

Efeitos da nebulização de Malation na histopatologia do Aparelho Respiratório de ratos *Wistar*, tratados com *Atropa belladonna* L.

Autores: Beatriz de Andrade Monte Alegre¹, Ana Rosa Crisci¹

Colaboradores: João Luiz Reis de Andrade¹, Prof. Dr. Wilson Roberto Malfará¹

¹Centro Universitário Barão de Mauá

¹bia_montealegre@hotmail.com, ¹ana.crisci@baraodemaua.br

Resumo

Por meio de uma pesquisa experimental aprovada pelo Comitê de Ética Animal foram feitas análises histopatológicas do pulmão e traqueia de animais expostos a nebulização com malation e expostos à nebulização e tratado com *Atropa Belladonna*. O grupo que inalou malation e tratado com atropina apresentou o parênquima da traqueia e dos pulmões mais semelhante ao do grupo que inalou água destilada. Concluiu-se que o tratamento com atropina reduziu os efeitos tóxicos do malation.

Introdução

O malation ou mercaptotion também sinônimo classificado pelo órgão fiscalizador do meio ambiente CETESB, é o mais eficiente inseticida e herbicida, e também muito eficiente no controle do mosquito *Aedes aegypti*. Em 2018, o Brasil ocupava 7ª posição mundial no consumo de agrotóxicos por área, isso devido ao tipo de agricultura predominante no país: a de pequenos produtores, estes por sua vez, por falta de auxílio, de informação e principalmente deficiente fiscalização mantém o país com uso indiscriminado deste produto (SANTOS; FARINA, 2013). Este defensivo agrícola ainda carece de embasamento científico sobre sua eficácia contra o mosquito e poder cancerígeno, segundo nota técnica da Diretoria do Instituto Oswaldo Cruz publicada em Julho/2016 resultando também em fator que impede registro na lista de agrotóxicos e princípios ativos permitidos no Brasil.

O uso deste inseticida da família dos organofosforados é o mais eficiente por ser altamente inespecífico, o que atrai produtores principalmente pelo seu baixo custo. O produto também tem aplicação até os dias atuais, por órgãos de combate ao vetor *Aedes aegypti* na pulverização de residências (ANDRIGHETTI *et al.*, 2013). Por meio dos estudos encontrados que se constatou a sua elevada toxicidade à população e aos animais. Foi relatado por Grecco

et al. (2009) que o mecanismo inibitório da enzima acetilcolinesterase (AChE) que promove um acúmulo deste neurotransmissor que tem função a estimulação do sistema autônomo parassimpático. Este acúmulo ocorre nas fendas sinápticas responsáveis por desencadear uma resposta aguda levando o indivíduo ou o animal ao óbito em poucas horas dependendo da quantidade intoxicada.

Por outro lado, dados do Relatório Nacional Em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos do Ministério da Saúde mostraram em 2017 um aumento elevado nas ocorrências de tentativa de suicídio, foram 1.449 pessoas, sendo que em 2007 este número era de 730 casos. Ainda sobre os dados do Ministério o número de pessoas que se intoxicaram aumentou principalmente no Estado de São Paulo. Em 2017 foram notificados 817 casos e em 2015 um registro de 1.994. Tais dados aumentam ainda mais a atenção e o cuidado com estes defensivos agrícolas para as pesquisas voltadas ao estudo das intoxicações, e principalmente pela eficácia na pulverização contra o vetor da Dengue, Zika e Chikungunya segundo o que o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) preconiza como ferramenta. Assim objetivou-se investigar os efeitos do Malation no aparelho respiratório e a ação da atropina no tratamento de animais intoxicados. Extrapolando para moradores rurais e aos animais, buscar um tratamento de fácil acesso e imediato quando houver ocorrência de exposição ou ingestão almejando uma redução dos efeitos neurotóxicos e sistêmicos.

Além disso, é importante salientar o aprofundamento no estudo das plantas tóxicas, não apenas focando nos riscos causados, mas nas possibilidades terapêuticas que podem ser oferecidas com diferentes indicações, a *A. belladonna* é um exemplo destas plantas que são muito utilizadas na medicina alopática, na fitoterapia e na homeopatia.

Objetivos

Investigar os efeitos que o malation pode causar no parênquima do pulmão e da traqueia de ratos *Wistar*, e avaliar se o tratamento com atropina pode minimizar esses efeitos.

Métodos/Procedimentos

Os animais foram distribuídos em 3 grupos com 8 animais cada grupo: o grupo 1 (Controle) grupo 2 (Malation) e 3 (Tratado), segue o esquema abaixo:

G1 Controle – expostos à nebulização de água destilada; G2: Malation – expostos à nebulização com Malation a 50%; G3: Tratados – malation e *Atropa Belladonna*: expostos à nebulização com malation a 50% e tratado com o colírio Allergan® (sulfato de atropina a 1%) sublingual. Durante 21 dias os animais receberam o malation e foram tratados conforme elucidado. Durante o período experimental os animais foram pesados para um controle de consumo alimentar e hídrico. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal (CEPAN) sob o número 367/19, encontrando-se em consonância com a Lei Nacional 11.794 de 8 de outubro de 2008, decreto nº 6899 de 15 de julho de 2009 e Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

Após o período experimental os animais receberam injeção de Tiopental sódico na dose de 120mg/Kg IP. Três vezes a dosagem para a espécie alvo, visando à eutanásia. Após o sacrifício foi feita a laparotomia exploratória e a toracotomia para a coleta dos pulmões e traquéia, e posterior análise histopatológica de rotina. De acordo com Souza e Montero (2007), para cada órgão são definidos parâmetros diferentes, devido à peculiaridade de cada um. No pulmão, verificou-se a presença de infiltração leucocitária, congestão vascular e espessamento de septos interalveolares. O sistema de escore foi utilizado para graduar as lesões presentes no pulmão, baseado na presença e intensidade das alterações, foram observados cinco campos ao acaso, de cada animal, sob vários aumentos (objetivas de 4 a 400x). As lesões foram graduadas em cruzes que variavam de ausente (-), moderado (+/-) até intenso (++++), conforme sua relevância. Estes valores foram transformados em números para aplicação de testes estatísticos, da seguinte maneira: ausência = 0; +/- = 0,5; + = 1; ++ = 2; +++ = 3 e, ++++ = 4.

Os dados obtidos foram catalogados em tabela de Excel para posterior análise estatística,

através do teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.

Resultados e Discussões

O malation é um inseticida de ação imediata ao entrar em contato com a superfície do corpo dos insetos, por isso muito utilizado pela população e agentes de controle de endemias, no controle do mosquito; entretanto, mesmo os produtos industrializados podem oferecer riscos à população (COLEONE; PAGANINI, 2014). O tratamento clínico padrão para a intoxicação por organofosforados envolve a administração de atropina (antagonista dos receptores muscarínicos) e de fármacos que auxiliam na reativação da enzima AChE (SHIH *et al.*, 2007; VOS *et al.*, 2002; ČOLOVIĆ *et al.*, 2013). Devido a grande área de contato entre a superfície do sistema respiratório e o meio ambiente, a qualidade do ar interfere diretamente na saúde respiratória, provocando uma resposta inflamatória.

Os resultados da histopatologia deste experimento mostraram nas fotomicrografias da traqueia que o grupo Controle (fig. 1A) apresentou um aspecto normal, com preservação de epitélio e de tecido subjacente (conjuntivo). No grupo Malation (fig. 1D), a traqueia apresentou um epitélio com alterações nos cílios e até mesmo a falta acentuada deles. No grupo tratado com atropina (fig. 1G), a traqueia apresentou um epitélio com aspecto normal assemelhando-se com o grupo controle. Esses resultados agregam ao que Paschoal *et al.* (2016) afirmam que há inflamação e degeneração ao epitélio respiratório podendo acarretar distúrbios do transporte mucociliar, provocado pela inalação de gases tóxicos.

Nas fotomicrografias do pulmão observou-se no grupo controle (fig 1 B e 1C), que o parênquima pulmonar apresentou-se totalmente preservado, septos interalveolares normais (seta preta), luz alveolar. Entretanto, no grupo Malation (fig. 1E) o parênquima pulmonar mostrou-se desorganizado apresentando uma congestão pulmonar (seta branca) e um espessamento de septos alveolares devido à congestão vascular (seta preta); no grupo tratado com atropina o parênquima pulmonar apresentou-se mais preservado, septos alveolares e luz alveolar normais.

Figura 1 - Fotomicrografias das secções da traquéia e pulmão. Em A, B e C grupo Controle; Em D, E e F grupo que inalou Malation; Em G, H e I grupo que inalou malation e tratado com *Atropa Belladonna*.

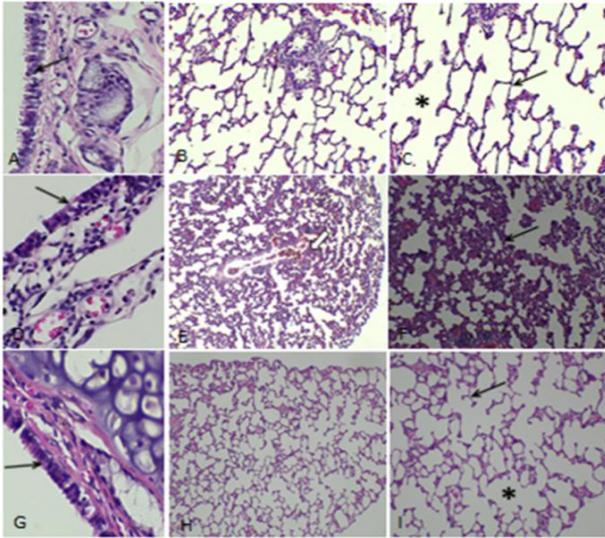


Gráfico 1 – Infiltrado Leucocitário

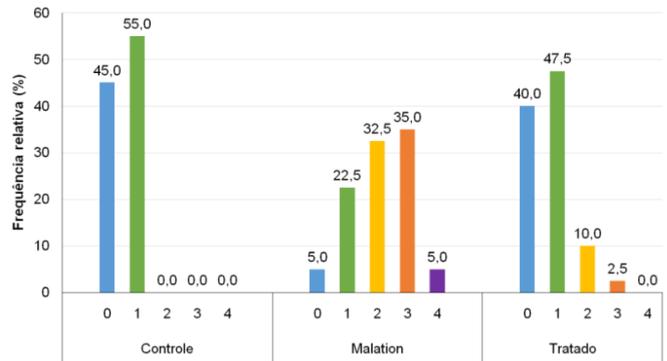
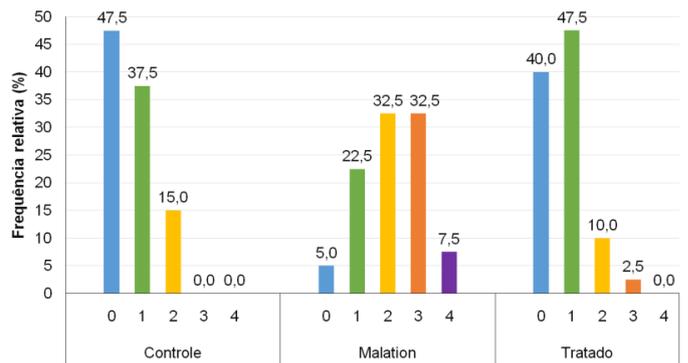


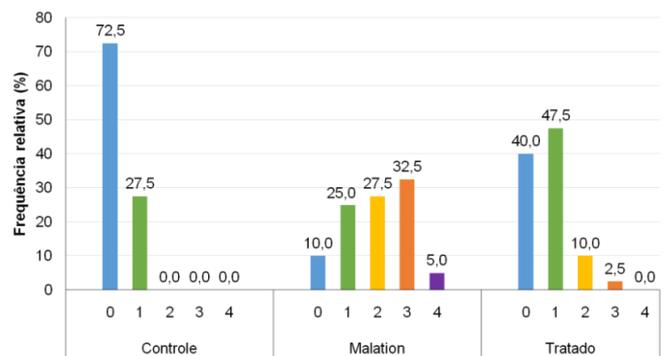
Gráfico 2 – Congestão Vascular



Com os dados obtidos pelos tipos de lesões que foram encontradas e principalmente os escores observados em cada grupo, foi possível calcular a significância, quantificar em porcentagem e delimitar três gráficos que apresentaram os seguintes resultados: para o infiltrado leucocitário, o grupo Controle comparado com Malation foi significativo ($p < 0,0001$) bem como Malation comparado com tratado foi significativo ($p < 0,0001$) mas, grupo controle e tratado não foi significativo ($p > 0,9999$). Conforme mostrado no gráfico 1, o grupo Malation apresentou 5% da intensidade máxima de células observadas do infiltrado leucocitário, sendo ausente no grupo tratado. Para os escores de congestão vascularos grupos controle e Malation, como também Malation e tratados apresentaram significância ($p < 0,0001$), porém o grupo controle comparado ao tratado não foi significativo ($p > 0,9999$). Os valores para o espessamento dos septos interalveolares, os grupos controle e Malation; e Malation comparado ao tratado foram significantes ($p < 0,0001$) mas não foi significante em controle e tratado ($p = 0,387$).

É possível comprovamos nos gráficos a confirmação de congestão vascular, descrita em cães e gatos no estudo de Melo *et al.* (2002) e do espessamento dos septos interalveolares. No gráfico 2, o grupo Malation apresentou 7,5% de intensidade máxima da congestão o que não ocorreu nos outros grupos. Ainda, o mesmo grupo dos animais que foram intoxicados apresentaram 5% de espessamento interalveolar, não observado no grupo tratado, mostrando um resultado eficaz com o colírio de atropina sublingual. Não houve uma supressão das lesões de graus mais brandos no grupo controle, devido ao estresse

Gráfico 3 – Espessamento Interalveolar



causado pela manipulação das ratas durante o experimento, e pelo comportamento intrínseco do sexo da espécie.

Conforme Melo *et al.* (2002) descreveram, os animais apresentaram broncoconstrição, e posteriormente hipotensão observada pelos episódios de pré-síncope durante a inalação do organofosforado. Esse sinal foi detectado quando uma das ratas se encontrava abruptamente paralisada apresentando um padrão de respiração abdominal caracterizando dispnéia e olhos fechados. Também foi relatado que em gatos que utilizaram coleiras antipulgas impregnadas com organofosforados apresentaram os mesmos sinais do efeito anticolinesterásico deste composto, o que não foi notado em cães, por apresentarem uma maior resistência aos organofosforados. Ainda houveram outros sinais descritos em King *et al.* (2015) como a inquietação severa também constatada.

Em contrapartida aos malefícios da intoxicação em animais, existe ainda uma segunda problemática que são os resíduos no solo, alimentos ou mesmo objetos devido à pulverização do Malation no controle do vetor causador da dengue. Estes resíduos podem ou não sofrer a degradação pelo solo a partir de volatilização ou reações químicas (SOCCOL *et al.*, 1995) o que pode levar a uma contaminação de alimentos.

Cabe ressaltar ainda mais a importância de remanejar os protocolos para essa situação devido à resistência do mosquito pela seleção como demonstra Loredó, Valle e Mesquita (2017) em que o próprio homem faz ao pulverizar pesticidas com frequência. Sendo assim, o Malation carece da pesquisa para elucidar todos os seus efeitos e consequências à população, aos animais e principalmente ao meio ambiente, são necessários tratamentos e antídotos de fácil acesso para os casos de intoxicação.

Conclusão

Concluiu-se que a exposição ao Malation durante o período estipulado e nas doses padronizadas causou alterações na histopatologia dos pulmões e traqueia e que o tratamento com *Atropa belladonna* L. minimizou os efeitos histopatológicos causados pelo Malation.

As alterações que o grupo Malation apresentou sugerem uma necessidade de maiores estudos sobre seus efeitos tendo em vista que, esse pesticida teve sua implantação em 2012 no Brasil, ainda mantém-se como medida de controle do *A. aegypti* nos casos endêmicos da dengue até nos

dias hoje juntamente a outros cinco pesticidas (Lambdacialotrina, Deltrametrina, Malation e Transcifenotrina) segundo o Ministério da Saúde

Referências

- SANTOS, Alessandra Antunes dos; FARINA, Marcelo. **Avaliação dos efeitos tóxicos induzidos por malation e malaoxon e a possível proteção por oximas**. 2013. 118 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/123030/321928.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 13 mar. 2019.
- ANDRIGHETTI, Maria T. M. *et al.* Avaliação do efeito do inseticida malathion aplicado sob a forma de ultra baixo volume com equipamentos portátil e pesado sobre *Aedes aegypti*: (DIPTERA: CULICIDAE). **Revista de Patologia Tropical**, [Campinas], v. 42, n. 1, p.81-95, 26 jan. 2013.
- GRECCO, Fabiane Borelli et al. Intoxicação por organofosforados em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Pelotas, v. 29, n. 3, p.211-214, mar. 2009. Mensal. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2009000300004>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000300004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 13 mar. 2019.
- RELATÓRIO NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DE POPULAÇÕES EXPOSTAS A AGROTÓXICOS. **Ministério da saúde**, 2018. Disponível em: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_agrototoxicos.pdf. Acesso em: 17, mar, 2019.
- SOUZA, Maria Aperecida Galhardo de; MONTERO, Edna Frasson de Souza. **Avaliação morfológica e imunohistoquímica tardia do fígado e do pulmão após lesão de isquemia e reperfusão hepática seletiva com modulação pelo condicionamento isquêmico ou pela n-acetilcisteína**. 2007. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Cirúrgica interdisciplinar, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <http://repositorio.unifesp.br/bitstream/handle/11600/23633/Publico-23633.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 12 fev. 2019.

COLEONE, Ana Carla; PAGANINI, Wanderley da Silva. **Avaliação da dissipação do inseticida malation utilizado em nebulização a ultrabaixo volume no controle da dengue: avaliação ecotoxicológica e de risco ambiental.** 2014. 152 f. Tese (Doutorado) - Curso de Saúde Ambiental, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/002488943>. Acesso em: 12 fev. 2019.

SHIH, Tsung-ming *et al.* Anticonvulsants for nerve agent-induced seizures: The influence of the therapeutic dose of atropine. **The Pharmacology And Experimental Therapeutics**, Maryland, v. 320, n. 1, p.154-161, 29 jul. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17015638>. Acesso em: 13 fev. 2019.

VOS, E.m.a.w *et al.* Poisoning with organophosphate compounds. **Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde**, Amersfoort, Holanda, v. 46, n. 1, p.34-37, 05 jan. 2002. Disponível em: <https://www.ntvg.nl/artikelen/intoxicatie-met-organofosforverbindingen/artikelinfo>. Acesso em: 18 mar. 2019.

ČOLOVIĆ, Mirjana B *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, Belgrado, Sérvia, v. 11, n. 3, p.315-355, nov. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648782/>. Acesso em: 18 mar. 2019.

PASCHOAL, Ilma Aparecida *et al.* Fisiopatogenia (e Imunologia) da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). **Pneumologia Paulista**, Campinas, v. 29, n. 3, p.7-13, out. 2016. Disponível em: <http://pneumologiapaulista.org.br/wp-content/uploads/2016/11/PP311016.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2019.

MELO, Marília Martins *et al.* Intoxicações causadas por pesticidas em cães e gatos. Parte I: Organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do Crmv-sp**, São Paulo, v. 5, n. 2, p.188-195, 1 jul. 2002. Revista de Educacao Continuada em Medicina Veterinaria e Zootecnia do CRMV-SP. <http://dx.doi.org/10.36440/recmvz.v5i2.3273>. Disponível em: <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/3273>. Acesso em: 20 ago. 2019.

KING, Andrew M. *et al.* Organophosphate and Carbamate Poisoning. **Emergency Medicine Clinics Of North America**, Detroit, v. 33, n. 1, p.133-151, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.emc.2014.09.010>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25455666>. Acesso em: 20 fev. 2020.

SOCCOL, Carlos Ricardo *et al.* Degradação Microbiológica de pesticidas no solo: Revisão Bibliográfica. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 5, p.1-18, 1995. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/39357>. Acesso em: 20 fev. 2020.

LOREDO, Priscila Viana Medeiros; VALLE, Denise; MESQUITA, Rafael Dias. **Avaliação do efeito da seleção de populações de campo de Aedes aegypti Linnaeus (1762) com o inseticida organofosforado malathion.** 2017. 206 f. Monografia (Especialização) - Curso de Biologia Parasitária, Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25678>. Acesso em: 20 fev. 2020.

NOTA TÉCNICA Nº:4/2016/IOC-FIOCRUZ/DIRETORIA. **Instituto Oswaldo Cruz**, 2016. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/media/NT04_2016_IOC_inseticida_aviao_dv_rlo_ppublicacao.pdf. Acesso em: 17, mar, 2020.

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA DENGUE. **Ministério da saúde**, 2002. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pncd_2002.pdf. Acesso em: 17, mar, 2020.