



**UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA
UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE DO
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
ATENÇÃO INTEGRAL À SAÚDE**

**ALTERAÇÕES TOXICOLÓGICAS EM
AGRICULTORES EXPOSTOS A AGROQUÍMICOS:
EFEITOS DO TRATAMENTO “*IN VITRO*” COM A
INFUSÃO DE *Cymbopogon citratus***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

NATACHA COSSETTIN MORI

**CRUZ ALTA-RS, Brasil
2015**

**ALTERAÇÕES TOXICOLÓGICAS EM AGRICULTORES
EXPOSTOS A AGROQUÍMICOS: EFEITOS DO
TRATAMENTO “*IN VITRO*” COM A INFUSÃO DE
*Cymbopogon citratus***

Por

NATACHA COSSETTIN MORI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde, da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ, RS), em associação ampla à Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Atenção Integral à Saúde**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Cattaneo Horn

Cruz Alta-RS, Brasil

2015

**UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA E UNIVERSIDADE DO NOROESTE DO RIO
GRANDE DO SUL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ATENÇÃO INTEGRAL
À SAÚDE**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ALTERAÇÕES TOXICOLÓGICAS EM AGRICULTORES EXPOSTOS A
AGROQUÍMICOS: EFEITOS DO TRATAMENTO “*IN VITRO*” COM A
INFUSÃO DE *Cymbopogon citratus***

elaborada por

NATACHA COSSETTIN MORI

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Atenção Integral à Saúde

Prof^a. Dr^a. Roberta Cattaneo Horn
(Orientador)

Prof. Dr. Jonatas Zeni Klafke
(Co - orientador)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Bárbara Estevão Clasen (UERGS)

Prof. Dr^a. Cândida Elisa Manfio (UNICRUZ)

Prof. Dr. Thiago Gomes Heck (UNIJUI)

Cruz Alta, 12 de junho de 2015

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais e ao meu esposo Samuel que, com muito carinho e apoio, acreditaram em mim e não mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante toda esta caminhada.

Aos meus pais, por acreditarem em mim a cada segundo e me darem a segurança de que não estou sozinha nesta jornada. Amo vocês!

Ao meu esposo, Samuel, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem nos momentos mais difíceis. Te amo!

À minha orientadora, professora Roberta Cattaneo Horn, pela oportunidade, por seus ensinamentos, paciência e confiança. Muito Obrigada!!

Ao meu co-orientador, professor Jonatas Zeni Klafke, pela disponibilidade, paciência e pelas relevantes contribuições realizadas à este trabalho.

Às todos os colegas do PPGAIS, em especial às amigas Mônica, Vanessa, Roberta, Juliana e Lidiane pelas discussões, pelas caronas, pelos sorrisos, pela companhia e pela amizade que certamente permacerá.

Às colegas pertencentes ao grupo ciências, Prof. Josiane, Caroline, Gabriela, Mariana, Ana, Cecília e Ronaldo pelo apoio e pela companhia durante toda esta jornada.

Agradeço também à colega Viviane Deuschle pela sua contribuição neste trabalho.

À todos os colaboradores da UNICRUZ, que de alguma forma auxiliaram para a realização deste trabalho.

À todos os professores do PPGAIS, pelos ensinamentos.

Aos professores componentes da banca examinadora desta dissertação, pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Por fim, meus agradecimentos aos demais familiares e amigos que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.

RESUMO

Alterações toxicológicas em agricultores expostos a agroquímicos: efeitos do tratamento “*in vitro*” com a infusão de *Cymbopogon citratus*

O uso de pesticidas é essencial para o manejo de lavouras e controle de pragas, de forma a permitir o aproveitamento máximo dos resultados obtidos no plantio. Apesar disso, o uso inadequado de agroquímicos é preocupante, visto que a exposição a tais produtos desencadeia alterações agudas e crônicas nos agricultores. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi analisar os parâmetros toxicológicos no plasma e eritrócitos dos agricultores familiares do COREDE Alto Jacuí, bem como correlacionar a alteração na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) nos eritrócitos destes agricultores, com a ocorrência de danos oxidativos e consumo da glutatona reduzida (GSH) nos mesmos. Foi realizado o tratamento “*in vitro*” dos eritrócitos desses produtores rurais com a infusão de *Cymbopogon citratus*, a fim de avaliar o efeito desta planta sobre a atividade AChE e/ou sobre os marcadores de estresse oxidativo. Os resultados mostram que, os agricultores não apresentaram alterações hepáticas e renais, mas observou-se inibição da atividade da colinesterase plasmática (butirilcolinesterase) e indicativos de ocorrência de estresse oxidativo. Além disso, verificou-se uma correlação negativa da inibição da AChE com a ocorrência dos danos proteicos e lipídios, bem como uma relação positiva, da inibição desta enzima com os níveis de GSH dos eritrócitos, demonstrando que a alteração na atividade da AChE pode levar a ocorrência de estresse oxidativo nos agricultores. Após o tratamento *in vitro* dos eritrócitos com a infusão de *Cymbopogon citratus* (5;10;25;50 g/L) pelo período de 1 hora, não foram observadas alterações na atividade da AChE, nem nos níveis de TBARS e PCs. Por outro lado, os níveis de GSH mostraram-se diminuídos. Assim, os resultados encontrados, demonstraram que os agricultores familiares estudados estavam intoxicados pela exposição a agrotóxicos e, que tal intoxicação pode ser a causa do aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e das proteínas carboniladas (PCs), juntamente com o estímulo da GSH. Além disso, foi possível perceber que a infusão de *Cymbopogon citratus* (5;10;25;50 g/L) não foi capaz de reverter os danos lipídicos e proteicos, provavelmente devido ao capim-limão também não ter revertido a inibição da AChE, no entanto, a infusão da planta aumentou os níveis de GSH, o que indica um efeito antioxidante da mesma nas concentrações testadas.

Palavras-chave: Alterações Bioquímicas; Alterações oxidativas; AChE; Agricultores; *Cymbopogon citratus*

ABSTRACT

The use of pesticides is essential for management and control of crop pests in order to better utilization of the results obtained in cultivation. Nevertheless, the inappropriate use of pesticides is worrying, since the exposure to such products triggers acute and chronic changes in farmers. Thus, the aim of this study was to analyze toxicological parameters in plasma and erythrocytes of family farmers "COREDE Alto Jacuí" region and correlate the changes in the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in erythrocytes of these farmers, with the occurrence of oxidative damage and consumption of reduced glutathione (GSH). Treatment of erythrocytes "in vitro" with the infusion of *Cymbopogon citratus* was realized to assess the effect of AChE activity in the plant and/or on the markers of oxidative stress. The results show that farmers no present hepatic and renal changes, but we observed inhibition of plasma cholinesterase activity (butyrylcholinesterase) and indicative of the occurrence of oxidative stress. Furthermore, there was a negative correlation between inhibition of AChE with the occurrence of protein and lipid damage, as well a positive correlation between inhibition of this enzyme with GSH levels, demonstrating that the change in the AChE activity can lead the occurrence of oxidative stress in farmers. After "*in vitro*" treatment of erythrocytes with the infusion of *Cymbopogon citratus*. (5; 10; 25; 50 g/L) for 1 hour period, no were observed changes in the AChE activity, or in the levels of TBARS and PCs, however GSH levels were increased. Thus, the results showed that family farmers studied were poisoned by exposure to pesticides and that such poisoning could be the cause of increased thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyls (PCs) along with the increased GSH. Moreover, can realize that the infusion *Cymbopogon citratus* (5; 10; 25; 50 g/L) was not able to reverse the lipid and protein damage, probably due to lemongrass also have not reversed the inhibition of AChE, However, infusion from plant increased the levels of GSH, which indicates an antioxidant effect of the same in the tested concentrations.

Keywords: Biochemical alterations; Oxidative alterations; AChE; Farmers; *Cymbopogon citratus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Formas moleculares da AChE	25
FIGURA 2 – Hidrólise da acetilcolina em colina e acetato pela AChE	26
FIGURA 3 – Principais reações que ocorrem durante o processo de lipoperoxidação	29
FIGURA 4 –Enzimas antioxidantes e danos oxidantes	31
FIGURA 5 – Planta Capim-Limão (<i>Cymbopogon citratus</i>).	34
FIGURA 6 – Estrutura do Citral	35
FIGURA 7 -- Principais compostos do Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	35

MANUSCRITO I

FIGURA 1 – Níveis de Substâncias Reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (nmol/g Hb) no plasma de trabalhadores rurais pertencentes ao COREDE Alto Jacuí	56
FIGURA 2 – Níveis de Proteínas Carboniladas (PCs) (nmol/carbonil/mg proteína) no plasma de trabalhadores rurais pertencentes ao COREDE Alto Jacuí	57
FIGURA 3 – Níveis de Glutathiona reduzida (GSH) (nmol/g Hb) no plasma de trabalhadores rurais pertencentes ao COREDE Alto Jacuí	58

MANUSCRITO II

FIGURA 1 – AChE Enzyme Activity (U/mL) in erythrocytes treated or not with infusion of lemongrass in different concentrations.....	83
FIGURA 2 – Levels of TBARS (nmol MDA/g Hb) in erythrocytes treated or not with infusion of lemongrass in different concentrations.....	84
FIGURA 3 – Levels PC (nmol/carbonyl/mg protein) in erythrocytes treated or not with infusion of lemongrass in different concentrations.....	85

FIGURA 4 – Levels of GSH ($\mu\text{mol GSH/mL}$) in erythrocytes treated or not with infusion of lemongrass in different concentrations..... 86

FIGURA 5 – Correlation between the enzyme activity of AChE and TBARS (Fig 5A), PCS (Fig. 5B) and GSH (Fig. 5C) in erythrocytes of healthy individuals (Control Group) and farmers without treatment with the infusion of lemongrass (Group 0) 87

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I	
Tabela 1 – Resultados das determinações bioquímicas e da atividade da enzima colinesterase plasmática	55
MANUSCRITO II	
Tabela 1 – Profile of study participants	81
Tabela 2 – Quantification of total polyphenols, tannins and flavonoids in the extract and in the Infusion of <i>Cymbopogon Citratus</i>	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina

AChE: acetilcolinesterase

AST: aspartato amino transferase

ALT: alanina amino transferase

ATP: adenosina trifosfato

BuChE: butirilcolinesterase

CAT: catalase

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

DTNB: ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)

ERs: espécies reativas

EROs: espécies reativas do oxigênio

ERNs: espécies reativas do nitrogênio

GPx: glutaciona peroxidase

GSH: glutaciona reduzida

GST: glutaciona S-transferase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

LPO: lipoperoxidação

MDA: malondialdeído

DP: desvio padrão

SDS: dodecil sulfato de sódio

SEM: erro padrão

SNC: Sistema Nervoso Central

SOD: superóxido dismutase

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

UV: ultravioleta

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

APÊNDICE 2 – Questionário Pessoal

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Carta de aprovação do comitê de ética

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE APÊNDICES	
LISTA DE ANEXOS	
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Pesticidas Agrícolas e Monitoramento Ocupacional	22
3.2 Marcadores Toxicológicos.....	24
3.2.1 Enzima Acetilcolinesterase (AChE).....	24
3.3 Estresse Oxidativo.....	27
3.3.1 Lipoperoxidação.....	28
3.3.2 Oxidação Proteica.....	29
3.4 Sistema de defesa antioxidante.....	30
3.5 Antioxidantes naturais	32
3.6 <i>Cymbopogon citratus</i>	33
4 MANUSCRITO(S)	38
4.1 Alterações bioquímicas e toxicológicas em plasma de agricultores familiares expostos a agroquímicos.....	38
4.1.1 Manuscrito I.....	38

4.2. Alterations in the activity of enzyme AChE and in the redox response of farmers treated "in vitro" with infusion of <i>Cymbopogon citratus</i>	59
4.2.1 Manuscrito II.....	59
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação apresenta os resultados na forma de manuscritos, os quais se encontram nos itens MANUSCRITOS CIENTÍFICOS. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos e representam a íntegra deste trabalho. No final desta dissertação encontra-se o item CONSIDERAÇÕES FINAIS, no qual há interpretações e comentários gerais sobre os manuscritos científicos contidos nesta dissertação. O item REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é praticada pela humanidade há mais de dez mil anos, contudo o uso intensivo de agrotóxicos para o controle de pragas e doenças das lavouras existe há pouco mais de meio século. No Brasil, os agroquímicos passaram a receber maior destaque na década de 1960, marcada pela modernização no processo agrícola (RECENA, 2006; SILVA et al., 2015).

Assim, em consequência à ampla utilização de pesticidas para a produção de alimentos houve também uma elevação nos casos de intoxicação por estes agentes. De acordo com o Sistema Nacional de Informações tóxico farmacológicas (SINITOX, 2015), 33,86% dos óbitos por intoxicações registrados no Brasil no ano de 2012 foram decorrentes do contato com agrotóxicos. Este fato pode ser atribuído especialmente ao uso inadequado e à toxicidade elevada destes produtos, à não utilização e/ou utilização incorreta de equipamentos de proteção individual e à deficiência estrutural da vigilância em saúde (MELLO; SILVA, 2013). Neste contexto, torna-se indispensável a realização de estudos que permitam avaliar a saúde dos trabalhadores rurais, tendo em vista que a falta de acompanhamento das questões de saúde dos trabalhadores rurais reflete diretamente no desenvolvimento agrícola, onde uma abordagem integradora têm sido cada vez mais necessária.

Alterações bioquímicas são consideradas indicadores biológicos de efeito no caso de exposição a agrotóxicos (AMORIM, 2003), visto que alterações nestes parâmetros podem evidenciar possíveis efeitos nocivos da exposição inadequada aos agroquímicos. As enzimas hepáticas aspartato transferase (AST), alanina transferase (ALT) têm sido utilizadas como parâmetro biológico de exposição aos pesticidas agrícolas, uma vez que as substâncias químicas são absorvidas pela via digestiva, transportadas pela veia hepática para o fígado e metabolizadas pelo sistema citocromo P450, que dentre outras funções, atua apreendendo e inativando vários xenobióticos que entram no organismo (MURUSSI et al., 2014). Cabe considerar ainda, a avaliação de biomarcadores da função renal, visto que o rim é um dos principais órgãos de biotransformação e excreção de substâncias tóxicas (SANTOS; AREAS; REYS, 2007).

A quantificação da atividade das colinesterases sangüíneas também é reconhecida como um importante marcador biológico humano de intoxicações por agrotóxicos (LIONETTO et al., 2013). Estas enzimas são divididas em acetilcolinesterase (AChE) ou colinesterase eritrocitária e butirilcolinesterase (BuChE) ou colinesterase plasmática (CARTER et al., 2014). A avaliação das intoxicações por agrotóxicos é comumente realizada através da quantificação da atividade da BuChE, no entanto, de acordo com Oga (2008), a acetilcolinesterase constitui um indicador mais específico e sensível que a butirilcolinesterase nas intoxicações crônicas, pois esta enzima é inibida de forma mais lenta e menos intensa que a butirilcolinesterase.

Os agroquímicos inibem a AChE causando acúmulo de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica e consequente síndrome colinérgica aguda, o que leva ao desenvolvimento de diversos sintomas, como rigidez muscular, fadiga, cansaço, cefaléia, entre outros (CÁRDENAS et al., 2005; BAYRAMI et al., 2012). Quando a exposição aos pesticidas é de caráter crônico, ocorrem ainda alterações imunológicas, neurológicas, na reprodução e no desenvolvimento em diversos níveis (SIMONIELLO; KLEINSORGE; CARBALLO, 2010).

Em consequência à inibição da AChE, os agroquímicos levam à redução da fosforilação oxidativa no sistema nervoso central (SNC) comprometendo a capacidade da célula para manter os seus níveis de energia e elevando as quantidades de Espécies reativas de Oxigênio (EROs) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) no organismo, o que caracteriza a condição de estresse oxidativo (MILATOVIC; GUPTA; ASCHNER, 2006). Este mecanismo também tem sido apontado como relevante para justificar os efeitos adversos na saúde de agricultores expostos a pesticidas agrícolas (SURAJUDEEN et al., 2014).

O estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de espécies reativas ou em detrimento da velocidade de remoção destas. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (BARBOSA et al., 2010). As espécies reativas promovem a quebra da cadeia do DNA, peroxidação lipídica da membrana celular e ainda degradação proteica. Em sistemas biológicos, estes danos são refletidos pela quantificação de

marcadores de estado redox. Efeitos sobre o DNA são avaliados comumente com a realização do teste cometa e determinação de micronúcleo, peroxidação lipídica através da determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e os danos proteicos são medidos pela quantificação dos níveis de proteínas carboniladas (PCs) (VASCONCELLOS et al., 2007).

O excesso de EROs no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. Os antioxidantes endógenos se dividem entre os que agem enzimaticamente, a exemplo da glutathione peroxidase (GPx), glutathione S transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) ou, não enzimaticamente a exemplo de GSH, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e ácido diidrolipóico. Cabe destacar ainda, os antioxidantes provenientes da dieta como o alfa-tocoferol (vitamina-E), beta-caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C) e compostos fenólicos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As plantas constituem uma importante fonte de compostos fenólicos (NEVES; CUNHA, 2006). Estes são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento. Dentre os antioxidantes naturais mais comuns sobressaem-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis. Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992; ANGELO; JORGE, 2007).

Nos países em desenvolvimento, assim como, nos mais desenvolvidos, os apelos da mídia para o consumo de produtos à base de produtos naturais aumentam a cada dia. Os ervanários prometem saúde e vida longa, com base no argumento de que plantas usadas há milênios são seguras para a população (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005). Entretanto, deve-se considerar que o uso milenar de plantas medicinais mostrou ao longo dos anos que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas (RODRIGUES et al., 2011), o que torna imprescindível maiores investigações acerca da utilidade dos recursos naturais que nos rodeiam, visto que muitas vezes ajudam a combater, tratar ou prevenir doenças (MELO et al., 2012).

O *Cymbopogon citratus* conhecido popularmente como capim limão ou capim cidreira, destaca-se nesse contexto, pois conforme levantamentos etnobotânicos

realizados esta planta é usada empiricamente em tratamentos gastrointestinais e sedativos (MOREIRA et al., 2002). Estas propriedades medicinais podem ser atribuídas ao seu elevado teor de óleo essencial, o citral, que além de eficácia terapêutica, parece ser um potente captador de EROs, promovendo redução das mesmas (HALABI; SHEIKH, 2014).

Soares et al. (2013) avaliaram a composição fitoquímica e atividade antioxidante do extrato de folhas de *Cymbopogon citratus* preparadas com diferentes solventes (água, metanol e etanol) e detectaram uma atividade de eliminação de espécies reativas em todos estes extratos. Contudo, é importante salientar que embora componentes fitoquímicos do extrato do capim limão já tenham sido descritos, a infusão desta planta foi pouco estudada, tanto com relação aos componentes quanto à atividade nos sistemas biológicos.

Sendo assim, considerando que o contato com os agroquímicos promovem alterações toxicológicas e da atividade das colinesterases, com possível geração de estresse oxidativo e, que a falta de acompanhamento das questões de saúde dos trabalhadores rurais reflete diretamente no desenvolvimento agrícola, torna-se indispensável a realização de estudos que analisem as condições de saúde dos trabalhadores rurais. Além disso, a busca de alternativas terapêuticas que tenham a capacidade de minimizar os danos ocasionados pelos pesticidas à saúde dos agricultores é fundamental, tendo em vista os números alarmantes das intoxicações relacionadas a estes produtos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a ocorrência de intoxicações por pesticidas em agricultores familiares pertencentes à região do Corede Alto Jacuí e, avaliar “*in vitro*” o efeito da infusão de *Cymbopogon citratus* sobre a atividade da enzima AChE e marcadores de estresse oxidativo nos eritrócitos destes produtores rurais.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os marcadores renais (creatinina, uréia e ácido úrico) e hepáticos (AST e ALT) no plasma de agricultores;
- Determinar a atividade da enzima butircolinesterase (BuChE) em plasma de agricultores;
- Avaliar os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), das proteínas carboniladas (PCs) e da glutatona reduzida (GSH) em plasma de agricultores;
- Preparar o extrato e a infusão da *Cymbopogon citratus*;
- Avaliar o teor de polifenóis totais, flavonóides e taninos no extrato etanólico e na infusão de *Cymbopogon citratus*;
- Analisar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em eritrócitos de agricultores, antes e depois do tratamento “*in vitro*” com a infusão de *Cymbopogon citratus*;
- Analisar os níveis de TBARS em eritrócitos de agricultores, antes e depois do tratamento “*in vitro*” com a infusão de *Cymbopogon citratus*;
- Avaliar os níveis de PCs em eritrócitos de agricultores, antes e depois do tratamento “*in vitro*” com a infusão de *Cymbopogon citratus*;
- Determinar os níveis de GSH em eritrócitos de agricultores, antes e depois do tratamento “*in vitro*” com a infusão de *Cymbopogon citratus*;

- Correlacionar a atividade da AChE com os níveis de TBARS, PCs e GSH em eritrócitos de agricultores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pesticidas Agrícolas e Monitoramento Ocupacional

O Brasil alcançou em 2009 o primeiro lugar no ranking mundial de consumo de agrotóxicos. Entre 2001 e 2008 a venda de pesticidas agrícolas no país saltou de pouco mais de US\$ 2 bilhões para mais de US\$ 7 bilhões. A região Sul do Brasil se encontra em segundo lugar na utilização destes produtos perdendo apenas para a região sudeste (EMBRAPA, 2013). Existem 366 ingredientes ativos registrados no Brasil para uso agrícola, pertencentes a mais de 200 grupos químicos diferentes, que dão origem a 1.458 produtos formulados para venda no mercado. Os herbicidas sozinhos representam 48% deste mercado, seguidos pelos inseticidas (25%) e pelos fungicidas (22%) (LONDRES, 2011; PELAEZ; TERRA; SILVA, 2011).

No entanto, a exposição humana a agrotóxicos constitui um grave problema de saúde pública em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. O desconhecimento dos riscos e das normas de segurança, a falta de fiscalização e a livre comercialização dos agroquímicos têm contribuído para o agravamento dos quadros de doenças relacionadas a estes produtos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o uso indiscriminado dos agrotóxicos no mundo causa, anualmente, 70 mil intoxicações agudas e crônicas nos trabalhadores do campo (SIQUEIRA et al., 2013). No Brasil, conforme o último relatório divulgado pelo SINITOX, no ano de 2012 foram registrados 4.657 casos de intoxicações por agrotóxicos (FIOCRUZ, 2015).

De acordo com Faria, Fassa & Facchini (2007) existe uma clara associação entre intoxicação por agrotóxicos e problemas de saúde de evolução prolongada. Os resultados deste estudo fortalecem a hipótese de que, além do quadro agudo, as intoxicações pelos pesticidas agrícolas afetam a saúde a médio e à longo prazo. Dentre as comorbidades mais comuns associadas ao uso destes produtos encontram-se o câncer, incidência de doenças mentais, malformações e alterações na reprodução (SIQUEIRA; KRUSE, 2008).

Além disso, evidências científicas tem demonstrado que os agroquímicos levam ao desenvolvimento de estresse oxidativo. Murussi et al. (2014), verificaram a

ocorrência de estresse oxidativo em agricultores expostos à pesticidas em comparação com o grupo controle e, Reis et al. (2012), avaliaram o perfil oxidativo de agricultores e observaram redução da atividade da CAT e aumento dos níveis de PCs, o que pode caracterizar a ocorrência de estresse oxidativo. Da mesma forma, os estudos de Sivapiriya, Jayanthisakthisekaran e Venkatraman (2006), Sulak et al. (2005), Selmi, El-fazaa e Gharbi, (2012) demonstraram a formação EROs em diferentes tecidos de ratos expostos à agroquímicos.

O estresse oxidativo desencadeia distúrbios metabólicos celulares que podem levar a mudanças permanentes na estrutura do DNA, RNA, proteínas, lipídios e açúcares, com consequente perda das funções biológicas mais comuns e um maior desenvolvimento de doenças como aterosclerose, diabetes, catarata, doenças neurodegenerativas, doenças auto-imunes e câncer (ETEMADI-ALEAGHA; AKHGARI; ABDOLLAHI, 2002; ABDOLLAHI et al., 2004; VALKO et al., 2006; MACIAG, 2011).

Tendo em vista o risco da exposição aos agrotóxicos torna-se imprescindível o monitoramento ocupacional de agricultores. O monitoramento da exposição humana aos agroquímicos tem por objetivo primordial identificar precocemente o potencial de agravo à saúde de determinado agente. Esse processo é realizado através de diversas metodologias analíticas e de diagnóstico, em que é possível identificar situações, indivíduos ou grupos com maior probabilidade de desenvolver processos patológicos derivados da exposição a determinados agrotóxicos, como também identificar alterações patológicas em estágio inicial de desenvolvimento (PERES et al., 2005). Além disso, segundo Figueiredo; Trape; Alonzo (2011), identificar possíveis efeitos à saúde decorrente da exposição a agentes químicos, torna possível a criação de novos protocolos de atendimento, novos marcadores de exposição e efeito e de políticas públicas que possam contribuir para a prevenção das doenças relacionadas à esta exposição.

3.2 Marcadores Toxicológicos

Biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado avalie a intensidade da

exposição e o risco à saúde. A importância da utilização de marcadores biológicos como parâmetros biológicos de exposição às substâncias químicas deve-se ao fato de eles estarem diretamente relacionados aos efeitos na saúde (AMORIM, 2003).

Os efeitos das substâncias químicas no fígado têm sido estimados tradicionalmente por determinação da atividade de enzimas hepáticas. O fígado é potencialmente suscetível às substâncias químicas por três fatores. Primeiramente devido ao efeito de primeira passagem, pois a maioria dos xenobióticos é absorvida pela via digestiva e transportada pela veia hepática para o fígado, sendo assim o primeiro órgão a entrar em contato com as substâncias tóxicas. Em segundo lugar, a grande maioria dos xenobióticos são metabolizados pelo sistema citocromo P450. A terceira razão é o fato de que a formação da bile e a sua movimentação pelo trato gastrointestinal podem concentrar os xenobióticos, muitos deles sendo reabsorvidos e transportados novamente para o fígado, pela circulação hepática. Todos estes fatores podem elevar a concentração desses xenobióticos no fígado e como consequência promover lesão nos hepatócitos, aumentando assim as concentrações plasmáticas das enzimas hepáticas. Dessa forma, especialmente as enzimas AST e ALT têm sido utilizadas como parâmetro biológico de exposição aos pesticidas agrícolas (AMORIM, 2003; HODGSON, 2010; BAHIA; GUIMARÃES; ASMUS, 2014).

Cabe considerar ainda, a avaliação da exposição aos agroquímicos por meio de biomarcadores da função renal, tendo em vista que o rim é um dos principais órgãos de biotransformação e excreção de substâncias tóxicas (SANTOS; AREAS; REYS, 2007). Figueiredo, Trapé e Alonzo (2011), avaliaram em seus estudos a exposição à pesticidas a longo prazo e detectaram que 21,8% dos agricultores avaliados apresentavam alterações renais.

3.2.1 Enzima Acetilcolinesterase (AChE)

As colinesterases sangüíneas são enzimas que atuam no organismo humano como mediadores químicos. Podem ser divididas em acetilcolinesterase (AChE) ou colinesterase eritrocitária e pseudocolinesterase, também conhecida como butirilcolinesterase (BuChE) ou colinesterase plasmática (CARTER et al., 2014). De acordo com Oga (2008), a acetilcolinesterase constitui um indicador mais específico

e sensível que a butirilcolinesterase nas intoxicações crônicas, pois esta enzima é inibida de forma mais lenta e menos intensa que a colinesterase plasmática.

A Acetilcolinesterase é uma glicoproteína que está presente nos mamíferos em três isoformas, G_1 (monomérica), G_2 (dimérica) e G_4 (tetramérica), sendo que a mais abundante no cérebro e sistema nervoso autônomo é a G_4 . A Figura 1 representa as formas moleculares da acetilcolinesterase (MARTINS E SILVA; SALDANHA, 2010).

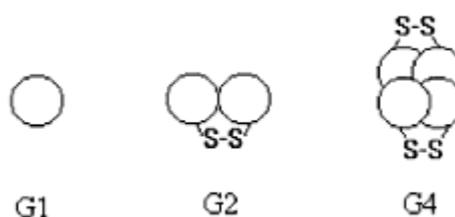


Figura 1. Formas moleculares da AChE (MARTINS E SILVA; SALDANHA, 2010)

A AChE é responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas através da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (RANG, 2001). Esta enzima, uma vez inibida, torna-se incapaz de hidrolisar a ACh, ocorrendo o acúmulo desse neurotransmissor no Sistema nervoso central (DOMINGOS; LONGHINOTTI; MACHADO, 2003; ORDENTLICH et al., 2004). Os sintomas decorrentes da exposição aos agroquímicos estão ligados a este acúmulo de Ach nas sinapses e à hiperestimulação colinérgica (PRIETO, 2013). A AChE é encontrada principalmente em junções neuromusculares e sinapses colinérgicas cerebrais (ČOLOVIĆ, 2013), o que justifica a sintomatologia relatada nas intoxicações pelos pesticidas agrícolas que inibem esta enzima, tais como: o eczema, a respiração fraqueza muscular, náuseas, e a secreção de saliva (BAYRAMI et al., 2012).

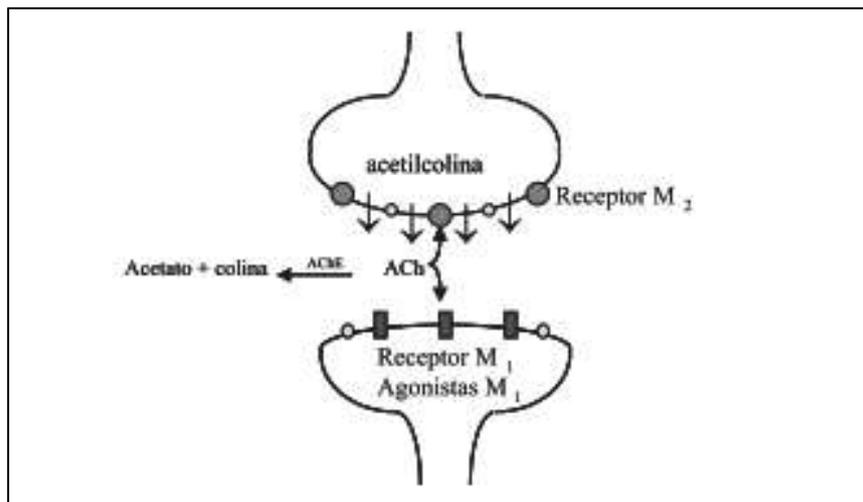


Figura 2. Hidrólise da acetilcolina em colina e acetato pela AChE (Adaptado de JUNIOR et al., 2004).

Organofosforados e carbamatos são as classes de agroquímicos mais conhecidas por serem inibidores específicos da atividade catalítica da AChE (HOBBIGER, 1961; LIONETTO et al., 2013). Os organofosforados são amplamente utilizados devido ao seu baixo índice de toxicidade aguda em mamíferos, em comparação com outros tipos de pesticidas, contudo relatos sobre os efeitos nocivos desses produtos químicos em diferentes órgãos têm aumentado nos últimos anos. A ação clássica destes compostos é a inibição irreversível da AChE (PRIETO, 2013). No caso dos carbamatos a inibição da AChE é reversível, entretanto, os sinais e sintomas característicos de uma hiperestimulação colinérgica não diferem daquelas de envenenamento por organofosforados (WILLE et al., 2013). Após a exposição por agrotóxicos destas classes, a atividade colinesterásica é diminuída quantitativa e proporcionalmente à intensidade da exposição, uma das razões pelas quais este indicador de efeito é amplamente utilizado no monitoramento humano a estes agentes agrotóxicos (PERES et al., 2005).

Além disso, no decurso destes processos excitatórios e de inibição de AChE, uma alta taxa de consumo de ATP, juntamente com a inibição da fosforilação oxidativa, compromete a capacidade da célula para manter os seus níveis de energia podendo gerar quantidades excessivas de EROs e ERNs. Cabe salientar ainda, que os organofosforados e os carbamatos promovem a formação excessiva de F2 isoprostanos e F4-neuroprostanos e de citrulina, biomarcadores de

peroxidação lipídica e de geração de ERNs, respectivamente (MILATOVIC; GUPTA; ASCHNER, 2006).

3.3 Estresse Oxidativo

Radical livre é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência, o que confere a estas moléculas uma alta reatividade, podem doar ou receber elétrons (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, 1999; DRÖGE, 2002; URSO; CLARKSON, 2003). Estes radicais livres, bem como as demais moléculas que surgem em função das suas ações oxidativas nos sistemas biológicos e, embora não tenham elétrons desemparelhados são altamente reativas, são denominados de espécies reativas de oxigênio (EROs) (RIBEIRO et al., 2006). Também é importante salientar que existem radicais que contêm Nitrogênio e, portanto, são designadas espécies reativas de nitrogênio (ERNs). A principal ERN é o óxido nítrico (NO•) (FERREIRA; ABREU, 2007).

As EROs podem ser originadas tanto exógena quanto endogenamente. As fontes exógenas incluem exemplos como, luz ultravioleta (UV) e exposição aos agentes químicos. Intracelularmente podem ser originadas como consequência do próprio metabolismo celular, uma vez que elétrons provenientes da cadeia de transportes de elétrons, localizada na mitocôndria, podem interagir com várias moléculas intracelulares. Além disso, é importante salientar que endogenamente as EROs também podem ser geradas pelas oxidases (enzimas específicas da membrana plasmática) como resposta a fatores de crescimento e citocinas e, conseqüentemente, podem servir como segundo mensageiro em alguns processos específicos de sinalização celular (BARZILAI; YAMAMOTO, 2004; BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006).

Os EROs encontram-se envolvidos em processos fundamentais no organismo humano, como por exemplo, na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, o excesso destas espécies no organismo, caracterizado como estresse oxidativo, apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos

lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O estresse oxidativo é resultado de um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade do sistema de defesa antioxidante para eliminar intermediários reativos, em favor dos primeiros, o que conduz a danos de macromoléculas biológicas e a desregulação do metabolismo (SIES, 1997; NORDBERG; ARNER, 2001; SPIERS et al., 2015).

Muitos xenobióticos como pesticidas podem produzir EROs através de vários mecanismos, tais como interferência no transporte de elétrons na membrana mitocondrial e subsequente acumulação de intermediários reativos, a inativação de enzimas antioxidantes, esgotamento de antioxidantes não enzimáticos e peroxidação lipídica (WINSTON; DI GIULIO, 1991; MODESTO; MARTINEZ, 2010).

3.3.1 Lipoperoxidação

As EROs possuem ação bem definida em todos os componentes celulares, entretanto, a membrana plasmática é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO). Em consequência à este fenômeno, ocorre perda da seletividade na troca iônica e formação de produtos citotóxicos culminando com a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BAGIS et al., 2005; AUDY; MOROSINI, 2009).

Conforme Negre-Salvayre et al. (2010) o acúmulo de LPO no organismo humano é uma das principais causas de disfunção tecidual e celular desempenhando um papel importante no envelhecimento e na maioria das doenças relacionadas com a idade e o estresse oxidativo, tais como: aterosclerose, diabetes, doenças neurodegenerativas e inflamação. Além disso, Wafa et al. (2013), avaliou marcadores de peroxidação lipídica em agricultores expostos à pesticidas, e evidenciou um aumento deste parâmetro na população estudada.

O processo da LPO pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Durante a primeira etapa ocorre a reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado. Tal reação é propagada por radicais peroxilas (Propagação), resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o

malondialdeído, 4-hidroxinonenal e isoprostanos. A terceira etapa dá-se pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares (GARDNER, 1989; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; LIMA; ABDALLA, 2001).

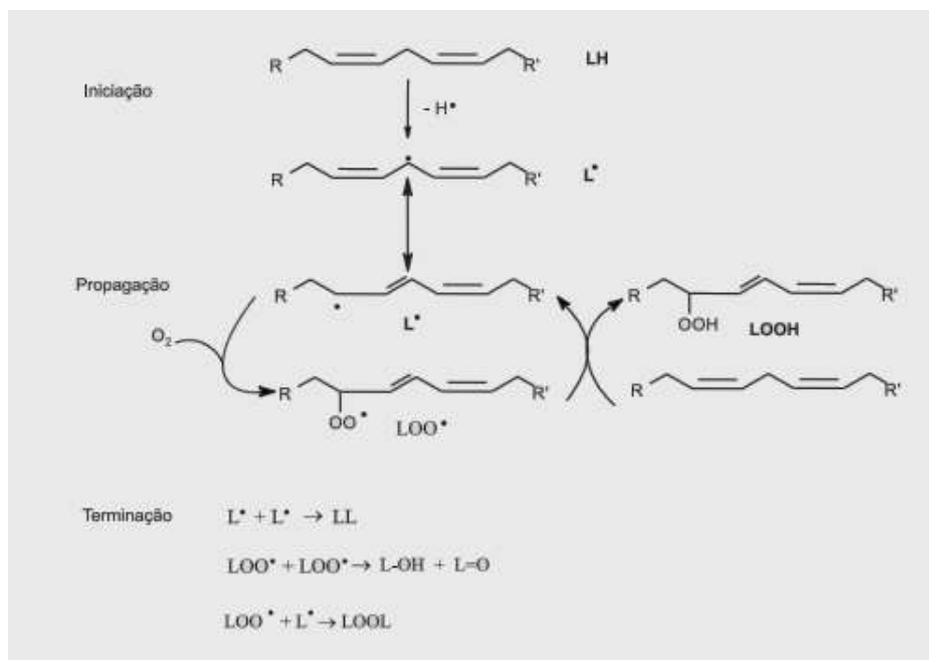


Figura 3. Principais reações que ocorrem durante o processo de lipoperoxidação (LIMA; ABDALLA, 2001).

O Malonaldeído, produto formado durante a etapa de propagação da lipoperoxidação das membranas, é usualmente utilizado para quantificar o grau deste processo no organismo, visto que este composto reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um pigmento rosado (Método TBARS) (SUCUPIRA et al., 2014).

3.3.2 Oxidação Proteica

As EROs também podem atuar sobre os grupamentos amino, carbóximo ou sobre as várias cadeias laterais dos aminoácidos. Estas alterações afetam diretamente a sinalização celular, estrutura da célula e processos enzimáticos, o que conseqüentemente pode levar à degradação de proteínas pelas proteases (IWAI et al., 1998; CECARINI et al., 2007; BAR-OR et al., 2015).

O principal produto da degradação proteica são as proteínas carboniladas (PCs). Estas são amplamente distribuídas em organismos vivos e conhecidas

principalmente por seus efeitos nocivos, visto que a modificação de biomoléculas por PCs dá origem a uma multidão de adutos e ligações cruzadas que são cada vez mais implicados no envelhecimento e na patologia de uma ampla gama de doenças humanas, tais como: a doença de Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica (ELA) (SEMCHYSHYN, 2014; BAR-OR et al., 2015).

Tendo em vista que as PCs estão presentes nas principais mudanças estruturais das proteínas e, que possuem formação relativamente rápida, grande estabilidade e longo tempo de vida, tornaram-se um dos principais marcadores da avaliação de estresse oxidativo (SILVA et al., 2011).

3.4 Sistema de defesa antioxidante

Para se defender da toxicidade das EROs o organismo apresenta mecanismos de defesa em três níveis distintos: prevenção da sua formação, o reparo de moléculas danificadas pelas EROs e a eliminação destas moléculas. A prevenção da formação de EROs inclui diversos mecanismos antioxidantes, dentre eles a restrição de spin do oxigênio (reduz a reatividade com biomoléculas), o transporte de oxigênio de forma ligada ao invés de forma livre, a quelação de metais durante o transporte e armazenamento, a eficiência da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e a organização estrutural do DNA em cromatina (RIBEIRO et al., 2006). O mecanismo de reparo de danos causados pelas EROs mais estabelecido é o sistema de reparo do DNA. Lunec et al. (2002), citam o reparo de excisão das bases, reparo de excisão do nucleotídeo e reparo de erro de pareamento como mecanismos básicos para tal reparo. Já a eliminação de EROs é realizada através de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (BARBOSA et al., 2010).

As principais enzimas envolvidas nos mecanismos antioxidantes enzimáticos são superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPX) (ORUÇ; USTA, 2007; BALLESTEROS; WUNDERLIN; BISTONI, 2009).

A SOD é encontrada dentro das mitocôndrias e no citosol. A principal função desta enzima é a inativação do ânion superóxido, gerando oxigênio e peróxido de

hidrogênio. Embora o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) isoladamente, seja pouco reativo e, portanto, não seja altamente citotóxico, este radical possui a habilidade de gerar radicais secundários extremamente tóxicos como o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (CAMPOS; YOSHIDA, 2004; LODISH et al., 2014).

A CAT possui estrutura centrada em torno de um grupamento ferro-heme, em que o ferro atua como o metal de transição durante o seu mecanismo de ação. A principal função desta enzima é a inativação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é uma ERO capaz de se difundir facilmente através das membranas e reagir com inúmeras moléculas. Além disso, este radical pode ser convertido por determinados metais, tais como o Fe^{2+} , em um radical hidroxila ainda mais perigoso (NORDBERG; ARNER, 2001; FRIDOVICH et al., 2007; LODISH et al., 2014).

As GSTs compreendem uma família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutationa (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; HUBER; ALMEIDA; FATIMA, 2008; TEW et al., 2011). Assim, por meio deste mecanismo, a GST participa no processo de biotransformação, catalisando a conjugação de uma variedade de metabólitos, incluindo xenobióticos e produtos de lipoperoxidação com GSH, facilitando a excreção dos compostos tóxicos (MODESTO; MARTINEZ, 2010).

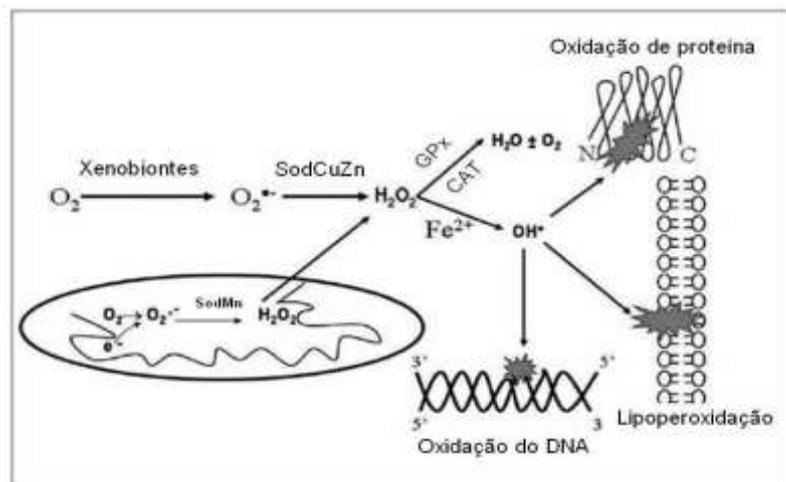


Figura 4. Enzimas antioxidantes e danos oxidantes (TREVISAN, 2008).

Já o mecanismo antioxidante não enzimático, relaciona-se a um grupo de antioxidantes que pode ser dividido em compostos produzidos “*in vivo*”, como é o

caso da glutathione (GSH), da ubiquinona e do ácido úrico e, compostos provenientes da dieta, onde se destacam α -tocoferol, o ácido L-ascórbico, os carotenóides, flavonóides, polifenóis, furanóides e tióis (JUNIOR et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2007; OLIVEIRA, 2009).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos endógenos, cabe destacar o papel da GSH. Esta é um tripeptídeo composto por ácido glutâmico, cisteína e glicina (SIES, 1985; RIBEIRO et al., 2006). É sintetizada nos eritrócitos pelas enzimas γ -glutamylcisteína-sintetase e glutathione sintetase com consumo de ATP, sendo considerada o mais abundante antioxidante à base de tiol intracelular (MACHADO et al., 2009; SPIERS et al., 2015). A combinação de sua abundância nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo sulfidril suporta a proposta de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra espécies reativas de oxigênio e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos (HUBER; ALMEIDA; FATIMA, 2008). A GSH exerce funções essenciais na célula, destacando-se na função de cofator da família de enzimas glutathione peroxidases, em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo. O seu papel intracelular como antioxidante inclui ainda, a desintoxicação de xenobióticos e de EROs (VASCONCELOS et al., 2007).

3.5 Antioxidantes naturais

Os compostos naturais têm se apresentado como importantes alternativas terapêuticas, visto que vários estudos epidemiológicos indicaram que a alta ingestão de produtos vegetais está associada com uma redução no risco de uma variedade de doenças crônicas. Estes efeitos têm sido particularmente atribuídos aos componentes que possuem atividade antioxidante. Dentre os principais antioxidantes nos vegetais estão os compostos fenólicos (MORAIS et al., 2009; SILVA et al., 2010).

Os compostos fenólicos são antioxidantes naturais frequentemente encontrados nas plantas e sua ação decorre principalmente das suas propriedades de oxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singlete ou decompondo peróxidos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Entre os

compostos fenólicos com uma reconhecida atividade antioxidante, estão as chalconas, cumarinas, os ácidos fenólicos, flavonóides e taninos (MARTÍNEZ-VALVERDE et al., 2000; GIADA; MANCINI-FILHO, 2006).

Muitos mecanismos antioxidantes têm sido propostos para os flavonoides, tais como: a) opressão da formação de EROs pela inibição do sistema enzimático responsável pela geração de radicais livres (ciclooxigenase, lipoxigenase ou xantina oxidase); b) quelação de íons metálicos que podem iniciar a produção de radicais hidroxil pela Reação de Fenton ou Harber-Weis; c) sequestro de radicais livres; d) regulação positiva ou proteção das defesas antioxidantes por induzir a fase II de enzimas como glutathione transferase que aumenta a excreção de espécies oxidadas ou e) indução de enzimas antioxidantes como a metalotioneína que é uma proteína queladora de metais, com propriedades antioxidantes (PIETTA, 2000; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; BEHLING, 2000).

Os taninos, por sua vez, são importantes componentes gustativos, sendo responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais que possuem seus mecanismos de ação no organismo relacionados a três propriedades: a) a complexação com íons metálicos; b) a atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; c) a habilidade de complexar com macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos (NIEMETZ; GROSS, 2005; SIMÕES et al., 2007; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

3.6 *Cymbopogon citratus*

O gênero *Cymbopogon* pertence à família Poaceae, uma das mais importantes famílias de óleos essenciais. Esta compreende cerca de 140 espécies que são amplamente distribuídas nas regiões tropicais da Ásia, África e América (ANAL, 2014).

O *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf é uma gramínea tropical perene com folhas longas e finas cultivada principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, América do Sul e África (ÁKHILA, 2010; BOUKHATEM et al., 2014). Esta planta, vulgarmente conhecida como erva-cidreira ou capim-limão, é reconhecida como uma das plantas medicinais mais utilizadas na América Latina, por seus

muitos usos terapêuticos e agradável aroma de limão. Na medicina tradicional é utilizada como um anti-espasmódico, hipotensor, hepatoprotetor, anticonvulsivante, analgésico, anti-emético, antitussígeno, anti-reumático, anti-séptico e para tratamento para distúrbios gastrointestinais, febres e distúrbios do sistema nervoso. Além disso, existem relatos da sua utilização como agente antibacteriano, antidiarréico e antioxidante. Entretanto, apenas algumas propriedades biológicas relacionadas ao capim-limão foram estudadas em detalhe (PARANAGANA et al., 2003; SHAH et al., 2011; KOH et al., 2012).

Adeneye e Agbaje (2007) demonstraram efeitos hipoglicemiantes e hipolipemiantes do extrato aquoso da folha fresca de *Cymbopogon citratus* em ratos Wistar normais. Costa et al. (2011a) também observaram redução dos níveis de colesterol em ratos tratados com o óleo essencial do capim-limão. Thangam et al. (2014) identificaram em seus estudos “*in vitro*” potencial citotóxico e efeitos apoptóticos de polissacarídeos extraídos de *Cymbopogon citratus*, relacionando sua utilização como anticancerígeno. Adaramoye e Azeez (2014) observaram efeito antioxidante do extrato metanólico desta planta. Hanifah et al. (2011) demonstrou atividade acaricida e Costa et al. (2011b) atividade biológica no SNC do óleo essencial obtido do extrato de *Cymbopogon citratus*.



Figura 5. Planta Capim-Limão (*Cymbopogon citratus*). (Adaptado de BALAKRISHNAN; PARAMASIVAM; ARULKUMAR, 2014)

As propriedades medicinais do capim-limão podem ser atribuídas ao seu elevado teor de óleos essenciais. Neral, geranial, limoneno, citronelal, mirceno, e geraniol (Figura 7) foram identificados como principais compostos dos óleos

essenciais do capim limão e, conseqüentemente responsáveis pelas inúmeras atividades biológicas desta planta (BARBOSA et al., 2008). A atividade antioxidante, em especial, parece estar relacionada ao citral, citado como principal óleo essencial do capim-limão e, que parece ser um potente captador de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HALABI; SHEIKH, 2014).

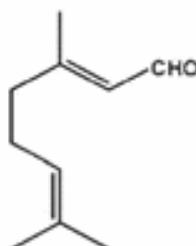


Figura 6. Estrutura do Citral. (Adaptado de LEE et al., 2008)

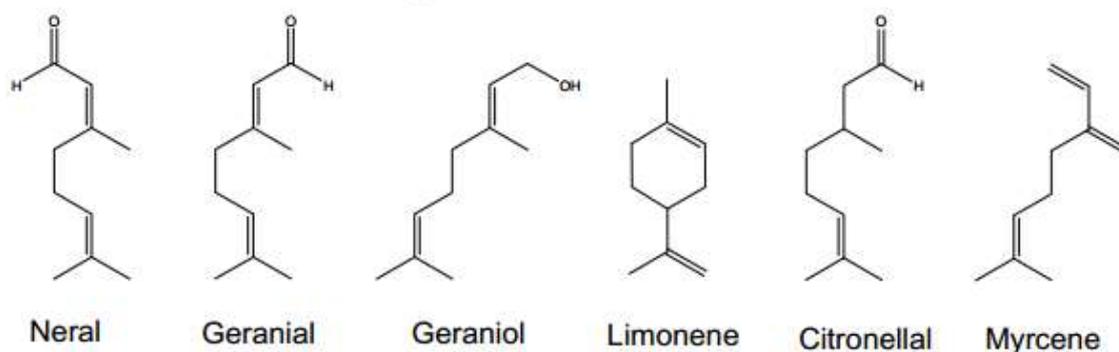


Figura 7. Principais compostos do Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Adaptado de BARBOSA et al., 2008)

Soares et al. (2013), realizaram uma triagem dos componentes fitoquímicos em extratos das folhas de *Cymbopogon citratus* e revelaram a presença de compostos antioxidantes, tais como: taninos, flavonóides e terpenóides. Da mesma forma, Alvis; Martinez; Arrazola (2012) evidenciaram que o extrato do capim-limão apresenta um alto conteúdo de compostos fenólicos e um agente alto poder de redução. Já, Cheel et al. (2005) identificaram ação do extrato desta planta na eliminação do radical superóxido e na peroxidação lipídica em eritrócitos humanos. Segundo Figueirinha et al. (2008) as frações de taninos e flavonóides são os componentes de *Cymbopogon citratus* com maior atividade frente aos processos

oxidativos. Proestos et. al. (2006) e Balakrishnan, Paramasivam e Arulkumar (2014) também relacionaram em seus estudos esta atividade à presença de flavonóides e compostos fenólicos no capim-limão. Segundo estes mesmos autores, os metabólitos citados agem como eliminadores de radicais livres, agentes redutores e doadores de hidrogênio.

Estudos com relação à toxicidade do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, apesar de escassos, indicam que tanto seu óleo natural, quanto o chá e o extrato são inócuos (LEITE et al., 1986; DUBEY; TAKEDA; ITOKAWA, 2000; MISRHA et al. 2001; NEGRELLE; GOMES, 2007; COSTA et al.; 2011a).

4 MANUSCRITO(S)

Os resultados apresentados nesta dissertação estão sob a forma de manuscritos científicos, os quais se encontram aqui estruturados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos.

4.1 Alterações bioquímicas e toxicológicas em plasma de agricultores familiares expostos a agroquímicos. Enviado para o Periódico Interciencia (Caracas); ISSN: 0378-1844; Estrato: B1; Área de Avaliação: interdisciplinar.

4.1.1 Manuscrito I

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E TOXICOLÓGICAS EM PLASMA DE AGRICULTORES FAMILIARES EXPOSTOS A AGROQUÍMICOS

Natacha Cossettin Mori¹; Roberta Cattaneo Horn²; Caroline Oliveira³; Paola Ariane Pereira Leal⁴; Diego Pascoal Golle⁵; Jana Koefender⁶; Josiane Bortolotto⁷; Helena Matielo Dias⁸

¹ **Natacha Cossettin Mori** – Possui graduação em Farmácia pela Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ). É especialista em Farmacologia pela Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). Mestranda do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Atenção Integral à Saúde pela Universidade de Cruz Alta - UNICRUZ em associação com a UNIJUÍ. Possui experiência profissional em farmácia comercial (responsabilidade técnica e Gestão) e Farmácia Hospitalar. Atualmente é professora

da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ) ministrando aulas nos Cursos de Graduação em Farmácia, Enfermagem, Fisioterapia e Agronomia.

² **Roberta Cattaneo Horn** – Possui graduação em Farmácia Análises Clínicas pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (2005). É especialista em Toxicologia Aplicada pela Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande do Sul (2007). Mestre (2009) e Doutora (2011), em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria. Atualmente, é Professora Ajunta da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ) ministrando aulas no Curso de Graduação como Farmácia e Biomedicina, na Especialização em Gestão e Desenvolvimento Sustentável em Empresas Rurais, no Mestrado Profissional em Desenvolvimento Rural e no Mestrado em Atenção Integral a Saúde. Coordenadora do Curso de Mestrado em Atenção Integral a Saúde e da Pós Graduação da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ).

³ **Caroline Oliveira** – Possui graduação em Farmácia pela Universidade de Cruz Alta (2006). Cursando Pós-Graduação em Gestão em Saúde pela Faculdade de Ciências Sociais Aplicadas- CELER FACULDADE. Mestranda em Atenção Integral à Saúde pela Universidade de Cruz Alta em parceria com a Universidade Regional do Noroeste do Estado. Atualmente é pesquisadora voluntária do Grupo Ciência da Universidade de Cruz Alta. Tem experiência na área de Farmácia comercial, pública e hospitalar.

⁴ **Paola Ariane Pereira Leal** – Acadêmica do curso de Biomedicina da Universidade de Cruz Alta – Unicruz

⁵ **Diego Pascoal Golle** – Possui Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de Cruz Alta (2005), Mestrado (2007) e Doutorado (2010) em Engenharia Florestal (Silvicultura) pela Universidade Federal de Santa Maria e Pós-

doutorado em Microbiologia do Solo (Biologia Molecular) realizando junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal de Santa Maria (PRODOC/CAPES, 2011). Revisor dos Periódicos Ciência Florestal, Revista Brasileira de Agroecologia, Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) e Brazilian Archives of Biology and Technology. Professor adjunto da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), docente de diversos cursos de graduação e pesquisador/docente permanente do Mestrado Profissional em Desenvolvimento Rural (linha de pesquisa: Produção Vegetal) e do Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Práticas Socioculturais e Desenvolvimento Social (linha de pesquisa: Práticas Socioculturais e Sociedade Contemporânea). Na contextualização de sua produção científica, os termos mais frequentes são: biotecnologia vegetal, cultura de tecidos vegetais, marcadores moleculares, produção de sementes e mudas, recursos genéticos, conhecimentos tradicionais, sociedade de risco e meio ambiente. Atualmente é Gestor do Polo de Inovação Tecnológica do Alto Jacuí e Pró-Reitor de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão da Universidade de Cruz Alta.

⁶ **Jana Koefender** – Possui graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Santa Maria (1990), mestrado (1992) e doutorado (2007) em Agronomia pela Universidade Federal de Santa Maria. Atualmente é professora Adjunta II no Curso de Agronomia e do Mestrado Profissional em Desenvolvimento Rural e do Programa de Pós-Graduação em Práticas socioculturais e Desenvolvimento Social da Universidade de Cruz Alta. Tem experiência na área de Agronomia, com ênfase em Manejo e Tratos Culturais, atuando principalmente nos seguintes temas: Ecofisiologia dos cultivos agrícolas, Bioclimatologia, Plantas medicinais, condimentares e hortaliças. Agricultura familiar - meio ambiente e Estudo de Plantas alimentícias não convencionais.

⁷ **Josiane Bortolotto** – Possui graduação em Faculdade de Farmácia com ênfase em Farmácia Industrial pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Mestrado no Programa de Pós graduação de Ciências Biológicas: Bioquímica - UFRGS e doutorado no Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular na PUCRS - PPGBCM. Professora tempo integral da Universidade de Cruz Alta - UNICRUZ.

⁸ **Helena Matielo Dias** – Acadêmica do curso de Biomedicina da Universidade de Cruz Alta – Unicruz

Resumo

A exposição ocupacional inadequada aos pesticidas agrícolas pode levar a situações patológicas em longo prazo. Alterações bioquímicas são consideradas indicadores biológicos de efeito no caso de exposição a agrotóxicos. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi analisar as condições de saúde de agricultores familiares expostos ocupacionalmente à agrotóxicos. Participaram da pesquisa 106 agricultores expostos à pesticidas agrícolas e 103 indivíduos sem exposição à agroquímicos (Grupo controle). Foram realizadas dosagens da atividade das enzimas Aspartato Amino transaminase (AST), Alanina Amino transaminase (ALT), Butirilcolinesterase (BuChE), além dos níveis de uréia, creatinina e ácido úrico, através de metodologias colorimétricas e de parâmetros de estresse oxidativo, tais como: níveis de Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), Proteínas carboniladas (PCs) e Glutathiona reduzida (GSH). Os parâmetros bioquímicos avaliados encontravam-se dentro dos valores de referência. Todavia, os agricultores estavam sob a condição de estresse oxidativo, tendo em vista que demonstraram

elevação nos níveis de TBARS, PCs e GSH. Além disso, a atividade da enzima butirilcolinesterase encontrava-se diminuída (4338 UI/mL). Dessa forma, conclui-se que os pesticidas agrícolas alteram não só a atividade da enzima butirilcolinesterase, como também o status oxidativo dos trabalhadores rurais, evidenciando a importância do monitoramento das condições de saúde dos mesmos, bem como o incentivo à utilização de equipamentos de proteção individual.

Palavras-chave: Agricultura; Intoxicação; Monitoramento.

INTRODUÇÃO

A utilização de pesticidas agrícolas é essencial para o manejo de lavouras e controle de pragas, de forma a permitir o aproveitamento máximo dos resultados obtidos no plantio. No Brasil, são consumidas anualmente cerca de 130 mil toneladas de agroquímicos. A região Sul do Brasil se encontra em segundo lugar na utilização destes produtos perdendo apenas para a região sudeste.¹

Os trabalhadores rurais se encontram vulneráveis aos agroquímicos durante os procedimentos de preparo de misturas, lavagem de equipamentos e aplicação na lavoura, bem como através do consumo de alimentos com resíduos ou pelo contato com os EPIs no momento da higienização dos materiais. Esta exposição inadequada aos agentes químicos pode causar alterações reversíveis ou irreversíveis e levar a situações patológicas em longo prazo, dependendo da concentração e período de contato a qual o trabalhador foi exposto. Quando esta exposição é de caráter crônico, ocorrem alterações imunológicas, neurológicas, na reprodução e no desenvolvimento em diversos níveis.² É importante salientar que no Brasil no ano de 2011, o Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas, registrou 129 óbitos devido a acidentes com agrotóxicos³.

Alterações bioquímicas são consideradas indicadores biológicos de efeito no caso de exposição a agrotóxicos⁴, visto que alterações nestes parâmetros podem

indicar possíveis efeitos nocivos da exposição inadequada aos agroquímicos. As enzimas hepáticas aspartato transferase (AST), alanina transferase (ALT) têm sido utilizadas como parâmetro biológico de efeitos da exposição aos pesticidas agrícolas, uma vez que as substâncias químicas são absorvidas pela via digestiva, transportadas pela veia hepática para o fígado e metabolizadas pelo sistema citocromo P450, que dentre outras funções, atua apreendendo e inativando vários xenobióticos que entram no organismo.⁵ Cabe considerar ainda, a avaliação de biomarcadores da função renal, visto que o rim é um dos principais órgãos de biotransformação e excreção de substâncias tóxicas.⁶

Além disso, a entrada de substâncias tóxicas no organismo induz a produção de espécies reativas (ERs) que quando não neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante (SDA) acabam gerando danos celulares. Assim, a partir do momento que há uma produção exagerada dessas ERs ocorre um desequilíbrio entre a produção de substâncias oxidantes e da ação do SDA, instalando-se o estresse oxidativo propriamente dito.^{7,8} Durante o processo de instalação do estresse oxidativo são gerados os marcadores biológicos que permitem identificar e quantificar os danos sofridos no organismo. Os marcadores irão provir da oxidação de lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico.⁸ Para quantificar a oxidação de lipídeos aplica-se o teste do Ácido Tiobarbitúrico (TBA), permitindo analisar a liberação de malondialdeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica.⁹ Como marcador de estresse oxidativo a nível proteico utiliza-se o método de Proteína Carbonilada. Tendo em vista que durante o estresse oxidativo ocorre a fragmentação das cadeias proteicas e oxidação de aminoácidos, devido os vários sítios reativos das proteínas, produzindo então compostos carbonilados como produto final da reação.⁷

Dessa forma, visando um maior entendimento dos eventos biológicos frente à exposição crônica de pesticidas e considerando que a falta de acompanhamento das questões de saúde dos trabalhadores familiares reflete diretamente no desenvolvimento agrícola, torna-se indispensável à realização de estudos que permitam avaliar a saúde dos trabalhadores rurais. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi analisar biomarcadores hepáticos, renais e de estresse oxidativo em agricultores familiares.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa teve como universo de estudo a região do COREDE Alto Jacuí, cuja localização é a região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, que abrange quatorze municípios, sendo eles: Boa Vista do Cadeado, Boa Vista do Incra, Colorado, Cruz Alta, Fortaleza dos Valos, Ibirubá, Lagoa dos Três Cantos, Não-Me-Toque, Quinze de Novembro, Saldanha Marinho, Salto do Jacuí, Selbach, Santa Bárbara do Sul e Tapera. A região do COREDE Alto Jacuí possui como base econômica a atividade agrícola, o que torna imprescindível uma caracterização da saúde dos trabalhadores rurais pertencentes à mesma.

Participaram do estudo 106 agricultores com exposição a pesticidas à mais de 5 anos e 103 indivíduos saudáveis sem contato com agrotóxicos (Grupo controle), todos pertencentes à região do COREDE Alto Jacuí. Os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam um questionário sobre saúde ocupacional com perguntas estruturadas: nome, idade, sexo, uso ou não de medicamentos que interfiram nos resultados do estudo, utilização de suplemento vitamínico, ingestão de água tratada ou não, tempo de trabalho no meio agrícola, agrotóxicos mais manuseados, formas de aplicações dos mesmos, utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs) ao manipular os agroquímicos, entre outras perguntas. Estes dados foram utilizados nas discussões dos resultados encontrados neste estudo, como também na seleção dos participantes da pesquisa respeitando os critérios de exclusão. Foram excluídos da pesquisa os indivíduos que possuíam alguma doença crônica como: sífilis, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), hepatites B ou C, câncer.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) sob o protocolo: 0071.0.417.000-11.

Coleta das Amostras

A coleta das amostras sanguíneas dos participantes foram realizadas nas propriedades dos agricultores, bem como em eventos organizados pelos municípios do COREDE Alto Jacuí no período de Maio a Outubro de 2014. Em seguida, o

material foi levado ao laboratório de análises toxicológicas e centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos. Os plasmas foram coletados em tubos *Vacutainers* contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), separados e mantidos sob refrigeração a -20°C para realização das determinações analíticas.

Determinações Bioquímicas

Foram realizadas as dosagens da atividade das enzimas AST e ALT e dos níveis de uréia, creatinina e ácido úrico através de metodologias colorimétricas utilizando kits comerciais da marca Labtest®.

Determinações da Atividade da Enzima Colinesterase

A análise da atividade da enzima colinesterase plasmática foi realizada utilizando metodologia cinética utilizando kits comerciais da marca Doles®.

Determinações dos Marcadores de Estresse Oxidativo

Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Foi realizada conforme metodologia descrita por Jentzsch¹¹ (1996). Que é baseada na reação do MDA com ácido ortofosfórico 1% e ácido tiobarbitúrico (TBA), em alta temperatura. As leituras foram realizadas espectrofotômetro visível a 532 nm e os resultados foram expressos por nmol MDA/mL.

Proteínas Carboniladas

Foi realizada conforme metodologia descrita por Levine et al.¹⁰ (1990) cujo método consiste na dosagem de proteínas carboniladas através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM, após o acréscimo de ácido clorídrico 2 M e

tampão desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) a 3%, pH 8,0. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro visível a 370 nm e os resultados expressos por nmol carbonil/mg de proteína total. As proteínas totais foram realizadas utilizando kit da marca Labtest®.

Glutathiona reduzida (GSH)

Foram determinadas a partir da técnica descrita por de Ellman¹² (1959). Em que se utiliza tampão fosfato de potássio (TFK) 1M em pH 7,4 e ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB). O procedimento foi realizado em espectrofotômetro visível, e as leituras feitas em 412 nm. Os resultados foram expressos por $\mu\text{mol GSH/mL}$

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Graphpad Prism 5. Os resultados das determinações bioquímicas e da atividade da enzima colinesterase foram comparados com os valores de referência dos kits comerciais utilizados. Os resultados dos marcadores de estresse oxidativo, foram expressos por médias \pm erro padrão (SEM) e analisados pelo teste t-student. Foram considerados valores significativamente diferentes quando entre os grupos estudados foi encontrado um $P < 0,05$.

RESULTADOS

A idade média dos participantes da pesquisa foi de 49 anos, sendo 11,33% do sexo feminino e 88,67% do sexo masculino.

A partir do questionário avaliado verificou-se que o tempo médio de serviço na área agrícola foi de 27 anos, sendo que a última exposição aos pesticidas teve uma média de 122 dias. Quanto à utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), verificou-se que 51,62% utilizavam equipamentos, como luvas e máscara de

proteção, 8,06 % faziam uso eventual e 40,32 % não faziam uso de nenhum tipo de proteção.

Os resultados das determinações bioquímicas deste estudo encontravam-se normais quando comparados com os valores de referência (Tabela 1). Também foi avaliada a atividade da colinesterase plasmática, a qual apresentou uma diminuição da sua atividade, quando comparada aos valores de referência (Tabela 1).

Os níveis de TBARS (Figura 1) e os de PCs (Figura 2) dos agricultores avaliados encontravam-se aumentados quando estes foram comparados ao grupo controle. Da mesma forma, os níveis de GSH (Figura 3), que é um importante antioxidante, também estavam elevados.

DISCUSSÃO

A avaliação do perfil dos agricultores participantes do estudo chama a atenção à pouca utilização de EPIs pelos mesmos. Neste contexto, Gregolis, Jesus-Pinto e Peres¹³ (2012), questionaram em seus estudos os motivos da falta de uso de EPIs por agricultores familiares da região de Rio Branco-AC, e obtiveram como principais respostas, a falta de necessidade da utilização de EPIs, o não fornecimento dos mesmos pelos responsáveis das propriedades dais quais eram funcionários; e o desconforto na utilização destes equipamentos.

As enzimas AST e ALT, são enzimas intracelulares presentes em grande quantidade no citoplasma dos hepatócitos. Lesões ou destruição das células hepáticas liberam essas enzimas para a circulação.¹⁴ Os resultados encontrados para a dosagem da atividade destas enzimas estão de acordo com os valores de referência para as mesmas (Tabela 1). Estes achados indicam que a função hepática dos agricultores avaliados neste estudo encontra-se normal. Contrariando o que a literatura indica, tendo em vista que segundo Oga¹⁵ (2008), a exposição a agrotóxicos induz lesões hepáticas significativas, com o aumento da liberação da AST e ALT para o sangue. Assim, o resultado encontrado neste estudo pode estar relacionado com o tempo da última exposição direta aos agroquímicos, que foi de 122 dias anteriores à coleta e, à possibilidade de regeneração do tecido hepático. Da mesma forma, no presente estudo os resultados encontrados para as dosagens

de creatinina, uréia e ácido úrico (Tabela 1), encontram-se dentro dos valores de referência para os mesmos, indicando que os agricultores avaliados estavam com suas funções renais normais. Por outro lado, em estudo semelhante, Figueiredo, Trape e Alonzo¹⁶ (2011), encontraram alterações renais em 370 agricultores da região de Campinas – SP. Assim, baseado nestes achados, sugere-se que seja realizada uma avaliação mais detalhada no tempo de exposição dos agricultores aos pesticidas agrícolas.

As colinesterases são alvos moleculares específicos de pesticidas organofosforados e carbamatos. Dessa forma, a medição da sua atividade é reconhecida como um marcador biológico humano de intoxicações por agrotóxicos.¹⁷ O presente estudo evidenciou uma redução da atividade da enzima colinesterase plasmática nos trabalhadores rurais (Tabela 1). A família das colinesterases é composta pela acetilcolinesterase e butirilcolinesterase (BuChE), também conhecidas como colinesterase eritrocitária e plasmática, respectivamente. Organofosforados ou carbamatos de ésteres são potentes inibidores destas enzimas.¹⁸ O mecanismo de ação e os efeitos tóxicos são determinados pela inibição da enzima colinesterase, resultando no acúmulo de acetilcolina ou butirilcolina nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso central, periférico e autônomo, e no aparecimento das manifestações clínicas da síndrome colinérgica.¹⁵ A inibição máxima da atividade das colinesterases é geralmente obtida 3 h pós-exposição, dura mais de 72 horas, e em seguida recupera dentro de poucos dias, no caso de intoxicação à carbamatos.¹⁹ Esse fato pode indicar que além da exposição à carbamatos os indivíduos estavam expostos aos organofosforados, uma vez que estes causam uma inibição irreversível da atividade da enzima colinesterase.¹⁵ Esta inibição pode estar relacionada com a não utilização dos EPIs.

A peroxidação lipídica é caracterizada pela reação das ERs com ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, podendo ser avaliada e utilizada como um indicador do estresse oxidativo celular.²⁰ Na figura 1, pode ser observado um aumento dos níveis de lipoperoxidação no plasma dos agricultores estudados quando comparados à lipoperoxidação observada no grupo controle, o que pode levar a uma série de consequências, como por exemplo, o desencadeamento da aterogênese, diabetes e doenças neurodegenerativas.^{21,22,23,24}

As proteínas plasmáticas realizam uma série de funções fisiológicas importantes, dentre elas a manutenção do volume de sangue homeostático.²⁵ Danos diretos à modificação química dessas proteínas ou de seus aminoácidos durante condições de estresse oxidativo originam proteínas carboniladas²⁶, que por sua vez, são consideradas como importantes biomarcadores na avaliação de efeitos tóxicos em nível proteico. Considerando que a figura 2, mostra uma elevação dos níveis de proteínas carboniladas nos agricultores estudados em comparação aos indivíduos não expostos a pesticidas agrícolas, e que a modificação oxidativa destas proteínas tem sido demonstrada como um dos mecanismos relacionados a processos patológicos, como o câncer e doenças inflamatórias,^{27,28} estes resultados podem indicar a possível ocorrência de oxidação proteica nos agricultores expostos aos agroquímicos.

Por outro lado, em virtude dos danos causados pelas ERs, o organismo lança mão dos antioxidantes que podem ser produzidos pelo próprio organismo, ou serem adquiridos pela dieta, tendo em vista, que estas moléculas, mesmo em pequenas concentrações, ajudam a neutralizar e reparar os danos causados pelo estresse oxidativo.²⁹ Neste estudo, de acordo com a figura 3, os níveis de GSH mostraram-se mais elevados nos produtores rurais quando comparados aos controles. A elevação das concentrações deste importantíssimo antioxidante pode ter ocorrido em resposta a uma produção acentuada de ERs no organismo provocada pela exposição aos agroquímicos, a fim de manter o balanço redox, já que de acordo com Júnior et al.³⁰ (2001), o estresse oxidativo pode causar mudanças no estado redox da GSH, aumentando a liberação de glutatona oxidada (dissulfeto) no organismo.

De modo geral, os resultados mostram que, embora não tenham sido encontradas alterações nos marcadores de função hepática e renal nos agricultores familiares avaliados, foram encontradas significativas alterações em lipídios e proteínas nestes indivíduos, evidenciando a ocorrência de estresse oxidativo nos mesmos. Em contraponto aos danos lipídicos e proteicos observados, o organismo parece estar aumentando a produção de seu principal agente antioxidante, a GSH, a fim de manter a homeostasia celular. Portanto, conclui-se que os pesticidas agrícolas alteram o *status* oxidativo dos trabalhadores rurais, evidenciando a

importância do monitoramento das condições de saúde dos mesmos, bem como o incentivo à utilização de equipamentos de proteção individual.

REFERÊNCIAS

1. Spadotto CA, Gomes MAF. Agrotóxicos no Brasil [online]. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html>. Acesso em: 9 set. 2013.
2. Simoniello MF, Kleinsorge E, Carballo MA. Evaluacion bioquimica de trabajadores rural expuestos a pesticidas. *Medicin* [Internet]. 2010;70:489-498. Disponível em: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S002576802010000600001
3. SINITOX. Agrotóxicos de Uso Agrícola [online]. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=399>>. Acesso em: 24 de out. 2014.
4. Amorim LCA. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. *Rev Bras Epidemiol* [Internet]. 2003;6(2):158. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415790X2003000200009&script=sci_arttext DOI: 10.1590/S1415-790X2003000200009
5. Murussi C, Horn RC, Santi A, Clasen BE, Reis G, Souza D et al. Changes in oxidative markers, endogenous antioxidants and activity of the enzyme acetylcholinesterase in farmers exposed to agricultural pesticides - a pilot study. *Cienc Rural* [Internet]. 2014;44(7):1186-1193. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010384782014000701186&script=sci_arttext DOI: 10.1590/0103-8478cr20130516
6. Santos MAT, Areas MA, Reys FGR. Pyrethroids: a review. *Alim Nutr*. 2007; 18(3):399-349.
7. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e

- marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova* [Internet]. 2007; 30(5):1323-1338. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01004042200700050046 DOI: 10.1590/S0100-40422007000500046
8. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr* [Internet]. 2010;4(23):629-643. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S141552732010000400013&script=sci_arttext DOI: 10.1590/S1415-52732010000400013
9. Bertolin TE, Farias D, Guarienti C, Petry FTS, Colla LM, Costa JAV. Antioxidant effect of phycocyanin on oxidative stress induced with monosodium glutamate in rats. *Braz Arch Biol Technol* [Internet]. 2011;54(4):733-738. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S15168913201100040012 DOI: 10.1590/S1516-89132011000400012
10. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464-478. DOI:10.1016/0076-6879(90)86141-H
11. Jentzsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20:251-256.
12. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys*. 1959;82:707. DOI: 10.1016/0003-9861(59)90090-6
13. Gregolis TBL, Jesus Pinto W, Peres F. Percepção de riscos do uso de agrotóxicos por trabalhadores da agricultura familiar do município de Rio Branco, AC. *Rev Bras Saúde Ocup* [Internet]. 2012;37(125):99-113. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S030376572012000100013&script=sci_arttext DOI: 10.1590/S0303-76572012000100013

14. Motta VT. *Bioquímica Clínica para Laboratório: Princípios e Interpretações*. Porto Alegre; Médica Missau; 2003.
15. Oga S, Carvalho MMA, Batistuzzo JA. *Fundamentos em Toxicologia*. São Paulo; Atheneu; 2008
16. Figueiredo GM, DeTrape AZ, Alonzo HA. Exposição a múltiplos agrotóxicos e prováveis efeitos a longo prazo à saúde: estudo transversal em amostra de 370 trabalhadores rurais de Campinas (SP). *Rev Bras Med Trab*. 2011;9(1):1-9.
17. Lionetto MG, Caricato R, Calasi A, Giordano ME, Schettino T. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *Bio Medres Int* [Internet]. 2013;2013:1-8. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/321213/> DOI: 10.1155/2013/321213
18. Çokugras AN. Butyrylcholinesterase: structure and physiologic importance. *Turk J Biochem* [Internet]. 2003;28(2):54-61. Disponível em: http://www.turkjbiochem.com/2003/054_061.pdf
19. Karami-Mohajeri S, Nikfar S, Abdollahi MA. Systematic review on the nerve–muscle electrophysiology in human organophosphorus pesticide exposure. *Hum. Exp Toxicol* [Internet]. 2014;33(1):92-102. Disponível em: <http://het.sagepub.com/content/33/1/92.long> DOI: 10.1177/0960327113489047
20. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci* [Internet]. 2001;37(3):293-303. Disponível em: <http://www.rbcf.usp.br/edicoes/Volumes/V37N3/PDF/v37n3p293-303.pdf>
21. Duarte MMMF, Loro VL, Rocha JBT, Leal DBR, De Bem AF, Dorneles A et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory process. *FEBS Journal* [Internet]. 2007;274:2707–2714. Disponível em:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2007.05805.x/epdf>
DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05805.x

22. Duarte MMMF, Maresco R., Duarte T, Santi A, Bagatini MD, Cruz IBM et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem*. 2010;43:1118–1123. DOI:10.1016/j.clinbiochem.2010.07.002

23. Oliveira JS, Seifert QCBS, Junqueira CR, Librelotto CS, Possenti CGR, Horn RC. Níveis indesejáveis de colesterol total no organismo humano e a ocorrência de estresse oxidativo. *Biomotriz* [Internet]. 2013;7:2317-3467. Disponível em: http://revistaeletronica.unicruz.edu.br/index.php/BIOMOTRIZ/article/view/296/pdf_1

24. Choi SI, Yoo S, Lim JY, Hwang SW. Are Sensory TRP Channels Biological Alarms for Lipid Peroxidation? *Int J Mol Sci* [Internet]. 2014;15(9):16430-16457. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25233127> DOI:10.3390/ijms150916430

25. Griffiths HR, Dias IH, Willetes RS, Devitt A. Redox regulation of protein damage in plasma. *Redox Biology* [Internet]. 2014; 2:430-435. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231714000251> DOI: doi: 10.1016/j.redox.2014.01.010

26. Parvez S, Raisuddin S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channapunctata*(Bloch). *Environ Toxicol Pharm* [Internet]. 2005; 20(1):112-117. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668904002431> DOI: 10.1016/j.etap.2004.11.002.

27. Cruzate VF, Rogero MM, Borges MC, Tirapegui J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Rev Bras Med Esporte* [Internet]. 2007;13(5):336-342. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151786922007000500011&script=sci_arttext DOI: 10.1590/S1517-86922007000500011

28. Deresz LF, Lazzarotto AR, Manfroi WC, Gaya A, Sprinz E, Oliveira R, Dall' Aço P. O Estresse Oxidativo e o Exercício Físico em Indivíduos HIV Positivo. *Rev Bras Med Esporte* [Internet] 2007;13(4):275-279. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S15178692200700040013 DOI: 10.1590/S1517-86922007000400013
29. Ribeiro SMR, Queiroz JH, Peluzio MCG, Costa NMB, Matta SLP, Queiroz MELR. A formação e os efeitos de espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Biosci J* [Internet]. 2005;21(3):133-149. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6617/4350>
30. Júnior LR, Hoehr NF, Vellasco AP, Kubota TL. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim Nova* [Internet]. 2001; 24(1):112-119. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01004042200100010019 DOI: 10.1590/S0100-40422001000100019

TABELAS

Tabela 1 - Resultados das determinações bioquímicas e da atividade da enzima colinesterase plasmática. Os valores de referência estão de acordo o Kit comercial da marca Labtest[®]

Parâmetros	Resultados \pm Erro Padrão	Valores de referência
ALT (mg/dL)	26,89 \pm 1,33	5 a 38
AST (mg/dL)	34,85 \pm 1,01	4 a 36
Creatinina (mg/dL)	1,14 \pm 0,04	0,7 a 1,2
Uréia (mg/dL)	33,4 \pm 1,15	15 a 40
Ácido úrico (mg/dL)	3,65 \pm 0,20	2,5 a 7,0
Colinesterase Plasmática (U/L)	4338 \pm 0,33	4620 a 11500

LISTA DE FIGURAS

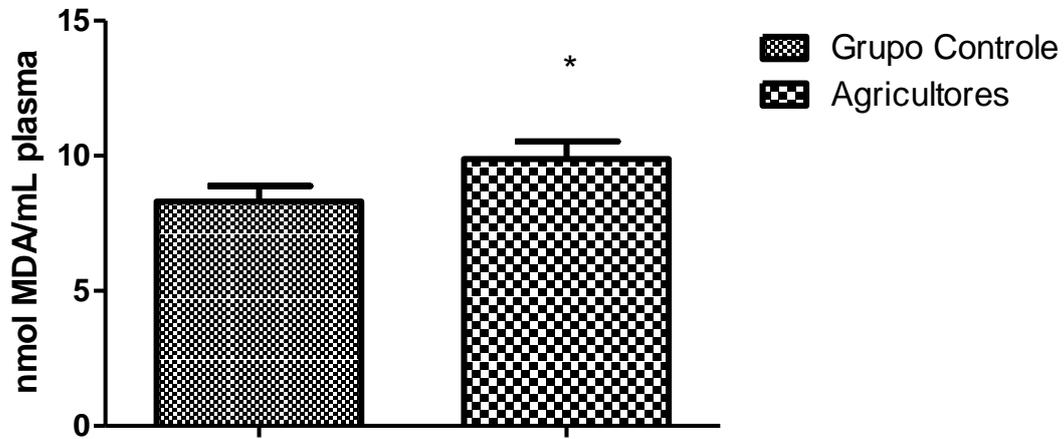


Figura 1. Níveis de Substâncias Reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (nmol MDA/ml plasma) no plasma de 103 indivíduos sem exposição à agrotóxicos (Grupo controle) e de 106 trabalhadores rurais pertencentes ao COREDE Alto Jacuí.

*resultados diferentes significativamente em comparação ao controle ($P < 0,05$).

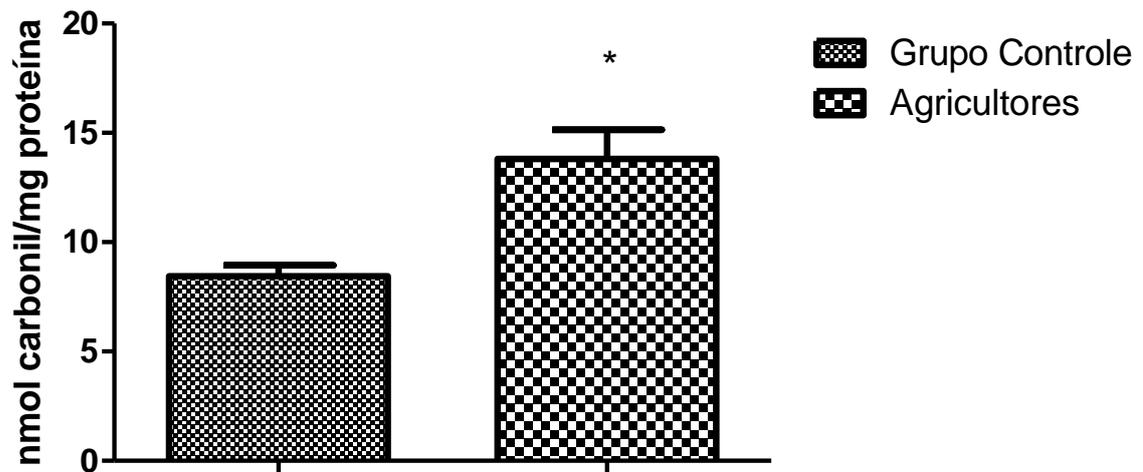


Figura 2. Níveis de Proteínas Carboniladas (PCs) (nmol carbonil/mg proteína) no plasma de 103 indivíduos sem exposição à agrotóxicos (Grupo controle) e de 106 trabalhadores rurais pertencentes ao COREDE Alto Jacuí.

*resultados diferentes significativamente em comparação ao controle ($P < 0,05$).

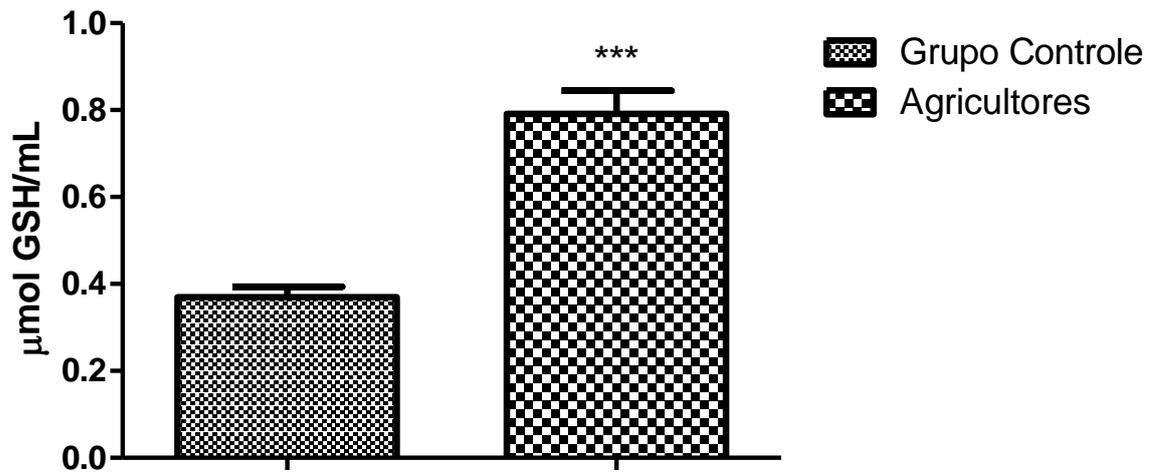


Figura 3. Níveis de Glutathiona reduzida (GSH) ($\mu\text{mol GSH/mL}$) no plasma de 103 indivíduos sem exposição à agrotóxicos (Grupo controle) e de 106 trabalhadores rurais pertencentes ao COREDE Alto Jacuí.

***resultados diferentes significativamente em comparação ao controle ($P < 0,0001$).

4.2. Alterations in the activity of enzyme AChE and in the redox response of farmers treated "*in vitro*" with infusion of *Cymbopogon citratus*. O manuscrito foi submetido ao periódico Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology (Print); ISSN: 1742-7835; Estrato: A2; Área de Avaliação: interdisciplinar.

4.2.1 Manuscrito II

Alterations in the activity of enzyme AChE and in the redox response of farmers treated "*in vitro*" with infusion of *Cymbopogon citratus*

Natacha Cossettin Mori^{1,2}, Roberta Cattaneo Horn^{1,2,*}, Caroline Oliveira^{1,2}, Gabriela Tassotti Gelatti^{1,2}, Jonathas Zeni Klafke¹, Ana Caroline Tissiani², Viviane Deuschle², Cecília Gabriela Rubert Possenti²

¹Postgraduate Program at "Integral Attention to Health" from University of Cruz Alta RS- Brazil

²Laboratory of Oxidative Stress, Center for Health Sciences and Agricultural of University of Cruz Alta (UNICRUZ), Cruz Alta, RS, Brazil.

Corresponding Author:

(*) Dr. Roberta Cattaneo Horn

Center for Health and Agricultural Sciences

University of Cruz Alta

98.020-290– Cruz Alta, RS, Brazil.

Phone: 55 (55) –3321-1556

E-mail:rcattaneo@unicruz.edu.br

Abstract

Agrochemicals have received more highlights in 1960s, marked by the agricultural modernization process. As a result of this widespread use for food production there was also an increase in cases of intoxication by these agents made necessary to search for alternative therapies for agricultural workers exposed to pesticides. Thus, considering that phytochemical characterization revealed the presence of antioxidants in *Cymbopogon citratus* extract, the objective of this study was to evaluate in vitro the effect of infusion of this plant on the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) and on the redox response in erythrocyte of the farmers. This red blood cells were processed and subjected to treatment with the infusion of *Cymbopogon citratus* (5, 10, 25 and 50 g/L). In these samples were determined the AChE enzyme activity, the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyls (PCs) and reduced glutathione (GSH). In general, it was found that the inhibition of AChE activity in the studied farmers is negative correlated to increased protein carbonyl levels and positive correlated with GSH levels. Also, *Cymbopogon citratus* infusions could not reverse this inhibition and

nor the high levels of TBARS and PCs. On the other hand, levels of GSH were increased by infusions demonstrating the increased antioxidant activity in erythrocytes of rural workers.

Keywords: Farmworkers; Pesticides; Treatment; *Cymbopogon citratus*.

INTRODUCTION

Agriculture is practiced by humans for over ten thousand years, however, the intensive use of pesticides to control pests and diseases of crops has existed for just over half a century. In Brazil, agrochemicals have received greater prominence in the 1960s, marked by the agricultural modernization process^[1,2]. Thus, due to the widespread use of pesticides to food production there is also an increase in cases of poisoning by these agents. According to the National System of Toxic-Pharmacological Information^[3], 33.86% of deaths from poisoning registered in Brazil in 2012 were caused by contact with pesticides.

The agrochemicals promote inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), causing accumulation of acetylcholine in the synaptic cleft and consequent acute cholinergic syndrome, which leads to the development of various symptoms such as stiffness, fatigue, tiredness, headache, among others^[4,5]. Moreover, many studies "in vitro" indicate that several blood markers are negatively affected by an increased oxidative stress, wherein the AChE activity is also inhibited by the increased reactive oxygen species (ROs)^[6]. According Milatović, Gupta and Aschner^[7] agricultural pesticides promote inhibition of oxidative phosphorylation in the central nervous system (CNS), compromising the ability of the cell to keep your energy levels, which possibly increases the amount of reactive oxygen species

(ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNSs) in the body, characterizing the condition of oxidative stress. This mechanism has also been identified as relevant to justify the adverse health effects of farmers exposed to agricultural pesticides^[8]. Nevertheless, the biological role of AChE present in the erythrocyte membrane is not well understood, it is known that this enzyme only present in red blood cells have many properties similar to those obtained in purified form from brain tissues^[9]. Thus, AChE activity in erythrocytes can be considered a marker of central cholinergic state^[10].

Oxidative stress is a result from an imbalance between oxidants and antioxidants compounds in favor excessive generation of reactive species or to the detriment of the removal rate thereof. This process leads to the oxidation of biomolecules with consequent loss of its biological functions and/or homeostatic imbalances, whose manifestation is the potential oxidative damage to cells and tissues^[11]. The reactive species promote the breaking of the DNA chain, lipid peroxidation of the cell membrane and protein degradation. In biological systems this damage is reflected by the completion of the comet assay and micronucleus determination, determination of levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and the quantification of levels of protein carbonyls, respectively^[12].

The excess of ROS in the body is countered by antioxidants produced by the body or absorbed from the diet. Endogenous antioxidants are divided between those that act enzymatically, such as glutathione peroxidase (GPx), Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) or non-enzymatically, for example the reduced glutathione (GSH), histidine peptides, linked proteins to the iron (ferritin and transferrin), diidrolipoic acid and CoQH. It should be noted still the function of antioxidant compounds from the feed, such as alpha-tocopherol (vitamin-E), beta

carotene (pro-vitamin A), ascorbic acid (vitamin-C) and phenolic compounds^[13]. According to Barbosa et al.^[11], despite the effects from dietary antioxidants on oxidative stress are not conclusive, the diet is a factor of great importance in the modulation of the oxidative stress.

Plants are a valuable source of phenolic compounds, such as flavonoids, phenolic acids, tannins and tocopherols^[14-15-16]. Studies of Alvis, Martinez and Arrazola^[17] and Smith et al.^[18] revealed the presence of these same phytochemical constituents in extracts of the leaves *Cymbopogon citratus*. However, it should be considered that certain plants have potentially hazardous substances^[19], which makes it imperative further investigation about the use of natural resources that surround us^[20].

The *Cymbopogon citratus* popularly known as lemon grass, stands out in this context, because according ethnobotanical surveys this plant is used empirically in gastrointestinal treatments and as sedative^[21]. These medicinal properties may be attributed to its high essential oil content, the citral, which in addition to therapeutic efficacy, appears to be a potent collector of reactive oxygen species (ROS)^[22]. In addition, Soares et al.^[18] evaluated the total antioxidant capacity of the extract of *Cymbopogon citratus* leaves prepared with different solvents (water, methanol and ethanol) and detected the collecting activity of reactive species in all them. However, it is important to note that although phytochemical constituents of lemon grass extract have been described, the infusion of this plant, which is the form of popular consumption, has been little studied, both with respect to the components as the activity in biological systems.

Thus, considering that phytochemical characterization of *Cymbopogon citratus* revealed the presence of antioxidants in the extract of this plant and that contact and

agrochemicals causes changes in the activity of AChE with possible generation of oxidative stress, it is important to evaluate the effect of same about the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) and on the response redox in erythrocyte from farmers, since the lemon grass can be presented as a future alternative therapy for workers exposed to pesticides.

MATERIALS AND METHODS

This present research work was accepted by the Ethics Committee in Research (ECR) of the Cruz Alta University - UNICRUZ under protocol: 0071.0.417.000-11. The study participants were asked about the feasibility of participation in the research and signed a free and informed consent form (ICF).

Samples from rural farmers used in the study were from municipalities in the COREDE Alto Jacuí Region - RS, Brazil, that signed the free and consent form, had aged between 18 and 59 years and worked at least three years in the agriculture area (inclusion criteria). To group control composition were selected healthy individuals with age and gender similar to the group of farmers. All volunteers answered a questionnaire on occupational health with structured questions aiming to use this data to select survey participants respecting the exclusion criteria, such as not smoking, not drink alcoholic and not having chronic disease. Therefore, of the 40 farmers who agreed to participate in the study, 30 were selected and randomly divided into five groups:

- Group 0 (basal): samples without treatment with lemon grass;
- Group 5: samples treated with infusion of 5 g/L of lemon grass;

- Group 10: samples treated with infusion of 10g/L of lemon grass;
- Group 25: samples treated with infusion of 25 g/L of lemon grass;
- Group 50: samples treated with infusion of 50 g/L of lemon grass.

The control group (Group S) was composed of samples from 30 healthy subjects that did not receive treatment with the infusion of *Cymbopogon citratus*.

Blood samples of the participants were performed using vacutainers containing ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), were excluded hemolyzed samples or lipemic samples with insufficient volume to the determinations. Then, the samples were immediately centrifuged at 3000 rpm for 10 min and the plasma was removed. The erythrocytes were washed three times with cold saline isotonic solution and centrifuged again. After the final washing erythrocytes were resuspended in saline, then diluted to achieve a 5% hematocrit according to the technique described by Catalgol et al.^[23], with minor adaptations. After dilution of erythrocytes was performed the treating of samples with plant infusion in the concentrations (5-50 g/L) closer to those by population. Then, the samples were incubated for 1 hour in a water bath at 37°C, after this period the samples were hemolyzed by vortexing for 30 seconds and centrifuged at 3600 rpm by 15 minutes. The supernatant was stored at -20°C for later realization of analytical determinations.

The *Cymbopogon citratus* extract was prepared aiming to compare the concentrations of phytochemicals present in it with the concentrations of the infusion. To this was followed by the methodology described Simões et al.^[24], which recommends the use of water and ethanol (70:30) as solvent extractors. The plant material was submitted to manual shake daily for fourteen days, filtered and

concentrated in a rotary evaporator. This extract was lyophilized to remove water, thereby obtaining the hydro ethanolic crude extract.

The leaves of *Cymbopogon citratus* came from the garden of the Cruz Alta University- UNICRUZ, Rio Grande do Sul. The infusion was prepared pouring boiling water on plant leaves and then closed the container for 10 minutes. According the Brazilian Pharmacopoeia^[25], this method is suitable for parts of drugs plants less rigid consistency such as leaves, flowers, inflorescences and fruits, or containing volatile active substances.

The determination of total polyphenols was carried according the method Folin-Ciocalteu described by Chandra and Mejia^[26], with modifications. The sample was diluted to concentration of 0.150 mg / mL, added with sodium carbonate solution at 20% and Folin-Ciocalteu 2N reagent. The solution was incubated for 10 minutes and absorbance measurements were realized in triplicate using a spectrophotometer (730nm). The total polyphenol content was expressed in milligrams of gallic acid equivalents per ml of the infusion, based on the calibration curve of gallic acid.

The content of Total flavonoids was determined according to the method described by Woisky and Salatino^[27]. The sample was diluted to one a concentration of 1 mg/mL and added of aluminum chloride and methanol. The absorbance read at 420nm. The tests were performed in triplicate and for dosing calculation we used a quercetin standard curve. The flavonoid content were expressed in mg quercetin per ml of infusion.

The determination of tannins was carried out using the method described by Morrison et al.^[28] with some modifications. The sample was diluted to one a concentration of 25 mg/mL in methanol. Subsequently was added to the sample, vanillin solution (1g vanillin diluted in 100 mL of methanol) and hydrochloric acid

solution concentrated diluted in methanol. The absorbances were read to 500 nm. The analyses were performed in triplicate and the total tannin content will be expressed in milligrams of catechin equivalents per milligrams of infusion, based on the pattern of catechin curve.

Analysis of the AChE enzyme activity was performed by the method described by Ellman et al.^[29] that is used for the mixture of 100 mM potassium phosphate reaction buffer (pH 7.5), 10 mM DTNB, and substrate acetylthiocholine 1mM. Readings were taken in spectrophotometer 20 in 20 seconds for 2 minutes. The results are expressed in IU/ml.

Lipid peroxidation was determined according to the formation method of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) according Stocks and Dormandy Protocols^[30]. The supernatant (0.2 mL) was added to the reaction mixture containing trichloroacetic acid 28% (v/v); alkaline solution of thiobarbituric acid (TBA) (0.1 mol/L) followed by heating at 95°C. After cooling readings were performed at 532 nm. The results were expressed as nmol MDA/g Hb. The total hemoglobin levels were determined from methodology described by the manufacturers of the kit Labtest[®].

The analyzes were carried out using the technique described by Levine^[31] adapted to erythrocytes, wherein it is used trichloroacetic acid (TCA) to 10% (v/v), 2N hydrochloric acid; 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and 10 mM sodium dodecyl sulfate (SDS), 3% (w/v) to the reaction mixture. Readings were taken in visible spectrophotometer at 370 nm. The results were expressed as nmol/carbonyl/mg protein.

They were determined from the technique described by Ellman^[32] adapted to erythrocytes, which uses potassium phosphate buffer (TFK) 1M at pH 7.4 and 5,5'-dithiobis acid (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). The procedure was performed in an ice

bath and readings made in a visible spectrophotometer at 412 nm. The results were expressed as $\mu\text{mol GSH/mL plasma}$.

The characterizations of phytochemicals extract and lemon grass infusion were performed in triplicate and the results expressed as mean \pm standard deviation. Data were submitted to student-t test for parametric data considering the significantly different means with a $P < 0.001$.

The analytical determinations of all samples were performed in triplicate and the results thereof were expressed as mean \pm SEM (standard error). The distribution of variables was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Data from all groups studied for the same parameter, were submitted to analysis of variance (ANOVA) of a path followed by the Tukey-Kramer test for parametric data, or Kruskal-Wallis followed by Dunn's Multiple Comparison or Mann Whitney test for nonparametric data. The results of AChE, PCs and GSH were processed for parametric analysis, where $Y = \log(Y)$ and the results of TBARS were analyzed with non-parametric tests. Significantly different means were considered a $P < 0.05$.

For the correlation, it was performed the Spearman test (nonparametric data) or Pearson teste (parametric data), followed by linear regression.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the characteristics of the study participants. Both healthy individuals and farmers were men (100%) and sedentary (90 ± 6 ; 83.3 ± 3). The average age of the control group was 38 ± 9 years, while that of rural workers was 41 ± 12 years. Participants farmers in this study had an average time of exposure to

pesticides of 21.9 ± 12.2 years, and the last show was on average 58.9 ± 10.4 days. Only 40% of rural workers use personal protective equipment (PPE).

Table 2 describes the total polyphenol levels (E: 24.2 ± 0.61 mg/L and I: 4.0 ± 0.16 mg/L), flavonoids (E: $100.7 \text{ mg} \pm 2.30$ /L and I: 38.4 ± 1.23 mg/L) and tannins (E: 28.4 ± 1.01 mg/L and I: 8.9 ± 0.38 mg/L) present in the extract (E) and infusion (I) of lemongrass in the concentration of 50 g/L. These results demonstrate that both the extract as an infusion of the plant have antioxidant activity compounds, however, it appears a significant difference between the concentrations of these components when the two preparations were compared, noting the lowest measurements for the tested infusion. These results corroborate the findings of Cheel et al.^[33], who found the main eliminators ERs both the infusion, and in decoction and *Cymbopogon Citratus* extract, but with important differences in the relative proportions in each preparation.

Moreover, although it is evident the presence of polyphenols and tannins in lemon grass, we can highlight both the amount of flavonoids in the extract and in the infusion of the plant, which according to Balakrishnan; Paramasivam; and Arulkumar^[34], indicates an important antioxidant activity of lemongrass, given that these authors reported that flavonoids have strong ROS removal activities, and is effective in cellular protection against oxidative damage. Nevertheless, it is worth considering that according to Sousa et al.^[35] and Simões et al.^[24] total polyphenols contribute to the initiation step, as well as the propagation of oxidative process, and the tannins seem to trap reactive oxygen radicals forming more stable.

Figure 1 shows the results for the AChE enzyme activity, where you can see that the red cells from farmers without treatment with the plant (Group 0), the activity of this enzyme is significantly reduced (0.53 ± 0.15 IU/mL) compared to the control

group (3.78 ± 0.22 IU/mL), indicating that these rural workers can be intoxicated with pesticides, as organophosphates and carbamates^[36]. This inhibition of AChE activity causes accumulation of acetylcholine in the synaptic cleft from the nerve endings, which can trigger a number of undesirable physiological effects such as: back pains and severe headache^[37], frequently reported symptoms for workers who are exposed to pesticides.

In order to verify that the *Cymbopogon citratus* would revert the inhibition of the AChE enzyme activity, treatment of erythrocytes these farmers with different concentrations of infusion of lemongrass were performed. After these treatments performed in vitro significant changes were observed, suggesting that this plant has no action on the activity of acetylcholinesterase. This finding corroborates the findings of Adaramoye and Azeez^[38], given that the authors still did not observe significant differences between AChE activity in rats treated with *Cymbopogon citratus* extract and the control group (untreated rat with plant).

The erythrocyte membrane is a direct target of lipid peroxidation and protein carbonyls in oxidative stress conditions. Figures 2 and 3 show that the TBARS and PCs levels analyzed in farmers erythrocytes were higher than the amount of these oxidative markers in the control group, showing an occurrence of oxidative stress in these subjects chronically exposed to chemicals tillage, which increases risk of developing some diseases, such as: atherosclerosis, diabetes, neurodegenerative diseases and cancer^[39-44].

In addition, it is found in Figure 2 and 3 that levels of malondialdehyde (MDA) and PCs were not changed after treatment with lemongrass infusion (5-50 g/L), demonstrating that this plant does not seem to be able to reverse the lipid and protein damage caused by exposure to pesticides. This may be due to low levels of

antioxidant phytochemicals these infusions (5-50 g/L), in order that already exist in the literature authors found a significant reduction in oxidative markers after treatment of healthy human erythrocytes with the extract *Cymbopogon citratus*^[33]. These findings can also be related to the inability of lemongrass infusions (5-50 g/L) reversed the inhibition of AChE enzyme, in order that the reduction of the activity of this enzyme may induce the production of ROS and thus promote damage to macromolecules^[7-38].

GSH has a central role in the elimination of xenobiotics and protection of cells against oxidative stress since it assists the GST and glutathione peroxidase (GPx) in reduction of oxidizing species^[45]. Thus, considering the importance of the antioxidant for defense against ROS also performed in this study was the assessment of GSH levels (Figure 4). Thus, we observed that the levels of GSH were higher in the basal group (farmers) compared to the control group, suggesting that the body increased this non-protein thiol in response to increased TBARS levels and found PCs erythrocytes in these same farm workers (Figure 2 and 3), probably to counteract the damaging ROS acting lipids, proteins and DNA^[11]. Moreover, after treatment of the samples with infusion of lemongrass GSH levels were significantly increased when compared to healthy group and a group without treatment with the plant, indicating that the infusions of the same (5-50 g/L) are capable to stimulate antioxidant action.

Figure 5A show the correlations between lipid peroxidation levels of samples from healthy individuals and samples from farmers before treatment with the lemongrass. This correlation was not significant, demonstrating that there is no relationship between lipid damage and inhibition of AChE.

Figure 5B show the correlations between protein carbonylation levels of erythrocytes before treatment with the plant, demonstrating that the enzyme activity

and levels of protein carbonylation, were inversely proportional, confirming that Milatović, Gupta and Aschner^[7] describe in their studies; cholinergic overstimulation promoted by inhibition of AChE affect the process of oxidative phosphorylation, thereby increasing the production of ROS which in turn promote destruction of cellular components. It should be noted that this finding corroborates the findings of Jha and Rizvi^[46], who observed correlation between antioxidant capacity and the activity of AChE.

Furthermore, in figure 5C it was observed that the lower the AChE activity in RBCs farmers, lower GSH levels were the same, indicating a possible use of endogenous antioxidant in an attempt to reverse the damage caused by the increase in TBARS levels and PCS generated by inhibiting AChE activity.

Overall, the decline in AChE activity by the use of pesticides appears to be correlated with the occurrence of oxidative stress as it presents negative correlation with the levels of PCs and positively correlated with antioxidant status verified by evaluating the GSH levels^[7-38].

Therefore, it was observed the presence of polyphenols, flavonoids and tannins in lemongrass infusions (5-50 g/L), however these concentrations were lower than those present in the extract of this plant. Probably because of this low amount of antioxidant phytochemicals, lemongrass infusions the (5-50g/L) not reversed the inhibition of AChE activity verified in farmers exposed to pesticides and with that, they have not revert the levels of oxidative markers in 1 hour exposure performed in this study. On the other hand, infusions *Cymbopogon citratus* (5-50g/L) increased antioxidant activity in erythrocytes by raising the elevation of GSH levels, which decreases the generation and increases the neutralization of ROS^[11-43].

Lemongrass infusions tested in this study (5, 10, 25 and 50 g/L) failed to reverse the inhibition of AChE enzyme observed in erythrocytes farmers also no lowering TBARS and PCs, however, increased GSH levels, demonstrating what the *Cymbopogon citratus* increased the antioxidant status in erythrocytes of rural workers. Furthermore, from this study confirm the hypothesis that inhibition of AChE activity is accompanied by increased levels of a oxidative marker (PCs) and the most important endogenous antioxidant.

REFERENCES

- ¹ Recena MCP, Caldas ED, Pires DX, Pontes ER. Pesticides exposure in Culturama, Brazil: Knowledge, attitudes, and practices. *Environ Res* 2006;102:230-6.
- ² Silva FM, Coelho CD, Ferreira PML, Sousa EML, Azevedo PB, Almeida IP, et al. Os riscos no uso indiscriminado de agrotóxicos: uma visão bibliográfica. *Informativo Técnico do Semiárido* 2015;9:77-86.
- ³ FIOCRUZ/CICT/SINITOX. Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Informação Científica e Tecnológica/Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Estatística Anual de Casos de Intoxicação e Envenenamento. Brasil, 2015. [acessado 2015 Mar 15]. Available in: <http://www.fiocruz.br/sinitox>.

⁴ Cárdenas O, Silva E, Morales L, Ortiz J. Estudio epidemiológico de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos, 1998-2001 *Biomédica* 2005;25:170-80.

5 Bayrami M, Hashemi T, Malekirad AA, Ashayeri H, Faraji F, Abdollahi M. Electroencephalogram, cognitive state, psychological disorders, clinical symptom, and oxidative stress in horticulture farmers exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Ind Health* 2012;28:90-6.

⁶ Molochkina EM, Zorina OM, Fatkullina LD, Goloschapov AN, Burlakova EB. H₂O₂ modifies membrane structure and activity of acetylcholinesterase. *Chem Biol Interact* 2005;157-158:401-4.

⁷ Milatovic D, Gupta RC, Aschner M. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *Sci World J* 2006;6:295-310.

⁸ Surajudeen YA, Sheu RK, Ayokulehin KM, Olatunbosun AG. Oxidative stress indices in Nigerian pesticide applicators and farmers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Int J Appl Basic Med Res* 2014;4:37-40.

⁹ Sorensen K, Gentinetta R, Brodbeck U. An amphiphile-dependent form of human brain caudate nucleus acetylcholinesterase: purification and properties. *J Neurochem* 1982;39:1050-60.

¹⁰ Kaizer RR, Correa MC, Gris LR, da Rosa CS, Bohrer D, Morsch VM, et al. Effect of long-term exposure to aluminum on the acetylcholinesterase activity in the central nervous system and erythrocytes. *Neurochem Res* 2008;33:2294-301.

¹¹ Barbosa KB, Costa NMB, Alfenas RCG, Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr* 2010;23:629-643.

¹² Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato S, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím Nova* 2007;30:1323-38.

¹³ Barreiros ALB, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím Nova* 2006;29:113-23.

¹⁴ Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1992;32:67-103.

¹⁵ Neves JM, Cunha S. Plantas Medicinais. *Rev Cienc Saude* 2006;3:50-7.

¹⁶ Angelo PM, Jorge, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2007;66:1-9.

- ¹⁷ Alvis A, Martínez W, Arrazola, G. Obtención de extractos hidro-alcohólicos de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) como antioxidante natural. Inf Tecnol 2012;2:3-10.
- ¹⁸ Soares MO, Alves RC, Pires PC, Oliveira MB, Vinha AF. Angolan *Cymbopogon citratus* used for therapeutic benefits: Nutritional composition and influence of solvents in phytochemicals content and antioxidant activity of leaf extracts. Food Chem Toxicol 2013;60:413-8.
- ¹⁹ Rodrigues HG, Meireles CG, Lima JTS, Toledo GP, Cardoso JL, Gomes SL. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. Rev Bras Plantas Med 2011;13:359-66.
- ²⁰ Melo DB, Holanda CAS, Pereira AP, Morais TMDM, Barros APP, Pereira BL, et al. Fitoterapia, porque não? Rev Bras Med Fam Comunidade 2012;7:52.
- ²¹ Moreira, RCT et al. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. Acta Farm. Bonaer 2002; 1-7.
- ²² Halabi, MF, Sheikh BY. Anti-proliferative effect and phytochemical analysis of *Cymbopogon citratus* extract. Biomed Res Int 2014;2014.

- ²³ Catalgol BK, Ozden S, Alpertunga B. Effect of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. *Toxicol In Vitro* 2007;21:1538-44.
- ²⁴ Simões CMO, Shenkel EP, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: Editora UFGRS/UFSC, 2010. 1102p.
- ²⁵ Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira*. São Paulo, SP: Anvisa, 2011.
- ²⁶ Chandra S, Meija EG. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguayensis*) and Green tears (*Camellia sinensis*). *J Agr Food Chem* 2004;52:3583-9.
- ²⁷ Woisky RG, Salatino A. Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicult Res* 1998;37:99-105.
- ²⁸ Morrison M, Asiedu EA, Stuchbury T, Powell AA. Determination of lignin and tannin contents of cowpea seeds coats. *Ann Botany* 1995;76:287-90.
- ²⁹ Ellman GL, Courtney KD, Valentino A, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholin-esterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88-95.

³⁰ Stock J, Dormandy TL. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Brit J Haematol* 1971;20:95-111.

³¹ Levine RL. Determination of carbonil in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-8.

³² Ellman GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 1959;7:70-82.

³³ Cheel J, Theodoluz C, Rodrigues J, Schmeda-Hirschmann G. Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *J Agric Food Chem* 2005;53:2511- 7.

³⁴ Balakrishnan B, Paramasivam S, Arulkumar A. Evaluation of the lemongrass plant (*Cymbopogon citratus*) extracted in different solvents for antioxidant and antibacterial activity against human pathogens. *Asian Pac J Trop Dis* 2014;4:134-9.

³⁵ Sousa CMM, Rocha e Silva H, Vieira-Jr G, Ayres MC, S. da Costa CL. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím Nova* 2007;30:351-5.

³⁶ Lionetto MG, Caricato R, Calisi A, Giordano ME, Schettino T. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *Biomed Res Int* 2013;2013.

³⁷ Murussi C, Horn RC, Santi A, Clasen BE, Reis -G , Souza -D , et al. Changes in oxidative markers, endogenous antioxidants and activity of the enzyme acetylcholinesterase in farmers exposed to agricultural pesticides – a pilot study. *Ciênc Rural* 2014;44:1186-93.

³⁸ Adaramoye AO, Azeez FA. Evaluation of antioxidant and acteylcholinesterase-inhibitory properties of methanol extracts of *Nauclealatifolia*, *Cymbopogon Citratus* and *Cocos nucifera*: an in vitro study. *Br J Med Med Res* 2014;4:2156-70.

³⁹ Cruzat VF, Rogero MM, Borges MC, Tirapegui J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Rev Bras Med Esporte* 2007;13:336-342.

⁴⁰ Deresz LF, Lazzarotto AR, Manfroi WC, Gaya A, Sprinz E, Oliveira R, Dall' Ago P. O estresse oxidativo e o exercício físico em indivíduos HIV positivo. *Rev Bras Med Esporte* 2007;13:275-9.

⁴¹ Duarte MMMF, Loro VL, Rocha JBT, Leal DBR, De Bem AF, Dorneles A, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory process. *FEBS J* 2007;274:2707–14.

⁴² Duarte MMMF, Maresco R, Duarte T, Santi A, Bagatini MD, Cruz IBM, et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem* 2010;43:1118–23.

⁴³ Oliveira JS, Seifert QCBS, Junqueira CR, Librelotto CS, Possenti CGR, Horn RC. Níveis indesejáveis de colesterol total no organismo humano e a ocorrência de estresse oxidativo. *Biomotriz* 2013;7:95-107.

⁴⁴ Choi SI, Yoo S, Lim JY, Hwang SW. Are sensory TRP channels biological alarms for lipid peroxidation? *Int J Mol Sci* 2014;15:16430-57.

⁴⁵ Huber PC, Almeida WP, Fatima A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Quim Nova* 2008;31:1170-9.

⁴⁶ Jha R, Rizvi SI. Age-dependent decline in erythrocyte acetylcholinesterase activity: correlation with oxidative stress. *Biomedical Papers* 2009;153:195-8.

TABLES

Table 1. Profile of study participants.

	Healthy individuals (Group S)	Farmers
Male (%)	100	100
Age (Years)	38±9	41±12
Sedentary (%)	90 ±6	83,3±3
Exposure Time (Years)	-	21,9±12,2
Use of Personal Protective Equipment (%)	-	40
Last application (Days)	-	58,9±10,4

Table 2. Quantification of total polyphenols, tannins and flavonoids in the extract and in the infusion of *Cymbopogon citratus*. Results were expressed as mean \pm standard deviation.

Sample	Amounts (mg/mL)		
	Total Polyphenols	Flavonoids	Tannins
Extract <i>Cymbopogon citratus</i> (E)	24,2 \pm 0,61	100,7 \pm 2,30	28,4 \pm 1,01
Infusion <i>Cymbopogon citratus</i> 50g /L (I)	4,0 \pm 0,16***	38,4 \pm 1,23***	8,9 \pm 0,38***

* Indicates significantly different results, considering a $p < 0.01$

FIGURE CAPTIONS

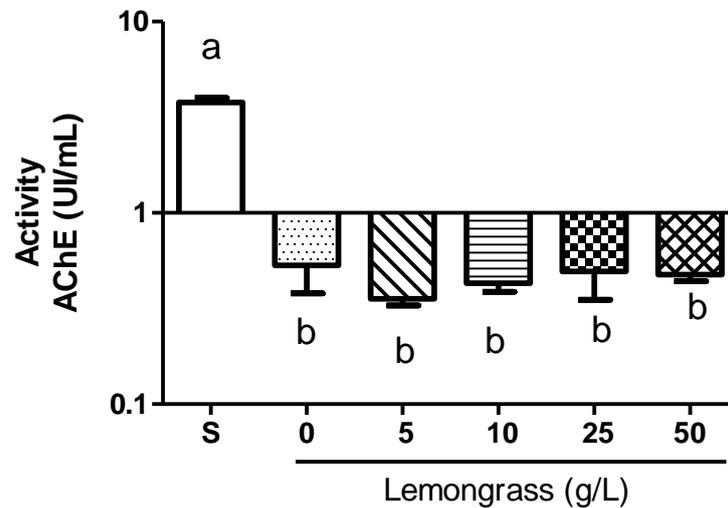


Figure 1: AChE Enzyme Activity (UI/mL) in erythrocytes treated or not with infusion of lemongrass in different concentrations. Group S: samples from healthy individuals (control group); Group 0: sample from farmers untreated; Group 5: samples from farmers treated with infusion of lemongrass 5 g/L; Group 10: samples from farmers treated with infusion of lemongrass 10 g/L; Group 25: samples from farmers treated with infusion of lemongrass to 25 g/L; Group 50: samples from farmers treated with infusion of lemongrass to 50g/L. Different letters represent results significantly different ($p < 0.05$).

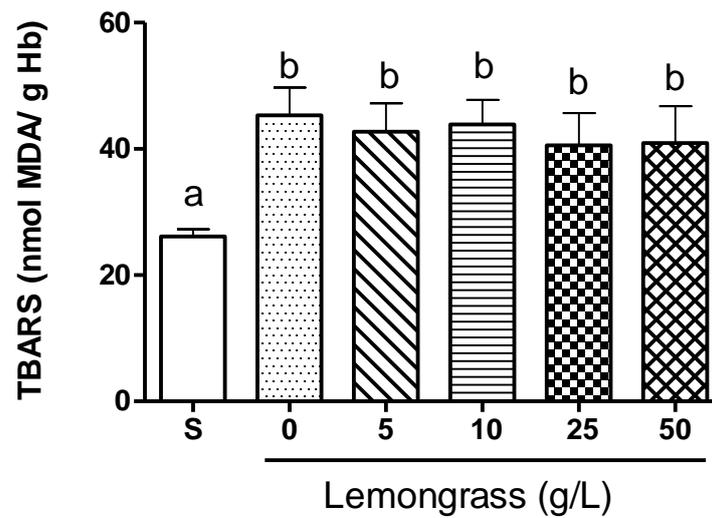


Figure 2: Levels of TBARS (nmol MDA/g Hb) in erythrocytes treated or not with infusion of lemongrass in different concentrations. Group S: samples from healthy individuals (control group); Group 0: sample from farmers untreated; Group 5: samples from farmers treated with infusion of lemongrass 5 g/L; Group 10: samples from farmers treated with infusion of lemongrass 10 g/L; Group 25: samples from farmers treated with infusion of lemongrass to 25 g/L; Group 50: samples from farmers treated with infusion of lemongrass to 50g/L. Different letters represent results significantly different ($p < 0.05$).

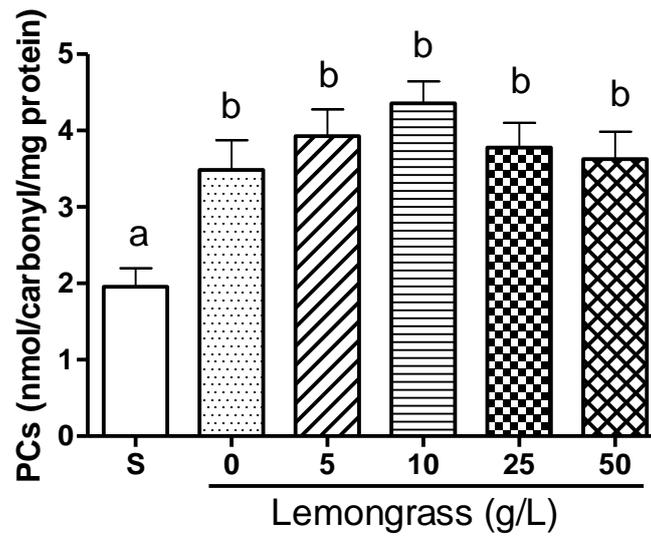


Figure 3. Levels PC (nmol/carbonyl/mg protein) in erythrocytes treated or not with infusion of lemongrass in different concentrations. Group S: samples from healthy individuals (control group); Group 0: sample from farmers untreated; Group 5: samples from farmers treated with infusion of lemongrass 5 g/L; Group 10: samples from farmers treated with infusion of lemongrass 10 g/L; Group 25: samples from farmers treated with infusion of lemongrass to 25 g/L; Group 50: samples from farmers treated with infusion of lemongrass to 50g/L. Different letters represent results significantly different ($p < 0.05$).

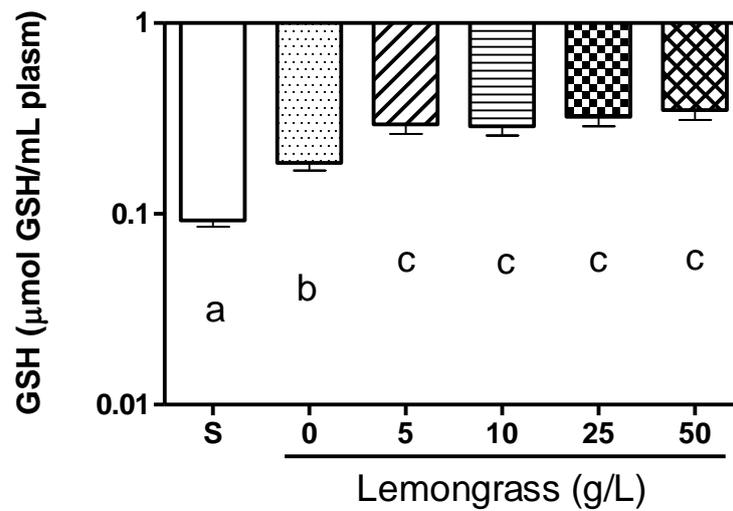


Figure 4: Levels of GSH ($\mu\text{mol GSH/mL plasm}$) in erythrocytes treated or not with infusion of lemongrass in different concentrations. Group S: samples from healthy individuals (control group); Group 0: sample from farmers untreated; Group 5: samples from farmers treated with infusion of lemongrass 5 g/L; Group 10: samples from farmers treated with infusion of lemongrass 10 g/L; Group 25: samples from farmers treated with infusion of lemongrass to 25 g/L; Group 50: samples from farmers treated with infusion of lemongrass to 50g/L. Different letters represent results significantly different ($p < 0.05$).

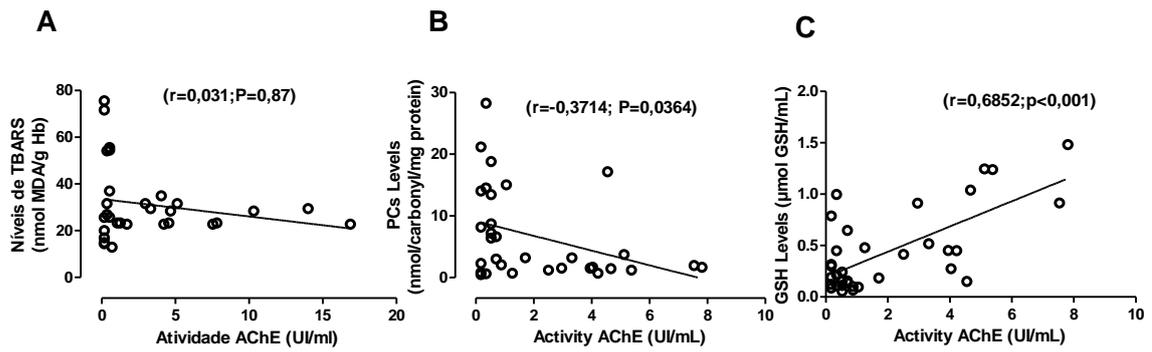


Figure 5.Correlation between the enzyme activity of AChE and TBARS (Fig 5A), PCS (Fig. 5B) and GSH (Fig. 5C) in erythrocytes in samples from healthy individuals (Control Group) and samples from farmers without treatment with the infusion of lemongrass (Group 0).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstraram que os agricultores familiares estudados estavam intoxicados por agrotóxicos que inibem as enzimas colinesterases, tendo em vista que os mesmos estavam com uma significativa inibição da atividade da BuChE e AChE. Além disso, a partir deste estudo também foi verificado que estas inibições podem ser a causa do aumento do TBARS e das proteínas carboniladas, juntamente com o estímulo da GSH. Por outro lado, cabe salientar que os marcadores frequentemente solicitados para monitorar a intoxicação por pesticidas (AST, ALT, uréia, creatinina e ácido úrico), não estavam alterados, mesmo com a situação de intoxicação dos agricultores, mostrando que as lesões hepáticas e renais podem levar um tempo maior para aparecerem, dependendo muito da dose e da frequência da exposição.

Após o tratamento destas amostras com as infusões de *Cymbopogon citratus* nas concentrações 5;10;25;50 g/L, não foi verificada a reversão da inibição da enzima AChE, nem a diminuição dos níveis de lipoperoxidação e da carbonilação proteica. Por outro lado, as infusões conseguiram aumentar os níveis de GSH, mostrando que apesar das mesmas terem concentrações baixas de fitoquímicos antioxidantes, em comparação com o extrato etanólico desta planta, estas infusões foram eficientes na estimulação do principal agente antioxidante, a GSH, que participa como substrato de muitas reações enzimáticas do sistema de defesa do organismo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, M. et al. Pesticides and oxidative stress: a review. **Med. Sci. Monit.**, v. 10, n. 6, p. RA141-147, 2004.

ADARAMOYE, O. A. et al. Evaluation of antioxidant and acetylcholinesterase-inhibitory properties of methanol extracts of *Nauclea latifolia*, *Cymbopogon citratus* and *Cocos nucifera*: an in vitro study. **BJMMR**, v. 4, n. 11, p. 2156-2170, 2014.

ADENEYE, A.; AGBAJE, E. O. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 112, n. 3, p. 440-444, 2007.

ÁKHILA, A. **Essential oil-bearing grasses: the genus *Cymbopogon***. New York: CRC Press; 2010.

AGENCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA (AGEIPEC): disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html>. Acesso em: 02 mai. 2015.

ALVIS, A; MARTÍNEZ, W.; ARRAZOLA, G. Obtención de Extractos Hidro-Alcohólicos de Limoncillo (*Cymbopogon citratus*) como Antioxidante Natural. **Inf. Tecnol.**, v. 23, n. 2, p. 3-10, 2012.

AMORIM, L.C.A. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. **Rev. bras. epidemiol.**, v.6, n.2, p.158-170, 2003.

ANAL, J.M.H. Trace and essential elements analysis in *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf samples by Graphite Furnace-Atomic Absorption Spectroscopy and its health concern. **J. Toxicol.**, v. 2014, 2014.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Rev. do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.

AUDY, J.L.N.; MOROSINI, M.C. **Inovação, Universidade e Relação com a Sociedade: boas práticas na PUCRS**. Porto Alegre: Edipucrs, 2009. 606 p.

BAGIS, S. et al. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? **Rheumatol Int.**, v. 25, n. 3, p. 188-190, 2005.

BAHIA, C. A.; GUIMARÃES, R. M.; ASMUS, C. I. R. F. Alterações nos marcadores hepáticos decorrentes da exposição ambiental a organoclorados no Brasil. **Cad. saúde colet.**, v. 22, n. 2, p. 133-141, 2014.

BALAKRISHNAN, B.; PARAMASIVAM, S.; ARULKUMAR, A. Evaluation of the lemongrass plant (*Cymbopogon citratus*) extracted in different solvents for antioxidant and antibacterial activity against human pathogens. **Asian Pac. J. Trop. Dis**, v. 4, p. 134-139, 2014.

BALLESTEROS, M. L.; WUNDERLIN, D. A.; BISTONI, M. A. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 72, p. 199-205, 2009.

BARBOSA, L. C. A. et al. Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf samples. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1864-1874, 2008.

BARBOSA, K. B. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BAR-OR, D. et al. Redox Biology Oxidative stress in severe acute illness. **Redox Biol.**, v. 4, p. 340–345, 2015.

BARREIROS, A. L. B.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v.29, n. 1, p.113-123, 2006.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. I. DNA Repair. **Elsevier**, v. 3, p.1109, 2004.

BAYRAMI, M. et al. Electroencephalogram, cognitive state, psychological disorders, clinical symptom, and oxidative stress in horticulture farmers exposed to organophosphate pesticides. **Toxicol Ind Health**, v. 28, n. 1, p. 90–96, 2012.

BEHLING, E.V. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2008.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quím. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340, 2006.

BOUKHATEM, M.N. et al. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan J. Med.**, v.19, n. 9, p.1-10, 2014.

CAMPOS, E.B.P. de; YOSHIDA, W.B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **J. Vasc. Br.**, v. 3, n. 4, p. 357-66, 2004.

CÁRDENAS, O. et al. Estudio epidemiológico de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos, 1998-2001. **Biomédica**, v. 25, n. 2, p. 170-180, 2005.

CARTER, M.D. et al. Profiling Cholinesterase Adduction A High-Throughput Prioritization Method for Organophosphate Exposure Samples. **J. Biomol. Screen.**, v.19, n.2, p. 325-330, 2014.

CECARINI, V.J.G. et al. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1773, p. 93-104, 2007.

CHEEL, J. et al. Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 7, p. 2511-7, 2005.

ČOLOVIĆ, M. B. et al. Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. **Curr. Neuropharmacol.**, v. 11, n. 3, p. 315-335, 2013.

COSTA, C. ARA et al. Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 9, p. 2268-2272, 2011a.

COSTA, C. ARA et al. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **J Ethnopharmacol**, p. 828-836, 2011b.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004

DOMINGOS, J.B; LONGHINOTTI, E; MACHADO, V.G. A Química dos Ésteres de Fosfato. **Quím. Nova**, v.27, p.745, 2003.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Rev. Physiol.**, v.82, n.1, p.47-95, 2002.

DUBEY, N. K.; TAKEDA, K.; ITOKAWA, H. Citral: a cytotoxic principle isolated from the essential oil of *Cymbopogon citratus* against P388 leukemia cells. **Curr. Sci.**, v. 73, n. 1, p. 22-4, 1997.

ETEMADI-ALEAGHA A.; AKHGARI M.; ABDOLLAHI M. A brief review on oxidative stress and cardiac diseases. **Mid. East. Pharmac.**, v. 10, p. 8–9, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Farmacopéia Brasileira**. 4. ed.. São Paulo, SP: Atheneu, 2011. 546 p.

FARIA, N.M. X.; FASSA, A. C. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Cienc. Saude Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 25-38, 2007.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**, n. 2, 2007.

FERREIRA, A. L. A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.43, p.61-68, 1997.

FIGUEIRINHA, A. et al. *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. **Food Chem.**, v. 110, n. 3, p. 718-728, 2008.

FIGUEIREDO, G. M. de; TRAPE, A. Z.; ALONZO, H. A. Exposição a múltiplos agrotóxicos e prováveis efeitos a longo prazo à saúde: estudo transversal em amostra de 370 trabalhadores rurais de Campinas (SP). **Rev. Bras. Med. Trab.**, v. 9, n. 1, p.1-9, 2011.

FIOCRUZ/CICT/SINITOX. Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Informação Científica e Tecnológica/Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Estatística Anual de Casos de Intoxicação e Envenenamento. Brasil, 2015. [acessado 2015 Mar 15]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox>

FRIDOVICH, I. et al. **Antioxidant Enzymes, Redox Biochemistry**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007.

GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radical Biol. Med.**, v.7, p.65-86, 1989.

GIADA, M. de L. R.; MANCINI-FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **Publ. UEPG. ciênc. biol. saúde**, v. 12, n. 4, 2009.

HALABI, M.F.; SHEIKH, B.Y. Anti-Proliferative Effect and Phytochemical Analysis of *Cymbopogon citratus* Extract. **Biomed. Res. Int.**, v. 2014, 2014.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3^o ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HANIFAH, A.L. et al. Acaricidal activity of *Cymbopogon citratus* and *Azadirachta indica* against house dust mites. **Asian Pac J Trop Dis.**, v. 1, n. 5, p. 365-369, 2011.

HAYES, J.D ; FLANAGAN J.U; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. **Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 51-88, 2005.

HOBBIGER, F. The inhibition of acetylcholinesterase by organophosphorus compounds and its reversal. **Proc. R. Soc. Med.**, v. 54, p. 403–405, 1961.

HODGSON, E. **A textbook of modern toxicology**. 4th edition. North Carolina: Wiley; 2010

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

IWAI, K. et al. Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, n. 9, p. 4924-4928, 1998.

JUNIOR, L.R. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím. Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

JUNIOR, C. V. et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

KOH, P.H. et al. Antioxidant Potential of *Cymbopogon Citratus* extract: Alleviation of carbon tetrachloride induced hepatic oxidative stress and toxicity. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 31, n. 1, p. 81-91, 2012.

LEE, H.J. et al. Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF- κ B activation in RAW264. 7 cells. **Arch. Pharmacol Res.**, v. 31, n. 3, p. 342-349, 2008.

LEITE, J.R. et al. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus Stapf*). 3. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. **J. Ethnopharmacol**, v.17, n.1, p.75-83, 1986.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, v. 37, n. 3, p.293-303, 2001.

LIONETTO, M G et al. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. **Biomed. Res. Int.**, v. 2013, 2013.

LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular**. 7° ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 1° ed. Rio de Janeiro: ANA E RBJA; 2011.

LUNEC, J. et al. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? **Free Radical Biol. Med.**, v. 33, n. 7, p.875-885, 2002.

MACHADO, L. P. et al. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na medicina veterinária. **Rev. port. ciênc. vet.**, v.8, n.1, p. 84-94, 2009.

MACIAG, E. G. Biological consequences of oxidative stress induced by pesticides. **Postepy hig. Med. Dosw.**, v. 65, p. 357–366, 2011.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I. et al. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Arch Latinoam Nutr**, v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000.

MARTINS E SILVA, J; SALDANHA C. **Bioquímica em medicina – Vol II – Metodologias e Programas de estudo**. Lisboa: Editora Colibri, 2010. 596 p.

MELO, D. B. de et al. Fitoterapia, por que não? **Rev. Bras. Med. Fam. Comunidade**, v.7, n.1, 2012.

MELLO, C. M. de; SILVA, L. F. Fatores associados à intoxicação por agrotóxicos: estudo transversal com trabalhadores da cafeicultura no sul de Minas Gerais. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 22, n. 4, p. 609-620, 2013.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MILATOVIC, D.; GUPTA, R. C.; ASCHNER, M. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. **Sci World J**, v. 6, p. 295-310, 2006.

MISRHA, M. et al. Diuretic studies on lemon grass tea from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf in rat. **Pakistan J. Sci. Ind. R.**, v.44, n.2, p.96-100, 2001.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup[®] causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, p. 294-299, 2010.

MORAIS, S. M. de et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Braz J Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, p. 315-320, 2009.

MOREIRA, R. C. T. et al. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farm. Bonaer**, v.21, n.3, p.1-7, 2002.

MURUSSI, C. et al. Changes in oxidative markers, endogenous antioxidants and activity of the enzyme acetylcholinesterase in farmers exposed to agricultural pesticides – a pilot study. **Ciênc. Rural**, v. 44, n. 7, p. 1186-1193, 2014.

NEGRELLE, R. R. B.; GOMES, E .C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf : chemical composition and biological activities. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.9, n.1, p.80-92, 2007.

NEGRE-SALVAYRE, A et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. **Free Radic. Res**, v. 44, p. 1125–1171, 2010.

NEVES, J. M.; CUNHA, S. Plantas Mediciniais. **Rev. Cienc. Saude**, v. 3, p. 50-57, 2006.

NIEMETZ, R. E; GROSS, G. G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. **Phytochem.**, v. 66, 2001-2011, 2005.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 31, p.1287–1312, 2001.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 3º ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 442 p.

OLIVEIRA, A. C. de et al. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. **Quím. Nova**, v. 32, n. 3, 2009.

ORDENTLICH, A. et al. Stereo selectivity toward VX is Determined by Interactions with Residues of the Acyl Pocket as well as of the Peripheral anionic site of AChE. **Biochemistry**, v.43, p. 11255, 2004.

ORUÇ, E.Ö.; USTA, D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 23, p. 48-55, 2007.

PARANAGANA, P. A. Et al. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* isolated from stored rice. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 37, n. 1, p. 86-90, 2003.

PELAEZ, V.; TERRA, F.H.B; SILVA, L.R.A. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Rev. Econ.**, v. 36, n. 1, p. 27-48, 2011.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M. das G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **J. Biotechnol. Biodivers.**, v. 3, n. 4, 2012.

PERES, F. et al. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Ciênc. saúde colet.**, v.10, p.1-11, 2005.

PIETTA, P.G. J. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v.63, p. 1035-1042, 2000.

PRIETO, C.S.L. Neurotoxicidade de pesticidas organofosforados durante o desenvolvimento: alterações bioquímicas e comportamentais. **Rio de Janeiro**, p. 103, 2013.

PROESTOS, C. et al. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Food Chem.**, v.95, p.664-671, 2006.

RANG, H.P. et al. **Drogas que Inibem a Colinesterase**. 4° ed. Guanabara Koogan, p. 110-115, 2001.

RECENA, M.C.P. et al. Pesticides exposure in Culturama, Brazil—knowledge, attitudes, and practices. **Environm. Res**, v. 102, n. 2, p. 230-236, 2006

REIS, G. et al. Avaliação do perfil oxidativo e da atividade da enzima ache em agricultores expostos a pesticidas agrícolas. In: XVII SEMINÁRIO DE PESQUISA INTERINSTITUCIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, XV MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, X MOSTRA DE EXTENSÃO, 2012, Cruz Alta. Anais... Cruz Alta, 2012. p. 1-4

RIBEIRO, S.M.R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2006.

RODRIGUES, H.G. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Rev. bras. plantas med.**, v.13, n.3, p.359, 2011.

SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYS, F.G.R. Pyrethroids: a review. **J. Bras. Patol. Med.**, v.18, n.3, p.399-349, 2007.

SELMİ, S.; EL-FAZAA, S.; GHARBI, N. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in plasma, erythrocyte and brain of rats' pups following lactational exposure to malathion. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 34, n. 3, p. 753-760, 2012.

SEMCHYSHYN, H.M. Reactive carbonyl species in vivo: generation and dual biological effects. **Sci. World J.**, v. 2014, 2014.

SIES, H. **Oxidative stress**. London: Academic, 1985. 507 p.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp. Physiol.**, v. 82, p. 291–295, 1997.

SILVA, M.L.C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, M. et al. Effect of streptozotocin on the glycemic and lipid profiles and oxidative stress in hamsters. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 55, n. 1, p. 46-53, 2011.

SILVA, F. M. da et al. Os riscos no uso indiscriminado de agrotóxicos: uma visão bibliográfica. **Intesa**, v. 9, n. 1, p. 77-86, 2015.

Simoniello M. F., Kleinsorge E.; Carballo M.A. Evaluacion bioquimica de trabajadores rural expuestos a pesticidas. **Medicin.** 2010;70:489-498.

SHAH, G. et al. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus stapf* (Lemon grass). **J. Adv. Pharm. Technol. Res.**, v. 2, n. 1, p. 3- 8, 2011.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 1102p.

SIQUEIRA, D.F. de et al. Análise da exposição de Trabalhadores rurais a agrotóxicos. **RBPS**, 26, n. 2, p.182, 2013.

SIQUEIRA, S.L. de; KRUSE, M.H. L. agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. **Rev. esc. enferm. usp** , v. 42, n. 3, p. 584-90, 2008.

SIVAPIRIYA, V.; JAYANTHISAKTHISEKARAN, J.; VENKATRAMAN, S. Effects of dimethoate (O,O-dimethyl S-methyl carbamoyl methyl phosphorodithioate) and ethanol in antioxidant status of liver and kidney of experimental mice. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.85, p. 115–121, 2006.

SOARES, M.O. et al. Angolan *Cymbopogon citratus* used for therapeutic benefits: Nutritional composition and influence of solvents in phytochemicals content and antioxidant activity of leaf extracts. **Food Chem. Toxicol.**, v. 60, p. 413-418, 2013.

SPIERS, J.G. et al. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. **Front. Neurosci.**, v. 8, p. 456, 2015.

SUCUPIRA, N.R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 14, p. 263–270, 2014.

SULAK, O. et al. Nephrotoxicity in rats induced by organophosphate insecticide methidathion and ameliorating effects of vitamins E and C. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 83, p. 21–28, 2005

SURAJUDEEN, Y.A. et al. Oxidative stress indices in Nigerian pesticide applicators and farmers occupationally exposed to organophosphate pesticides. **Int. J. Appl. Basic. Med. Res.**, v. 4, n. Suppl 1, p. S37, 2014.

TEW, K.D. et al. The Role of Glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in Cancer. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 51, n. 2, p. 299–313, 2011.

THANGAM, R. et al. Activation of intrinsic apoptotic signaling pathway in cancer cells by *Cymbopogon citratus* polysaccharide fractions. **Carbohydr Polym**, v. 107, p. 138-150, 2014.

TREVISAN, R. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses.** 2008. 70f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, n. 1, p. 41-54, 2003.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VASCONCELOS, S.M.L et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. nova**, v. 30, n. 5, p.1323-1338, 2007.

VEIGA JR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: Cura segura? **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, pp.519-528, 2005.

WAFI, T. et al. Oxidative stress, hematological and biochemical alterations in farmers exposed to pesticides. **Environ. Sci. Health B.**, v.48, n.12, p.1058-69, 2013.

WILLE, T. et al. Investigation of kinetic interactions between approved oximes and human acetylcholinesterase inhibited by pesticide carbamates. **Chem. Biol. Interact.**, v. 206, n. 3, p. 569-72, 2013.

WINSTON, G.W.; DI GIULIO, R.T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquat. Toxicol.**, v. 9, p. 137–161, 1991.

APÊNDICES

Apêndice 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Apêndice 2: Questionário Pessoal

Apêndice 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE CURSO DE FARMÁCIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE E DA RESPOSTA REDOX EM ERITRÓCITOS DE AGRICULTORES TRATADOS COM A INFUSÃO DE *Cymbopogon citratus***

A exposição diária a agrotóxicos pode causar severos danos à saúde, os danos causados dependem da concentração e natureza química que o trabalhador rural está exposto, gerando a possibilidade de causar efeitos agudos e crônicos, afetando o sistema imunológico, endócrino e nervoso. O monitoramento através do uso de biomarcadores permite uma estimativa da exposição e uma possível correlação com os efeitos tóxicos manifestados. Portanto esta pesquisa tem por objetivo, avaliar os toxicológicos da exposição aos agrotóxicos sofrida pelos trabalhadores rurais.

Ao aceitar participar desta pesquisa o participante aderirá voluntariamente, podendo a sua participação ser interrompida em qualquer etapa, sem nenhum prejuízo ou punição. Sua participação permitirá a coleta de sangue, e esta será realizada por um profissional habilitado de acordo com o protocolo e normas de biossegurança do Laboratório de Análises Clínicas da Unicruz. Eventuais desconfortos poderão ocorrer durante a coleta de sangue, como hematomas e dor local, caso ocorra serão observadas pelo responsável da coleta.

O participante deverá preencher um questionário que tem por objetivo esclarecer a que situação se encontra sua saúde, situação no trabalho, os costumes e hábitos, se já sofreu intoxicação devido à rotina de trabalho e outras questões que tem relevância e importância para a realização deste estudo.

O participante não terá nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela minha participação no projeto.

A qualquer momento, os participantes poderão solicitar informações sobre os procedimentos ou outros assuntos relacionados a este estudo, podendo entrar em contato com a coordenadora do projeto Roberta Cattaneo Horn pelo telefone (55) 96264308. Todos os cuidados serão tomados para garantir o sigilo e a confidencialidade das informações, preservando a identidade dos participantes. Haverá divulgação dos resultados da pesquisa, de forma coletiva através de comunicações científicas, para os envolvidos na pesquisa e comunidade científica.

Desde já, agradecemos sua contribuição para o desenvolvimento desta atividade de pesquisa e colocamo-nos à disposição para esclarecimentos adicionais.

Roberta Cattaneo Horn

Coordenadora do Projeto: Laboratório de Estresse Oxidativo

E-mail: rcattaneo@unicruz.edu.br

Tel.: (55) 3321 1536 / 3321-1608

Eu, _____ fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. O presente estudo utilizará amostra de mucosa oral e sangue doado por mim para a realização da pesquisa. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disto, sei que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa. Fui informado também que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Frente ao que foi acima exposto, expressei meu consentimento em relação à execução desta pesquisa, no que se refere à coleta e análise do sangue, mucosa oral e preenchimento do questionário.

_____, _____ de _____ de 2015

Assinatura do representante legal

Apêndice 2

QUESTIONÁRIO PESSOAL

OBRIGATÓRIO INFORMAR O NOME CASO QUEIRA RECEBER UM LAUDO COM O RESULTADO DOS EXAMES REALIZADOS:

Contato para entrega dos resultados:

1. Nome: _____
2. Idade (anos): _____ Data de Nascimento: ____/____/____,
Cidade Natal: _____ Cidade na qual mora: _____.
3. Sexo: () M () F 4. Grupo étnico: _____ 5. Estado civil: _____
6. Número de Filhos (as): _____
7. Emprego anterior: _____ 8. Função que exercia: _____
9. No seu emprego atual já se expôs a alguma destas substâncias? (Informe seu tempo de exposição ao lado do que marcar):
() derivados de petróleo _____ () tintas/corantes _____
() solventes _____ () agrotóxicos _____
() mercúrio/ vapores metais pesados _____
() outras substâncias químicas – quais e por quanto tempo? _____
10. Função atual: _____
11. Tempo de serviço nesta função: _____
12. No seu emprego atual já se expôs a alguma destas substâncias? (Informe seu tempo de exposição ao lado do que marcar):
() derivados de petróleo _____ () tintas/corantes _____
() solventes _____ () agrotóxicos _____
() mercúrio/ vapores metais pesados _____
() outras substâncias químicas – quais e por quanto tempo? _____
13. Tipos de agrotóxicos que trabalha:
() carbamatos;
() organofosforados;
() piretróides;
() herbicidas;

- () fungicidas;
- () organoclorados.
14. De que forma o produto é aplicado?
- () trator; () bomba manual; () avião; () outros – quais? _____
15. Meses do ano que é aplicado? _____
16. Mês(es) que é mais aplicado? _____
17. Periodicidade (todos os dias?) _____
18. Utiliza equipamentos de segurança? () Sim () Não . Se sim qual (is) _____
19. Quando foi a última vez que o produto foi aplicado? _____
20. Você come, fuma ou bebe enquanto aplica ou logo após aplicar o agrotóxico? () Sim () Não
21. Se sim, lava as mãos antes de pegar nos alimentos? () Sim () Não
22. Já fumou? () Sim () Não – se não vá para a questão 26
23. Quantos anos? _____
24. Ainda fuma?
- () Sim () Não - se não há quantos anos parou? _____
25. Se sim, quantos cigarros por dia?
- () menos de meio maço; () de meio a um maço;
- () 1-2 maços; () mais de dois maços
26. Fuma também: () cigarros de palha; () cachimbo – quantas vezes ao dia? _____
27. Medicamentos utilizados rotineiramente por você:
- () Não utilizo nenhum rotineiramente.
- () vitaminas e suplementos _____; () pílulas para pressão _____;
- () antibióticos _____; () insulina _____; () tranqüilizantes _____;
- () relaxantes musculares _____;
- () outros - Quais _____
- Com que frequência utiliza o(s) medicamento(s) marcado(s)? _____
28. Está fazendo algum tratamento? () Sim () Não - qual? _____
29. Consome bebidas alcoólicas?
- () Sim () Não Se sim, qual(is)? _____ e com que Frequência? _____
30. Ingere frutas e verduras?
- () Sim () Não Se sim, qual(is)? _____ e com que Frequência? _____
31. Ingere carnes (não só vermelhas)?
- () Sim () Não Se sim, qual(is)? _____ e com que Frequência? _____

32. Preferência das carnes: () crua; () mal passada; () bem passada; () gorda;

() magra

33. Já contraiu alguma doença como:

() câncer - Quais o(s) tipo(s)? _____

() AIDS; () diabete; () anemia; () doenças cardíacas;

() outras - Quais? _____

34. Tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou doença hereditária que afetem seus pais, irmãos, irmãs, conjugues?

() Sim () Não Se sim, quais? _____

35. Você e conjugue já tiveram dificuldades em conceber filhos (mais de doze meses) ou já foram diagnosticados estéreis?

() Sim () Não

36. Histórico de aborto espontâneo na família?

() Sim () Não Se sim, qual o grau de parentesco? _____

37. Histórico de bebês que nasceram com alguma Má Formação, na família?

() Sim () Não Se sim, qual o grau de parentesco? _____

38. Possui irmão gêmeo idêntico?

() Sim () Não

39. Possui irmão gêmeo não idêntico?

() Sim () Não

40. Casos de câncer na família?

() Sim () Não Se sim, qual o grau de parentesco? _____

41. Tipos de câncer:

() pele; () mama; () leucemia; () esôfago; () outros _____

42. Faz algum exercício físico?

() Sim () Não Se sim, com qual frequência? _____

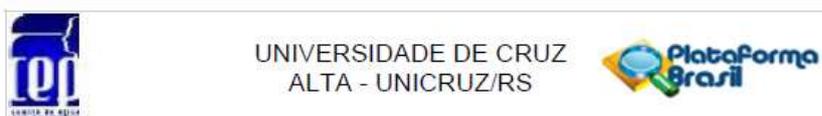
43. Ingere água tratada?

() Sim () Não

ANEXOS

ANEXO A: CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do efeito antioxidante de diferentes princípios ativos e PROJETO GUARDA CHUVA

Pesquisador: Roberta Cattaneo Hom

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 1

CAAE: 15510413.3.0000.5322

Instituição Proponente: Fundação Universidade de Cruz Alta - UNICRUZ/RS

Patrocinador Principal: Fundação Universidade de Cruz Alta - UNICRUZ/RS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 273.167

Data da Relatoria: 15/05/2013

Apresentação do Projeto:

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da GPx, CAT e SOD ou, não-enzimaticamente a exemplo de GSH, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e CoQH. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (provitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito antioxidante de diferentes princípios, a partir de testes com eritrócitos humanos ("in vitro").

As amostras de sangue são obtidas de doadores randômicos, todos os grupos constituídos de eritrócitos de um mesmo indivíduo.

Endereço: Campus Universitário Ulysses Guimarães - Rodovia Municipal Jacob Della Mèa, Km 5,6 - Caixa Postal 858
Bairro: Campus Universitário Prédio **CEP:** 98.020-290
UF: RS **Município:** CRUZ ALTA
Telefone: (55)3322-1618 **E-mail:** comitedeetica@unicruz.edu.br



UNIVERSIDADE DE CRUZ
ALTA - UNICRUZ/RS



Continuação do Parecer: 273.167

As amostra de sangue total, de 5 indivíduos voluntários que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), serão coletadas com vacutainers contendo EDTA. O procedimento experimental constará da avaliação basal com técnicas de estresse. Após, os eritrócitos serão expostos ao extrato da planta medicinal e as técnicas de estresse serão repetidas novamente.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito antioxidante de princípios ativos.

Objetivo Secundário:

Avaliação dos níveis de TBARS; Avaliação dos níveis de proteínas carboniladas; Avaliação dos níveis de GSH (glutathiona)

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Na coleta das amostras o participante pode apresentar algum hematoma da punção venosa, podendo ser necessária uma massagem local com aplicação do medicamento tópico Reparil® Gel fim de eliminar esse transtorno ao participante.

Benefícios:

Diminuição dos níveis de marcadores de estresse oxidativo no grupo tratado com os princípios ativos estudados, evidenciando o efeito antioxidante dos mesmos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo em vitro destinado a testar o efeito antioxidante de princípios ativos extraídos de plantas medicinais.

A amostra será proveniente de 5 doadores randômicos, mas não está claro no projeto se os indivíduos serão saudáveis ou expostos à fatores de risco que elevam o estresse oxidativo como a exposição aos pesticidas.

No projeto consta que na coleta das amostras o participante pode apresentar algum hematoma da punção venosa, podendo ser necessária uma massagem local com aplicação do medicamento tópico Reparil® Gel fim de eliminar esse transtorno ao participante. No entanto, o termo de consentimento sugere outra abordagem se houver hemotoma "Após a coleta pode ocorrer a formação de hematomas na região coletada e neste caso o indivíduo deve fazer compressas com água frio e/ou gelo no local acometido várias vezes por dia." Sugere-se adotar uma melhor definição do procedimento adotado se houver hematoma.

Endereço: Campus Universitário Ulysses Guimarães - Rodovia Municipal Jacob Della Méa, Km 5,6 - Caixa Postal 858
Bairro: Campus Universitário Prédio CEP: 98.020-290
UF: RS Município: CRUZ ALTA
Telefone: (55)3322-1618 E-mail: comitedeetica@unicruz.edu.br



UNIVERSIDADE DE CRUZ
ALTA - UNICRUZ/RS



Continuação do Parecer: 273.167

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Esclarecer no projeto se os indivíduos serão saudáveis ou expostos à fatores de risco que elevam o estresse oxidativo.

Definir qual procedimento será adotado se houver hematoma; aquele que consta no idem riscos do projeto ou aquele que consta no termo de consentimento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado, visto que trata-se de um estudo em vitro.

No entanto, sugere-se esclarecer no projeto se os indivíduos serão saudáveis ou expostos à fatores de risco que elevam o estresse oxidativo. Além de definir qual procedimento será adotado se houver hematoma; aquele que consta no projeto ou aquele que consta no termo de consentimento.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

Analisar as recomendações expostas pelo avaliador

CRUZ ALTA, 15 de Maio de 2013

Assinador por:
Adalberto Fernandes Falconi
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Ulysses Guimarães - Rodovia Municipal Jacob Della Mèa, Km 5,6 - Caixa Postal 858
Bairro: Campus Universitário Prédio CEP: 98.020-290
UF: RS Município: CRUZ ALTA
Telefone: (55)3322-1618 E-mail: comitedeetica@unicruz.edu.br