alterations in mitochondrial membrane potential were also observed, with decreased TMRE fluorescence in HepG2 cells exposed to DIM and FEN and increased TMRE fluorescence in LX-2 cells, indicating concentration- and cell line-dependent mitochondrial responses. These findings contribute to the understanding of the cellular mechanisms associated with the toxicity of these fungicides and reinforce the importance of in vitro studies to support future risk assessments related to human exposure to pesticides.

Keywords: *dimethomorph; mitochondrial dysfunction; fenpropimorph; HepG2; LX-2.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS.....	18
3. METODOLOGIA	18
3.1. Tratamento experimental com os pesticidas e cultivo celular das linhagens HepG2 e LX-2	18
3.2. Determinação da viabilidade celular e atividade metabólica	19
3.2.1. Sulforrodamina B (SRB)	19
3.2.2. Alamar Blue.....	20
3.3. Determinação do potencial de membrana mitocondrial por sonda tetrametilrodamina etil éster (TMRE).....	21
3.4. Análise Estatística	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Viabilidade celular pelo ensaio de Sulforrodamina B (SRB).....	23
4.2. Atividade Metabólica (Alamar Blue)	24
4.3. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	30
5. CONCLUSÃO	34

1. INTRODUÇÃO

O uso intensivo de defensivos agrícolas tornou-se uma prática central na agricultura moderna, especialmente em sistemas produtivos de larga escala voltados ao atendimento da crescente demanda global por alimentos. Esses compostos são utilizados com a finalidade de reduzir perdas causadas por pragas, plantas daninhas e doenças que comprometem o rendimento e a qualidade das culturas agrícolas. Embora sua aplicação esteja associada ao aumento da produtividade e à estabilidade da produção de alimentos, a ampla utilização desses produtos tem levantado preocupações crescentes quanto aos seus impactos sobre a saúde humana, os ecossistemas e os sistemas públicos de saúde (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009). A exposição humana aos pesticidas pode ocorrer por diferentes vias, incluindo contato ocupacional durante o preparo e a aplicação dos produtos, exposição ambiental em áreas próximas às lavouras e ingestão de água e alimentos contendo resíduos desses compostos (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009). No Brasil, esse cenário assume particular relevância, uma vez que o país apresenta consumo de agrotóxicos elevado e ampla dependência desses produtos em diferentes cadeias agrícolas (PANIS *et al.*, 2022; INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2024).

A utilização intensiva de pesticidas também está relacionada a efeitos ambientais importantes, uma vez que esses compostos podem atingir diferentes compartimentos do ambiente após sua aplicação. Parte dos produtos aplicados pode permanecer no solo, ser transportada por escoamento superficial, atingir águas superficiais e subterrâneas ou dispersar-se pelo ar, ampliando o alcance da contaminação para além da área diretamente tratada (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009). A persistência ambiental, a mobilidade e a toxicidade desses compostos variam de acordo com suas características físico-químicas, formulações comerciais, condições climáticas e práticas agrícolas adotadas. Em revisão crítica sobre a distribuição de pesticidas em solos agrícolas e urbanos brasileiros, Fernandes *et al.* (2020) demonstraram a presença de diferentes classes desses compostos em matrizes ambientais, evidenciando a importância da contaminação do solo como indicador de exposição ambiental. Além disso, pesticidas podem afetar organismos não-alvo, incluindo microrganismos do solo, insetos benéficos, organismos aquáticos e espécies silvestres, comprometendo processos ecológicos essenciais e a qualidade dos recursos naturais (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009; FERNANDES *et al.*, 2020).

Do ponto de vista da saúde pública, a exposição a pesticidas representa uma preocupação relevante devido à diversidade de efeitos adversos já associados a esses compostos. A exposição aguda pode estar relacionada a quadros de intoxicação com manifestações neurológicas, respiratórias, gastrointestinais, dermatológicas e sistêmicas, enquanto a exposição crônica tem sido associada a alterações endócrinas, efeitos reprodutivos, imunológicos, metabólicos e carcinogênicos, dependendo do composto, da dose e do tempo de exposição (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009; PANIS *et al.*, 2022). No Brasil, trabalhadores rurais, crianças, gestantes e populações residentes próximas a áreas agrícolas constituem grupos particularmente vulneráveis, seja pela exposição ocupacional direta, seja pela exposição ambiental e alimentar (PANIS *et al.*, 2022). Entre 2010 e 2019, foram registrados 56.870 casos de intoxicação por agrotóxicos no país, número provavelmente subestimado em razão da subnotificação desses agravos (FUNDAÇÃO HEINRICH BÖLL, 2023). Esses dados reforçam a relevância do tema não apenas como questão agrícola, mas também como problema de saúde coletiva.

Além dos impactos sanitários, as intoxicações por pesticidas geram consequências econômicas e sociais significativas. Os custos associados à exposição e ao adoecimento incluem atendimentos ambulatoriais, internações, afastamentos do trabalho, perda de produtividade, sequelas em longo prazo e sobrecarga ao Sistema Único de Saúde (SUS). Soares e Porto (2012) destacam que os impactos econômicos associados ao uso de agrotóxicos não se restringem ao setor produtivo, pois os custos decorrentes dos danos à saúde frequentemente são transferidos para o sistema público e para a sociedade. Esse cenário evidencia que, embora os pesticidas sejam utilizados para aumentar a produtividade agrícola, parte dos prejuízos sanitários, ambientais e sociais relacionados ao seu uso não é incorporada diretamente ao custo de produção. Assim, a avaliação científica dos efeitos desses compostos torna-se essencial para subsidiar políticas públicas, estratégias de prevenção e medidas regulatórias voltadas à redução da exposição humana e ambiental.

A preocupação com resíduos de pesticidas em alimentos também reforça a necessidade de monitoramento e avaliação de risco. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) coordena o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), cujo objetivo é monitorar resíduos em alimentos de origem vegetal e subsidiar ações de avaliação de risco, fiscalização e comunicação à população. No relatório referente aos ciclos de 2018/2019 e 2022, a ANVISA analisou 3.296 amostras no ciclo 2018/2019, das quais 25,6% apresentaram inconformidade, e 1.772 amostras no ciclo 2022, das quais 25,0% foram consideradas inconformes. Essas

inconformidades incluem resíduos acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR), presença de agrotóxicos não autorizados para determinada cultura ou ingredientes ativos proibidos ou não aprovados no Brasil (ANVISA, 2023). Em âmbito internacional, a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e a *World Health Organization* (WHO) destacam que a gestão de pesticidas deve ser baseada em evidências científicas, avaliação de risco, boas práticas agrícolas e medidas de redução da exposição humana e ambiental (FAO; WHO, 2014). A *European Food Safety Authority* (EFSA) também realiza avaliações de risco de substâncias ativas, considerando aspectos toxicológicos, ambientais, ocupacionais e alimentares (EFSA, 2023). Esses mecanismos de regulação demonstram que a segurança no uso de pesticidas depende de uma base científica continuamente atualizada.

Em nível celular e molecular, um dos mecanismos frequentemente associados à toxicidade dos pesticidas é o desequilíbrio redox. Esse processo ocorre quando há aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e redução da capacidade antioxidante celular, favorecendo danos oxidativos em diferentes biomoléculas (SULE; CONDON; GOMES, 2022). Lipídios de membrana, proteínas estruturais e enzimáticas, além do material genético, podem ser afetados por esse desequilíbrio, resultando em alterações funcionais importantes (SULE; CONDON; GOMES, 2022). Jabłońska-Trypuć *et al.* (2017) discutem que o estresse oxidativo constitui um mecanismo relevante na toxicidade induzida por pesticidas e pode estar associado a efeitos celulares e sistêmicos. De forma semelhante, Sule, Condon e Gomes (2022) apontam que a indução de estresse oxidativo é uma característica comum observada em diferentes classes de pesticidas, tanto em modelos celulares quanto em modelos animais. Esses achados indicam que a investigação de eventos celulares associados ao desequilíbrio redox é fundamental para compreender os mecanismos de toxicidade desses compostos.

Embora o estresse oxidativo seja amplamente descrito na literatura, a disfunção mitocondrial tem recebido crescente atenção como evento central na toxicidade induzida por xenobióticos (REDDAM *et al.*, 2022). As mitocôndrias são organelas essenciais para a produção de ATP por meio da fosforilação oxidativa, além de participarem da regulação do metabolismo celular, da sinalização redox, da homeostase de cálcio e da ativação de vias de morte celular (VASAN *et al.*, 2022). Dessa forma, alterações mitocondriais podem comprometer a bioenergética celular e desencadear respostas que antecedem a perda de viabilidade (VASAN *et al.*, 2022). O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é um dos principais indicadores da integridade funcional das mitocôndrias, pois reflete o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons e o gradiente eletroquímico necessário

à síntese de ATP (SCADUTO JUNIOR; GROTYOHANN, 1999). Alterações no $\Delta\Psi_m$ podem indicar despolarização, comprometimento da atividade respiratória, perda de eficiência energética e ativação de processos associados à morte celular (VASAN et al., 2022). Assim, a avaliação do $\Delta\Psi_m$ constitui uma abordagem relevante para investigar toxicidade celular e disfunção bioenergética.

O fígado destaca-se como um dos principais órgãos-alvo da toxicidade por pesticidas, pois exerce papel central na absorção, biotransformação, metabolização e detoxificação de xenobióticos (ARZUMANIAN; KISELEVA; POVERENNAYA, 2021). As células hepáticas estão particularmente expostas aos efeitos de substâncias químicas, tornando o fígado um modelo fundamental para estudos toxicológicos. A elevada demanda energética desse órgão também torna a mitocôndria um alvo relevante de investigação, uma vez que alterações na função mitocondrial podem comprometer processos metabólicos essenciais. Portanto, estudar a viabilidade celular, a atividade metabólica e o $\Delta\Psi_m$ em modelos hepáticos permite compreender eventos iniciais associados à toxicidade de pesticidas.

Modelos *in vitro* baseados em células humanas têm sido amplamente utilizados em toxicologia por permitirem a avaliação de respostas celulares em condições experimentais controladas e reprodutíveis (OECD, 2018). Esses modelos possibilitam a análise de eventos específicos, como viabilidade celular, citotoxicidade, atividade metabólica, estresse oxidativo e função mitocondrial, além de contribuírem para a redução do uso de animais em etapas iniciais de investigação. Embora não reproduzam integralmente a complexidade de um organismo, os modelos celulares são úteis para identificar mecanismos de toxicidade e selecionar concentrações relevantes para estudos posteriores. A linhagem HepG2, derivada de hepatoblastoma humano, é uma das mais utilizadas em estudos de toxicologia hepática, metabolismo de xenobióticos e citotoxicidade (ARZUMANIAN; KISELEVA; POVERENNAYA, 2021). Apesar de apresentar limitações em relação a hepatócitos primários, essa linhagem mantém características hepáticas relevantes e oferece vantagens como estabilidade, fácil manutenção, elevada reprodutibilidade e ampla disponibilidade experimental (ARZUMANIAN; KISELEVA; POVERENNAYA, 2021).

Em estudo desenvolvido pelo próprio grupo de pesquisa, Arruda et al. (2024) utilizaram células HepG2 para estabelecer um modelo *in vitro* de doença hepática gordurosa não alcoólica induzida por ácidos graxos livres, avaliando deposição lipídica, viabilidade celular, estresse oxidativo e expressão diferencial de anexina A2.

Além da linhagem HepG2, células estreladas hepáticas também apresentam grande relevância em estudos de toxicidade e dano hepático (YIN et al., 2013). As células estreladas são componentes importantes do microambiente hepático e participam de processos relacionados a resposta inflamatória, remodelamento da matriz extracelular e fibrogênese (XU et al., 2005). A linhagem LX-2 corresponde a células estreladas hepáticas humanas imortalizadas e mantém características relevantes desse tipo celular, sendo considerada uma ferramenta importante para estudos relacionados ao dano hepático e à fibrose (XU *et al.*, 2005). A utilização de LX-2 com HepG2 permite avaliar a resposta a pesticidas em diferentes populações celulares hepáticas, ampliando a interpretação dos mecanismos envolvidos na toxicidade. Enquanto HepG2 representa um modelo associado a hepatócitos e metabolismo hepático, LX-2 permite investigar respostas de células estreladas, que são fundamentais em processos de remodelamento tecidual e resposta ao dano. Assim, a combinação dessas linhagens fornece uma abordagem mais abrangente para avaliar os efeitos celulares de xenobióticos em modelos hepáticos humanos.

A literatura recente demonstra que a exposição a pesticidas pode provocar múltiplos efeitos em células hepáticas humanas. Yang *et al.* (2024) observaram que piretrinas naturais induziram dano oxidativo em linhagens celulares hepáticas humanas por meio da modulação da via Nrf-2 (Fator Nuclear Eritróide 2 relacionado ao fator 2), reforçando a sensibilidade desses modelos à toxicidade induzida por pesticidas. Wang *et al.* (2023), ao avaliarem os efeitos combinados de três pesticidas, amplamente utilizados, em células HepG2, demonstraram que tanto compostos isolados quanto misturas podem provocar citotoxicidade, apoptose, necrose e estresse oxidativo. Esses dados são relevantes porque a exposição humana raramente ocorre a um único composto isolado. Na prática, diferentes resíduos podem coexistir em alimentos, água, solo ou ambientes ocupacionais, resultando em cenários de exposição combinada. Dessa forma, a investigação de efeitos celulares em modelos hepáticos contribui para compreender mecanismos de toxicidade que podem ocorrer em condições próximas à exposição real.

Entre os compostos de interesse neste estudo, o dimetomorfe e o fenpropimorfe são fungicidas utilizados no controle de doenças que comprometem culturas de importância agrícola. O dimetomorfe pertence ao grupo das carboxamidas do ácido carboxílico, classificadas pelo *Fungicide Resistance Action Committee* (FRAC) no código 40, grupo associado ao controle de oomicetos e relacionado à interferência em processos de biossíntese de parede celular (FRAC, 2024). A EFSA avaliou o dimetomorfe em processo de revisão de risco, considerando aspectos toxicológicos, ambientais e de exposição, o que

demonstra a relevância regulatória desse composto (EFSA, 2023). O fenpropimorfe, por sua vez, é classificado como fungicida morfolínico associado à inibição da biossíntese de esteróis, interferindo em etapas relacionadas ao ergosterol, componente essencial à integridade da membrana celular de fungos. Compostos que interferem na biossíntese de esteróis podem comprometer a estabilidade e a função das membranas fúngicas, justificando sua ação antifúngica (ONYEWU *et al.*, 2003; FRAC, 2024).

Além dos estudos com células hepáticas, ensaios *in vitro* voltados à avaliação de misturas de pesticidas têm demonstrado a importância da toxicologia baseada em múltiplos desfechos. Tait *et al.* (2022) avaliaram misturas de pesticidas em concentrações derivadas de cenários de exposição ocupacional e destacaram a relevância de abordagens experimentais capazes de priorizar combinações com maior potencial toxicológico. Embora o presente trabalho avalie o DIM e o FEN em condições experimentais específicas, a literatura sobre misturas reforça que a toxicidade de pesticidas deve ser interpretada em um contexto mais amplo, considerando a possibilidade de exposições múltiplas e efeitos cumulativos ou sinérgicos.

Estudos *in vivo* também reforçam a necessidade de investigar fungicidas em diferentes níveis biológicos. Em embriões de *zebrafish*, a exposição ao dimetomorfe em combinação com difenoconazol interferiu no desenvolvimento embrionário e aumentou efeitos adversos relacionados à mortalidade e deformidades (FAN *et al.*, 2021). Mais recentemente, Wang *et al.* (2025) demonstraram que a exposição combinada ao dimetomorfe e ao difenoconazol pode afetar diferentes processos biológicos em *zebrafish*, incluindo respostas intergeracionais. Embora modelos animais não substituam ensaios em células humanas, eles contribuem para a compreensão de efeitos sistêmicos, ambientais e de desenvolvimento associados à exposição a fungicidas. A integração entre modelos *in vitro* e *in vivo* fortalece a avaliação toxicológica, pois permite associar alterações celulares iniciais a possíveis consequências biológicas em níveis mais complexos de organismos.

Apesar da relevância agrícola desses fungicidas, a maior parte das informações disponíveis está relacionada à eficácia agrônômica, ao modo de ação sobre fitopatógenos ou à avaliação regulatória. No entanto, ainda são escassos os estudos voltados aos seus efeitos diretos sobre células humanas, especialmente quanto a alterações funcionais que possam ocorrer antes da perda evidente de viabilidade. Nesse sentido, alterações na atividade metabólica, nos processos bioenergéticos e na integridade mitocondrial podem indicar eventos precoces de toxicidade celular. Portanto, avaliar esses desfechos em

linhagens hepáticas humanas contribui para ampliar o conhecimento sobre os possíveis efeitos celulares associados à exposição ao DIM e ao FEN.

A investigação do $\Delta\Psi_m$, nesse contexto, representa relevância significativa. O ensaio baseado em tetrametilrodamina etil éster (TMRE), permite avaliar o acúmulo do marcador em mitocôndrias funcionalmente ativas, fornecendo uma medida indireta da manutenção do $\Delta\Psi_m$ (SCADUTO JUNIOR; GROTYOHANN, 1999). Reduções na fluorescência de TMRE são geralmente associadas à despolarização mitocondrial e ao comprometimento da função bioenergética, enquanto aumentos podem indicar alterações no equilíbrio eletroquímico e respostas adaptativas dependentes do contexto experimental (TOVAR-FERRERO et al., 2025). Assim, a avaliação do $\Delta\Psi_m$ deve ser interpretada em conjunto com outros parâmetros celulares, como viabilidade e atividade metabólica, para fornecer uma compreensão mais consistente dos efeitos tóxicos. Essa integração é importante porque a disfunção mitocondrial pode contribuir para alterações na atividade metabólica celular e para a ativação de vias associadas à morte celular (VASAN *et al.*, 2022).

Diante desse contexto, torna-se necessário aprofundar a investigação sobre os efeitos do DIM e do FEN em células hepáticas humanas, especialmente considerando a escassez de estudos voltados a efeitos biológicos. A utilização das linhagens HepG2 e LX-2 permite avaliar respostas complementares em diferentes populações celulares do fígado, contribuindo para a compreensão dos mecanismos associados à exposição a fungicidas. Além disso, a análise integrada dos ensaios de SRB, Alamar Blue e TMRE permite relacionar alterações na massa celular, metabolismo redox e integridade mitocondrial, fornecendo uma avaliação mais ampla dos efeitos celulares induzidos por esses compostos.

Assim, o presente estudo apresenta relevância científica, nas áreas da saúde e do meio ambiente, ao investigar compostos amplamente utilizados na agricultura e ainda pouco explorados quanto aos seus efeitos em células hepáticas humanas. A geração de dados experimentais sobre citotoxicidade, atividade metabólica e $\Delta\Psi_m$ pode contribuir para preencher lacunas na literatura, apoiar futuras avaliações de risco e subsidiar estratégias de prevenção relacionadas à exposição humana a pesticidas. Dessa forma, pesquisas dessa natureza fortalecem a toxicologia experimental e podem fornecer subsídios para discussões regulatórias, políticas públicas e ações voltadas à proteção da saúde humana e ambiental.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Objetiva-se, com o presente trabalho, avaliar os efeitos dos fungicidas dimetomorfe e fenpropimorfe sobre a citotoxicidade e o potencial de membrana mitocondrial em células hepáticas humanas das linhagens HepG2 e LX-2, identificando as concentrações associadas a alterações estatisticamente significativas após 24 horas de exposição.

2.1. Objetivos Específicos

- Cultivar e manter células hepáticas humanas da linhagem HepG2 e LX-2 em condições controladas de cultivo celular.
- Tratar as células HepG2 e LX-2 com diferentes concentrações de dimetomorfe e fenpropimorfe por 24 h.
- Verificar a viabilidade celular das células HepG2 e LX-2 após o tratamento com os pesticidas.
- Verificar a atividade metabólica das células HepG2 e LX-2 após o tratamento com os pesticidas.
- Analisar alterações no potencial de membrana mitocondrial das células HepG2 e LX-2 em resposta ao tratamento com o dimetomorfe e fenpropimorfe.

3. METODOLOGIA

3.1. Tratamento experimental com os pesticidas e cultivo celular das linhagens HepG2 e LX-2

As células hepáticas humanas da linhagem HepG2 foram obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). O cultivo celular foi realizado em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) baixa glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e solução de antibióticos – estreptomicina (100 µg/ml) e penicilina (100 U/ml). As células foram mantidas em frascos de cultivo apropriados, em estufa com atmosfera umidificada, a 37°C e

5% de CO₂, condições necessárias para manutenção da viabilidade, adesão e proliferação celular.

As células foram acompanhadas periodicamente em microscópio invertido, a fim de verificar a morfologia, a aderência, a confluência e a ausência de contaminações. A troca do meio de cultivo foi realizada conforme a necessidade metabólica das células, visando à manutenção das condições ideais de crescimento. Quando atingida confluência adequada, as células foram submetidas ao processo de subcultivo, com remoção do meio de cultura, lavagem com solução tampão PBS (Tampão Fosfato-salino) e desprendimento celular por meio de solução de tripsina (0,25%). Após o desprendimento, a ação da tripsina foi neutralizada com meio suplementado com SFB, e a suspensão celular foi homogeneizada para posterior contagem e semeadura em novas placas ou frascos de cultivo.

As células da linhagem LX-2, correspondentes a células estreladas hepáticas humanas imortalizadas, foram cedidas pelo professor Scott L. Friedman, NY, EUA (XU *et al.*, 2005). Essas células foram mantidas sob as mesmas condições gerais de cultivo descritas para a linhagem HepG2.

Após o período necessário para adesão celular, as células foram expostas aos fungicidas DIM e FEN. Para isso, foram preparadas soluções estoque (SE) em dimetilsulfóxido (DMSO), nas concentrações de 20mM para DIM e 1mM para FEN. A partir dessas SE, foram realizadas diluições seriadas em meio de cultura, de modo a obter as concentrações finais utilizadas nos tratamentos (soluções trabalho). As faixas avaliadas foram selecionadas por abrangerem concentrações fisiologicamente relevantes, associadas a níveis potenciais de exposição humana ao DIM e ao FEN.

As células foram incubadas com diferentes concentrações de DIM (9,375; 18,75; 37,5; 75; 150 e 300 µM) e FEN (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2 µM), diluídas em meio de cultivo. Além dos grupos tratados, foram incluídos um grupo controle não tratado, contendo apenas células e meio de cultivo, e um controle de veículo, contendo células, meio de cultivo e DMSO utilizado como veículo, em volume correspondente a 0,5 µL para volume final de 200 µL, permitindo a avaliação dos efeitos dos pesticidas sobre parâmetros da viabilidade celular, atividade metabólica e função mitocondrial.

3.2. Determinação da viabilidade celular e atividade metabólica

3.2.1. Sulforodamina B (SRB)

A viabilidade celular das linhagens HepG2 e LX-2 foi avaliada por meio do ensaio de SRB, conforme metodologia descrita por Vichai e Kirtikara (2006), que se baseia na ligação do corante a resíduos básicos de aminoácidos das proteínas celulares totais em condições levemente ácidas, permitindo estimar indiretamente a massa celular aderida e, consequentemente, a viabilidade celular após os tratamentos. Para isso, 7×10^3 células foram semeadas por poço em placas de 96 poços e, após o período de adesão celular, foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de pesticidas anteriormente citadas.

Posterior ao período de tratamento, as células foram fixadas pela adição direta da solução de ácido tricloroacético (TCA) 50% a 4°C sobre o meio de cultivo sobrenadante, seguida de incubação a 4°C por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas em água corrente para remoção do excesso de TCA e resíduos do meio de cultivo. A secagem foi realizada por inversão da placa, sendo o volume de água remanescente nos poços seco de forma natural em temperatura ambiente.

Para a etapa de coloração, as células fixadas foram incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com solução de SRB 0,04%. Após esse período, as placas foram lavadas, rapidamente, quatro vezes com solução de ácido acético a 1%, a fim de remover o corante não ligado às proteínas celulares. Posteriormente, as placas foram novamente secas em temperaturas ambiente, e o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com solução Tris base 10 mM, pH 10,5. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 510 nm.

A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação ao grupo controle não tratado, a partir da normalização da média de absorbância dos grupos tratados pela média de absorbância dos controles, conforme a equação:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{m\u00e9dia\ da\ absorb\u00e2ncia\ dos\ tratados}{m\u00e9dia\ de\ absorb\u00e2ncia\ dos\ controles} \times 100$$

3.2.2. Alamar Blue

A atividade metabólica celular e a viabilidade celular das linhagens HepG2 e LX-2 foi avaliada por meio do ensaio de Alamar Blue, baseado na redução da resazurina em resorufina por células metabolicamente ativas, conforme descrito por Rampersad (2012), com adaptações. Para isso, 2×10^4 células foram cultivadas em placas de 96 poços e, após o período de adesão celular, foram tratadas por 24 horas com as soluções de pesticidas apresentadas.

A solução de resazurina foi preparada na concentração de 0,4 mM em PBS 1x, sendo posteriormente filtrada em condições estéreis. Devido à sensibilidade da molécula de resazurina

à luz, o preparo, o manuseio e o armazenamento da solução foram realizados protegidos da luminosidade. Ao final do período experimental de 24 h, o meio de cultivo contido nos poços foi removido e substituído por meio novo contendo 10% de solução de resazurina.

Após a adição do reagente, as placas foram incubadas novamente em estufa a 37°C e 5% de CO₂, durante o período suficiente para permitir a redução da resazurina em resorufina pelas células viáveis. A mudança de coloração de azul para rosa foi monitorada durante a incubação, indicando atividade metabólica celular. Foram utilizados controles contendo células não tratadas em meio de cultivo, considerados como controle de viabilidade, bem como poços contendo apenas meio de cultivo, utilizados como branco.

A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm. Para análise dos resultados, os valores de absorbância foram corrigidos pela subtração da leitura em 600 nm da leitura em 570 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação ao grupo controle não tratado conforme a equação:

$$Viabilidade (\%) = \frac{(117216 \times tratamento\ 570) - (80586 \times tratamento\ 600)}{(117216 \times controle\ viável\ 570) - (80586 \times controle\ viável\ 600)} \times 100$$

3.3. Determinação do potencial de membrana mitocondrial por sonda tetrametilrodamina etil éster (TMRE)

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das linhagens HepG2 e LX-2 foi avaliado por meio do ensaio com tetrametilrodamina etil éster (TMRE), um corante catiônico permeável à membrana celular que se acumula na matriz mitocondrial de acordo com o potencial eletroquímico da membrana interna. Assim, alterações na intensidade de fluorescência do TMRE refletem modificações na integridade funcional mitocondrial, sendo este método amplamente utilizado para avaliação do $\Delta\Psi_m$ em células viáveis (SCADUTO JUNIOR; GROTYOHANN, 1999).

Para o ensaio, células HepG2 foram semeadas em placas pretas de fundo transparente de 96 poços na densidade de 2×10^4 células/poço, enquanto células LX-2 foram semeadas na densidade de 1×10^4 células/poço e mantidas em cultivo por mais um dia para adesão e crescimento celular. Após esse período, as células foram tratadas conforme desenho experimental, respeitando as mesmas concentrações e tempo dos demais ensaios.

O controle positivo foi incubado com carbonil cianeto de p-trifluorometoxifenil-hidrazona (FCCP) a 10 μ M, por 30 minutos. O FCCP foi utilizado como indutor da disfunção mitocondrial, permitindo verificar a responsividade do ensaio frente a uma condição de despolarização de membrana previamente conhecida.

Após os tratamentos, as células foram lavadas delicadamente com tampão HBSS/Ca/Mg a 37°C e, em seguida, incubadas com solução de TMRE a 100 nM em DMSO. A placa foi incubada por 30 minutos a 37°C, protegida da luz, a fim de permitir a marcação das mitocôndrias funcionalmente ativas. Passado o tempo de incubação, as células foram novamente lavadas com HBSS/Ca/Mg a 37°C para remoção do excesso de corante. Ao final, foi adicionado o mesmo tampão das lavagens aos poços e a placa permaneceu protegida da luz por 15 a 30 minutos antes da leitura.

A fluorescência do TMRE foi determinada em leitor de placas multimodal utilizando comprimento de onda de excitação de 530 nm e emissão de 580 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de IFR (intensidade de fluorescência relativa) em relação ao grupo controle, considerando que reduções na fluorescência de TMRE indicam perda do $\Delta\Psi_m$ e comprometimento da função mitocondrial.

A intensidade de fluorescência relativa (IFR) foi calculada conforme a equação:

$$IFR = \frac{\text{fluorescência média dos tratados}}{\text{fluorescência média dos controles}} \times 100$$

3.4. Análise Estatística

Os dados foram submetidos à avaliação quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. A homogeneidade das variâncias entre os grupos experimentais foi verificada utilizando o teste de Brown-Forsythe. Os dados que apresentaram distribuição normal e homogeneidade foram analisados por meio da análise de variância de uma via (*One-way* ANOVA). Quando identificadas as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Dunnett, utilizando o grupo controle como referência para as comparações. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05 ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism, versão 8.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP (desvio padrão) de três experimentos independentes em triplicata.

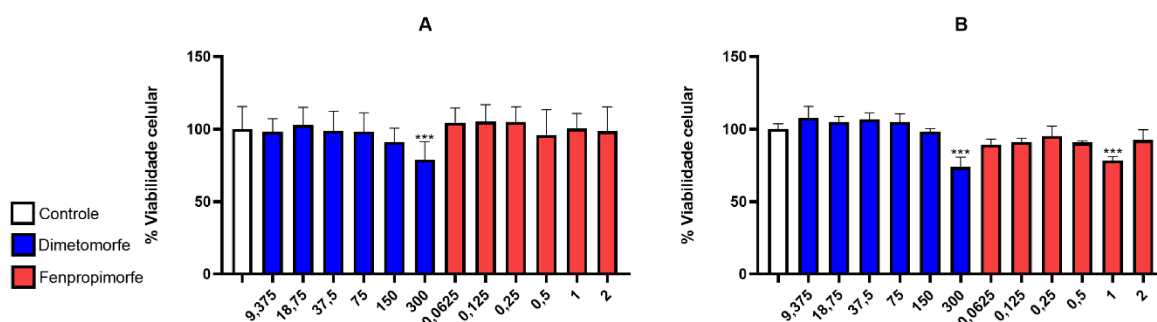
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A definição das concentrações e do tempo de exposição constitui um aspecto importante na interpretação dos resultados obtidos em ensaios *in vitro*. No presente estudo, as células HepG2 e LX-2 foram expostas por 24 horas a uma faixa crescente de concentrações de DIM e FEN, permitindo avaliar as respostas celulares e identificar alterações específicas para cada tipo celular. Essa abordagem está de acordo com recomendações gerais da *Organisaton for Economic Co-operation and Development* (OECD) para boas práticas em métodos *in vitro*, que destacam a importância da seleção de uma faixa apropriada de concentrações, considerando aspectos como solubilidade, citotoxicidade, limites técnicos do método e obtenção de uma possível relação concentração-resposta (OECD, 2018). A exposição por 24 horas foi adotada por representar um período adequado para detectar respostas celulares a exposições agudas aos fungicidas, antes ou durante o estabelecimento de alterações funcionais mais evidentes. Dessa forma, a análise conjunta dos efeitos observados nesse intervalo fornece uma visão inicial dos impactos celulares induzidos pelos compostos avaliados.

4.1. Viabilidade celular pelo ensaio de SRB

A viabilidade das células HepG2 e LX-2 foi avaliada após 24 horas de exposição ao dimetomorfe e ao fenpropimorfe por meio do ensaio de SRB, cujos resultados estão apresentados na Figura 1. Esse ensaio baseia-se na ligação do corante SRB a proteínas celulares totais em condições levemente ácidas, sendo utilizado como estimativa indireta da massa celular aderida e, conseqüentemente, da viabilidade celular após os tratamentos (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Dessa forma, reduções na absorbância refletem diminuição do conteúdo proteico celular, podendo indicar perda de células viáveis, redução da proliferação ou desprendimento celular decorrente do efeito citotóxico dos compostos avaliados.

Figura 1 – Viabilidade celular das linhagens HepG2 (A) e LX-2 (B) após exposição ao DIM e ao FEN por 24 horas, avaliada pelo ensaio de Sulforrodamina B. As barras representam média $\pm$ desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle são indicadas por: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Células da linhagem HepG2 apresentaram viabilidade celular relativamente preservada após exposição à maioria das concentrações de DIM e FEN (Figura 1.A). Para o DIM, observou-se redução significativa da viabilidade celular apenas na maior concentração testada, 300 μ M, em comparação ao grupo controle. As demais concentrações mantiveram valores próximos a 100%, indicando que, nas condições experimentais avaliadas, a linhagem HepG2 apresentou baixa sensibilidade à perda de massa celular induzida pelo DIM em concentrações inferiores. Para o FEN, não foram observadas reduções significativas da viabilidade celular em nenhuma das concentrações avaliadas, sugerindo que esse fungicida não promoveu diminuição expressiva do conteúdo proteico celular total em HepG2 após 24 horas de exposição.

Esse perfil indica que a HepG2 foi relativamente resistente aos efeitos citotóxicos detectáveis pelo SRB, apresentando alteração significativa apenas diante da maior concentração de DIM. Essa resistência pode estar relacionada às características próprias da linhagem. As células HepG2 são derivadas de hepatoblastoma humano e, embora sejam amplamente empregadas em estudos de toxicologia hepática, apresentam particularidades metabólicas e proliferativas associadas à sua origem tumoral (ARZUMANIAN; KISELEVA; POVERENNAYA, 2021). Essas células possuem elevada estabilidade em cultura, capacidade proliferativa acentuada e maior tolerância a determinados estímulos tóxicos, o que pode contribuir para a manutenção da massa celular mesmo em condições de exposição química. Além disso, adaptações metabólicas típicas de células tumorais podem favorecer mecanismos de sobrevivência frente ao estresse celular, incluindo alterações no metabolismo energético, na resposta antioxidante e em vias de reparo (ARZUMANIAN; KISELEVA; POVERENNAYA, 2021).

Entretanto, a ausência de redução expressiva no ensaio de SRB não deve ser interpretada como ausência completa de efeito celular. Como esse ensaio avalia principalmente massa proteica aderida, alterações funcionais mais precoces, como comprometimento metabólico ou disfunção mitocondrial, podem ocorrer antes que haja diminuição evidente do número de

células ou do conteúdo proteico total. Por isso, os resultados devem ser interpretados em conjunto com ensaios complementares, como Alamar Blue e TMRE, que avaliam, respectivamente, atividade metabólica e $\Delta\Psi_m$. Essa abordagem integrada é importante porque diferentes ensaios de viabilidade podem responder de maneira distinta dependendo do mecanismo de toxicidade, do tempo de exposição e do tipo celular avaliado (RISS *et al.*, 2016).

Na linhagem LX-2, o ensaio de SRB revelou respostas que variaram de acordo com o fungicida e a concentração avaliados. Para o DIM, a concentração de 300 μM promoveu redução significativa da viabilidade celular, indicando efeito citotóxico na maior concentração avaliada (Figura 1.B). Para o FEN, observou-se redução significativa da viabilidade celular na concentração de 1 μM . Embora as demais concentrações tenham permanecido próximas ao controle, a presença de reduções significativas em LX-2 demonstra que essa linhagem respondeu de forma mais sensível a determinados tratamentos. Esse achado é relevante porque células LX-2 correspondem a uma linhagem de células estreladas hepáticas humanas imortalizadas, amplamente utilizada como modelo para estudos relacionados ao dano hepático, ativação celular, remodelamento de matriz extracelular e fibrogênese (XU *et al.*, 2005).

A maior sensibilidade da LX-2 pode estar associada ao papel biológico das células estreladas hepáticas em processos de resposta ao dano. Em condições fisiológicas, essas células participam da homeostase hepática e permanecem em estado relativamente quiescente (HOU; SYN, 2018). No entanto, diante de estímulos tóxicos, inflamatórios ou oxidativos, podem sofrer ativação e adquirir um fenótipo semelhante ao de miofibroblastos, caracterizado por maior atividade metabólica, aumento da expressão de proteínas contráteis e maior produção de componentes da matriz extracelular, especialmente colágeno (HOU; SYN, 2018; XU *et al.*, 2005). Esse processo é relevante porque a ativação persistente das células estreladas hepáticas está diretamente relacionada à deposição excessiva de matriz extracelular e ao desenvolvimento da fibrose hepática (XU *et al.*, 2005; HOU; SYN, 2018; SMITH-CORTINEZ *et al.*, 2020). Estudos demonstram que a ativação de células estreladas envolve mudanças no metabolismo energético e na função mitocondrial processos que podem modificar a resposta dessas células a xenobióticos (SMITH-CORTINEZ *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2022). Assim, a redução da viabilidade observada em LX-2 sugere que células estreladas hepáticas podem representar um alvo relevante na toxicidade induzida por fungicidas, especialmente considerando que o dano hepático envolve a interação entre diferentes populações celulares.

A comparação entre as duas linhagens evidencia que a citotoxicidade induzida pelos fungicidas não ocorreu de maneira uniforme nos modelos hepáticos avaliados. Especificamente, o DIM, na concentração de 300 μM , reduziu significativamente a viabilidade

em HepG2 e LX-2, enquanto o FEN, na concentração de 1 μ M, promoveu redução significativa somente em LX-2. Esse comportamento sugere que a resposta citotóxica depende não apenas da concentração e do composto testado, mas também das características biológicas do modelo celular. Diferenças no estado metabólico basal, na capacidade proliferativa, na sensibilidade ao estresse oxidativo, na função mitocondrial e nos mecanismos de reparo celular podem influenciar diretamente a susceptibilidade das linhagens aos pesticidas.

Além disso, os resultados não demonstram um padrão estritamente dose-dependente para todos os tratamentos, especialmente no caso do FEN em LX-2, no qual a redução significativa foi observada na concentração de 1 μ M, mas não na maior concentração testada. Esse tipo de resposta pode ocorrer em estudos toxicológicos *in vitro*, uma vez que diferentes concentrações podem ativar mecanismos celulares distintos, incluindo adaptação, compensação metabólica, estresse subletal ou perda seletiva de subpopulações celulares mais sensíveis (CALABRESE; MATTSON, 2017). Portanto, embora a redução de viabilidade em pontos específicos indique efeito citotóxico, a ausência de linearidade reforça a necessidade de interpretar os dados em conjunto com outros parâmetros funcionais.

Os achados deste estudo estão de acordo com a literatura, que demonstra que pesticidas podem comprometer a viabilidade de células hepáticas humanas, embora a intensidade da resposta varie conforme o composto, a concentração, o tempo de exposição e o modelo celular utilizado. Wang *et al.* (2023) observaram que clorpirifós, carbofurano e acetamiprido, avaliados isoladamente ou em combinação em concentrações correspondentes a 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2 vezes as respectivas EC_{50} , promoveram citotoxicidade, apoptose, necrose e estresse oxidativo em células HepG2. De forma complementar, em uma revisão sobre os mecanismos envolvidos na toxicidade induzida por pesticidas, Sule, Condon e Gomes (2022) destacam que diferentes classes desses compostos podem induzir estresse oxidativo em diversos tipos celulares e modelos animais, frequentemente associado a alterações mitocondriais e ativação de vias de morte celular. Assim, mesmo com a redução da viabilidade apenas em determinadas concentrações, esses dados podem representar parte de um processo toxicológico mais amplo.

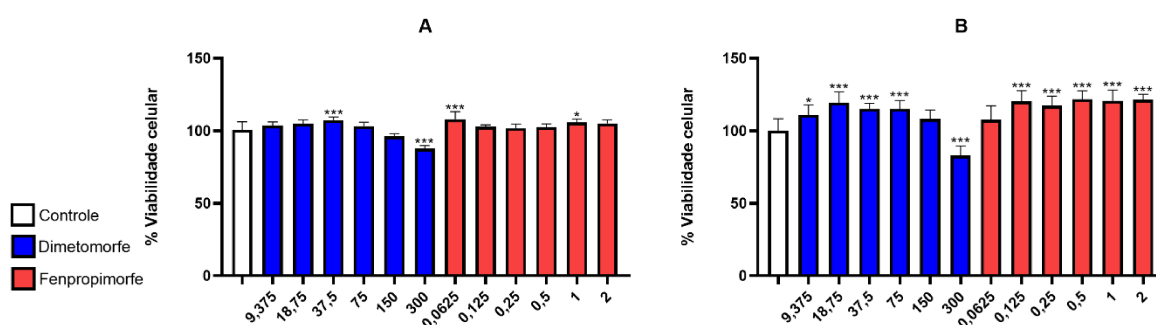
Em conjunto, os resultados indicam que o DIM e o FEN foram capazes de reduzir a viabilidade celular em concentrações específicas, com maior sensibilidade observada na linhagem LX-2. A resposta distinta entre HepG2 e LX-2 reforça a importância da utilização de diferentes tipos celulares para a avaliação da toxicidade de pesticidas. Enquanto a HepG2 fornece informações relacionadas a um modelo hepático amplamente utilizado em toxicologia, a LX-2 permite avaliar respostas de células estreladas hepáticas, importantes na resposta ao dano e na remodelação tecidual. Portanto, os dados sugerem que os fungicidas avaliados podem

exercer efeitos citotóxicos dependentes da linhagem celular e da concentração, contribuindo para a compreensão inicial dos impactos desses compostos em modelos hepáticos humanos.

4.2. Atividade metabólica pelo ensaio de Alamar Blue

A atividade metabólica das linhagens HepG2 e LX-2 foi avaliada após 24 horas de exposição ao DIM e ao FEN por meio do ensaio de Alamar Blue, cujos resultados estão apresentados na Figura 2. Esse ensaio baseia-se na redução da resazurina, composto azul e pouco fluorescente, em resorufina, produto rosa e altamente fluorescente, por células metabolicamente ativas. Dessa forma, o Alamar Blue permite estimar a atividade redox celular e a viabilidade metabólica das células após a exposição aos compostos avaliados (RAMBERSAD, 2012). No entanto, é importante destacar que esse ensaio não mede diretamente o número de células, mas sim a capacidade metabólica das células viáveis em reduzir a resazurina. Por esse motivo, aumentos ou reduções no sinal do Alamar Blue devem ser interpretados como alterações na atividade metabólica celular, e não necessariamente como mudanças diretas na proliferação ou na quantidade total de células (RISS *et al.*, 2016; VIEIRA-DASILVA *et al.*, 2023).

Figura 2 - Atividade metabólica das linhagens HepG2 (A) e LX-2 (B) após exposição ao DIM e ao FEN por 24 horas, avaliada pelo ensaio de Alamar Blue. As barras representam média $\pm$ desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle são indicadas por: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Conforme apresentado na Figura 2, a linhagem HepG2 apresentou atividade metabólica relativamente preservada após exposição à maioria das concentrações de DIM e FEN. Para o DIM, observou-se aumento significativo da atividade metabólica na concentração de 37,5 μ M,

enquanto a maior concentração avaliada, 300 μM , promoveu redução significativa em relação ao grupo controle. As demais concentrações permaneceram próximas aos valores do controle, sugerindo que a resposta metabólica da HepG2 ao DIM ocorreu de forma dependente da concentração, mas sem um padrão linear simples. Esse resultado indica que concentrações intermediárias podem induzir uma resposta metabólica compensatória, enquanto a maior concentração testada foi capaz de comprometer a atividade metabólica celular.

Em relação ao FEN, em células HepG2, foi observado aumento significativo da atividade metabólica nas concentrações de 0,0625 μM e 1 μM , sem redução significativa nas demais concentrações. Esse padrão sugere que o FEN, nas condições experimentais avaliadas, não comprometeu de forma evidente a viabilidade metabólica da linhagem HepG2 após 24 horas de exposição. No entanto, esse não deve ser interpretado necessariamente como aumento de proliferação celular. Como a redução da resazurina depende da atividade metabólica e do estado redox celular, esse aumento pode refletir intensificação transitória do metabolismo das células remanescentes, ativação de mecanismos adaptativos ou alteração na atividade de vias oxidorreduzidoras (VIEIRA-DA-SILVA; CASTANHO, 2023).

A interpretação desses resultados deve considerar as características biológicas da linhagem HepG2. Como exposto anteriormente, por ser derivada de hepatoblastoma humano, essa linhagem apresenta particularidades metabólicas associadas à sua origem tumoral, incluindo maior plasticidade bioenergética e capacidade de adaptação a condições de estresse (ARZUMANIAN; KISELEVA; POVERENNAYA, 2021). Assim, a manutenção ou o aumento da atividade metabólica em determinadas concentrações pode estar relacionado à ativação de respostas compensatórias, permitindo que as células mantenham seu metabolismo mesmo diante da exposição aos fungicidas. Esse comportamento é coerente com o observado no ensaio de SRB, no qual a HepG2 apresentou redução significativa da viabilidade apenas na maior concentração de DIM. Portanto, em células HepG2 alterações metabólicas podem ocorrer de forma discreta ou pontual antes da perda expressiva de massa celular.

Na linhagem LX-2, o perfil observado no Alamar Blue foi mais pronunciado quando comparado com as células HepG2, conforme apresentado na Figura 2. Para o DIM, houve aumento significativo da atividade metabólica em concentrações iniciais e intermediárias, especialmente entre 9,375 e 75 μM . Por outro lado, a concentração de 300 μM promoveu redução significativa da atividade metabólica em relação ao controle. Esse padrão sugere uma resposta bifásica, na qual concentrações menores ou intermediárias estimulam a atividade metabólica das células, enquanto a maior concentração avaliada compromete esse parâmetro. Esse tipo de comportamento pode ocorrer quando a célula, diante de um estresse químico

moderado, aumenta temporariamente sua atividade metabólica como tentativa de adaptação. Entretanto, quando a intensidade do estímulo ultrapassa a capacidade de compensação celular, ocorre redução da atividade metabólica, como observado na concentração de 300 μM .

Para o FEN em LX-2, a Figura 2 demonstra aumento significativo da atividade metabólica em várias concentrações, principalmente entre 0,125 e 2 μM . Esse resultado indica que a LX-2 apresentou forte resposta metabólica ao FEN, mesmo em concentrações que não reduziram significativamente a viabilidade celular pelo ensaio de SRB. Tal achado reforça que o método de Alamar Blue pode detectar alterações funcionais que não são necessariamente acompanhadas por perda imediata de massa celular. Nesse caso, o aumento da atividade metabólica pode estar associado à ativação de mecanismos celulares de resposta ao estresse, alteração do metabolismo energético ou reprogramação metabólica das células estreladas hepáticas.

O aumento da atividade metabólica observado no ensaio de Alamar Blue deve ser interpretado como alteração da capacidade redutora celular, e não como aumento direto de viabilidade ou proliferação (VIEIRA-DA-SILVA; CASTANHO, 2023). A conversão da resazurina em resorufina depende da atividade de sistemas oxidorredutores celulares, incluindo enzimas associadas ao metabolismo energético e ao balanço de NADH/NADPH (VIEIRA-DA-SILVA; CASTANHO, 2023). Assim, compostos capazes de modificar o estado redox intracelular podem aumentar ou reduzir o sinal do ensaio sem que isso corresponda, necessariamente, a variações proporcionais no número de células viáveis. Nesse sentido, os aumentos observados principalmente em LX-2 sugerem que a exposição ao dimetomorfe e ao fenpropimorfe pode ter alterado a atividade redox/metabólica das células remanescentes, indicando uma resposta funcional ao estresse químico. Essa interpretação reforça a necessidade da análise em conjunto com outros parâmetros, como viabilidade celular e potencial de membrana mitocondrial, uma vez que alterações metabólicas podem ocorrer de forma independente da perda imediata de massa celular (RISS *et al.*, 2016).

Esse ponto é importante porque ensaios baseados no metabolismo celular podem ser influenciados por alterações na função mitocondrial, no consumo de substratos, na atividade de desidrogenases e no estado redox intracelular (VIEIRA-DA-SILVA; CASTANHO, 2023). Vieira-da-Silva *et al.* (2023) destacam que ensaios baseados na redução da resazurina exigem interpretação cuidadosa, pois o sinal pode ser afetado por processos intracelulares e extracelulares, além de apresentar desvios de linearidade dependendo da densidade celular, do tempo de incubação e das condições experimentais. Essa interpretação é coerente com a biologia das células estreladas hepáticas, uma vez que a ativação dessas células envolve intensa

reprogramação metabólica. Chen *et al.* (2012) demonstraram que a transdiferenciação de células estreladas hepáticas em miofibroblastos depende de alterações metabólicas associadas à glicólise e ao acúmulo de lactato, enquanto Hou e Syn (2018) destacam que glicólise, glutaminólise e metabolismo lipídico participam da ativação e da fibrogênese mediada por essas células.

A resposta bifásica observada em LX-2 para o DIM também pode ser discutida sob o conceito de respostas não monotônicas ou adaptativas em toxicologia. Em determinadas condições, concentrações menores de agentes químicos podem induzir respostas compensatórias, enquanto concentrações mais elevadas resultam em inibição funcional ou citotoxicidade (CALABRESE; MATTSON, 2017). Esse fenômeno não significa ausência de toxicidade, mas sim que diferentes faixas de concentração podem ativar mecanismos celulares distintos. No presente estudo, o aumento da atividade metabólica em concentrações menores e intermediárias, seguido de redução em 300 μ M, sugere que a célula pode inicialmente tentar compensar o estresse induzido pelo DIM, mas perde essa capacidade em concentrações mais elevadas.

Quando analisados em conjunto com os resultados de viabilidade celular, os dados de Alamar Blue indicam que a linhagem LX-2 apresentou maior sensibilidade funcional aos fungicidas em comparação à HepG2. Enquanto a HepG2 manteve atividade metabólica próxima ao controle na maior parte das concentrações, com alterações significativas apenas em pontos específicos, a LX-2 apresentou aumento metabólico em várias condições experimentais e redução significativa na maior concentração de DIM. Esse perfil sugere que os fungicidas avaliados podem modular a atividade metabólica de maneira dependente da linhagem e da concentração, mesmo em condições nas quais a perda de viabilidade celular ainda não é expressiva. Dessa forma, os resultados reforçam que a toxicidade do DIM e do FEN não deve ser interpretada apenas pela redução da massa celular, mas também por alterações funcionais associadas ao metabolismo celular, evidenciando a importância da análise integrada entre SRB e Alamar Blue.

4.3. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

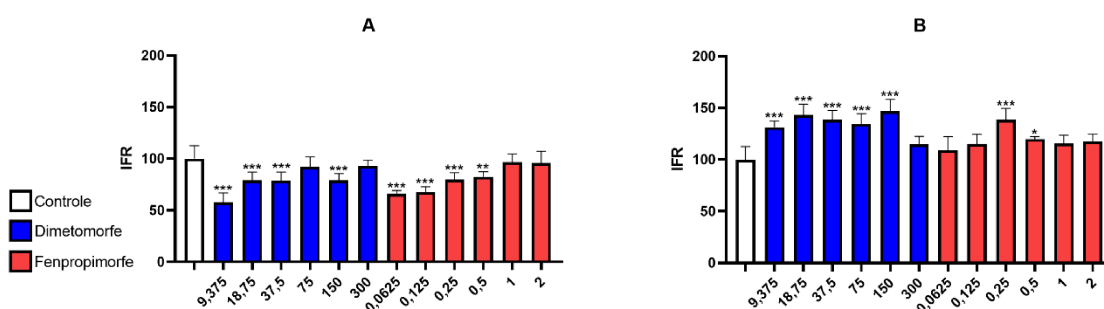
O $\Delta\Psi_m$ das linhagens HepG2 e LX-2 foi avaliado após 24 horas de exposição ao DIM e ao FEN. Os resultados estão apresentados na Figura 3.

O TMRE é um fluoróforo catiônico permeável à membrana celular que se acumula preferencialmente em mitocôndrias funcionalmente ativas, de acordo com o potencial

eletroquímico da membrana mitocondrial interna. Dessa forma, alterações na fluorescência de TMRE refletem modificações no $\Delta\Psi_m$, um parâmetro essencial para a manutenção da fosforilação oxidativa, produção de ATP e homeostase energética celular (SCADUTO JUNIOR; GROTYOHANN, 1999; ZOROVA *et al.*, 2018).

Conforme apresentado na Figura 3, a linhagem HepG2 apresentou redução significativa da fluorescência de TMRE após exposição a diferentes concentrações dos fungicidas. Para a exposição ao DIM, observou-se redução significativa do sinal de TMRE nas concentrações de 9,375; 18,75; 37,5 e 150 μ M. Esse resultado indica despolarização mitocondrial em condições específicas, sugerindo comprometimento do potencial eletroquímico mitocondrial. É relevante destacar que essa redução ocorreu em concentrações que não reduziram significativamente a viabilidade celular. Esse achado sugere que a disfunção mitocondrial pode ocorrer antes da perda evidente de massa celular, caracterizando um evento funcional precoce na toxicidade induzida pelo DIM.

Figura 3 - Potencial de membrana mitocondrial das linhagens HepG2 (A) e LX-2 (B) após exposição ao DIM e ao FEN por 24 horas, avaliado pela marcação com fluoróforo TMRE. Os resultados estão expressos em IFR. As barras representam média $\pm$ desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle são indicadas por: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Ainda nas células HepG2, a concentração de 300 μ M de DIM reduziu significativamente a viabilidade celular e a atividade metabólica, mas não apresentou alteração significativa do $\Delta\Psi_m$, observada em algumas concentrações menores. Esse resultado pode refletir a natureza dinâmica da resposta mitocondrial. Em concentrações mais elevadas, parte das células pode estar em estágio avançado de comprometimento, com perda de aderência, redução da atividade

metabólica ou alterações que modificam a retenção do marcador. Outra possibilidade é que, nessa condição, o efeito citotóxico envolva mecanismos adicionais além da despolarização mitocondrial, incluindo dano à membrana plasmática, estresse oxidativo intenso, alteração de proteínas celulares ou comprometimento metabólico global. Assim, a ausência de alteração significativa no $\Delta\Psi_m$ em uma concentração elevada não exclui toxicidade, mas indica que o mecanismo observado pode ser mais complexo do que uma relação linear entre dose e despolarização.

Os dados apresentados na Figura 3, demonstram redução significativa da fluorescência de TMRE em concentrações iniciais e intermediárias, especialmente entre 0,0625 e 0,5 μM em células HepG2 tratadas com o FEN. Esse achado indica que o FEN também foi capaz de alterar o $\Delta\Psi_m$ nas células HepG2, mesmo em concentrações que não promoveram redução significativa da viabilidade. Portanto, esse resultado reforça que a mitocôndria pode ser um alvo sensível à ação dos fungicidas, e que alterações no $\Delta\Psi_m$ podem anteceder ou ocorrer independentemente da perda evidente de viabilidade celular.

O $\Delta\Psi_m$ é essencial para a produção de ATP e para a manutenção da função celular. A despolarização mitocondrial pode comprometer a fosforilação oxidativa, alterar a homeostase de cálcio, favorecer a geração de espécies reativas e contribuir para a ativação de vias de morte celular (ZOROVA *et al.*, 2018). Em contexto toxicológico, a mitocôndria é reconhecida como um alvo central de diferentes xenobióticos, incluindo pesticidas. Reddam *et al.* (2022) destacam que exposições químicas ambientais podem afetar a função mitocondrial por múltiplos mecanismos, incluindo redução do potencial de membrana, dano ao DNA mitocondrial, alterações na cadeia respiratória e aumento do estresse oxidativo. Assim, os resultados observados em HepG2 são compatíveis com a literatura que associa a exposição a pesticidas à disfunção mitocondrial.

Por outro lado, na linhagem LX-2, diversas concentrações dos fungicidas promoveram aumento significativo da fluorescência de TMRE. Para o DIM, foram observados aumentos significativos nas concentrações de 9,375; 18,75; 37,5; 75 e 150 μM . Para o FEN, os aumentos significativos ocorreram principalmente nas concentrações de 0,25 e 0,5 μM . Esse padrão sugere hiperpolarização mitocondrial ou alteração do estado eletroquímico mitocondrial em resposta à exposição aos fungicidas. Esses resultados indicam que os mesmos compostos podem induzir respostas mitocondriais distintas de acordo com o tipo celular e podem ser relacionados ao aumento significativo da atividade metabólica em várias concentrações de DIM e FEN observado nas células LX-2. Essa associação sugere que as células LX-2 podem

responder aos fungicidas por meio de ativação metabólica acompanhada de alteração bioenergética mitocondrial.

A hiperpolarização mitocondrial pode ocorrer em situações de estresse celular, alteração no consumo de ATP, redução do retorno de prótons pela ATP sintase ou tentativa de compensação bioenergética (TOVAR-FERRERO *et al.*, 2025). Zorova *et al.* (2018) destacam que o $\Delta\Psi_m$ está diretamente associado ao estado funcional das mitocôndrias e pode variar de acordo com o balanço entre transporte de elétrons, bombeamento de prótons, consumo energético e integridade da membrana interna. Portanto, o aumento da fluorescência observado na LX-2 pode ser interpretado como alteração da homeostase mitocondrial.

Estudos sobre células estreladas hepáticas demonstram que o metabolismo mitocondrial exerce papel importante na ativação dessas células e na resposta ao dano hepático. Smith-Cortinez *et al.* (2020) observaram que a ativação de células estreladas envolve indução simultânea da glicólise e da fosforilação oxidativa, indicando que essas células aumentam sua demanda energética durante processos de ativação. De forma complementar, Zhou *et al.* (2022) demonstraram que o estresse oxidativo pode promover fissão mitocondrial e estimular a fosforilação oxidativa durante a ativação de células estreladas hepáticas. Esses dados ajudam a sustentar a hipótese de que o aumento da intensidade de fluorescência do TMRE observado pode refletir uma resposta adaptativa ou de ativação mitocondrial em LX-2 frente à exposição aos fungicidas.

A diferença entre os efeitos observados sobre o $\Delta\Psi_m$ entre as células HepG2 e LX-2 expostas aos pesticidas é um dos achados mais importantes deste estudo. Enquanto a HepG2 apresentou tendência predominante de despolarização mitocondrial, a LX-2 apresentou aumento da fluorescência de TMRE em várias concentrações, sugerindo hiperpolarização. Essa resposta oposta pode ser explicada pelas diferenças funcionais entre as linhagens. A HepG2, por ser derivada de hepatoblastoma, apresenta adaptações metabólicas próprias de células tumorais, enquanto a LX-2 representa células estreladas hepáticas, cuja função está diretamente relacionada à resposta ao dano, ativação celular e remodelamento do tecido hepático (ARZUMANIAN; KISELEVA; POVERENNAYA, 2021; XU *et al.*, 2005). Portanto, os resultados da Figura 3 indicam que a exposição aos fungicidas afeta a função mitocondrial de maneira dependente do modelo celular.

Outro ponto importante é que os resultados não apresentaram um padrão estritamente dose-dependente em todas as condições. Esse tipo de resposta é comum em ensaios celulares envolvendo xenobióticos, pois diferentes concentrações podem ativar mecanismos celulares distintos. Concentrações menores podem induzir respostas adaptativas ou compensatórias,

enquanto concentrações maiores podem provocar dano celular mais intenso, redução da atividade metabólica ou perda de células sensíveis antes da leitura. Assim, a ausência de linearidade não invalida os resultados, mas reforça que a toxicidade dos fungicidas envolve mecanismos complexos e dependentes do contexto celular.

A literatura recente reforça que a mitocôndria constitui um alvo sensível da toxicidade induzida por fungicidas e outros pesticidas em células hepáticas humanas. Vandensande *et al.* (2024) demonstraram que a exposição de células HepG2 ao fungicida kresoxim-metil, isoladamente ou em combinação com boscalida, promoveu disfunção mitocondrial, caracterizada por redução da respiração celular, aumento de superóxido mitocondrial, diminuição dos níveis de ATP e alteração da viabilidade celular. De modo semelhante, Ren *et al.* (2022) observaram que o inseticida clorfenapir induziu toxicidade em HepG2 por mecanismos mediados pela mitocôndria, incluindo acúmulo de espécies reativas, sobrecarga de cálcio mitocondrial, apoptose e autofagia. Esses estudos não avaliam diretamente DIM e FEN, mas demonstram que compostos utilizados na agricultura podem alterar a função mitocondrial em modelos hepáticos humanos. Nesse sentido, os resultados apresentados na Figura 3 indicam que os fungicidas avaliados interferiram no $\Delta\Psi_m$ de maneira dependente da linhagem celular, com despolarização predominante em HepG2 e provável hiperpolarização em LX-2, sugerindo respostas bioenergéticas distintas frente ao mesmo estímulo químico.

Em conjunto, os resultados indicam que o DIM e o FEN promoveram alterações no $\Delta\Psi_m$ de forma dependente da linhagem celular. Esses achados reforçam a mitocôndria como alvo relevante da toxicidade induzida por fungicidas e demonstram que diferentes populações celulares hepáticas podem responder de maneira distinta à exposição aos mesmos compostos.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo conclui, portanto, que a exposição ao DIM e ao FEN promoveu alterações dependentes da linhagem celular e da concentração em células hepáticas humanas. A linhagem HepG2 apresentou maior preservação da viabilidade celular, mas alterações relevantes no $\Delta\Psi_m$, enquanto a linhagem LX-2 demonstrou maior sensibilidade funcional, com alterações na viabilidade, atividade metabólica e provável hiperpolarização mitocondrial. Esses resultados contribuem para ampliar o conhecimento sobre os efeitos celulares desses fungicidas e reforçam a importância de estudos *in vitro* com diferentes modelos hepáticos para subsidiar

futuras investigações toxicológicas e avaliações de risco relacionadas à exposição humana a pesticidas.

Apesar da relevância dos resultados obtidos, algumas limitações devem ser consideradas. O estudo foi realizado em modelos *in vitro*, que, embora permitam controle experimental e análise de mecanismos celulares específicos, não reproduzem integralmente a complexidade de um organismo. Além disso, a exposição foi avaliada em um único tempo experimental, 24 horas, o que limita a compreensão de respostas tardias ou persistentes. Também é importante considerar que os ensaios utilizados indicam alterações de viabilidade, metabolismo e potencial mitocondrial, mas não permitem, isoladamente, definir todos os mecanismos moleculares envolvidos. Assim, estudos futuros devem incluir outros tempos de exposição, avaliação de espécies reativas de oxigênio, apoptose, necrose, produção de ATP, dinâmica mitocondrial e expressão de marcadores associados ao estresse oxidativo e à ativação de células estreladas hepáticas.

REFERÊNCIAS

- AKTAR, Md Wasim; SENGUPTA, Dwaipayan; CHOWDHURY, Ashim. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2009. DOI: 10.2478/v10102-009-0001-7. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>. Acesso em: 07 jul. 2026.
- ANVISA. *Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA: relatório dos ciclos 2018–2019 e 2022*. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2023. Disponível em: <https://bibliotecadigital.anvisa.gov.br/jspui/bitstream/anvisa/12503/4/Relatorio-2018-2019-2022.pdf>. Acesso em: 07 jul. 2026.
- ARRUDA, Vinícius Marques; AZEVEDO, Gabriela Tolentino; GRANATO, Maria Júlia Maia Gonçalves; MATOS, André Carlos Pereira; ARAÚJO, Thaise Gonçalves; GUERRA, Joyce Ferreira da Costa. Oxidative stress and Annexin A2 differential expression in free fatty acids-induced non-alcoholic fatty liver disease in HepG2 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 25, n. 17, art. 9591, 2024. DOI: 10.3390/ijms25179591. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25179591>. Acesso em: 16 ago. 2026.
- ARZUMANIAN, V. A.; KISELEVA, O. I.; POVERENNAYA, E. V. The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 23, art. 13135, 2021. DOI: 10.3390/ijms222313135. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>. Acesso em: 09 jul. 2026.
- CALABRESE, E. J.; MATTSON, M. P. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *NPJ Aging and Mechanisms of Disease*, v. 3, art. 13, 2017. DOI: 10.1038/s41514-017-0013-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0013-z>. Acesso em: 15 jul. 2026.
- CAYMAN CHEMICAL. *TMRE Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit: instruction manual*. Ann Arbor: Cayman Chemical Company, 2018.
- CHEN, Yuping et al. Hedgehog controls hepatic stellate cell fate by regulating metabolism. *Gastroenterology*, v. 143, n. 5, p. 1319–1329.e11, 2012. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.07.115. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.07.115>. Acesso em: 21 jul. 2026.
- EFSA. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance dimethomorph. *EFSA Journal*, v. 21, n. 6, e08032, 2023. DOI: 10.2903/j.efsa.2023.8032. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8032>. Acesso em: 07 jul. 2026.
- FAN, R.; ZHANG, W.; JIA, L.; LI, L.; ZHAO, J.; ZHAO, Z.; PENG, S.; CHEN, Y.; YUAN, X. Combined developmental toxicity of the pesticides difenoconazole and dimethomorph on embryonic zebrafish. *Toxins*, Basel, v. 13, n. 12, art. 854, 2021. DOI: 10.3390/toxins13120854. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins13120854>. Acesso em: 11 fev. 2026.
- FAO; WHO. *International Code of Conduct on Pesticide Management: guidelines on pesticide legislation*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization, 2014. Disponível em: <https://www.fao.org/3/i3604e/i3604e.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2026.

FERNANDES, Caroline Lopes Feijo; VOLCÃO, Lisiane Martins; RAMIRES, Paula Florêncio; MOURA, Renata Rodrigues de; SILVA JÚNIOR, Flavio Manoel Rodrigues da. Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: a critical review. *Environmental Science: Processes & Impacts*, v. 22, n. 2, p. 256–270, 2020. DOI: 10.1039/C9EM00433E. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C9EM00433E>. Acesso em: 07 jul. 2026.

FRAC. *CAA fungicides*. Fungicide Resistance Action Committee, [s.d.]. Disponível em: <https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/caa-fungicides/>. Acesso em: 07 jul. 2026.

FRAC. *FRAC Code List 2024: fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action*. Fungicide Resistance Action Committee, 2024. Disponível em: <https://www.frac.info/media/kufnaceb/frac-code-list-2024.pdf>. Acesso em: 09 jul. 2026.

FUNDAÇÃO HEINRICH BÖLL. *Atlas dos Agrotóxicos: fatos e dados do uso dessas substâncias na agricultura*. Rio de Janeiro: Fundação Heinrich Böll, 2023. Disponível em: <https://br.boell.org/sites/default/files/2023-12/atlas-do-agrotoxico-2023.pdf>. Acesso em: 07 jul. 2026.

HOU, Wenzhao; SYN, Wing-Kin. Role of metabolism in hepatic stellate cell activation and fibrogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 6, art. 150, 2018. DOI: 10.3389/fcell.2018.00150. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00150>. Acesso em: 21 jul. 2026.

IBAMA. *Relatórios de comercialização de agrotóxicos*. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 07 jul. 2026.

JABŁOŃSKA-TRYPUĆ, A.; WOŁEJKO, E.; WYDRO, U.; BUTAREWICZ, A. The impact of pesticides on oxidative stress level in human organism and their activity as an endocrine disruptor. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 52, n. 7, p. 483–494, 2017. DOI: 10.1080/03601234.2017.1303322. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1303322>. Acesso em: 11 fev. 2026.

LORI, Gabriele et al. Toxicological comparison of mancozeb and zoxamide fungicides at environmentally relevant concentrations by an *in vitro* approach. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 18, n. 16, art. 8591, 2021. DOI: 10.3390/ijerph18168591. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph18168591>. Acesso em: 21 jul. 2026.

OECD. *Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP)*. OECD Series on Testing and Assessment, n. 286. Paris: OECD Publishing, 2018. DOI: 10.1787/9789264304796-en. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264304796-en>. Acesso em: 29 jul. 2026.

OECD. *Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests*. OECD Series on Testing and Assessment, n. 129. Paris: OECD Publishing, 2010. DOI: 10.1787/d77a7e39-en. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/d77a7e39-en>. Acesso em: 29 jul. 2026.

ORELLANA, Esteban A.; KASINSKI, Andrea L. Sulforhodamine B (SRB) assay in cell culture to investigate cell proliferation. *Bio-protocol*, v. 6, n. 21, e1984, 2016. DOI:

10.21769/BioProtoc.1984. Disponível em: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1984>. Acesso em: 25 fev. 2026.

ONYEWU, Chiatogu; BLANKENSHIP, Jill R.; DEL POETA, Maurizio; HEITMAN, Joseph. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 3, p. 956–964, 2003. DOI: 10.1128/AAC.47.3.956-964.2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.956-964.2003>. Acesso em: 12 ago. 2026.

PANIS, Carolina et al. Evidence on human exposure to pesticides and the occurrence of health hazards in the Brazilian population: a systematic review. *Frontiers in Public Health*, v. 9, art. 787438, 2022. DOI: 10.3389/fpubh.2021.787438. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.787438>. Acesso em: 07 jul. 2026.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 2012. DOI: 10.3390/s120912347. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/s120912347>. Acesso em: 04 jul. 2026.

REDDAM, A. et al. Environmental chemical exposures and mitochondrial dysfunction. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 19, n. 21, art. 14376, 2022. DOI: 10.3390/ijerph192114376. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph192114376>. Acesso em: 15 jul. 2026.

REN, Yuanhang et al. Unravelling the polytoxicology of chlorfenapyr on non-target HepG2 cells: the involvement of mitochondria-mediated programmed cell death and DNA damage. *Molecules*, v. 27, n. 17, art. 5722, 2022. DOI: 10.3390/molecules27175722. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27175722>. Acesso em: 21 jul. 2026.

RISS, T. L. et al. Cell viability assays. In: MARKOSSAN, S. et al. (ed.). *Assay Guidance Manual*. Bethesda: Eli Lilly & Company; National Center for Advancing Translational Sciences, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Acesso em: 15 jul. 2026.

SCADUTO JUNIOR, R. C.; GROTYOHANN, L. W. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical Journal*, v. 76, n. 1, p. 469–477, 1999. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77214-0. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77214-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77214-0). Acesso em: 09 jul. 2026.

SIGMA-ALDRICH. *In vitro Toxicology Assay Kit, Sulforhodamine B Based: technical bulletin*. St. Louis: Sigma-Aldrich, 2018.

SMITH-CORTINEZ, N. et al. Simultaneous induction of glycolysis and oxidative phosphorylation during activation of hepatic stellate cells. *Cells*, v. 9, n. 11, art. 2456, 2020. DOI: 10.3390/cells9112456. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9112456>. Acesso em: 15 jul. 2026.

SOARES, Wagner Lopes; PORTO, Marcelo Firpo de Souza. Uso de agrotóxicos e impactos econômicos sobre a saúde. *Revista de Saúde Pública*, v. 46, n. 2, p. 209–217, 2012. DOI: 10.1590/S0034-89102012005000006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-89102012005000006>. Acesso em: 07 jul. 2026.

SULE, Rasheed O.; CONDON, Liam; GOMES, Aldrin V. A common feature of pesticides: oxidative stress — the role of oxidative stress in pesticide-induced toxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2022, p. 1–31, 2022. DOI: 10.1155/2022/5563759. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/5563759>. Acesso em: 07 jul. 2026.

TAIT, S. et al. *In vitro* assessment and toxicological prioritization of pesticide mixtures at concentrations derived from real exposure in occupational scenarios. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Basel, v. 19, n. 9, art. 5202, 2022. DOI: 10.3390/ijerph19095202. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph19095202>. Acesso em: 25 fev. 2026.

TOVAR-FERRERO, O. et al. Measuring mitochondrial membrane potential. *The EMBO Journal*, v. 44, n. 24, p. 7334–7345, 2025. DOI: 10.1038/s44318-025-00632-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s44318-025-00632-9>. Acesso em: 15 jul. 2026.

VANDENSANDE, Yasmine et al. Mitochondrial dysfunction induced in human hepatic HepG2 cells exposed to the fungicide kresoxim-methyl and to a mixture kresoxim-methyl/boscalid. *Redox Report*, v. 29, n. 1, art. 2424677, 2024. DOI: 10.1080/13510002.2024.2424677. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13510002.2024.2424677>. Acesso em: 21 jul. 2026.

VASAN, Karthik et al. Genes involved in maintaining mitochondrial membrane potential upon electron transport chain disruption. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, art. 781558, 2022. DOI: 10.3389/fcell.2022.781558. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.781558>. Acesso em: 07 jul. 2026.

VICHAJ, Vanicha; KIRTIKARA, Kanyawim. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006. DOI: 10.1038/nprot.2006.179. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>. Acesso em: 04 jul. 2026.

VIEIRA-DA-SILVA, Beatriz; CASTANHO, Miguel A. R. B. Resazurin reduction-based assays revisited: guidelines for accurate reporting of relative differences on metabolic status. *Molecules*, v. 28, n. 5, art. 2283, 2023. DOI: 10.3390/molecules28052283. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28052283>. Acesso em: 21 jul. 2026.

WANG, D.; WANG, Y.; MAO, L.; LIU, X.; CHEN, C.; WANG, Y.; YANG, G. Elucidating the combined toxicity of dimethomorph and difenoconazole: intergenerational effects on different biological processes in zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 302, art. 118740, 2025. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2025.118740. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2025.118740>. Acesso em: 11 fev. 2026.

WANG, R. et al. Synergistic effects on oxidative stress, apoptosis and necrosis resulting from combined toxicity of three commonly used pesticides on HepG2 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 263, art. 115237, 2023. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2023.115237. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115237>. Acesso em: 09 jul. 2026.

WANG, Tiancai; MA, Mengmeng; CHEN, Chen; YANG, Xi; QIAN, Yongzhong. Three widely used pesticides and their mixtures induced cytotoxicity and apoptosis through the ROS-related caspase pathway in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 152, art. 112162, 2021. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112162. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112162>. Acesso em: 21 jul. 2026.

XU, L. et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*, v. 54, n. 1, p. 142–151, 2005. DOI: 10.1136/gut.2004.042127. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/gut.2004.042127>. Acesso em: 09 jul. 2026.

YANG, Y. et al. Natural pyrethrin-induced oxidative damage in human liver cells through Nrf-2 signaling pathway. *Toxics*, v. 12, n. 4, art. 258, 2024. DOI: 10.3390/toxics12040258. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxics12040258>. Acesso em: 09 jul. 2026.

YIN, Chunyue; EVASON, Kimberley J.; ASAHINA, Kinji; STAINIER, Didier Y. R. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 123, n. 5, p. 1902–1910, 2013. DOI: 10.1172/JCI66369. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI66369>. Acesso em: 12 ago. 2026.

ZHOU, Y. et al. Oxidative stress-mediated mitochondrial fission promotes hepatic stellate cell activation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, art. 921065, 2022. DOI: 10.3389/fcell.2022.921065. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.921065>. Acesso em: 15 jul. 2026.

ZOROVA, L. D. et al. Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, v. 552, p. 50–59, 2018. DOI: 10.1016/j.ab.2017.07.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>. Acesso em: 25 ago. 2026.