



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

**Wanessa Botelho Marques Cabral**

**ANÁLISE DA GENOTOXIDADE *IN VIVO* DOS  
AGROTÓXICOS CIROMAZINA E MANCOZEB EM  
BAIXAS DOSES**

**Vitória de Santo Antão**

**2014**

**Wanessa Botelho Marques Cabral**

**ANÁLISE DA GENOTOXIDADE *IN VIVO* DOS  
AGROTÓXICOS CIROMAZINA E MANCOZEB EM  
BAIXAS DOSES**

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

Área de Concentração: Saúde e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas

**Vitória de Santo Antão**

**2014**

Catálogo na Fonte  
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.  
Bibliotecária Ana Lígia Feliciano dos Santos, CRB4: 2005

C117a Cabral, Wanessa Botelho Marques.

Análise da genotoxicidade in vivo dos agrotóxicos ctiromazina e mancozeb em baixas doses. / Wanessa Botelho Marques Cabral. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2014.

xxiii, 76 folhas; il., tab., graf.

Orientador: Cristiano Aparecido Chagas.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Toxinologia genética. 2. Agrotóxicos. 3. Saúde pública. I. Chagas, Cristiano Aparecido (Orientador). II. Título.

363.7384 CDD (23.ed.)

**BIBCAV/UFPE-009/2014**



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

---



Dissertação de Mestrado apresentada por **Wanessa Botelho Marques Cabral** à Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título **"Análise Da Genotoxicidade In Vivo Dos Agrotóxicos Ciromazina E Maconzeb Em Baixas Doses"**, orientada pelo Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas, aprovada no dia 22 de janeiro de 2014 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

---

**Dr.<sup>a</sup> Ana Cristina Lauer Garcia**  
Núcleo de Biologia/CAV-UFPE

---

**Dr. André Maurício Melo Santos**  
Núcleo de Biologia/CAV-UFPE

---

**Dr.<sup>a</sup> Katharine Raquel Pereira dos Santos**  
Núcleo de Biologia/CAV-UFPE

Autor

---

**Wanessa Botelho Marques Cabral**

Dedico esta vitória ao grande e maravilhoso Deus,  
e a todos que amo. E em especial a minha querida  
e amada vizinha Maria José (*in memória*).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao todo poderoso e amado Deus, pois durante todos os momentos desta minha linda caminhada sei que Ele esteve sendo minha grande rocha, meu refúgio, me encorajando e me dando forças para continuar onde parecia ser impossível aos olhos humanos. Eu creio no Deus do impossível, tu és sempre fiel nas tuas promessas meu Senhor. Só tenho à agradecer por TUDO!

A todos os familiares que estiveram comigo nesta jornada. Em especial aos meus queridos e amados pais, Edwiges Botelho (minha gordinha) e Adauto Marques (meu gordinho) por todo amor incondicional, dedicação, cuidado e carinho. Vocês são meu porto seguro, sem vocês eu não chegaria a lugar algum!

A minha querida tia-mãe, a famosa Tia Penha, por todo carinho, palavras, incentivos, compreensão em meus momentos de aperreio e stress. Meu grande exemplo de pesquisadora, pois diariamente me ensina a arte do amor e do perdão. Muito obrigada Titia!! Quando crescer quero ser igual à senhora.

Ao meu noivo Lairson Alencar por toda dedicação, amor, paciência e compreensão. Com você ao meu lado as coisas difíceis se tornaram mais fáceis. Te Amo meu Amor!!! Esta vitória é nossa!!!

A tia Cris, por me encorajar com as suas sábias palavras, sua alegria, seu sorriso, e por me abençoar com as suas orações. Muito obrigada tia de coração!

A todos os meus amigos de perto, em especial a: Tatiane Lobo por diariamente se dispor a me ajudar e me encorajar a prosseguir, sem você ao meu lado não teria conseguido forças todas as manhãs, Muito obrigada Amoriga!!! A Juliana Arandas por estar sempre ao meu lado sendo uma grande amiga, e por sempre me ajuda a driblar as dificuldades. Ao meu amigo Rudson que com o seu enorme coração bondoso me ajudou em momentos de aflições, aos amigos do PR pelas orações, incentivos e carinho, e aos meus amigos André Pedrosa, Isabely Barbosa e Paloma Silva pela acolhida e amizade, vou sentir saudades das nossas conversas científicas das madrugadas. E a todos os amigos de longe em especial: Rosali Bandeira, Martinho Machado, Maralã Rocha, Cássia Melo, Marcelo Colombo que me encorajou com suas sábias palavras: “Deus dar um jeito para dar certo no final” que mesmo com a distância geográfica sempre me deram a mão e me ajudaram a prosseguir nessa batalha juntos. E até mesmo aqueles que não estão citados aqui, saibam que sem vocês eu não teria conseguido.

Ao programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente (PPGSHMA), por reunir excelentes mestres, que contribuíram para a minha formação profissional. Assim como a minha turma do mestrado, na qual pude conhecer pessoas que me ajudaram a crescer pessoal e profissionalmente, partilhando ensinamentos os quais não irei esquecer. E em especial, gostaria de agradecer ao meu amigo Amaro Alexandre pelas batalhas e alegrias partilhadas. E as funcionárias Adalva e a Ana, por sempre me ajudar, pelo seu carinho e prazer no fazer o melhor para o PPGSHMA. Muito obrigada!!!

A todos que fazem parte da grande família do Laboratório de Biotecnologia e Fármacos do CAV, onde desenvolvi a maior parte dos meus experimentos. Vocês que por muitas vezes carregaram comigo as alegrias e stress de partilharmos do mesmo laboratório. Em especial gostaria de agradecer ao técnico Rafael por sempre estender sua mão amiga em diversos momentos, e ao professor Francisco Amanajás, por toda compreensão, incentivo e ajuda técnica dada para o andamento da minha pesquisa.

A todos que compõem o Laboratório de Genética do CAV, por terem me acolhido e me fornecerem a parte da microscopia de fluorescência utilizada nas análises do presente estudo. A professora Dra. Claudia Rohde, por se mostrar disponível em me ajudar. E especialmente gostaria de agradecer a professora Dra. Ana Lauer Garcia, por me ensinar a dar os primeiros passos na pesquisa, pelos seus grandes ensinamentos, suas sábias palavras amigas e por seu incentivo que me encorajaram para que independente de onde eu esteja seguir o meu coração.

Ao meu Orientador Dr. Cristiano Aparecido Chagas, pela paciência, compreensão, ensinamento, acolhimento e confiança. Por estar sempre disposto a me escutar e partilhar comigo dos mais diversos momentos que passei ao longo da execução deste projeto.

A todos aqueles que têm o prazer em compor o nosso maravilhoso grupo de pesquisa GENOTOX. Em especial: Alyson, Charles, Hugo, Sídney, e Soraya por partilharmos inúmeras experiências científicas e de vida. Que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada por vocês fazerem parte de mais esta conquista!

Aos camundongos utilizados para a execução experimental desse estudo, os quais se tornaram verdadeiros companheiros ao longo de toda esta jornada de trabalho.

Ao professor Dr. André Santos pelas sugestões nas análises estatísticas.

A Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido para a realização deste estudo.

## SUMÁRIO

<b><u>LISTA DE FIGURAS</u></b>	lx
<b><u>LISTA DE TABELAS</u></b>	X
<b><u>LISTA DE ABREVIATURAS</u></b>	Xi
<b><u>RESUMO</u></b>	xiii
<b><u>ABSTRACT</u></b>	xv
<b><u>CAPÍTULO 1</u></b>	1
<b><u>1.1 Introdução</u></b>	1
<b><u>1.2 Objetivos</u></b>	4
<u>1.2.1 Objetivo Geral</u>	4
<u>1.2.2. Objetivos Específicos</u>	4
<b><u>1.3 Revisão da Literatura</u></b>	5
<u>1.3.1 História dos Agrotóxicos no Brasil</u>	5
<u>1.3.2 Definição, Composição e Classificação dos Agrotóxicos</u>	9
<u>1.3.3 Genotoxicidade Ambiental</u>	18
<u>1.3.4 Teste do Micronúcleo</u>	20
<u>1.3.5 Ensaio Cometa</u>	23
<u>1.3.6 Estudos sobre o Agrotóxico Ciromazina</u>	25
<u>1.3.7 Estudos sobre o Agrotóxico Mancozeb</u>	26
<b><u>CAPÍTULO 2</u></b>	29
<b><u>ANÁLISE DA GENOTOXIDADE AGUDA <i>IN VIVO</i> DO PESTICIDA CIROMAZINA EM BAIXAS DOSES</u></b>	
<b><u>2.1. Resumo</u></b>	30
<b><u>2.2 Introdução</u></b>	32
<b><u>2.3 Material e Métodos</u></b>	35
<u>2.3.1 Animais em tratamento</u>	35
<u>2.3.2 Delineamento Experimental</u>	35
<u>2.3.3 Teste do Micronúcleo</u>	37
<u>2.3.4 Ensaio Cometa</u>	38
<u>2.3.5 Análise estatística</u>	39
<b><u>2.4 Resultados</u></b>	40
<b><u>2.5 Discussão</u></b>	41
<b><u>2.6 Agradecimento</u></b>	44

<b><u>2.7 Referências Bibliográficas</u></b>	45
<b><u>CAPÍTULO 3</u></b>	48
<b><u>ANÁLISE DA GENOTOXIDADE AGUDA IN VIVO DO PESTICIDA MANCOZEB EM BAIXAS DOSES</u></b>	
<b><u>3.1. Resumo</u></b>	49
<b><u>3.2 Introdução</u></b>	50
<b><u>3.3 Material e Métodos</u></b>	52
<u>3.3.1 Animais em tratamento</u>	52
<u>3.3.2 Delineamento Experimental</u>	52
<u>3.3.3 Teste do Micronúcleo</u>	53
<u>3.3.4 Ensaio Cometa</u>	54
<u>3.3.5 Análise estatística</u>	55
<b><u>3.4 Resultados</u></b>	56
<b><u>3.5 Discussão</u></b>	57
<b><u>3.6 Agradecimento</u></b>	59
<b><u>3.7 Referências Bibliográficas</u></b>	59
<b><u>CONCLUSÃO</u></b>	63
<b><u>REFERÊNCIAS</u></b>	64
<b><u>ANEXOS</u></b>	xvi

## LISTA DE FIGURAS

- [Figura 1](#) Rachel Carson, ano de 1962. (Foto original de Marco, Hollingworth & Durhan, com permissão do Rachel Carson Council Inc.) Capa do bestseller Silent Spring. (Original de R.M. Moura) 2
- [Figura 2](#) População sendo pulverizada pelo DDT, como medida de prevenir doenças. Imagem disponível na internet: [http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g28\\_ddt/historia\\_ficheiros/image001.jpg](http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g28_ddt/historia_ficheiros/image001.jpg) 7
- [Figura 3](#) Crescimento da importação anual dos agrotóxicos no Brasil desde o ano de 2005 até o ano de 2012, segundo dados da ABIFINA. 8
- [Figura 4](#) Classificação toxicologica de acordo a legislação brasileira que segue o padrão de faixas coloridas (vermelha, amarela, azul e verde) impressas nos rótulos das embalagens dos defensivos agrícolas. 12
- [Figura 5](#) Formação do micronúcleo pelos efeitos: A clastogênico e em B Aneugênico. Figura adaptada retirada da internet:<http://www.uab.es/lmatge/242/472/micronuclisim.jpg> 21
- [Figura 6](#) Três diferentes tipos de células utilizadas para estudo do micronúcleo. A seta aponta a presença do MN nas seguintes células: A - Reticulócitos Micronucleado; B - Hemácias micronucleada; C - Linfócito micronucleado que foi retirado de Zalancaín L. et al., 2005. 22
- [Figura 7](#) Classificação visual dos nucleóides baseada no comprimento e quantidade de DNA na cauda dos cometas. O dano classificado como 0 mostra a ausência da quebra do DNA, ou seja, a célula é classificada como normal. Nas demais classificações ocorre fragmentação do DNA. Imagens de nucleóides gerados a partir de leucócitos, corados por GelRed™ em microscopia fluorescente. 24
- [Figura 8](#) Fórmula estrutural da Ciromazina 26
- [Figura 9](#) Fórmula estrutural dos carbonatos e ditiocarbonatos. Em A, sendo evidenciados os átomos de oxigênio que compõem a sua molécula dos carbonatos. E em B, os átomos de enxofre que compõem os ditiocarbonatos. 27

**LISTA DE TABELAS**

<a href="#">Tabela 1</a>	Principais Alvos de atuação dos Agrotóxicos	10
<a href="#">Tabela 2</a>	Classificação toxicológica ambiental, ou também chamada de periculosidade ambiental dos agrotóxicos.	13
<a href="#">Tabela 3</a>	Principais grupos químicos dos agrotóxicos, assim como as principais características conferidas a estes grupos.	13
<a href="#">Tabela 2.1</a>	Resultados dos testes de genotoxicidade pelo teste do micronúcleo e ensaio cometa.	40
<a href="#">Tabela 3.1</a>	Resultados dos testes de genotoxicidade pelo teste do micronúcleo e ensaio cometa.	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABIFINA	Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades
AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
ANOVA	Análise de Variância (Do inglês “Analysis of Variance ”)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C1	Grupo Concentração C1
C2	Grupo Concentração C2
C3	Grupo Concentração C3
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CIROMAZINA	N-cyclopropyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine
CN	Grupo Controle negativo
CP	Grupo Controle Positivo
CS2	Dissulfeto de carbono págiPna x20 ajustar
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DIDT	Etileno bisitiouram dissulfeto
DMDC	Dimetilditiocarbomatos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirronucleico
EBDC	Etileno-bis-ditiocarbamatos
EDA	Etileno diamina
EDI	Etileno diisocianato
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (Do inglês “Ethylenediamine tetra-acetic acid”)
EFSA	(Do inglês “European Food Safety Authority”)
EPA	Agência Ambiental dos Estados Unidos
ETU	Etilenotiouréia
EU	Etilenouréia
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura (Do ingles: Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FD	Frequência de dano
H2S	Sulfeto de hidrogênio

IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ID	Índice de dano
IDA	Índice de Dieta Aceitável
MELAMINA	1,3,5 -triazina- 2,4,6-triamina
MN	Micronúcleo pagina 34
MRL	Limite Máximo de Resíduo (Do inglês “Maximum Residue Limit”)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PARA	Programa de Análise de Resíduos Agrotóxicos em Alimentos
PCE	Eritrócitos policromáticos
PND	Plano Nacional de Desenvolvimento
PPA	Potencial de Periculosidade Ambiental
RNA	Ácido ribonucleico
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SUCEN	Superintendência de Controle de endemias
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
UE	União Europeia

## RESUMO

Os agrotóxicos são largamente utilizados no mundo para proteger as plantações contra pragas e doenças, e na saúde pública no controle de vetores que causam doenças ao homem. Contudo, a exposição a esses produtos pode representar graves riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Relatos da literatura sobre ação genotóxica das formulações comerciais isoladas de agrotóxicos é bastante escassa, uma vez que a maioria das pesquisas se preocupa em estudar o efeito das misturas desses compostos. Desta forma, o presente trabalho realizou um biomonitoramento *in vivo*, utilizando camundongos *Mus musculus*, para avaliar a ação genotóxica aguda, através da ingestão isolada dos agrotóxicos Ciromazina (Trigard 700 WP) e Maconzeb (Dithame NT) em baixas doses. Foram realizados os testes do micronúcleo e do ensaio cometa, para avaliar respectivamente a mutagenicidade e a genotoxicidade desses pesticidas. Sendo utilizados 80 camundongos, divididos em oito grupos contendo 10 animais (cinco machos e cinco fêmeas). As administrações foram feitas por gavagem e cada animal recebeu 1 mL da solução, de acordo com o grupo a que pertencia: o grupo controle negativo recebeu apenas o veículo de diluição (água destilada); para a Ciromazina foram usados três grupos experimentais: C1 com a concentração de  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mg/Kg, o C2 com a concentração de  $5 \cdot 10^{-4}$  mg/Kg, e C3 com a concentração de  $5 \cdot 10^{-3}$  mg/Kg; para o Mancozeb foram usados também três grupos experimentais: C1 com a concentração de  $3,76 \cdot 10^{-4}$  mg/Kg, C2 com a concentração de  $7,52 \cdot 10^{-4}$  mg/Kg, e C3 com a concentração de  $7,52 \cdot 10^{-3}$  mg/Kg; para o grupo controle positivo foi administrado via injeção intraperitoneal 20 mg/kg p.c. de ciclofosfamida. Na análise estatística, foram realizados dois testes: uma ANOVA multifatorial (Análise de variância), para comparar a ação genotóxica entre os grupos experimentais; e o teste de Mann-Whitney para verificar a influência do sexo no aparecimento do dano genético dentro de um mesmo grupo tratado. O agrotóxico Ciromazina demonstrou ser mutagênico e altamente genotóxico na concentração do grupo C2, além de apresentar uma diferença significativa entre os sexos no grupo C1. Já o pesticida Mancozeb mostrou ser genotóxico na concentração do grupo C2, e foi constatado também que houve diferença significativa entre os sexos dos indivíduos do grupo C3. Através desta pesquisa evidenciamos que mesmo em baixas concentrações estes pesticidas oferecem grandes riscos à saúde humana e ao meio ambiente.

**Palavras-Chave:** Trigard 700 WP, Dithame NP, Mutagenicidade, Micronúcleo e Ensaio Cometa

## ABSTRACT

Pesticides are widely used worldwide to protect crops against pests and diseases, and public health vector control that cause diseases to humans. However, exposure to these products can pose serious risks to human health and the environment. Literature reports on genotoxicity of isolated commercial formulations of pesticides is quite scarce, since most research is concerned with studying the effect of mixtures of these compounds. Thus, this study conducted a biomonitoring in vivo using mice *Mus musculus*, to evaluate the acute genotoxicity through isolated ingestion of pesticides Cyromazin (Trigard WP 700) and Mancozeb (Dithame NT) at low doses. The micronucleus test and the comet assay were performed to evaluate respectively mutagenicity and genotoxicity of these pesticides. Being used 80 mice were divided into eight groups of 10 animals (five males and five females). Administrations were made by gavage and each animal received 1 mL of the solution, according to the group to which he belonged:; negative control group received only the vehicle dilution (distilled water) for Cyromazin three experimental groups were used: C1 with , the concentration of  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mg / kg, C2 with the concentration of  $5 \cdot 10^{-4}$  mg / kg, and C3 with a concentration of  $5 \cdot 10^{-3}$  mg / kg for the three experimental groups Mancozeb were also used with C1 the concentration of  $3,76 \cdot 10^{-4}$  mg / kg, with a concentration of C2  $7,52 \cdot 10^{-4}$  mg / kg, and C3 at the concentration of  $7,52 \cdot 10^{-3}$  mg / kg and for the positive control group were administered via injection intraperitoneal 20 mg / kg bw cyclophosphamide. In the statistical analysis, two tests were performed: a multifactor ANOVA (analysis of variance) to compare the genotoxicity between experimental groups, and the Mann-Whitney test to check the influence of sex on the onset of genetic damage within a group treated. The Cyromazin pesticides proved to be highly mutagenic and genotoxic in the concentration of C2 group, besides presenting a significant difference between the sexes in C1. Have the pesticide Mancozeb was found to be genotoxic in the concentration of C2 group, and was also found that there was significant difference between the sexes of individuals of the C3 group. Through this research we showed that even at low concentrations of these pesticides offer great risks to human health and the environment.

**Keywords:** Trigard 700 WP, Dithame NT, Mutagenicity, Micronucleus and Comet Assay

*“Onde os pesticidas se encaixam no quadro da doença ambiental?  
Já vimos que agora eles contaminam o solo, a água e os alimentos,  
que eles têm o poder de tornar nossos rios sem peixes e nossos jardins  
e bosques silenciosos e sem pássaros. O ser humano, por mais que  
finja o contrário, é parte da natureza. Será que ele conseguirá  
escapar de uma poluição que agora está tão amplamente disseminada  
por nosso mundo?”*

**Raquel Carson**

# CAPÍTULO 1

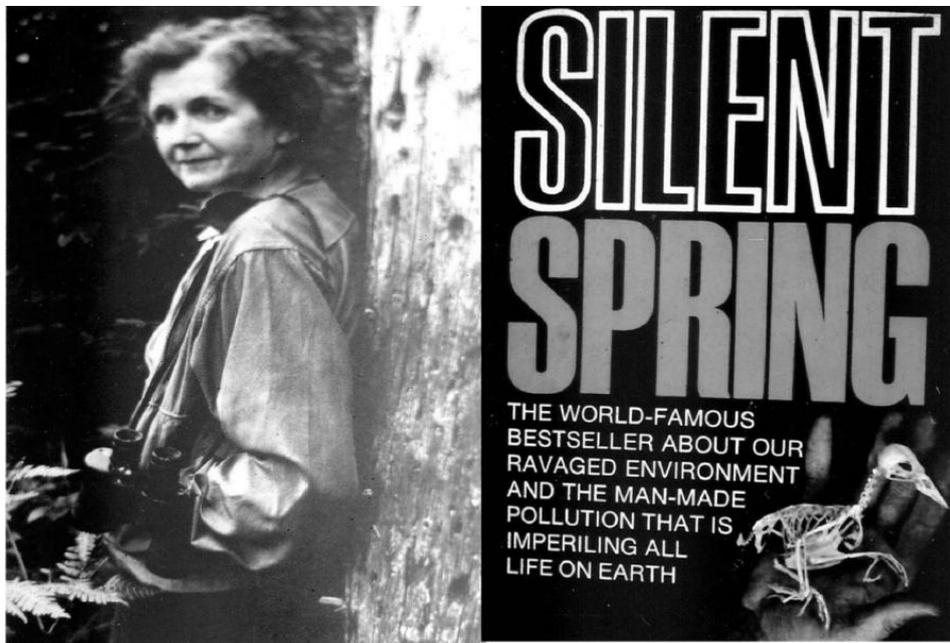
## 1.1 Introdução

O uso do termo “Agrotóxico” é bastante abrangente, tal como sua utilização no Brasil que foi iniciada em 1943. Nessa época, chegaram as primeiras amostras do inseticida DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), que foi usado para prevenir e evitar a irradiação de diversas doenças, como a malária, febre amarela, doença do sono, tifo, oncocercose e muitas outras doenças transmitidas por vetores (SPADOTTO, 2007).

Desde então, os pesticidas têm sido, uma excelente alternativa principalmente para o desenvolvimento das nações em seus esforços para erradicar as doenças endêmicas transmitidas por insetos, para aumentar o rendimento e a qualidade da produção de alimentos para a agricultura e para proteger as florestas, plantações e fibras (SOLOMON et al.,2010). Embora o seu uso ofereça uma gama de vantagens na economia, na agricultura e no combate a alguns vetores de doenças, não se pode negligenciar os riscos dos praguicidas para a saúde e para o meio ambiente, como descrita pela primeira vez por Rachel L. Carson, em seu livro Primavera Silênciosa (Silent Spring) em 1962 (Figura 1) (MOURA, 2008).

Dentre seus vários estudos Rachel Carson elucidou pela primeira vez o perigo no uso do DDT, inseticida largamente utilizado pela população daquela época, e outros produtos químicos utilizados como pesticidas. O mais alarmante não era apenas a toxicidade, mas também sua capacidade de persistir em organismos através da acumulação nos tecidos adiposos. Carson relata em seu livro Silent Spring que ao estudar a estrutura organizacional de uma região agrícola dos Estados Unidos da América (EUA), observou a danosa ação dos pesticidas ao homem e ao meio ambiente. Ela observou que em uma área pulverizada com DDT para acabar com uma invasão de uma espécie de besouros, conseguiu exterminar metade dos besouros. Com a morte desses animais um grande número de aves insetívoras, foram atraídas para se alimentar uma vez que com a morte dos besouros tinha um oferta de alimento facilmente acessível. A chuva, ao cair naquele solo

tratado com o DDT, varreu os os componentes químicos, o que afetou os vermes e formaram-se poças contaminadas, cuja água era bebida por alguns animais que acabavam contaminados pelo DDT. Esquilos, ratos almiscarados, coelhos ou raposas tigrillo começaram a morrer. Algumas aves sobreviventes ficavam estéreis já que o DDT impede o endurecimento da casca de ovo; assim os ovos se tornam frágeis e se quebram antes do nascimento dos filhotes. Como o DDT estava subindo níveis tróficos, ou seja, passando dos produtores para os mais diversos estágios de consumidores, foi visto que a sua concentração aumentava nos tecidos animais, isto é facilmente explicado uma vez que este composto se acumula no tecido adiposo dos animais (CARSON, 2010).



**Figura 1:** Rachel Carson, ano de 1962. (Foto original de Marco, Hollingworth & Durhan, com permissão do Rachel Carson Council Inc.) Capa do bestseller Silent Spring. (Original de R.M. Moura)

Esse uso frequente, e muitas vezes incorreto, de agrotóxicos pode causar a contaminação dos solos, da atmosfera, das águas superficiais e subterrâneas, dos alimentos, apresentando conseqüentemente, efeitos danosos em organismos aquáticos e terrestres. Nos seres humanos a exposição aos agroquímicos, seja através de exposição ambiental ou ocupacional, pode ocasionar danos à saúde se as exposições forem frequentes, mesmo que seja em pequenas doses (CASTRO et al., 2009).

Investigações epidemiológicas têm sido conduzidas para determinar se há qualquer relação entre a exposição aos pesticidas e as doenças (De Roos et al, 2005). Os

biomonitoramentos de populações humanas são um sistema de alerta precoce para detectar os efeitos adversos no sistema endócrino (GROTE et al, 2004; HAYES et al, 2002; LAVADO et al, 2004; NICOLOPOULOU et al, 2001; e REEDER, 2005), imunológico (CHRISTIN et al., 2003; GALLOWAY et al, 2003; QING LI et al, 2007; STEERENBERG et al, 2008; CORSINI et al, 2008), nervoso (JIA et al, 2007; BETARBET et al, 2000; MORETTO et al., 2011; BALDI et al, 2002) e reprodutivo (BRETVELD et al, 2006; ELBETIEHA et al, 2001; HANKE et al, 2004) em populações agrícolas. Ao passo que danos no DNA têm sido relacionados à exposição a pesticidas, levando a abortos (PETRELLI et al, 2000; ARBUCKLE e SEVER, 1998; ESKANAZI et al, 2004). Nessa perspectiva doenças degenerativas tem sido enfocadas (ENGEL et al, 2001; GAUTHIER et al, 2001; JENNER, 2001) além de desenvolvimento neoplásico (LA VECCHIA et al, 1989; JI et al, 2001; ACQUAVELLA et al, 2003; JAGA e DHARMANI, 2005). Estudo realizado por Araújo em 2000, em trabalhadores da cultura de tomate no Estado de Pernambuco demonstrou que 70% das mulheres entrevistadas sofreram aborto espontâneo. Entretanto, ainda é insuficiente o número de trabalhos que mostre o potencial genotóxico destas substâncias no organismo humano exposto através da alimentação a baixas doses de ingestão diária aceitável.

A necessidade do mercado consumidor atual, que busca cada vez mais a qualidade, ainda que esta seja apenas aparente do produto, tem feito com que os agricultores recorram cada vez mais ao uso dos defensivos agrícolas. Como consequência dessa grande utilização, os consumidores se expõem aos pesticidas e estão sujeitos às consequências de tal exposição. O conhecimento sobre a genotoxicidade dos agrotóxicos utilizados no Brasil é de extrema importância, visto que estas substâncias são capazes de afetar os mais variados tipos de ecossistemas e assim interferir no funcionamento do equilíbrio natural e essencial para a sobrevivência das espécies. As moléculas precursoras dos agrotóxicos podem interagir com os ácidos nucleicos, e como consequência desencadear processos de mutagêneses, teratogêneses e carcinogêneses que influenciará de forma intensa na ocorrência de diversas doenças. Podem ainda interferir na permanência desta espécie na natureza. Desta forma, este trabalho visou contribuir para os estudos na área ambiental e saúde humana acerca da utilização dos agrotóxicos no meio ambiente ao avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade causadas pelos pesticidas *Ciromazina* e *Maconzebé* a partir da administração de baixas doses.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação genotóxica aguda através da ingestão de baixas doses das formulações comerciais de dois praguicidas: Trigard 750 WP e Dithame NT, o primeiro tem como princípio ativo a *Ciromazina* e o segundo tem em seu princípio ativo o *Mancozeb*.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar a frequência de micronúcleos em reticulócitos de sangue periférico de camundongos *Mus musculus* tratados com as formulações comerciais isoladas dos pesticidas Trigard 700 WP, a base de Ciromazina, e o Dithame NT, a base de Mancozeb, em três concentrações abaixo do Índice de dieta aceitável (IDA).
- ❖ Avaliar a frequência de danos ao DNA, pelo ensaio cometa, de células sanguíneas de sangue periférico de camundongos *Mus musculus* tratados com as formulações comerciais isoladas dos pesticidas Trigard 700 WP, a base de Ciromazina, e o Dithame NT, a base de Mancozeb, em três concentrações abaixo do Índice de dieta aceitável (IDA).
- ❖ Avaliar a ação genotóxica entre os sexos masculinos e femininos tratados com as formulações comerciais isoladas dos pesticidas Trigard 700 WP, a base de Ciromazina, e o Dithame NT, a base de Mancozeb, submetidos à mesma concentração abaixo do Índice de dieta aceitável (IDA).

## 1.3 Revisão da Literatura

### 1.3.1 História dos Agrotóxicos no Brasil

A indústria de agrotóxicos iniciou-se na Primeira Guerra Mundial. Nesta época as pesquisas se preocupavam em desenvolver moléculas tóxicas que fossem empregadas como poderosas armas bélicas. Pesquisas subsequentes, realizadas entre fins da década de 1930 e no decorrer de 1940, identificaram que estas armas químicas eram letais contra pragas que atacavam as culturas agrícolas (ZAMBRONE, 1986).

Embora a indústria de agrotóxicos tenha surgido com a Primeira Guerra, seu uso foi efetivamente difundido com o término da Segunda Guerra Mundial em 1945. Quando as empresas do ramo químico buscavam novos mercados consumidores para reaproveitar as moléculas tóxicas desenvolvidas para fins bélicos. Foi neste período que foram criadas então empresas como Bayer, Basf, Hoescht, DuPont, que se utilizavam das moléculas tóxicas para produção de agrotóxicos organossintéticos (BULL e HATHAWAY, 1986).

Estrada (1998) agrupa a história dos pesticidas em três etapas. A primeira, quando foi descoberta, acidentalmente, a ação praguicida de alguns elementos naturais como: enxofre, cobre, arsênio e fósforo. Os gregos já haviam utilizado enxofre para combater certas pragas, e os romanos queimavam betume para remover insetos das plantações de uva. Em meados de 1800, a *London Horticultura Society* recomendava o uso de enxofre para combater os fungos que apareciam nos pessegueiros. Na França, no mesmo ano, foi descoberto que o uso de uma mistura feita a base de cobre poderia destruir fungos de forma muito eficaz.

A segunda etapa foi marcada pelo uso de diferentes óleos inseticidas e pelo desenvolvimento do primeiro agrotóxico sintético, o dinitro-2-cresilato de potássio, que foi comercializado na Alemanha. No começo de 1900, foram introduzidas substâncias inorgânicas e, ao final de 1932, iniciou-se a comercialização de produtos para combater pragas domésticas (ESTRADA, 1998).

Antes da Segunda Guerra Mundial, a maior parte dos produtos utilizados para combater as pragas eram inorgânicos que, como regra geral, são aqueles compostos que

não possuíam átomos de carbono na sua molécula química ativa. Sendo a maioria destes compostos formados a partir da combinação de vários metais pesados, como mercúrio, arsênico e chumbo. Apesar de terem sido banidos por causarem efeitos tóxicos em longo prazo, alguns elementos inorgânicos são ainda utilizados. Segundo Alves Filho e Prado (2002), a utilização desses tipos de elementos químicos traça o marco histórico conhecido como a “primeira geração” de agrotóxicos (ALVES FILHO e PRADO, 2002).

A terceira etapa definida por Estrada (1998) corresponde ao período da Segunda Guerra Mundial, que propiciou a criação de três novos produtos: o inseticida DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) desenvolvido pelo químico suíço Paul Hermann Müller em 1940, os inseticidas organofosforados e os herbicidas de ação seletiva. Esses produtos são considerados a “segunda geração” de agrotóxicos, incluindo ampla gama de compostos orgânicos sintéticos, ou seja, orgânico por possuir na sua molécula ativa átomos de carbono e sintético por ser elaborados pelo homem. Desde então, têm-se desenvolvido venenos potentes contra pragas, sendo a maior parte deles organoclorada e organofosforada. (ESTRADA, 1998)

Em 1943 chegaram ao Brasil às primeiras amostras do pesticida DDT, o qual teve seu uso descoberto como um potente inseticida, sendo usado para prevenir e evitar a irradiação de diversas doenças, como: malária, febre amarela, doença do sono, tifo, oncocercose e muitas outras doenças transmitidas por vetores (SPADOTTO, 2006). Assim, esse composto passou a ser chamado de milagroso pó branco e as pessoas saíam às ruas para serem expostas a pulverização do DDT em programas de saúde pública, objetivando a prevenção dessas doenças, uma vez que o índice de mortalidade decorrente da propagação delas era alto (Figura 2). Acreditava-se que, se utilizado corretamente, não causaria nenhum mal em humanos nem aos animais domésticos, pois não induziam nenhuma sintomatologia imediata que pudesse ser notada. Sendo assim, foram utilizados em larga escala na agricultura, nas residências e na saúde pública. O efeito nocivo contra os vetores era imediato, o que ressaltava a ilusão de que o DDT não trazia nenhum problema para a saúde do homem e dos animais domésticos, pois não ocorria nenhum tipo de intoxicação aguda (MOURA, 2007).



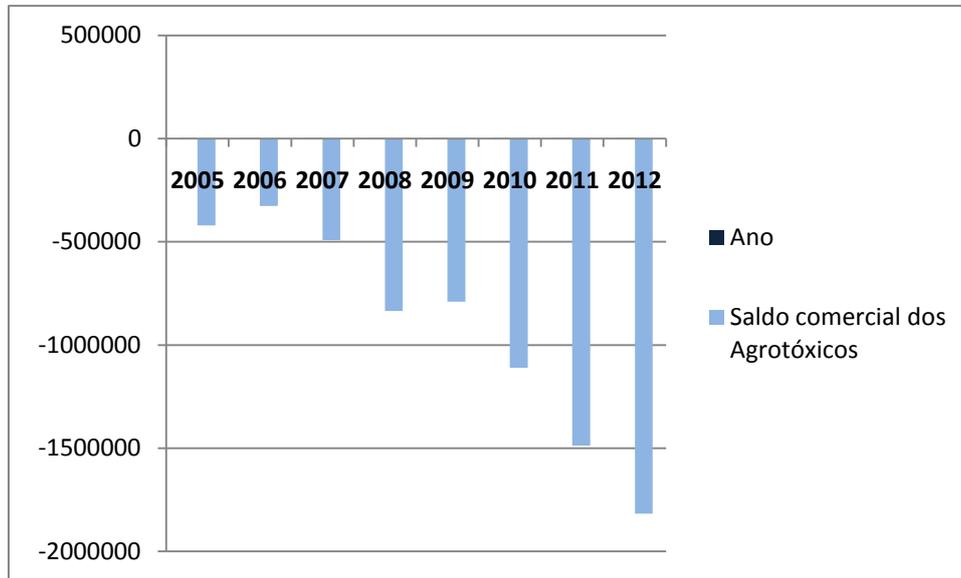
**Figura 2:** População sendo pulverizada pelo DDT, como medida de prevenir doenças. Imagem disponível na internet: [http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g28\\_ddt/historia\\_ficheiros/image001.jpg](http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g28_ddt/historia_ficheiros/image001.jpg)

Em 1975 o Plano Nacional de Desenvolvimento (PND) destinou parte de recursos financeiros para a criação de empresas nacionais e a instalação no país de subsidiárias de empresas transnacionais de insumos agrícolas. Além de estimular o uso dos agrotóxicos através do financiamento agrícola, que destinava obrigatoriamente um valor para a aquisição de praguicidas a serem utilizados na agricultura (SILVA et al., 2007).

Outro fator que colaborou de forma marcante para a vasta disseminação da utilização dos agrotóxicos Brasil foi o marco regulatório defasado e pouco rigoroso que facilitava o registro de centenas de substâncias tóxicas, muitas das quais já proibidas por determinações legais nos países desenvolvidos (SILVA, J.M. et al., 2005; PELAEZ et al., 2010). Só após 14 anos, ou seja, no ano de 1989, é que foi instituída a lei 7.802 que regulamentaria a utilização dos agrotóxicos.

A partir do ano de 2008 até os dias atuais o Brasil passou a ocupar o primeiro lugar no *ranking* dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, ultrapassando os Estados Unidos (ANVISA, 2013). Como podemos observar segundo os dados da Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades (ABIFINA),

que demonstra que o Brasil apresenta um déficit financeiro cada vez mais crescente no decorrer dos anos, ou seja, a quantidade de defensivos agrícolas importada pelo país é muito superior à quantidade exportada (Figura 3).



**Figura 3:** Crescimento da importação anual dos agrotóxicos no Brasil desde o ano de 2005 até 2012, segundo dados da ABIFINA.

Com esta grande procura, cresceu o uso indiscriminado de agrotóxicos, resultando em intoxicações de diferentes graus que atingem agricultores, consumidores e várias espécies de animais e vegetais, tornando-se um problema de saúde pública e ambiental (PERES et al.,2005). É válido salientar também que nos últimos anos o Brasil se tornou o principal destino de produtos banidos no exterior. Segundo dados da ANVISA, são usados nas lavouras brasileiras pelo menos dez produtos banido de utilização pela União Europeia (UE), Estados Unidos, China e outros países (ANVISA, 2010).

Com essa má utilização, cresceu o número de casos registrados de intoxicação por agrotóxicos no país. Dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) demonstraram que no ano de 2009, foram registrados um total de 5.253 casos de intoxicação por defensivos agrícolas. Desse total, 886 casos foi registrado para a região nordeste, sendo Pernambuco o Estado com o maior número de intoxicação por pesticidas, com 362 casos (SINITOX 2009).

### 1.3.2 Definição, Composição e Classificação dos Agrotóxicos

Os agrotóxicos, ou também chamados de praguicidas, pesticidas, biocidas, fitossanitários, defensivos agrícolas e agroquímicos (TOMYTA, 2005) são definidos de acordo com a Lei Federal n. 7.802, de 11/07/1989, regulamentada pelo Decreto n. 4.074, de 04/01/2002, em seu artigo 2º, inciso I, como sendo:

“Os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento”.

Os agrotóxicos são constituídos basicamente pelo ingrediente ativo e outros componentes de formulação. O ingrediente ativo é o composto químico na forma sólida ou líquida responsável diretamente pelo combate à praga ou doença a ser tratada. Já os componentes de formulação, também chamados de ingredientes inertes, são definidos como todo material que é adicionado para a preparação do pesticida além do ingrediente ativo. Sendo assim, os componentes de formulação podem incluir carreadores, agentes antipoeira, atraentes, encapsuladores, solventes, adjuvantes, emulsificantes ou adesivos. Os ingredientes inertes têm funções importantes e indispensáveis para potencializar a eficiência dos agrotóxicos, por serem capazes de aumentar a capacidade de pulverização, aumentar a solubilidade, melhorar a capacidade de espalhamento, aumentar a estabilidade dos compostos de sua formulação, aumentar a segurança no manuseio, etc (SANTOS, 2002).

Com a grande diversidade de formulações comerciais e em muitos casos, formulações diferentes com o mesmo ingrediente ativo (Superintendência de Controle de endemias - SUCEN, 2013), estima-se que no Brasil existam cerca de 300 princípios ativos em 2 mil formulações comerciais diferentes (PEDROSSO e VICENTE, 2007). Desta forma, é importante conhecer a classificação dos agrotóxicos quanto a sua ação, seu alvo, sua toxicidade, sua periculosidade ambiental e grupo químico a que pertencem. Essa classificação também é útil para o diagnóstico das intoxicações e para a instituição de tratamento específico (OPAS/OMS, 2000).

Quanto à ação os agrotóxicos podem ser sistêmicos ou não sistêmicos. Os não sistêmicos têm ação de contato (via dérmica), penetração, ingestão e fumigante que consiste na aspiração na forma gasosa dos pesticidas (via respiratória). Esse por sua vez, além de atingir a espécie-alvo é capaz de atingir outros animais, sendo também responsável por causar alterações fisiológicas do próprio vegetal (CHANDLER, 1997; DELLA LUCIA e CHANDLER, 1987). Já os agrotóxicos sistêmicos surgiram para propiciar um aperfeiçoamento na seletividade do combate a pragas e assim não matar os insetos não nocivos que poderiam estar ajudando na própria contenção das pragas, além de minimizar a intervenção na biodiversidade do meio ambiente da área tratada. Desta forma, ao ser aplicado na lavoura, o agrotóxico com ação sistêmica é transportado pela seiva do vegetal em quantidade letal para a praga, sem prejudicar a planta e os demais animais (CARVALHO, 2009).

Segundo Yamashita (2008), os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com a espécie-alvo em que irão atuar como podemos observar na Tabela 1. Com relação aos estágios de desenvolvimento da espécie-alvo atingida os agrotóxicos podem ser classificados também como: larvicida (que atua em larvas), Ovicida (que atua nos ovos) e Adulticida (que atua nos adultos).

**Tabela 1:** Principais alvos de atuação dos agrotóxicos

<b>Classificação</b>	<b>Alvo de Atuação</b>
Inseticida	Insetos
Acaricidas	Ácaros
Moluscocidas	Moluscos
Nematicidas	Nematelmintos
Bactericidas	Bactérias
Fungicidas	Fungos
Herbicidas	Plantas Invasivas
Rodenticidas	Roedores
Vermífugos	Vermes
Desfolhantes	Folhas indesejadas
Fumigantes	Bactérias do Solo

Segundo a legislação atual brasileira cabe ao Ministério da Saúde executar a avaliação e classificação toxicológica dos agrotóxicos (PERES e MOREIRA, 2003). Quanto ao grau de

toxicidade este é aferido segundo os resultados de testes e de estudos realizados em laboratórios, estabelecidos pela portaria nº3/MS/SNVS, de 16 de janeiro de 1992, da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). A classificação toxicológica traz um importante alerta para os efeitos à saúde humana provocada por esses compostos. O teste mais utilizado para aferir a toxicologia é realizado em animais e baseado na DL50, ou seja, dose letal que consegue matar 50% das espécies em teste com uma determinada concentração. De acordo com SOUZA (2006) a DL50, expressa em mg/kg de peso corpóreo, “é uma estimativa estatística relativa à menor dose de uma substância que, se administrada em dose única, é capaz de matar metade da população de ratos em estudo. Assim, quanto menor a DL50, maior a toxicidade do produto”. Desta forma, esta classificação diz respeito exclusivamente para quem manuseia o produto, sendo importante como medida de segurança para os que trabalham na produção, na embalagem, no armazenamento, no transporte, no preparo e na aplicação dos pesticidas. É válido salientar que esta classificação não se relaciona com a exposição a longo prazo e com a segurança ambiental (STÜTZER e GUIMARÃES, 2003; FARIA, et al., 2007). No Brasil os pesticidas são classificados em classes toxicológicas que variam de I a IV. Para cada uma das classes temos como definição: classe I - produtos extremamente tóxicos; classe II - produtos altamente tóxicos; classe III - produtos medianamente tóxicos; e a classe IV- produtos pouco tóxicos. Por determinação legal, o rótulo de um pesticida deve conter a classe toxicológica a qual pertence, sendo atualmente representada por uma faixa colorida na parte inferior da embalagem, conforme demonstrado na Figura 4 (GARRIDO & SONEGO, 2003).

Segundo dados do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários – AGROFIT, para cada classe toxicológica ainda existem algumas recomendações para a sua manipulação: Para a classe I - somente devem ser utilizados por operadores profissionais licenciados, que tenham conhecimento da química, usos, perigos e precaução no uso; para a classe II - devem ser utilizados por operadores que aplicam, seguindo estritas condições controladas, supervisionadas e treinadas; para a classe III - seus operadores devem observar as normas rotineiras de segurança na aplicação; para a classe IV – devem ser utilizados por operadores treinados que observem medidas de proteção rotineiras (AGROFIT, 2013 ).



**Figura 4:** Classificação toxicológica de acordo a legislação brasileira que segue o padrão de faixas coloridas (vermelha, amarela, azul e verde) impressas nos rótulos das embalagens dos defensivos agrícolas.

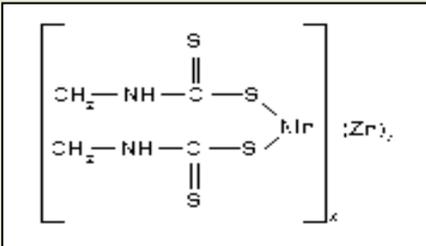
O grau de toxidade ambiental de cada praguicida, também chamado de potencial de periculosidade ambiental (PPA), é determinado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (PERES e MOREIRA, 2003), órgão do Ministério do Meio Ambiente. Esta classificação é feita considerando a legislação ambiental atual, que requer estudos e testes, que são divididos em quatro grupos: testes físicos-químicos; testes de toxicidade para organismo não alvo (ecotoxicológicos); teste de comportamento do composto no meio ambiente, através da utilização de estudos de biodegradabilidade, sorção (absorção/dessorção) e de mobilidade; testes de toxicidade para animais superiores, incluindo potencial genotóxico, embriofetotóxico e carcinogênico (STÜTZER et al., 2003). De acordo com estes parâmetros, os pesticidas são definidos em classes, que variam de I a IV conforme a Tabela 2 (GRISOLIA, 2005).

**Tabela 2:** Classificação toxicológica ambiental, ou também chamada de periculosidade ambiental dos agrotóxicos.

Classe	Classificação do produto
I	Produto Altamente Perigoso
II	Produto Muito Perigoso
III	Produto Perigoso
IV	Produto Pouco Perigoso

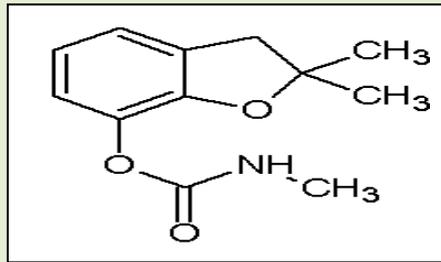
Para a classificação química, os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com a composição estrutural das moléculas que fazem parte do seu princípio ativo em orgânicos (apresentam átomos de carbono em sua estrutura química) e os inorgânicos (possuem na metais pesados como o arsênio, mercúrio, chumbo e cobre em sua estrutura química) (CARAPETO, 1999). Ao observar o agrupamento químico estas moléculas recebem outra classificação a depender do radical que compõe o pesticida (Tabela 3), tendo como principais classificações: carbomatos, ditiocarbomatos, organoclorados, organofosforados, piretrinas e as triazinas. (GARCIA, 2001).

**Tabela 3:** Principais grupos químicos dos agrotóxicos e as suas principais características.

Classificação	Fórmula Química Estrutural	Características Principais
<b>Ditiocarbamatos</b>	<p>Ex: Mancozeb</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Derivados do Ácido Carbâmico</li> <li>✓ Usados como fungicidas, acaricida</li> <li>✓ O grupo pode ser dividido em: dimetilditiocarbamato (ferbam,metam, tiram e ziram) e os etileno-bis-ditiocarbamatos (Maneb, mancozeb,metiram, propinebe e zineb. (SILVA, 2005)</li> </ul>

**Carbomatos**

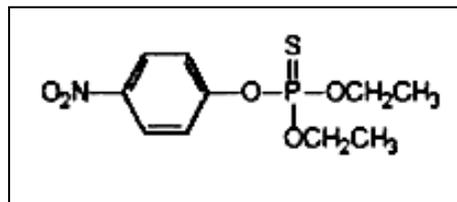
Ex: Carbofuran



- ✓ Derivados do Ácido Carbâmico
- ✓ Utilizados como herbicidas, fungicidas, nematicidas e inseticida
- ✓ São compostos instáveis e facilmente degradado
- ✓ São lipossolúveis
- ✓ Sua ação ocorre com o contato e ingestão,
- ✓ São inibidores das enzimas colinesterase

**Organofosforados**

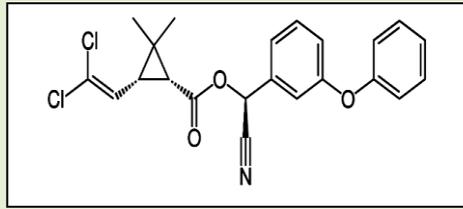
Ex: Parathion



- ✓ Derivados do Ácido Fosfórico tem carbono e fósforo em sua molécula.
- ✓ Apresentam classificação desde extremamente tóxicos até aqueles com baixa toxicidade
- ✓ São biodegradáveis, tendo duração de 1 a 3 meses no solo
- ✓ São muito tóxicos para o ser humano e os vertebrados, sendo responsável por grande números de intoxicações e mortes no país
- ✓ O modo de ação é por contato e ingestão.

**Piretróides**

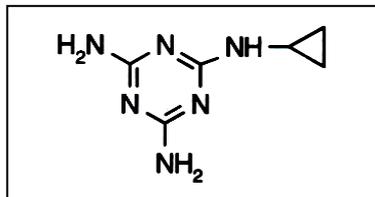
Ex: Cipermetrina



- ✓ Derivado da piretrina, extraído a partir da flor *Crysanthumum (pyrethrum) cinenariaefolium*
- ✓ São inseticidas
- ✓ Apresenta uma alta eficiência, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo, resultando em menor contaminação nas aplicações
- ✓ São os compostos de mais rápida ação na interferência da transmissão de impulsos nervosos.
- ✓ Podem possuir efeito repelente, espantando os insetos ao invés de eliminá-los.

**Triazinamina**

Ex: Ciromazina

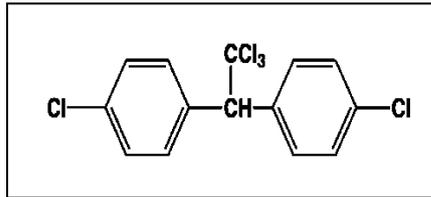


- ✓ Inseticida
- ✓ Derivado
- ✓ Utilizados nas culturas de batatas, crisântemo, feijão, feijão-vagem, melancia, melão, pepino e tomate

---

**Organoclorados**

Ex: DDT



- ✓ Grupo pioneiro dos praguicidas sintéticos
  - ✓ São derivados do clorobenzeno, do ciclohexano ou do ciclodieno
  - ✓ Possui o Cloro em sua molécula
  - ✓ Altamente Persistente no meio ambiente levando até 30 anos no solo
  - ✓ Baixa solubilidade em água
  - ✓ Acumulação nas cadeias alimentares.
  - ✓ Acumula-se nos tecidos adiposos dos seres vivos
  - ✓ São volátil
  - ✓ 70,3% estão entre a classificação I e II, extremamente e altamente tóxico para o ser humano
  - ✓ Seu uso esta está proibido ou severamente restringido em diversas partes do mundo
  - ✓ Atuam por ingestão e contato, bloqueando a transmissão dos impulsos nervosos
-

Os efeitos da contaminação por agrotóxicos não ocorrem apenas nos trabalhadores expostos, ocorre também à contaminação do solo, da atmosfera, das águas e alimentos. Além de colocar em risco a população que consome o que é produzido no campo. Tal contaminação pode, ainda, alterar o funcionamento dos ecossistemas (FEHLBERG et al., 2003). Diante desse cenário é de extrema importância o conhecimento das classificações dos agrotóxicos, pois através delas podemos minimizar danos ocasionados pelo desconhecimento e pela falta de cuidado ao manipular esses compostos. A classificação poderia, por exemplo, influenciar na distribuição dos agrotóxicos no ambiente de aplicação, fazendo com que os produtos de maior periculosidade sofram restrições de uso, conforme recomendado pela Organização Mundial da Saúde - OMS (COPPLESTONE, 1988; OMS 1990), pela Organização Para a Alimentação e Agricultura - FAO (FAO, 1990) e pela Agência Ambiental dos Estados Unidos – EPA (GARCIA, 2001). Pesquisas feitas com trabalhadores rurais ressaltam a falta de conhecimento sobre o produto que estão manipulando (DOMINGUES, 2004; GRISOLIA, 2005; SILVIA et.al., 2005; DAMS, 2006), tornando-os agentes causadores e potencializadores de danos à saúde humana, animal e ao meio ambiente.

Os efeitos adversos à saúde humana e ao meio ambiente estão diretamente relacionados com o uso de pesticidas, dependem do perfil toxicológico do produto, do tipo e intensidade da exposição e da susceptibilidade da população exposta (DELGADO e PAUMGARTTEN, 2004). Os trabalhadores rurais ao utilizarem agrotóxicos contaminam o local de trabalho e atingem em maior ou menor intensidade a si próprios, a produção e o meio ambiente, ocasionando os mais variados graus de intoxicações (PIGNATI et al., 2007). Moreira (2003) estimou que o número de indivíduos contaminados por agrotóxicos no Brasil, em meados da década de 90, era de 540.000 casos com aproximadamente 4.000 mortos. Tal fato demonstra a necessidade do conhecimento a respeito da classificação toxicológica, do correto manuseio, aplicação e descarte dos agrotóxicos para tentar de minimizar danos a saúde pública e ambiental.

### 1.3.3 Genotoxicidade Ambiental

Os seres vivos estão expostos a ações de numerosos agentes potencialmente tóxicos e a diferentes tipos de substâncias mutagênicas, ou seja, substâncias que podem induzir danos na molécula de DNA dos organismos e assim comprometer o funcionamento normal dos seus sistemas. Esses agentes podem ser físicos, químicos ou biológicos e podem provocar efeitos fisiológicos, bioquímicos e genéticos (ARNAIZ, 1995), afetando assim processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica. Além de poder provocar alterações cromossômicas, o que resultará em processos cancerosos e morte celular. Por serem capazes de causar lesões no material genético, essas substâncias são chamadas de genotóxicas (MENKE, 2001).

Quando lançados no ambiente, os agrotóxicos são capazes de interagir com os organismos vivos, causando múltiplas alterações que podem gerar graves desequilíbrios ecológicos, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (YOUNES, 2000). Os riscos da dispersão desses compostos não se limitam apenas aos agricultores, que estão em contato direto com os pesticidas. Os resíduos das aplicações podem se distribuir, degradar ou acumular nos mananciais de água superficial e subterrânea, no solo, na atmosfera e nos seres vivos (GRISOLIA, 2005)

Numerosos trabalhos têm revelado a presença de níveis alarmantes de agrotóxicos nos mais variados tipos de ecossistemas (FINIZIO et al., 2001; FANTKE et al., 2012; DOSSIÊ ABRASCO, 2012). A quantidade dos pesticidas no meio ambiente poder interferir diretamente no equilíbrio genético das populações, propiciando a vulnerabilidade dos organismos, o declive da diversidade e possivelmente a extinção da espécie (DALLEGRAVE et al., 2006). Os fatores determinantes da dinâmica dos pesticidas no meio ambiente são a sua forma de uso, as características ambientais e as propriedades físico-químicas de seu princípio ativo do pesticida (DORES e DE- LAMONICA-FREIRE, 1999).

Sendo válido ressaltar que cada agrotóxico tem um tempo de meia vida para se degradar ou ser metabolizado por enzimas do próprio produto para se transformar em um metabólito. Entretanto, em alguns casos esses metabólitos podem ser muito mais tóxicos e nocivos ao meio ambiente do que composto original (GRISOLIA, 2005).

Além da contaminação do meio ambiente, estes resíduos podem chegar ao homem através da cadeia alimentar. Os alimentos plantados no campo e comercializados nas

idades apresentam um grande teor de resíduos de agrotóxico (SILVA, 2012), isto é facilmente explicado devido à contaminação dos alimentos durante a aplicação em uma das fases do plantio, do transporte ou do armazenamento. Aliado a este fator pode ser citado também à falta de higienização adequada destes alimentos antes do consumo humano. Segundo dados do Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA, um terço dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros está contaminado com agrotóxicos (ANVISA, 2011). Todas as pessoas são inevitavelmente expostas aos agrotóxicos através da contaminação ambiental ou ocupacional. A população em geral está exposta aos resíduos de pesticidas, incluindo os produtos de degradação físicos e biológicos no ar, água e alimentos (BOLOGNESI, 2003).

O PARA é responsável por determinar o Índice de Dieta Aceitável (IDA), que é a estimativa da quantidade de substância no alimento ou bebida, expressa em base de peso corpóreo, que pode ser ingerida diariamente por toda vida sem risco apreciável; é estabelecida em unidades de miligrama por quilograma de peso corpóreo (mg/Kg p.c.) (ANVISA, 2013). Segundo o último levantamento, realizado em 2011, 37% das amostras não apresentaram resíduos de agrotóxicos, 35% estavam com níveis de resíduos abaixo do Limite Máximo de Resíduo (MRL) e 28% foram consideradas insatisfatórias pela presença de agrotóxicos não autorizados ou acima do MRL. Embora a exposição pela dieta seja em geral baixa ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de alimento), grandes setores da população podem ser expostos por meio dessa via praticamente por toda vida (SOLOMON *et al.*, 2010).

Em humanos, sabe-se que um baixo grau de exposição está associado a resultados negativos para danos citogenéticos e, em contraste, resultados positivos são relacionados a populações com altos níveis de exposição. É importante ressaltar que a exposição crônica a baixas doses é cumulativa e também pode induzir tais danos (BOLOGNESI, 2003). Entretanto, ainda é insuficiente o número de trabalhos que mostre o potencial genotóxico destas substâncias no organismo humano, através da alimentação baseada em doses abaixo da IDA.

Na tentativa de minimizar e de aprimorar estudos sobre a genotoxicidade ambiental dos pesticidas, houve nos últimos anos um grande interesse em desenvolver testes rápidos e simples para identificar substâncias com atividade genotóxica. Diversos métodos são usados para detectar efeitos biológicos precoces decorrente da exposição a agentes que causam danos ao DNA (SIMONIELLO *et al.*, 2008). A utilização de organismos experimentais e bioensaios têm permitido a quantificação e o reconhecimento de uma ampla gama de substâncias com atividade genotóxica (OBE *et al.*, 2004), assim como o teste do micronúcleo (MN) e o ensaio cometa, são importantes ferramentas usadas como

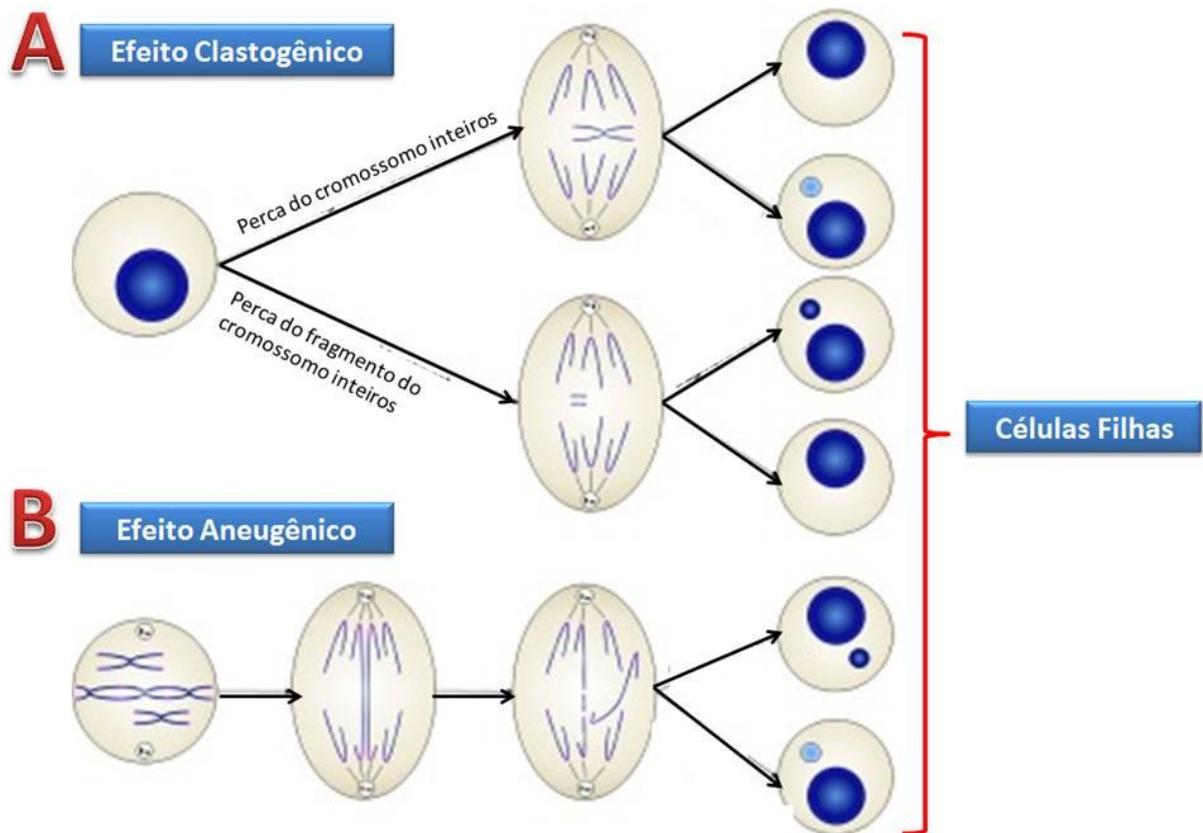
marcadores de danos genéticos, causados por diversos agentes mutagênicos e genotóxicos.

### 1.3.4 Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo (MN) foi originalmente desenvolvido como um teste que utilizava eritrócitos policromáticos de medula óssea de roedores (SCHMIDT, 1976) e mais tarde estendido a eritrócitos circulantes (MACGREGOR et al., 1980). O micronúcleo (MN) é semelhante ao núcleo celular em forma, estrutura e propriedades de coloração, e pode variar grandemente em tamanho (EL-SHAHABY, 2003). Os MNs são resultado da perda de fragmento(s) cromossômico(s) ou de cromossomo(s) inteiro(s), podendo ser induzido por agentes que danificam diretamente o cromossomo produzindo quebras (clastogênese), ou por agentes que afetam o fuso mitótico (aneugênese), como visto na Figura 6 (NATARAJAN, 2002). Os fragmentos ou cromossomos inteiros que não se orientam para o núcleo das células filhas ficam perdidos no citoplasma. Ao redor deles forma-se o envoltório nuclear, originando assim os micronúcleos (Figura 5).

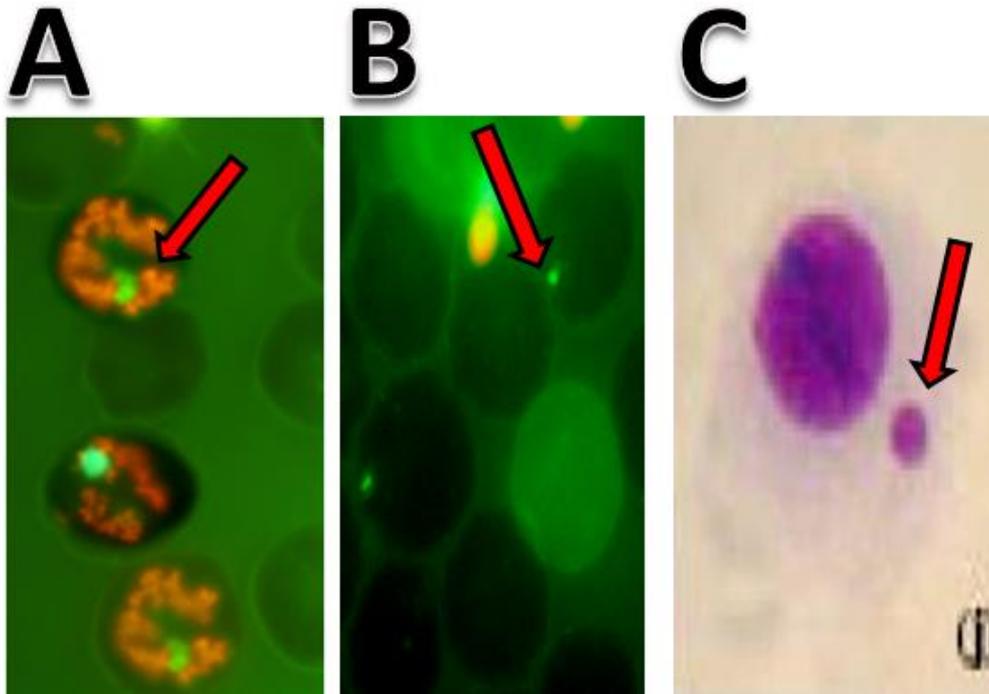
De acordo com Stopper & Müller (1997) uma das causas do aparecimento de células micronucleadas seria a indução de alterações na maquinaria mitótica, principalmente, alteração no fuso e no cinetócoro. Outro fator causador do aparecimento do MN deve-se a decorrência da exposição da célula ao agente de teste administrado e a sua capacidade de agir e causar quebras e trocas cromossômicas.

Esse teste é um dos ensaios mais utilizados em avaliações genotóxicas, pois é bastante eficiente devido ao grande número de células que podem ser analisadas. Além de representar uma maneira simples, rápida, de baixo custo e precisa de se estimar dano genético induzido, sendo assim utilizado como uma ferramenta amplamente aplicável para testar o efeito de compostos químicos sobre as células (EL-SHAHABY, 2003). Aliado a esses fatores o teste do micronúcleo tanto pode ser realizado *in vitro* como *in vivo* (KRISHNA et al., 2000).



**Figura 5:** Formação do micronúcleo pelos efeitos (A) clastogênico e (B) Aneugênico. Figura adaptada retirada da internet: <http://www.uab.es/Imatge/242/472/micronuclisim.jpg>

Diversos estudos sobre a genotoxicidade dos agrotóxicos se utilizam do MN em células da medula óssea ou do sangue periférico (HAYASHI et al., 1990). Podendo por sua vez ser detectados e estudados nos seguintes tipos de células: hemácias maduras, a qual já perdeu o seu material genético; nos reticulócitos que são as hemácias imaturas, cuja qual apresenta em seu interior RNA; e nos linfócitos, células participantes do sistema imunológico (Figura 6). Grover e Malhi, em 1985, ao utilizar o sangue da medula óssea de ratos albinos para realizar o teste do micronúcleo, puderam determinar a genotoxicidade de alguns pesticidas organofosforados, demonstrando ser esse teste um dos mais sensíveis para bioensaios e monitoramento dos efeitos genotóxicos no meio ambiente.



**Figura 6:** Três diferentes tipos de células utilizadas para estudo do micronúcleo. A seta aponta a presença do MN nas seguintes células: A - Reticulócitos Micronucleado; B - Hemácias micronucleada; C - Linfócito micronucleado que foi retirado de Zalancaín L. et al., 2005.

Embora o micronúcleo possa se originar espontaneamente, a sua indução é comumente utilizada para se detectar danos no material genético, resultantes da exposição a um agente mutagênico (HEDDLE et al., 1983). As consequências da formação do micronúcleo, produzido espontaneamente (devido a um erro no mecanismo de reparo por exemplo) ou por indução, podem ser um passo tanto para a carcinogênese (BONASSI et al., 2006) quanto para a eliminação do dano genético.

Desta forma, a ANVISA preconiza que para os defensivos agrícolas serem lançados para o mercado consumidor brasileiro, esses devem passar por alguns testes de genotoxicidade. Avaliação da frequência de micronúcleos in vivo é o teste preliminar em uma bateria de testes de genotoxicidade recomendado pelos órgãos reguladores em todo o mundo a ser realizado como parte da avaliação de segurança do produto (ANVISA).

### 1.3.5 Ensaio Cometa

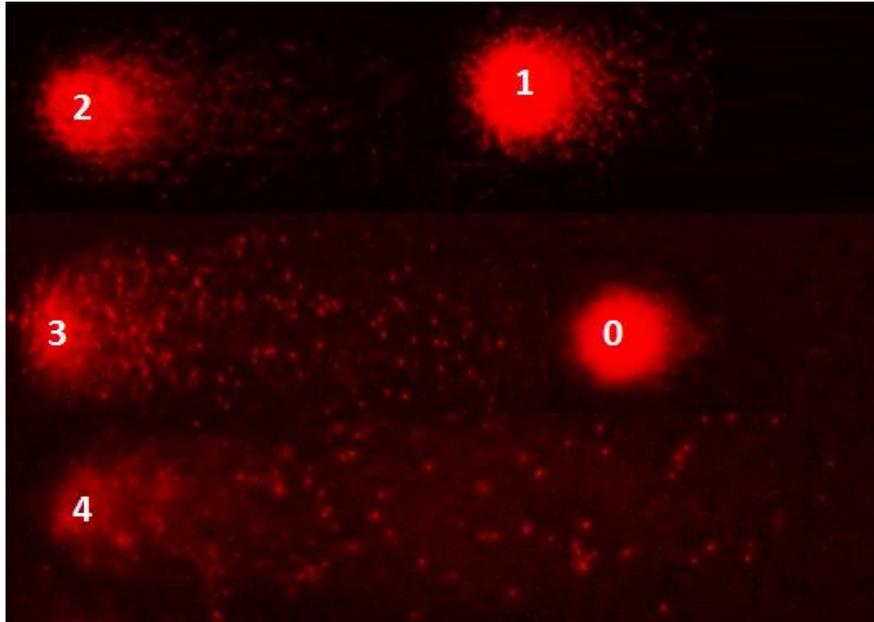
Este método foi desenvolvido por Ostling & Johanson (1984) e posteriormente foi modificado por Singh *et al.*, em 1988. Sendo também chamado de Eletroforese de Gel de Célula Única (SCGE-Single Cell Gel Electrophoresis Assay). É um teste de genotoxicidade capaz de detectar danos ao DNA em células eucarióticas induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (ERDTMANN *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2008). Trata-se de uma técnica ideal para avaliar a ação genotóxica dos pesticidas, cujas composições podem apresentar substâncias que tenham poder oxidante e sejam, assim, formadoras de radicais livres nos sistemas biológicos (LUZ *et al.*, 2003). Os radicais livres são moléculas altamente instáveis que reagem com as estruturas celulares. Consequentemente, modificam a conformação estrutural dos lipídios e proteínas de membrana, alterando a permeabilidade da célula (ANDRADE Jr., 2005), e que podem chegar ao núcleo celular e atingir o DNA de modo a desencadear eventos importantes no processo de carcinogênese (FERREIRA, 1997).

Considerada por Monteith & Vanstone (1995) como uma das melhores ferramentas para o biomonitoramento ambiental, o ensaio cometa pode ser utilizado para se avaliar danos em células em proliferação ou não, *in vivo* ou *in vitro* e pode ser aplicado com o propósito de analisar a ação genotóxica dos mais variados compostos.

Esse ensaio evidencia a ocorrência de quebras na cadeia simples do DNA. As células são colocadas sobre uma lâmina coberta por uma fina camada de agarose, em seguida, estas lâminas são submetidas a uma solução de lise, para que o material genético destas células seja exposto para a análise. Desta forma, o material genético assume a forma de um “nucleóide”. Isto se dá em decorrência do relaxamento do material genético e da retirada do envoltório nuclear (UMBUZEIRO & ROUBICEK *et al.*, 2006). Logo após a lise, os nucleóides são submetidos à eletroforese; é nessa etapa que são formadas as figuras chamadas “cometas” quando a molécula de DNA sofreu quebras de fita dupla ou simples. Após a eletroforese, as células são coradas com corante adequado, e analisadas no microscópio de fluorescência.

As células que apresentam um núcleo redondo são classificadas com células normais, ou seja, sem dano reconhecível no DNA (Figura 7). Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, como de um cometa, que é formada

pelos fragmentos do DNA que fora quebrado. Estes fragmentos podem ter diferentes tamanhos, e ser classificados em categorias de acordo com o tamanho da migração do DNA e conseqüentemente relacionados com o dano ocorrido. (FAIRBAIRN et al.,1995). Assim a extensão média de migração de DNA entre as células, pode ser calculada gerando um índice, chamado de Índice de dano (DI).



**Figura 7:** Classificação visual dos nucleóides baseada no comprimento e quantidade de DNA na cauda dos cometas. O dano classificado como 0 mostra a ausência da quebra do DNA, ou seja, a célula é classificada como normal. Nas demais classificações ocorre fragmentação do DNA. Imagens de nucleóides gerados a partir de leucócitos, corados por GelRed™ em microscopia fluorescente.

O ensaio do cometa é particularmente uma técnica valiosa e de baixo custo, que permite a detecção de diferentes respostas celulares ao dano e reparo de DNA em qualquer população de células eucarióticas que pode ser obtida por uma suspensão simples (SASAKI et al, 1997; KOSZ-VNENCHAK & ROKOSZ, 1997; MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998). A técnica requer pequenas amostras celulares (1 - 10.000 células) e os resultados podem ser obtidos em um único dia. Ostling & Johanson (1984) e Olive et al.(1990) mostraram que a sensibilidade do ensaio cometa em detectar danos em células simples é comparável a de outros métodos de avaliação, sendo usado na investigação da genotoxicidade de vários agentes (SINGH et al, 1988; TICE et al, 1990; OLIVE et al, 1991, 1992; BETTI et al, 1993; MATSUMOTO et al, 2005).

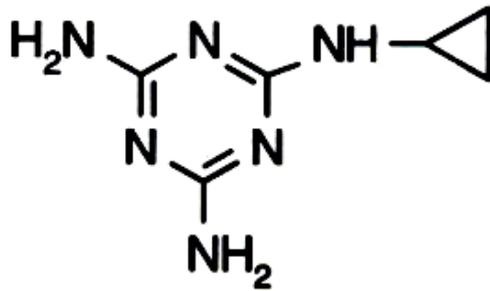
### 1.3.6 Estudos sobre o Agrotóxico Ciromazina

A Ciromazina (N-cyclopropyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine) pertence ao grupo químico das triazinas (Figura 8). É usada como potente inseticida por ser altamente eficaz em eliminar larvas de insetos ou deformar suas pupas, além de atuar sobre o inseto adulto causando um rápido enrijecimento da cutícula que reveste o seu corpo fazendo com que este animal não se desenvolva e tenha assim um curto período de vida (JEMÃA e BOUSHIH, 2010). Foi desenvolvida para controle de *miíase cutânea* que acometia os ovinos (EL-GAZZAR et al, 1988; GRAF, 1993).

O composto ativo foi registrado primeiramente no estado de Nova Iorque em 1986, é comercializado na forma de um pó molhável, que ao ser solubilizada em água pode ser facilmente pulverizada e, assim, dispersa no meio ambiente. No Brasil, a ANVISA determina o seu IDA como sendo de 0,02 mg/kg p.c.. A sua utilização é autorizada para controlar pragas que atacam as culturas de batatas, crisântemo, feijão, feijão-vagem, melancia, melão, pepino e tomate (ANVISA, 2013).

A ciromazina pode ser metabolizada via reações de desalquilação em plantas e animais e submetidos a degradação do meio ambiente para formar melamina (COOK e HUTTER, 1981; RAWLINGS et al., 1998; LIM et al, 1990). Os primeiros estudos com a melamina (1,3,5 -triazina- 2,4,6-triamina) em ratos demonstrou que este composto pode ser cancerígeno (MELNICK et al., 1985), no entanto, a toxicidade pode ser devida a um efeito secundário a partir do desenvolvimento de pedras na bexiga renais induzida por melamina (HECK e TYL, 1985).

É válido salientar que o número de trabalhos a cerca da ação genotóxica da ciromazina nos organismos vivos e para o meio ambiente é insuficiente.

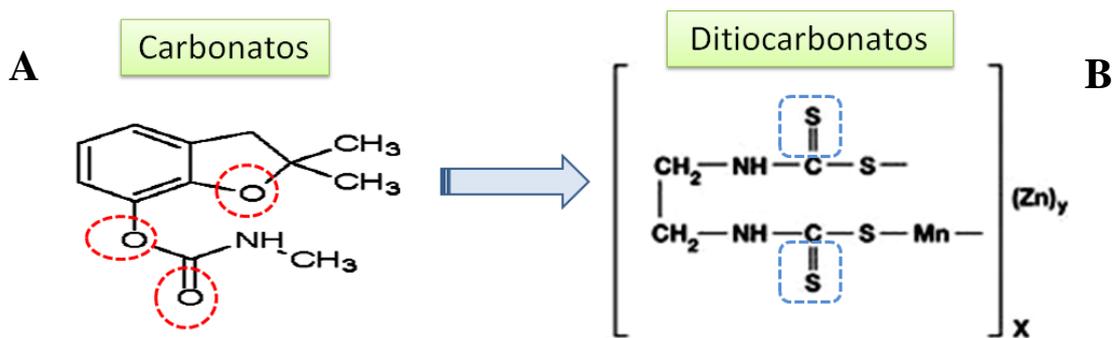


**Figura 8:** Formula estrutural da Ciromazina

### 1.3.7 Estudos sobre o Agrotóxico Mancozeb

O Mancozeb é um pesticida mundialmente utilizado como fungicida para proteger frutas, legumes e outras culturas contra um largo espectro de doenças fúngicas (GRISOLIA, 2005; DOMICO et al., 2006). Lançado em 1944, nos Estados Unidos, foi rapidamente adotado como fungicida devido a sua eficiência no ataque contra grande variedade de fungos e fitopatologias causadas por fungos. Em estudo realizado por Delgado & Paumgarten em 2004, revelou-se que o mancozeb foi o ditiocarbamato mais utilizado em propriedades rurais, apresentando percentual de 44% de presença, demonstrando o quanto o fungicida é empregado nas culturas.

De acordo com dados da ANVISA, esse fungicida apresenta um IDA de 0,03 mg/kg p.c e pertencente à classe dos ditiocarbamatos. Segundo Lemes et al. (2005), os ditiocarbamatos são subdivididos em: Dimetilditiocarbamatos (DMDC), tendo como alguns dos representantes o Ferbam, Ziram e Tiram; Etileno-bis-ditiocarbamatos (EBDC), como o Mancozeb, Manebe, Zinebe e Metiram; Monometildimetilcarbomato, como o Metam sódico; e por fim, o Propilenobisditiocarbamato, como o Propineb. Sendo um análogo aos carbonatos, os ditiocarbamatos apresentam em sua molécula átomos de enxofre em vez de átomos de oxigênio (Figura 9). São compostos derivados do ácido ditiocarbâmico, que apresentam baixa toxicidade aguda. Os EBDC agem como inibidores multi-sítio no patógeno e formam uma barreira na superfície da planta, prevenindo a penetração do fungo no tecido vegetal (GISI e SIEROTZKI, 2008).



**Figura 9:** Formula estrutural dos carbonatos e ditiocarbonatos. Em A, sendo evidenciados os átomos de oxigênio que compõem a molécula dos carbonatos. E em B, os átomos de enxofre que compõem os ditiocarbonatos.

A decomposição do mancozeb é complexa e resulta na formação dos seguintes produtos: dissulfeto de carbono ( $CS_2$ ), sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), etileno diamina (EDA), etileno bisitiouram dissulfeto (DIDT), etileno diisocianato (EDI), etilenotiouréia (ETU), etilenouréia (EU) e o 2-imidazolina (WHO, 1988). Os efeitos biológicos do mancozeb nos organismos de mamíferos devem-se principalmente aos metabólitos dissulfeto de carbono (CS) e etilenotiuréia (ETU), sendo este o produto de maior importância para estudos de toxicologia do mancozeb (KOLANKAYA et al., 1989). Ao ser disperso no meio ambiente, o ETU ocasiona uma série de riscos a exposição de animais e do homem. Ocasionando os homens distúrbios do funcionamento da tireóide e desordens reprodutivas (BALIGAR e KALIWAL, 2002; JOSHI et al., 2005; ROSSI et al., 2006). Evidências apontam para carcinogenicidade (SHUKLA et al., 1990; BELPOGGI et al., 2002), neurotoxicidade (NORDBY et al., 2005); efeitos no sistema imunitário (CORSINI et al., 2008; MEDJDOUB et al., 2011; SRIVASTAVA et al., 2012) e reprodutivo (BALIGAR e KALIWAL, 2002; JOSHI et al., 2005; ROSSI et al., 2006), de danos ao material genético, de atividade mutagênica e teratogênica, tendo-se verificado que induz uma variedade de tumores de diferentes origens em animais de laboratório assim como em trabalhadores rurais.

O Mancozeb é constituído por 58,13% ETU, 15% de Manganês ( $Mn^{+2}$ ), 1,8% de Zinco ( $Zn^{+2}$ ) e 25% de outros ingredientes inertes (KSHEERASAGAR e KALIWAL, 2003). A presença do manganês oferece riscos, pois exposições prolongadas a esse composto, de forma inalada ou oral, podem provocar efeitos adversos no sistema nervoso (hiperirritabilidade, atos violentos e alucinações, denominado de loucura mangânica) e na respiração celular (mitocôndrias). Outras consequências sérias do aumento de manganês são a oclusão das coronárias, a artrite reumatoide e os efeitos mutagênicos (SHILS & SHIKE, 1994). Os sintomas dos danos causados pela exposição dos trabalhadores a este composto podem ser classificados como subclínicos, início da sintomatologia, e o clínico. Os

efeitos subclínicos podem ser os distúrbios do sono, dores musculares, excitabilidade mental e movimentos desajeitados. Em relação ao início da sintomatologia clínica, temos transtornos da marcha, dificuldade na fala, reflexos exagerados e tremor, enquanto na fase clínica, aparecem sintomas de psicose maníaco-depressiva e síndrome que lembra o Parkinson. Além de efeitos neurotóxicos, tem-se grande incidência de bronquites agudas e asma brônquica e pneumonia ( HSDB 2000; BARCELOUX, 1999; WHO, 1981 E 1999).

De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), o Mancozeb é classificado como um fungicida de classificação toxicológica I, ou seja, como extremamente tóxico. Já para a classificação de periculosidade ambiental está enquadrado na classe II, ou seja, produto muito perigoso ao meio ambiente. Apesar de vários estudos indicarem uma elevada toxicidade do Mancozeb, este continua sendo um dos pesticidas mais usados no mundo, devido à sua eficácia, baixo custo e baixa persistência no ambiente relativamente a outros pesticidas.

Embora os estudos sobre os efeitos biológicos dos ditiocarbamatos tenham aumentado nos últimos anos, esta área ainda é muito carente de investigações a cerca dos efeitos nocivos do Mancozeb a organismos expostos a baixas doses e a períodos de tempo pequeno de exposição, uma vez que a maioria dos estudos enfoca os efeitos causados por grandes doses e por grande tempo de exposição.

## CAPÍTULO 2

### ANÁLISE DA GENOTOXIDADE AGUDA *IN VIVO* DO PESTICIDA CIROMAZINA EM BAIXAS DOSES

Wanessa Botelho Marques Cabral<sup>1</sup> e Cristiano Aparecido Chagas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>: Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco- Centro Acadêmico de Vitória, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup> Grupo de pesquisa em Genotoxicidade aplicada à Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco- Centro Acadêmico de Vitória, Pernambuco, Brasil.

\* Corresponding author: Centro Acadêmico de Vitória, Alto do Reservatório, S/N, Bairro Bela Vista, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brasil. Tel.: +55 81 35230670.

E-mail address: cristiano.chagas@ufpe.br (C. Chagas)

Artigo a ser submetido para a Revista: **Genetics and Molecular Biology**

## 2.1 Resumo

Os pesticidas são utilizados na agricultura brasileira desde o período da revolução verde. Esses compostos tornaram-se essenciais na agricultura, no desenvolvimento econômico e social dos brasileiros, fazendo do Brasil o maior consumidor desses produtos no mundo. Conseqüentemente, cresceu também o uso indiscriminado dessas substâncias, o que resulta em riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Um dos agrotóxicos mais utilizados na agricultura brasileira é o inseticida Ciromazina, que pertence ao grupo das triazinas. É classificado como pouco tóxico ao homem, o que fez criar a ideia de ser improvável que seu uso ofereça um perigo grave a saúde humana e ambiental. Sobretudo, os efeitos genotóxicos da Ciromazina permanecem obscuros, especialmente quando se trata de estudos com as formulações comerciais. Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito genotóxico agudo de uma formulação comercial de Ciromazina em dose abaixo da ingestão diária aceitável (IDA). Para avaliar a genotoxicidade desse composto, foram realizados o teste de micronúcleo em reticulócitos do sangue periférico e o ensaio cometa em células sanguíneas. Foram utilizados 50 camundongos *Mus musculus*, de ambos os sexos, divididos em cinco grupos: CN (controle negativo); C1 ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  mg / kg); C2 ( $5,10^{-4}$  mg / kg); C3 ( $5,10^{-3}$  mg / Kg); CP (20 mg/kg ciclofosfamida). Os resultados revelaram que a concentração do grupo C2 mostrou potencial genotóxico para ambos os testes. Quando se comparou a genotoxicidade entre os sexos, houve diferença significativa entre os animais pertencente ao grupo C1. Esse estudo revelou que mesmo nestas concentrações, o pesticida Ciromazina é capaz de causar danos genéticos.

**Palavras Chaves:** Agrotóxico, Meio Ambiente, Ciromazina, Micronúcleo, Ensaio Cometa

## 2.2 Introdução

Os agrotóxicos são largamente utilizados no Brasil. As primeiras amostradas desses produtos datam de um período que ficou conhecido como a modernização da agricultura nacional, também chamada de revolução verde, que ocorreu entre os anos de 1945 e 1985 (Palaez et al. 2010). Desde então esses produtos tornaram-se essenciais para a agricultura e para o desenvolvimento econômico e social, fazendo com que o Brasil ocupe o primeiro lugar no *ranking* dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, ultrapassando os Estados Unidos (ANVISA, 2013)

Aliado a esse grande consumo, cresceu o uso indiscriminado de agrotóxicos, resultando em intoxicações de diferentes graus que atingem desde agricultores a consumidores, assim como diferentes espécies de animais e vegetais, tornando-se um problema de saúde pública e ambiental (Peres et al.,2005; Costa et al.,2007). É válido salientar também que nos últimos anos o Brasil se tornou o principal destino de produtos banidos no exterior. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são usados nas lavouras brasileiras pelo menos dez produtos banidos pela União Europeia (UE), Estados Unidos, China e outros países (ANVISA,2012).

Com essa má utilização, cresceu o número de casos registrados de intoxicação por agrotóxicos no país. Dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) demonstraram que, no ano de 2010, um total de 9.889 casos de intoxicação por defensivos agrícolas foram registrados. Desse total, foram registrados 954 casos ocorreram na região Nordeste, sendo Pernambuco,

com 364 casos, sendo o Estado que com maior número de intoxicação por pesticidas (SINITOX 2010).

Muitos trabalhos têm revelado a presença de níveis alarmantes de agrotóxicos no ecossistema (Finizio et al., 2001; Dossiê Abrasco, 2012; Fantke et al., 2012). Níveis altos de pesticidas no meio ambiente podem interferir diretamente no equilíbrio genético das populações, propiciando a vulnerabilidade dos organismos e ocasionando o declive da diversidade biológica e possivelmente a extinção de diversas espécies do planeta (Dallegrave et al., 2006).

Além dos efeitos no meio ambiente, os agrotóxicos podem afetar os seres humanos, seja pela exposição ocupacional, seja pela exposição através da alimentação. Segundo dados do Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA, realizados em 26 estados do país, revelou que um terço dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros está contaminado com agrotóxicos (ANVISA, 2011). Portanto, a população em geral está exposta aos resíduos de pesticidas, incluindo os produtos de degradação físicos e biológicos no ar, água e nos alimentos (Bolognesi, 2003).

Visando garantir a segurança alimentar e a diminuição da exposição dos seres humanos a resíduos de pesticidas na alimentação, a ANVISA através do PARA estabelece alguns requisitos que incluem a caracterização das substâncias químicas presentes nos alimentos e o nível de exposição, além de avaliar o potencial perigo dessas substâncias em testes laboratoriais. O PARA é responsável por determinar o Índice de Dieta Aceitável (IDA), que é a estimativa da quantidade de substância no alimento ou bebida, expressa em base de peso corpóreo, que pode ser ingerida diariamente por toda vida sem causar risco à saúde; o IDA é estabelecida em

unidades de miligrama por kilogramas de peso corpóreo (mg/Kg p.c.) (ANVISA, 2013).

Um dos agrotóxicos mais utilizados na agricultura brasileira é a Ciromazina (2-cyclopropylamino-4,6-diamino-s-triazine), um inseticida do grupo químico das triazinas. O IDA estabelecido pela ANVISA para esse pesticida é de 0,02 mg/Kg. Trata-se de um composto altamente eficaz em eliminar larvas ou deformar as pupas de insetos (El-Gazzar et al., 1988; Graf, 1993), deste modo os insetos são banidos da região que recebe o tratamento com este pesticida.

O número de estudos sobre a Ciromazina é escasso, visto que este produto pertence à classe toxicológica IV, o que o classifica como um produto pouco tóxico ao homem. Desta forma, criou-se a ideia de ser improvável que seu uso ofereça perigo grave a saúde humana e ambiental. Consequentemente, os efeitos genotóxicos da Ciromazina permanecem obscuros, especialmente quando se trata de estudos com as formulações comerciais. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito genotóxico agudo da formulação comercial Trigard 700 WP a base de Ciromazina em dose abaixo do IDA determinada pela ANVISA, em camundongos *Mus musculus*, utilizando o teste do micronúcleo (Mn) em reticulócitos do sangue periférico e o ensaio cometa em células sanguíneas.

## 2.3 Material e Métodos

### 2.3.1 Animais em tratamento

Para o presente estudo, foram utilizados 50 camundongos - 25 machos e 25 fêmeas - da espécie *Mus Musculus*, pesando entre 30 a 50 gramas e com idade aproximada de 8 semanas. Os animais utilizados eram provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pernambuco do campus de Vitória de Santo Antão (UFPE-CAV). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, contendo cinco animais do mesmo sexo por caixa. As caixas foram acomodadas dentro de estantes ventiladas, com temperatura de  $22^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C, umidade relativa de  $50 \pm 5\%$ , com ciclo de 12 horas luz/escuro. Para alimentação desses animais era ofertada água filtrada e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA - 23076.018079/2011-16) da UFPE.

### 2.3.2 Delineamento Experimental

Os camundongos foram divididos em cinco grupos de acordo com os tratamentos experimentais. Cada grupo continha 10 animais, compostos por cinco machos e cinco fêmeas. Foi usado o pesticida Trigard 700 WP, uma formulação comercial com o princípio ativo Ciromazina. O primeiro grupo recebeu apenas água destilada, veículo de diluição dos praguicidas e foi chamado de grupo controle negativo (CN); o segundo grupo recebeu o agrotóxico na concentração de  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mg/Kg, e foi chamado de grupo concentração 1 (C1); o terceiro grupo recebeu o

agrotóxico na concentração de  $5.10^{-4}$  mg/Kg, e foi chamado de grupo concentração 2 (C2); o quarto grupo recebeu o agrotóxico na concentração de  $5.10^{-3}$  mg/Kg, e foi chamado de grupo concentração 3 (C3); o quinto e último grupo foi chamado de grupo controle positivo (CP) e recebeu, através de injeção intraperitoneal, 20 mg/kg p.c. de ciclofosfamida, substância reconhecidamente mutagênica.

Os animais receberam 1ml da solução por dia, através de sonda esofágica (gavagem), com a concentração pré-estabelecida para cada grupo. Com exceção do CP que recebeu apenas uma única dose do fármaco ciclofosfamida intraperitonealmente.

Foram realizadas duas coletas de sangue periférico, através da punção da base da caudal dos animais. Para anestésiar os animais foi feita a administração da combinação de 0,01 mL de Xilasina e 0,02 mL de Ketamina na proporção de 1:2. Todo o material biológico coletado era identificado e acomodado em vauettes contendo EDTA (VACUETTE® K3 EDTA Tube). A primeira coleta sanguínea foi realizada após 24 horas da administração da primeira gavagem, o material biológico coletado foi destinado à preparação de lâminas para serem analisadas pelo ensaio cometa. A segunda coleta sanguínea ocorreu 48 horas após a primeira gavagem, ou seja, no último dia do experimento. O material biológico coletado nessa foi destinado para o teste do micronúcleo, com o objetivo de verificar a existência de dano ao material genético causado pela Ciromazina. Ao término do procedimento experimental os animais foram sacrificados com injeção intraperitoneal letal da combinação de Xilazina e Ketamina.

### 2.3.3 Teste do Micronúcleo

As lâminas eram preparadas um dia antes da coleta do material biológico seguindo o protocolo de Krishna et al. (2000), o qual utiliza o corante fotossensível laranja de acridina. Após a coleta, o material biológico seguia para a montagem das lâminas. Com ajuda de uma micropipeta era retirado do vacuett 10µl do sangue periférico e colocado em um microtúbulo (EPPENDORF®) contendo 20 µl de soro fisiológico, em seguida era feita uma homogenização do sangue com o soro. Posteriormente eram retirados 15 µl da mistura sangue-soro e colocado na região central de uma lâmina previamente preparada com o corante laranja de acridina, em seguida era coberta com uma lamínula 20x50 mm. Todas as etapas de preparação e análise foram realizadas na ausência de luz branca, uma vez que esta pode ocasionar danos à molécula do DNA e degradar o corante que é fotossensível. Após o tempo de secagem das lâminas, cerca de 30 minutos, elas foram acomodadas em laminários e mantidas a temperatura ambiente para ser analisadas no dia seguinte.

As análises das lâminas foram feitas no microscópio de fluorescência Nikon modelo Eclipse 80i utilizando o filtro de cor verde, com comprimento de onda 515-555 nm, do Laboratório de Genética da UFPE-CAV. Sendo analisados 2.000 eritrócitos policromáticos (PCE) em cada animal, para se quantificar a presença de PCE micronucleados (OCDE, 2009).

### 2.3.4 Ensaio Cometa

O teste do ensaio cometa foi realizado segundo protocolo estabelecido por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000), com pequenas modificações. Para a realização desse teste as lâminas foram previamente preparadas com agarose de alto ponto de fusão (agarose padrão à 70°C), dois dias antes da coleta do material biológico, para propiciar uma melhor fixação da agarose à lâmina. As lâminas preparadas eram acomodadas em um laminário e colocadas na geladeira, mantidas a aproximadamente 4°C.

Após a coleta o material biológico seguia para a montagem das lâminas, com ajuda de uma micropipeta era retirado do vacuett 15µl do sangue periférico e colocado em um microtúbulo (EPPENDORF®) juntamente com 100 µl de agarose de baixo ponto de fusão (agarose LM – Low melting point, a 37°C). Posteriormente eram homogenizado e retirado 100 µl da mistura sangue-agarose LM e colocado sobre a lâmina previamente preparada, logo após era coberta com uma lamínula 20x50 mm para distribuir bem o conteúdo na superfície da lâmina. Ao término da montagem das lâminas, essas eram acodcinadas em laminários histológicos e colocados na geladeira por 30 minutos para secar. Transcorrido esse período, era retirada as lamínulas e em seguida as lâminas eram colocadas em uma cuba histológica contendo solução de lise uso (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100 e 10% DMSO (Dimetilsulfóxido). Essas cubas eram mantidas na geladeira a uma temperatura de aproximadamente 4°C, por três dias.

Passado os três dias, as lâminas eram retiradas da solução de lise uso e submetidas à eletroforese horizontal. Para permitir o desenrolamento do DNA, as

lâminas eram colocadas na cuba de eletroforese e deixadas 20 minutos imersas no tampão alcalino de eletroforese (NaOH 1 M e EDTA 200 mM, pH 13). A fonte da eletroforese estava ajustada com a voltagem de 40 V, corrente 300 mA e o tempo da corrida era de 20 minutos. Ao final da corrida as lâminas foram colocadas no tampão de neutralização (0.4M de Tris-HCL e pH 7.5), por 15 minutos. Após a neutralização as lâminas eram submetidas à etapa de desidratação, sendo imersas em álcool absoluto por 5 minutos.

A etapa de coloração das lâminas foi realizada com o corante Brometo de Etídio, na concentração de 79,25 µM. As análises das lâminas foram feitas no microscópio de fluorescência Nikon modelo Eclipse 80i utilizando o filtro de cor azul, com comprimento de onda 435-485 nm, do Laboratório de Genética da UFPE-CAV. Foram analisadas 100 nucleóides para cada animal, totalizando 1.000 nucleóides por grupo tratado. Sendo assim, quantificado a frequência de dano (FD) e o índice de dano (ID), para avaliar o potencial genotóxico do pesticida Ciromazina.

Todas as etapas de preparação e análise desse ensaio foram realizadas na ausência de luz branca, uma vez que esta pode ocasionar quebras na molécula do DNA e para evitar a degradação do Brometo de Etídio que é fotossensível.

### **2.3.5 Análise estatística**

Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para comparar os resultados do teste do micronúcleo e do ensaio cometa (ID e FD) entre os grupos experimentais. Possíveis diferenças entre machos e fêmeas nos resultados destes testes foram verificadas grupo a grupo pelo teste de Mann-Whitney, escolhido devido às características da amostra, sobretudo em relação ao tamanho dos grupos. Todos os

testes foram realizados no programa estatístico **SPSS Statistics 20**; foram considerados significativos os resultados com p menor do que 0,05.

## 2.4 Resultados

O teste do micronúcleo mostrou diferença significativa com  $p < 0.05$  entre o grupo C2 e o grupo CN (tabela1); não houve diferenças significativas quando as outras concentrações foram comparadas com o grupo controle negativo. Também se verificou que a C2 foi estatisticamente diferente ( $p < 0.05$ ) de todos os outros grupos de tratamento, com mais danos genéticos, quando foram analisados FD e ID (Tabela1). Assim, a concentração intermediária se mostrou mais genotóxica com os três marcadores.

Tabela 2.1: Resultados dos testes de genotoxicidade pelo teste do micronúcleo e ensaio cometa.

Grupo	Testes		
	MN Média (DP)	ID Média (DP)	FD Média (DP)
Concentração 1	15.3 (4.6)	18.3 (12.7)	11.8 (11.3)
Concentração 2	22.8 (5.2)*	86.5 (60.8) **	54.5 (42.2) **
Concentração 3	15.9 (7.5)	13.3 (9.9)	8.2 (4.2)
Controle negativo	7.4 (2.8)	18.9 (8.8)	8.9 (3.5)
Controle positivo	40.2 (19.5) *	-	-

DP: desvio padrão; MN: micronúcleo; ID: índice de dano pelo ensaio cometa; FD: fator de dano em percentagem pelo ensaio cometa; \* = diferença significativa com o controle negativo; \*\* diferença significativa com todos os grupos; - não realizado;  $\alpha = 0,05$ ; o teste utilizado foi a análise de variância.

Quando comparados os resultados entre machos e fêmeas em cada concentração, os resultados foram diferentes entre o teste do micronúcleo e os marcadores do ensaio cometa. Na concentração 1, houve diferença significativa entre machos e fêmeas apenas com Mn ( $p = 0,048$ ); de modo que as fêmeas apresentaram mais micronúcleos do que os machos para essa concentração. Na concentração 2, não houve diferenças significativas entre machos e fêmeas no MN, mas houve diferenças entre os sexos quando considerados ID ( $p = 0,008$ ) e FD ( $p = 0,008$ ); os machos nessa concentração apresentaram mais danos genéticos para ambos os índices. A concentração 3 não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa para nenhum dos marcadores de genotoxicidade, quando foi realizada a comparação entre os danos ocorridos em machos e fêmeas desse grupo.

## 2.5 Discussão

No presente trabalho verificamos que na concentração C2 o Agrotóxico Ciromazina apresentou potencial altamente genotóxico, revelando uma diferença significativa na FD quando comparada com as concentrações 1, 3 e CN. Evidenciado que este pesticida apresenta um grande potencial genotóxico, mesmo que este esteja em doses mais baixas do que o IDA sugerido pela ANVISA.

O grupo C2 apresentou diferença significativa quando comparado com o CN, divergindo dos resultados obtidos em outros trabalhos. Lucero *et al.* (2000) estudando 64 trabalhadores agrícolas da cidade de Almería (Espanha), expostos a uma mistura de pesticidas, e que dentre os pesticidas presentes nessa mistura tinha a

Ciromazina. Verificaram um ligeiro aumento na frequência do MN nesses trabalhadores, porém não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle. Nesse trabalho, os autores ressaltam que os danos genéticos causados por agrotóxicos ocorrem somente em populações humanas sujeitas a níveis elevados de exposição devido ao uso intensivo, indevido ou também pelo falta de medidas de controle. No presente estudo, entretanto, foi visto que mesmo os pesticidas sendo utilizados em baixas doses e com um curto período de exposição, eles são compostos altamente capazes de causar danos ao material genético.

Em estudo realizado por Piperakis *et al.* (2006), foi demonstrado que ao analisar a variância de seus dados, os pesquisadores verificaram que não houve diferenças significativas no nível de danos no DNA basal entre o controle não fumante e os trabalhadores do efeito estufa não fumantes ( $p > 0,05$ ) e nem entre os controles de fumante e trabalhadores fumante estufa ( $p > 0,05$ ). Embora os grupos de fumantes tivessem níveis um pouco maior de danos do DNA, as observações indicaram que nem fumar, nem a exposição a pesticidas tinha um efeito significativo sobre os níveis basais de danos no DNA.

Outro fator bastante intrigante com relação ao presente estudo é o que se refere à questão da segurança alimentar. A ANVISA, órgão brasileiro competente por avaliar os resíduos de pesticidas na alimentação humana, preconiza o IDA para a Ciromazina de 0,02 mg/Kg p.c. Ao analisar o grupo C2 estes animais foram submetidos ao tratamento que era considerado o IDA para os camundongos, e o que obtivemos como resultado foi que nessa concentração houve o maior índice e frequência de danos ao DNA. Diante do exposto temos um problema grave com

relação à saúde e a segurança alimentar, uma vez que para a determinação do IDA são realizados vários estudos toxicológicos com o objetivo de determinar uma padronização de concentração segura que não causará danos a saúde do homem. Amaral (2013), trás em seu estudo uma análise crítica dos valores dos IDAs estabelecidos pela ANVISA para vários praguicidas no Brasil, quando relacionando com os IDAs preconizados pelas Agências Internacionais de Organização Mundial de Saúde (OMS), a Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA), e pela European Food Safety Authority (EFSA). Ao realizar esta comparação foi constatado que para a Ciromaina, existe uma diferença entre os IDAs para cada desses órgãos. No Brasil a IDA é de 0,02 mg/Kg p.c /dia, já para a OMS a IDA 0,06 mg/Kg p.c /dia; a EPA determina como sendo 0,015 mg/Kg p.c /dia; e a EFSA é igual a IDA da OMS. Amaral, relata que estas disparidades ocorrida entre os IDAs esta relacionada aos parâmetros de análise estabelecidos por cada uma das agências. A OMS considerou o rato a espécie mais sensível aos efeitos dos pesticidas e por isto esse é utilizado para avaliar os efeitos dos agrotóxicos, enquanto que para EFSA é o camundongo e para a EPA os animais utilizados são cães. Além do tempo de exposição para a determinação dos IDAs entre as agências serem diferentes. Diante deste contexto, deve-se elaborar um plano de política pública que seja mais uniforme para a determinação dos IDA no mundo. Uma vez que alterações genéticas, e até mesmo a cacinogênese, são deconrrentes da exposição do homem a IDA dos pesticidas, desta maneira este assunto deve ser mais bem padronizado entre as agências para evitar risco à saúde alimentar.

Foi visto no presente estudo que o grupo C1, apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados os danos causados pela

Ciromazina entre os sexos. Entretanto, com o número escasso de trabalhos a cerca deste pesticida, não foi encontrado nenhum trabalho na literatura que relate este tipo de evento para os efeito da exposição à Ciromazina.

Trabalhos como este são de fundamental importância para a comunidade científica, visto que a maioria dos estudos a cerca do efeito genotóxico de pesticidas se detém em investigar o efeito da mistura, ou da exposição alimentar ou pela exposição ocupacional. Entretanto, como resalta Grisolia (2005), os pesticidas apresentam um grande poder de interação entre suas próprias moléculas, e entre as moléculas dos pesticidas ao qual estão sendo misturados, e a interação entre as moléculas dos pesticidas e o meio ambiente e os organismos. É fundamental saber não somente a interação destas misturas de pesticidas, mas como também a interação de um único pesticida com o organismo e o meio ambiente. Desta forma, podem ser criados mecanismos de proteção mais eficazes contra a exposição e degradação do material genético.

## **2.6 Agradecimentos**

A Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido para a realização deste estudo. Aos Laboratórios de de Biotecnologia e Fármacos e o de Genética da Universidade Federal de Pernambuco do Centro Acadêmico de Vitória de Santo (CAV) , pelo aparato técnico disponibilizado para o desenvolvimento desta pesquisa.

## 2.7 Referências

Amaral LMS (2013) Análise crítica dos valores de Ingestão Diária Aceitável estabelecidos para praguicidas no Brasil, em relação as agências internacionais e a Agência de Proteção Ambiental Americana, e suas implicações na avaliação do risco. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA), dados da coleta e análise de alimentos de 2010, available in: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) (01dez 2013)

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Nota técnica. Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo forato (2012), available in: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c480ff804f1d75bba8ddbcc88f4b6a31/Nota+T%C3%A9cnica+do+forato.pdf?MOD=AJPERES> (13 de dezembro de 2013).

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (2011), available in: <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/z> (11 de dezembro de 2013).

Bolognesi C (2003) Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutacion Revit.* 543:251-272.

Costa C, Silva S, Coelho P, Roma-Torres J, Teixeira JP, and Mayan O (2007) Micronucleus analysis in a Portuguese population exposed to pesticides: Preliminary survey. *Int. J. Hyg. Environ.-Health* 210:415–418.

Dossiê Abrasco (2012) Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde. World Nutrition – Rio.

Dallegrave E (2006) Toxicologia clínica: Aspectos teóricos-práticas. Porto Alegre: UFRGS, 44-61.

El-Gazzar L M, Patterson RS, and Koehler P G (1988) Activity of chitin synthesis inhibitors on the cat flea, *Ctenocephalides felis* bouche. J. Agric. Entomol 5:117-120.

Fantke P, Rainer F, and Olivier J (2012) Health impact and damage cost assessment of pesticides in Europe. Environment International 49:9–17.

Finizio A, Calliera M, and Vighi M (2001) Rating Systems for Pesticide Risk Classification on Different Ecosystems. Ecotoxicology and Environmental Safety 49:262-274.

Graf JF (1993) The Role of Insect Growth Regulators in Arthropod Control. Parasitol Today 9: 471-474.

Grisolia CK (2005) Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Brasília: Editora Universidade de Brasília, p. 392.

Krishna C, and Hayashi M (2000) In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. Mutation Research 45: 155-166.

Lucero L, Pastor S, Suarez S, Durban R, Gomez C, Parron T, Creus A, and Marcos R (2000) Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. Mutat. Res. 464: 255-262.

OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects: Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, França, 2009. (20 dez 2013)

Peres F, Oliveira-SilvaJJ, Della-Rosa HV, e Lucca SR (2005) Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. Ciência & Saúde Coletiva 10: 27-37.

Piperakis SM, Kontogianni K, Siffel C, and Piperakis MM (2006) Measuring the effects of pesticides on occupationally exposed humans with the comet assay. *Environ Toxicol.* 21:355–364.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, and Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184-191.

SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas) Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Centro na Região Nordeste, 2010. Available in: <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/media/b4.pdf](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/b4.pdf)> and <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/media/nd1.pdf](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/nd1.pdf)> (20 dez de 2013).

Tice RR, Argurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, and Sasaki YF (2000) Single cell gel/ Comet assay: Guidelines for in Vitro and in Vivo genetic toxicology testing, *environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221.

## CAPÍTULO 3

### ANÁLISE DA GENOTOXIDADE AGUDA *IN VIVO* DO PESTICIDA MANCOZEB EM BAIXAS DOSES

Wanessa Botelho Marques Cabral<sup>1</sup> e Cristiano Aparecido Chagas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>: Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco- Centro Acadêmico de Vitória, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup> Grupo de pesquisa em Genotoxicidade aplicada à Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco- Centro Acadêmico de Vitória, Pernambuco, Brasil.

\* Corresponding author: Centro Acadêmico de Vitória, Alto do Reservatório, S/N, Bairro Bela Vista, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brasil. Tel.: +55 81 35230670.

E-mail address: cristiano.chagas@ufpe.br (C. Chagas)

Artigo a ser submetido para a Revista: **Genetics and Molecular Biology**

### 3.1 Resumo

Os agrotóxicos são muito utilizados para controlar pragas e doenças que atingem as lavouras brasileiras. Entretanto, a má utilização aliada a escasse de estudos, tem feito com que o número de casos de intoxicação de diferentes graus atinja agricultores, consumidores, animais e vegetais, tornando-se um problema de saúde pública e ambiental. O Mancozeb é um fungicida mundialmente utilizado, apesar de ser classificado como extremamente tóxico ao homem e ser um produto muito perigoso ao meio ambiente. Estudos acerca dos efeitos nocivos do Mancozeb em organismos expostos as baixas doses e a períodos de curta exposição são escassos. Desta forma, o presente estudo investigou o efeito genotóxico agudo da formulação comercial Dithame NT (Mancozeb), em dose abaixo da ingestão diária aceitável (IDA). Para avaliar a genotoxicidade desse composto, foi realizado o teste de micronúcleo em reticulócitos do sangue periférico e o ensaio cometa em células sanguíneas. Sendo utilizados 50 camundongos *Mus musculus*, de ambos os sexos, divididos em cinco grupos: CN (controle negativo); C1 ( $3,76 \cdot 10^{-4}$  mg/Kg); C2 ( $7,52 \cdot 10^{-4}$  mg/Kg); C3 ( $7,52 \cdot 10^{-3}$  mg/Kg); CP- controle positivo (20 mg/kg de ciclofosfamida). O teste do ensaio cometa revelou que o grupo C2 (equivalente ao IDA) apresentou potencial genotóxico. Já o teste do micronúcleo não foi constatado ação mutagênica. Ao comparado a genotoxicidade entre os sexos, grupo C3 mostrou-se estatisticamente significativa. Esses estudos trazem um grande alerta para a população brasileira, pois demonstraram que mesmo em doses consideradas aceitáveis para o Mancozeb, ainda sim, ele é capaz de causar danos a molécula de DNA.

**Palavras Chaves:** Dithame NT, Ambiental, Agrotóxico, Ensaio Cometa, Micronúcleo.

### 3.2 Introdução

Os agrotóxicos, também chamados de praguicidas, pesticidas, biocidas, fitossanitários, defensivos agrícolas e agroquímicos (Tomyta, 2005), foram introduzidos no Brasil em um período que ficou conhecido como a modernização da agricultura nacional, também chamado de revolução verde, que ocorreu entre 1945 e 1985 (Pelaez et al., 2010). A partir do ano de 2008 até os dias atuais o Brasil passou a ocupar o primeiro lugar no *ranking* dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (ANVISA, 2013). Como resultado, houve aumento no número de casos de intoxicação de diferentes graus que atinge agricultores, consumidores, além de espécies de animais e vegetais, levando a um problema de saúde pública e ambiental (Peres et al., 2005).

Diversos trabalhos realizados em vários países demonstram que parte da contaminação mundial por agrotóxico ocorre através da alimentação (Caldas et al., 2000; Akoto et al., 2013; Gad Alla et al., 2013). Gebara et al. (2011) e Tutu et al. (2013) demonstraram que a contaminação dos alimentos pode afetar até as crianças. Para garantir a segurança alimentar e diminuir a exposição dos seres humanos a resíduos de pesticidas na alimentação, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina o Índice de Dieta Aceitável (IDA), definindo a estimativa da quantidade de agrotóxico no alimento ou bebida, expressa em base de peso corpóreo, que pode ser ingerida diariamente por toda vida sem causar risco à saúde; é estabelecida em unidades de miligrama por kg de peso corpóreo (mg/Kg p.c.) (ANVISA, 2013).

O Mancozeb é um pesticida mundialmente utilizado como fungicida para proteger frutas, legumes e outras culturas contra um largo espectro de doenças

fúngicas (Grisolia, 2005; Domico et al., 2006 ). Delgado & Paumgartten (2004) revelaram que o mancozeb foi o ditiocarbamato mais utilizado em propriedades rurais, apresentando percentual de 44% de presença.

De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), o Mancozeb é definido como um fungicida de classificação toxicológica I, ou seja, como extremamente tóxico. Já para a classificação de periculosidade ambiental, o Mancozeb está enquadrado na classe II, ou seja, é considerado um produto muito perigoso ao meio ambiente. Apesar de vários estudos indicarem uma elevada toxicidade, este agrotóxico continua sendo um dos pesticidas mais usados no mundo, devido à sua eficácia, baixo custo e baixa persistência no ambiente quando comparado com outros pesticidas.

Embora os estudos sobre os efeitos biológicos dos ditiocarbamatos tenham aumentado nos últimos anos, faltam investigações acerca dos efeitos nocivos do Mancozeb em organismos expostos a baixa doses e a períodos de tempo pequeno de exposição, uma vez que a maioria dos estudos enfocam os efeitos causados por grandes doses e por grande tempo de exposição. Assim, o presente estudo avaliou o efeito genotóxico agudo de uma formulação comercial de Mancozeb em dose abaixo do IDA determinada pela ANVISA, em camundongos *Mus musculus* utilizando o teste do micronúcleo em reticulócitos do sangue periférico (Mn) e o ensaio cometa em células sanguíneas.

### 3.3 Material e Métodos

#### 3.3.1 Animais e tratamento

Foram utilizados 50 camundongos (25 machos e 25 fêmeas) da espécie *Mus Musculus*, pesando entre 30 e 50 g e com idade aproximada de 8 semanas. Os animais foram cedidos pelo Biotério da Universidade Federal de Pernambuco do campus de Vitória de Santo Antão (UFPE-CAV), local onde foi realizado todo o procedimento experimental. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com cinco animais do mesmo sexo por caixa, com temperatura de  $22^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ , umidade relativa de  $50 \pm 5\%$ , com ciclo de 12 horas luz/escuro; se alimentavam com água filtrada e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação institucional Animal (CEEA-23076.018079/2011-16) da UFPE.

#### 3.3.2 Deliniamento Experimental

Os camundongos foram divididos em cinco grupos, de acordo com os tratamentos experimentais. Cada grupo continha 10 animais, com cinco machos e cinco fêmeas. Foi usado o pesticida Dithame NT, uma formulação comercial como o princípio ativo o Mancozeb. O primeiro grupo recebeu o veículo de diluição (água destilada) e foi denominado de grupo controle negativo (CN); o segundo grupo recebeu o agrotóxico na concentração de  $3,76 \cdot 10^{-4} \text{ mg/Kg}$  e foi chamado de grupo concentração 1 (C1); o terceiro grupo recebeu o agrotóxico na concentração de  $7,52 \cdot 10^{-4} \text{ mg/Kg}$  e foi chamado de grupo concentração 2 (C2); o quarto grupo

recebeu o agrotóxico na concentração de  $7,52 \cdot 10^{-3}$  mg/Kg e foi chamado de grupo concentração 3 (C3); o quinto, e último grupo, foi chamado de controle positivo (CP) e recebeu através de injeção intraperitoneal 20 mg/kg p.c. de ciclofosfamida, droga sabidamente mutagênica.

Os tratamentos foram realizados por meio de sonda esofágica (gavagem). O procedimento experimental teve duração de três dias. Os animais receberam duas doses, de 1 mL por dose ao dia do praguicida, ou de água no caso do grupo controle negativo. A primeira coleta sanguínea foi realizada após 24 horas da primeira gavagem e o sangue foi usado para a realização do ensaio cometa. A segunda coleta sanguínea ocorreu após 48 horas do início da primeira gavagem e o sangue coletado foi usado para realização do teste do micronúcleo. Nas duas coletas, o sangue foi colocado em vacuette contendo EDTA (VACUETTE® K3 EDTA Tube) para evitar coagulação.

### **3.3.3 Teste do Micronúcleo**

O teste do micronúcleo foi realizado de acordo com o protocolo sugerido por Krishna et al. (2000). As lâminas foram preparadas como o corante laranja de acridina um dia antes da coleta do material biológico. Logo após a coleta, 10µl de sangue periférico eram diluídos e homogeneizados em 20 µl de soro fisiológico. Em seguida, 15 µl do homogeneizado era colocado na região central de uma lâmina previamente preparada, sendo então coberta com uma lamínula 24 x 50 mm. Foram preparadas três lâminas para cada animal, e todas as etapas de preparação e análise foram realizadas na ausência de luz branca para evitar a degradação do material genético e do corante.

Foram analisados 2000 reticulócitos por animal, quanto à presença ou ausência de micronúcleos (OCDE, 2009). As análises das lâminas foram feitas no microscópio de fluorescência Nikon modelo Eclipse 80i, utilizando o filtro de cor verde, com comprimento de onda de 515-555 nm, no Laboratório de Genética da UFPE-CAV.

### **3.3.4 Ensaio Cometa**

O teste do ensaio cometa foi realizado segundo protocolo estabelecido por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000), com pequenas modificações. Para a montagem das lâminas 15 µl do sangue periférico coletado, foram misturados e homogeneizados com 100 µl de agarose de baixo ponto de fusão (agarose LM à 37°C). Desta mistura, 100 uL foram colocados sobre a lâmina contendo agarose e posteriormente coberta com lamínula 24 x 50 mm para espalhar a mistura sangue-agarose. As lâminas foram deixadas por 20 minutos na geladeira. Depois de transcorrido o tempo às lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em uma cuba histológica protegida da luz, contendo solução de lise uso (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100 e DMSO 10%, pH 10). Para cada animal duas lâminas foram preparadas e analisadas.

Passado os três dias, as lâminas eram retiradas da solução de lise uso e submetidas à eletroforese horizontal. Para permitir o desenrolamento do DNA, as lâminas eram colocadas na cuba de eletroforese e deixada 20 minutos imersas no tampão alcalino de eletroforese (NaOH 1 M e EDTA 200 mM, pH 13). A fonte da eletroforese estava ajustada com a voltagem de 40 V, corrente 300 mA e o tempo da corrida era de 20 minutos. Ao final da corrida as lâminas foram colocadas no tampão

de neutralizadas com 0.4M de Tris-HCL e pH 7.5, por 15 minutos. Após a neutralização as lâminas eram submetidas à etapa de desidratação, sendo imersas em álcool absoluto por 5 minutos.

A etapa de coloração das lâminas foi realizada com o corante Brometo de Etídio, na concentração de 79,25  $\mu$ M. As análises das lâminas foram feitas no microscópio de fluorescência Nikon modelo Eclipse 80i utilizando o filtro de cor azul, com comprimento de onda 435-485 nm, do Laboratório de Genética da UFPE-CAV. Foram analisadas 100 nucleóides para cada animal, totalizando 1.000 nucleóides por grupo tratado (Collins et al., 2008). Sendo assim, quantificado a frequência de dano (FD) e o índice de dano (ID), para avaliar o potencial genotóxico do pesticida Ciromazina.

### **3.3.5 Análise estatística**

Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para comparação entre os grupos tratados e o controle negativo, tanto para o MN quanto para o ensaio cometa. O teste de Mann-Whitney foi usado para verificar a diferença de danos genéticos entre machos e fêmeas grupo a grupo. Em todos os casos, o  $\alpha$  era igual 0,05 e as análises foram realizadas com o *software* **SPSS Statistics 20.**

### 3.4 Resultados

O Mancozeb se mostrou genotóxico na concentração 2, quando foi testado pelo ensaio cometa, utilizando-se o marcador ID. Tal marcador se mostrou mais elevado no grupo 2 do que no grupo CN, e tal aumento foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). As concentrações 1 e 3 não se mostraram diferentes estatisticamente do grupo CN, em relação ao ID. Nenhum dos grupos foi estatisticamente diferente do grupo CN, quando foram utilizados FD e MN. Estes marcadores não foram suficientemente sensíveis para detectar efeitos genotóxicos do mancozeb nas concentrações testadas aqui (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Resultados dos testes de genotoxicidade pelo teste do micronúcleo e ensaio cometa

Grupo	Testes		
	MN Média (DP)	ID Média (DP)	FD Média (DP)
Concentração 1	11.0 (3.5)	84.3 (61.7)	57.4 (44.1)
Concentração 2	19.30 (4.0)	143.3 (127.9) *	56.0 (46.5) *
Concentração 3	18.7 (6.0)	68.1 (21.6)	55.0 (47.1)
Controle negativo	12.7 (3.7)	8.8 (2.8)	11.8 (11.3)
Controle positivo	40.2 (19.51) *	-	-

DP: desvio padrão; MN: micronúcleo; ID: índice de dano pelo ensaio cometa; FD: fator de dano em percentagem pelo ensaio cometa; \* = diferença significativa com o controle negativo; \*\* diferença significativa com todos os grupos; - não realizado.

A análise grupo a grupo para se verificar diferenças em relação ao sexo dos animais demonstrou resultados interessantes, mas difíceis de serem explicados. Na C1, não houve diferença com o MN, mas houve diferença com ID e FD; ambos os

marcadores foram maiores nas fêmeas do que nos machos ( $p > 0,05$ ). Na C2, houve diferença com os biomarcadores ID e FD; mas neste grupo, machos apresentaram mais danos do que fêmeas ( $p > 0,05$ ); novamente, não houve diferença com o MN.

Na C3, houve diferença significativa com os três marcadores (ID, FD e MN), com fêmeas apresentando mais danos genéticos do que machos.

### 3.5 Discussão

No presente estudo verificamos que na concentração C2 o Agrotóxico Mancozeb apresentou diferença significativa no índice de danos quando comparada com a concentração CN, demonstrando assim que este pesticida é uma substância genotóxica.

O grupo C2, quanto ao dano e ao tempo de exposição, podemos constatar que mesmo tendo sido submetido ao IDA aceitável e um tempo de exposição curto, o grupo apresentou dano no material genético. Sendo corroborado com o trabalho realizado por Calviello et al., 2006, que ao expor durante 1 hora ao Mancozeb uma cultura de células preparada a partir do sangue periférico de ratos *Wistar*, observou que após a realização do ensaio cometa pode se evidenciar quebras significativas na fita de DNA das células e que estas foram dependentes das doses que foram expostas.

Srivastava et al., 2012 ao estudar culturas de células de linfócitos humanos, pode observar que quando essas foram submetidas a tratamentos com as seguintes doses 0.5, 2 e 5 mg/ml de Mancozeb, houve um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas e na formação de micronúcleos, de uma forma

também dependente da dose. Resultados também que corrobora com os dados da presente pesquisa, onde demonstrou que dependendo da dose de exposição ao pesticida houve a presença significativa da indução do micronúcleo.

Em contrapartida, o trabalho realizado por Goldoni & Silva (2012), divergiu dos resultados encontrados na presente pesquisa. Uma vez que ao estudar o efeito da exposição aguda ao pesticida Mancozeb no peixe *Astyanax jacuhiensis*, os autores observaram que não houve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) na frequência de micronúcleos entre o grupo controle e os quatro tratamentos (0,3 mg/L, 0,7 mg/L, 1,5mg/L e 2,5 mg/L) à base de Mancozeb, indicando que esse fungicida não apresenta evidências de genotoxicidade em peixes da espécie *Astyanax jacuhiensis*, quando expostos às estas concentrações.

Dessa forma, trabalhos sobre o biomonitoramento *in vivo* para estudar esse pesticida devem ser incentivados, já que na literatura a maioria dos trabalhos se preocupa em estudar os danos causados pela mistura de pesticidas através da exposição ocupacional. Entretanto, existem outras formas de contaminação por agrotóxicos, alimentação, exposição indireta e ambiental. Também não é muito relatado na literatura trabalhos que estudem os efeitos da interação do Mancozeb com organismos vivos e o meio ambiente, para revelar o seu potencial mutagênico. Visto que trabalhos para aferir a genotoxicidade desse praguicida são feito na sua maioria utilizando cultura de células ou através da exposição ocupacional induzida pela mistura de diferentes praguicidas. Como foi elucidado, mesmo em doses preconizada como aceitáveis pela ANVISA, foi constatado que o Mancozeb apresenta um grande potencial de indução de danos ao DNA em diferentes tipos de células.

### 3.6 Agradecimentos

A Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido para a realização deste estudo. Ao Laboratório de Biotecnologia e Fármacos e o Laboratório de Genética da Universidade Federal de Pernambuco do Centro Acadêmico de Vitória de Santo (CAV), pelo aparato técnico disponibilizado para o desenvolvimento desta pesquisa.

### 3.7 Referências

AGROFIT Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário. Disponível em <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 02 de agosto de 2013

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA), dados da coleta e análise de alimentos de 2010, available in: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) (01dez 2013)

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Nota técnica. Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo forato (2012), available in: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c480ff804f1d75bba8ddbccc88f4b6a31/Nota+T%C3%A9cnica+do+forato.pdf?MOD=AJPERES>> (13 de dezembro de 2013).

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (2011), available in: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/z>> (11 de dezembro de 2013).

Akoto O, Andoh H, Darko G, Eshun K, and Osei-Fosu P (2013) Health risk assessment of pesticides residue in maize and cowpea from Ejura, Ghana. *Chemosphere* 92: 67–73.

Caldas ED, Souza LCKR (2000) Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Ver. Saúde Pública.* 34:529-537

Calviello G, Piccioni E, Boninsegna A, Tedesco B, Maggiano N, Serini S, et al. (2006) DNA damage and apoptosis induction by the pesticide mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 211(2):87–96.

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaiva I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R (2008). REVIEW The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23:143-51.

DelgadoIF, and PaumgartenFJR (2004) Pesticide use and poisoning among farmers from the county of Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad. Saúde Pública Rio de Janeiro,* 20:180-186.

Domico LM , Zeevalk GD, Bernard LP, and Cooper KR (2006) Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. *NeuroToxicology* 27:816–825.

Gad Alla SA, Mohsen M, Ayoub, and Mohamed A (2013) Amer and Wasfi M. Thabet Dietary Intake of Pesticide Residues in some Egyptian Fruits. *Journal of Applied Sciences Research,* 9: 965-973.

Gebara AB, Ciscato CHP, Monteiro SH, Souza GS (2011) Pesticide residues in some commodities: dietary risk for children. *Bull Environ Contam Toxicol.* 86:506-510.

Goldoni A, and Silva LB (2012) MUTAGENIC POTENTIAL OF THE FUNGICIDE MANCOZEB IN *Astyanax jacuhiensis* (Teleostei: Characidae). *Bioscience Journal.* 28(2):297-301.

Grisolia CK (2005) *Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução.* Brasília: Editora Universidade de Brasília, p. 392. 2005.

Krishna C, and Hayashi M (2000) In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Reserarch* 45: 155-166.

OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects: Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, França, 2009. (20 dez 2013)

Peres F, Oliveira-SilvaJJ, Della-Rosa HV, e Lucca SR (2005) Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva* 10: 27-37.

Pelaez V, Terra FHB, Silva LR (2010) A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. *Revista de Economia.* 36: 27-48.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, and Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184-191.

Srivastava AK, Srivastava PK, Musarrat J, Al-Khedhairy AA, Shukla Y (2012) Allethrin-induced genotoxicity and oxidative stress in Swiss albino mice. *Mutat Res* 747:22–28.

Tomyta RY (2005) Legislação de agrotóxicos e sua contribuição para a proteção da qualidade do meio ambiente. São Paulo. Rocca. P 89-101.

Tutu AO, Yeboah PO, Golow AA, Adu-Kumi S, Clarke E, and Osei- Fosu P (2013) Levels of Organochlorine pesticide residues found in the breast milk of some first-birth mothers from a rural community (Ada) in Ghana. Elixir Pollution 54 : 12668-12672.

## CONCLUSÕES

A ingestão das formulações comerciais de Trigar 700 WP, (princípio ativo a Ciromazina) e do Dithame NT (princípio ativo o Mancozeb), se mostraram genotóxico nas concentrações C2 ( $5 \cdot 10^{-4}$  mg/Kg) e C2 ( $7,52 \cdot 10^{-4}$  mg/Kg) respectivamente. Para os camundongos em teste, essas concentrações equivalem a IDA. Para a ANVISA essa seria uma concentração segura e aceitável para ser ingerida diariamente sem causar danos aos animais. Entretanto, os resultados obtidos revelaram que mesmo submetido ao IDA aceitável e um tempo de exposição curto, essas concentrações ocasionaram danos ao material genético dos camundongos.

Diante do exposto temos um problema grave com relação à saúde e a segurança alimentar, uma vez que para a IDA seria uma dose ideal para ser consumida sem acarretar danos ao organismo. Dessa forma, trabalhos sobre o biomonitoramento *in vivo* para estudar esses pesticidas devem ser incentivados, já que na literatura a maioria dos trabalhos se preocupa em estudar os danos causados pela mistura de pesticidas através da exposição ocupacional. Assim como as IDAs preconizadas para esses pesticidas devem passar por uma reanálise toxicológica.

## REFERÊNCIAS

ABIFINA. Defensivos Agrícolas - notícias. In: Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades. Disponível em: <http://www.abifina.org.br>. Acessado 20 nov 2013.

ACQUAVELLA J, DOE J, TOMENSON J, CHESTER G, COWELL J, BLOEMEN L. Epidemiologic studies of occupational pesticide exposure and câncer: regulatory risk assessments and biologic plausibility. *Ann. Epidemiol.* 13(1)1-7. 2003.

AGROFIT-Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário. Disponível em <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 02 de agosto de 2013.

ALMUSSA, A; SCHMIDT, M. L. G.. O contato com agrotóxicos e os possíveis agravos à saúde de trabalhadores rurais. *Revista de Psicologia da UNESP*, 8(2), 186. 2009.

ALVES FILHO, PRADO J. Uso de Agrotóxicos no Brasil: Controle social e interesses corporativos. *Annablume/FAPESP*. São Paulo. 2002.

ANDRADEJR DR, et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 31:1. 2001.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Nota técnica. Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo forato (2012), Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c480ff804f1d75bba8ddbcc88f4b6a31/Nota+T%C3%A9cnica+do+forato.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 13 de dezembro de 2013.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Brasil destino de agrotóxicos banidos no exterior- O Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/noticias/impreso,brasil-se-torna-o-principal-destino-de-agrotoxicos-banidos-no-externo,558860,0.htm>. 2010.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (2011), Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/z>>. Acesso em: 11 de dezembro de 2013.

ARAUJO, A. C. P.; NOGUEIRA, D. P.; AUGUSTO, L. G. S.; Impacto dos praguicidas na saúde: estudo da cultura de tomate. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, 34(3), 2000. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102000000300016&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102000000300016&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 19 de dezembro de 2013.

ARBUCKLE TE, SEVER LE. Pesticide exposures and fetal death: a review of the epidemiologic literature. *Crit Ver Toxicol*, 28:229-270. 1998

ARNAIZ R R. Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. México: la ciência 2:95. 1995

BALDI I.; LEBAILLY P.; MOHAMMED-BRAHIM B.; LETENNEUR L.; DARTIGUES J. F.; BROCHARD P. Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. *American Journal of Epidemiology*, 157(5):409-14. 2003.

BARCELOUX D G. Manganês. *Clinical toxicology*. 37(2):293-307. 1999.

BALIGAR P N , KALI WAL B B. Reproductive toxicity of carbofuran to the female mice: effects on estrous cycle and follicles. *Ind. Health*. 40:345-352. 2002.

BELPOGGI F, SOFFRITTI M, GUARINO M, LAMBERTINI L, CEVOLANI D, MALTONI C. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 982:123-136.2002.

BETARBET R, SHERER T B, MACKENZIE G, GARCIA-OSUNA M, PANOV A V, and GREENAMYRE J T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *nature neuroscience* . 3 no 12 • december 2000

BETTI, C.; BARALE, R.; POOL-ZOBEL, B. L. Comparative studies on cytotoxic and genotoxic effects of two organic mercury compounds in lymphocytes and gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rats. *Environ Mol Mutagen*. 22:172-180. 1993.

Brasil. Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 jul.1989.*

BOLOGNESI C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutacion Revit*. 543:251-272. 2003.

BONASSI S, et al. Na increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of câncer in human. *Carcinogenesis Advanced Acess*. 28:625-631. 2006.

BRETVELD R. W.; THOMAS C. M.; SCHEEPERS P. T.; ZIELHUIS G. A.; ROELEVELD N. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4:30. 2006.

BULL, D. e HATHAWAY, D. Pragas e Venenos: Agrotóxicos no Brasil e no terceiro Mundo. Petrópolis, Vozes/OXFAN/FASE, 1986.

CARAPETO C.– Poluição das águas: causas e efeitos, 1ª ed. Universidade Aberta, Lisboa. 1999.

CARSON, R.; Primavera Silenciosa. Crítica Barcelona, 2010.

CARVALHO, N. L.; PIVOTO, T. S. Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônômica. Revista Monografias Ambientais, [S.I.], 2(2), p. 176-192, mar. 2011. ISSN 2236-1308. Disponível em: <<http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/remoa/article/view/2315>>. Acesso em: 07 de novembro de 2013.

CARVALHO P H V. Desenvolvimento de método para determinação de resíduos de pesticidas em plantas medicinais *Cordia salicifolia* por GC/MS e HPLC/UV empregando dispersão da matriz em fase sólida. Dissertação de mestrado, UFS, 2009.

CASTRO V. L. S. S.. Uso de Misturas de Agrotóxicos na Agricultura e Suas Implicações Toxicológicas na Saúde, J. Braz. Soc. Ecotoxicol. 4 : 87-94, 2009.

CHANDLER, L. Annual Report for 1976. Goiânia, USAID/EMBRAPA-CNPAF/PURDUE, 1977. 47p.

CHRISTIN, M.-S.; GENDRON, A. D.; BROUSSEAU, P.; MÉNARD, L.; MARCOGLIESE, D. J.; CYR, D.; RUBY, S.; FOURNIER, M. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22:1127–1133., 2003.

COPPLESTONE J. F.; The development of the WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard. *Bull World Health Organ*, 66:545-51.1988.

COOK A M, and HUTTER R. s-Triazines as nitrogen sources for bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 29:1135-1143.1981.

CORSINI E.; LIESIVUORI J.; VERGIEVA T.; VAN LOVEREN H.; COLOSIO C. Effects of pesticide exposure on the human immune system. *Human e Experimental Toxicology*. 27:671-680, 2008.

DAMS, R. I. Pesticidas: Usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, 7(2). 2006.

DE ARAÚJO A. J.; et al. Multiple exposure to pesticides and impacts on health: a cross-section study of 102 rural workers, Nova Friburgo, Rio de Janeiro State, Brazil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12(1):115-30. 2007.

DE ROOS E ANNECLAIRE J., et al. Cancer incidence among Glyphosate-Exposed Pesticide Applicators in the agricultural Health study. *Environmental Health Perspectives*. V. 113, n1, p.49-54, 2005.

DELGADO I F, PAUMGARTTEN FJ R. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. *Cad.Súde Pública* 20(1):180-186. 2004.

DELLA LUCIA, T.M.C. & CHANDLER, L. Tabela de vida das culturas aplicadas às pragas de *Phaseolus vulgaris* L. sob tratamento com carbofuran em quatro níveis de adubação NPK. *Revista Ceres, Viçosa*, 32(181):227-251. 1985.

DOMICO L M , ZEEVALK G D, BERNARD L P, and COOPER K R. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. *NeuroToxicology* 27:816–825. 2006.

DOMINGUES, Mara Regina et. al. Agrotóxicos: Risco à Saúde do Trabalhador Rural. *Rev. Ciências biológicas e da Saúde, Londrina*, v. 25, p. 45-54. 2004.

DORES E F G C, DE-LAMONICA-FREIRE E. Contaminação do ambiente aquática por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso- Análise preliminary. *Química Nova*. 24(1):27-36. 2001.

ELBETIEHA A.; DA'AS S. I.; KHAMAS W.; DARMANI H. Evaluation of the toxic potentials of cypermethrin pesticide on some reproductive and fertility parameters in the male rats. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 41(4):522-8. 2001.

EI-Gazzar L M, Patterson RS, and Koehler P G. Activity of chitin synthesis inhibitors on the cat flea, *Ctenocephalides felis* bouche. *J. Agric. Entomol* 5:117-120. 1988.

EL-SHAHABY AO et al. Genotoxicity screening of industrial Wasterwater using the *Allium Cepa* Chromosome Aberration Assay. *Pak.Joun.Biol.Sci.* 42(6):181-189.2003.

ENGEL L, CHECKOWAY H, KEIFER M, SEIXAS N, LONGSTRETH W, SCOTT K, HUDNELL K, ANGER W, CAMICOLI R. Parkinsonism and occupational exposure to pesticides, *Occup. Environ. Med* 58:581-589. 2001

ERDTMANN B, HENRIQUES JAP, SILVA J. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.

ESKENAZI B , Kim Harley,<sup>1</sup> Asa Bradman,<sup>1</sup> Erin Weltzien,<sup>1</sup> Nicholas P. Jewell,<sup>1</sup> Dana B. Barr,<sup>2</sup> Clement E. Furlong,<sup>3</sup> and Nina T. Holland<sup>1</sup> • Association of in Utero Organophosphate Pesticide Exposure and Fetal Growth and Length of Gestation in an Agricultural Population. *Environmental Health Perspectives* 112:1116–1124.2004.

ESTRADA M. Uso moderado de plaguicida en México. *Memorias, ciclo de conferencias "Hacia uma renovación ambiental em México"*. Facultad de Ciências Biológicas, Universidad Autónoma Del Estado de Morelos. 1998.

FAIRBAIRN D W, OLIVE P L, AND O'NEILL K L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339:37-59. 1995.

FARIA N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, Mar. 2007.

FANTKE P, RAINER F, and OLIVIER J . Health impact and damage cost assessment of pesticides in Europe. *Environment International* 49:9–17. 2012.

FEHLBERG, L.; LUTZ, L. V.; MOREIRA, A. Agrotóxicos e seus Efeitos Sócio-Culturais: Zona Rural do Valão de São Lourenço. *Natureza On Line*, Santa Tereza, 1(2), p. 51-55. 2003.

FERREIRA A L A, MATSUBARA L S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 4(1)61-68. 1997

FINIZIO A, M. CALLIERA, and VIGHI M. Rating Systems for Pesticide Risk Classification on Different Ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49: 262-274 .2001.

FORMENTI, L. Brasil se torna o principal destino de agrotóxicos banidos no exterior. O Estado de São Paulo, 2010. Disponível em < <http://www.estadao.com.br/noticias/impresso,brasil-se-torna-o-principal-destino-de-agrotoxicos-banidos-no-externio,558860,0.htm> >. Acesso em: 05 de dezembro de 2013.

GALLOWAY T.; HANDY R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology*, 12(1-4):345-63. 2003.

GARCIA, E. G. Segurança e saúde no trabalho rural: a questão dos agrotóxicos. São Paulo: Fundacentro, 182. 2001.

GARRIDO L R , SONEGO OR. Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado. Porto Alegre: EMBRAPA, 10-16.2003

GAUTHIER E, FORTIER I, COURCHESNE F, et al. Environmental pesticide exposure as a risk factor for Alzheimer's disease: a casecontrol study. *Environ Res*. 86:37-45. 2001.

GISI U, and SIEROTZKI H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *Eur. J. Plant. Pathol.* 122:157-167.2008.

GOAD R. T.; GOAD J. T.; ATIEH B. H.; GUPTA R. C.; Carbofuran-induced endocrine disruption in adult male rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 14(4):233-9. 2004.

GRAF J F. The Role of Insect Growth Regulators in Arthropod Control. *Parasitol Today* 9: 471-474. 1993.

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

GROTEN, J.P.; FERON, V.J.; S€ UHNEL, J. Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends Pharmacological Science*, v.22, p.316–321, 2001.

GROVER IS, MALHI PK. Genotoxic effects of some organophosphorous pesticides. Induction of micronuclei in bone marrow cells in rat. *Mutat. Res.* 155(3):131-140.1985

HANKE W.; JUREWICZ J. The risk of adverse reproductive and developmental disorders due to occupational pesticide exposure: an overview of current epidemiological evidence. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 17(2):223-43. 2004.

HAYASHI M, MORITA T, KODAMA Y, SOFUNI T and ISHIDATE JR M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*.245:245-249.1990.

HAYES T. B.; COLLINS A.; LEE M.; MENDOZA M.; NORIEGA N.; STUART A. A.; VONK A. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 99(8):5476–80. 2002.

HECK H A, TYL R W. The induction of bladder Stones by terephthalic acid, dimethyl terephthalate, and melanine (2,4,6-triamino-s-triazine) and its relevance to the risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 5(3):294-313. 1985.

HEDDLE J A, HITE M, IRKHART B, MACGREGOR J T E, SALAMONE M F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity- a measure of the US environmental protection agency gene-tox program. *Mutation Research*. 123(1):61-118.1983.

HSDB- HAZARDOUS Substances Data Bank. Manganese; National Library Medicine; Center for Occupational Health and Safety. 2000.

JAGA K, DHARMANI C. Epidemiology os pesticide exposure and câncer: a review. *Ver. Environ. Hlth.* 20:15-38. 2005.

JENNER P. Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci*, 24:245-247. 2001.

JIA Z, and MISRA H P. Reactive oxygen species in in vitro pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: Role of NFkB and caspase-3. *Biology & Medicine* 42 : 288–298, 2007.

KRISHNA C, and HAYASHI M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Reserarch* 45: 155-166. 2000.

KIMURA K.; YOKOYAMA K.; SATO H.; NORDIN R. B.; NAING L.; KIMURA S.; OKABE S.; MAENO T.; KOBAYASHI Y.; KITAMURA F.; ARAKI S. Effects of pesticides on the peripheral and central nervous system in tobacco farmers in Malaysia: studies on peripheral nerve conduction, brain-evoked potentials and computerized posturography. *Ind. Health*, 43(2):285-94. 2005.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 18(2), 435-445. 2002. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X20020002000008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X20020002000008&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 19 de dezembro de 2013.

KOLANKAYA D, OGUS A , AYAS Z, AKAY M T. Ethylenebisdithiocarbamate manganese (Maneb) and ethylenethiourea (ETU) residues in different parts of the tomato plant and soil. *Food chemistry*. 34(3):181-186. 1989.

KOSZ-VNENCHAK M, ROKOSZ K. The "comet" assay for detection of potential genotoxicity of polluted water. *Folia Biologica*. 45(3-4):153-156. 1997.

KSHEERASAGAR RL, KALIWAL B. Temporal effects of mancozeb on testes, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 14:9-17. 2003.

JI B T, SILVERMAN D T, STEWART P A, et al. Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *Am. J. Ind. Med*. 39:92-99. 2001.

JOSHI S C, GULATI N, GAJRAJ A. Evaluation of toxic impacts of mancozeb on testis in rats. *Journal of Experimental Sciences*. 19(1):73-83.2005.

LA VECHIA C, NEGRI E, d'EVANZO B, FRANCHESCHI S. Occupation and lymphoid neoplasms. *BR. J. Cancer*, 60:385-388. 1989.

LAVADO R.; THIBAUT R.; RALDÚA D.; MARTÍN R.; PORTE C.; First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196(2):247–57. 2004.

LEMES V R. et al. Avaliação de resíduos de ditiocarbomatos e etilenourea (ETU) em mamão e sua aplicação na saúde pública. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 64(1):50-57. 2005.

LI Q.; KOBAYASHI M.; KAWADA T. Organophosphorus pesticides induce apoptosis in human NK cells. *Toxicology*, 239(1-2):89-95. 2007.

LIM L O, SCHERER S J, SHULER K D, and TOTH J P. Disposition of cyromazine in plants under environmental conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 38: 860-864. 1990.

LUZ N B, SANTOS H P, MELO G W. Avaliação da resposta espectral de folhas de aveia preta (*Avena strigosa*) cultivadas em diferentes solos da Serra Gaúcha, com adição de cobre e material orgânico. In: anais do SBSR, 11. 2003.

MACGREGOR JT, WEHR CM, GOULD DR. Clastogen induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environmental International*, 35:1155-1159.2009.

MATSUMOTO, S. T.; MALAGUTI, M.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxic potential due to the action of an effluent contaminated with chromium, by the comet assay in CHO-K1 cultures, *Caryologia*, v. 58, n. 1, p. 40-46. 2005.

MEDJDOUB A, MERZOUK S A, MERZOUK H, CHIALI F Z, NARCE M. Effects of Mancozeb and Metribuzin on in vitro proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 101:27-33. 2011.

MELNICK L. Viruses, oncogenes and câncer. 5(2):123-127. 1985.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. .K. Detection of DNA strand breaks in brown trout *Salmo trutta* hepatocytes and blood cells using the single-gel electrophoresis comet assay. *Aquatic Toxicology*, New York, v. 41, p. 161-182, 1998.

MONTEITH D K, VANSTONE J. Comparison of the microge electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. *Mutation Research*. 345(3):97-103. 1995.

MORETTO A, and COLOSIO C. Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: The example of Parkinson's disease. *NeuroToxicology* 32:383–391. 2011.

MOURA, R.M. Agrotóxicos: Heróis ou Vilões? A face da questão que todos devem saber. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*,4:23-49. 2007.

MOURA, R.M. Rachel Carson e os agrotóxicos, 45 anos após Primavera Silenciosa. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife, vols 5 e 6, p.44-42, 2008-2009.

MENK M, CHEN IP, ANGELIS HJ, SCHUBERT I. DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. *Mutat. Res*. 493:87-93. 2001.

NATARAJAN A T. Chromosome aberration: Past, present and future. *Mutation Research*. 504(6):3-16.2002.

NICOLOPOULOU P.; STAMANTI P.; The impact of endocrine disrupters on the female reproductive system. *Human Reproduction Update*, 7(3):323–30. 2001.

NORDBY K C, ANDERSEN A, IRGENS L M, KISTENSEN P. Indicators of mancozeb exposure in relation to thyroid câncer and neural tube defects in farmer's families. *Scandinavian Journal of Work Environmental and Health*. 31(2): 89-96. 2005.

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

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogenicity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay, *Radiation Res*. 122: 86-94. 1990.

OLIVE, P. L.; WLODEK D.; BANÁTH, J. P. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis, *Cancer Res*. 51:4671-4676. 1991.

OPAS- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Manual de Vigilância da Saúde de população exposta a agrotóxicos. Brasília: Organização Pan-Americana de Saúde. 2000.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación - FAO. Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Roma; 1990.

OSTLING O, JOHANSON KJ. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 123:291-298. 1984.

PETRELLI G, FIGA-TALAMANCA I, TROPEANO R, TANGUCCI M, CINI C, AQUILANI S, GSPERINI L, and MELI P. Reproductive malemediated risk: spontaneous abortion among wives of pesticide applicators. *European Journal of Epidemiology*, 16:391-393. 2000.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. (org.). É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. 384p.

PERES F, OLIVEIRA-SILVA J J, DELLA-ROSA H V, e LUCCA S R. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva* 10: 27-37. 2005.

PELAEZ V, TERRA F H B, SILVA L R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. *Revista de Economia*. 36: 27-48. 2010.

PIGNATI WA, MACHADO JNH. CABRAL JF. Acidente rural ampliado: o caso das "chuvas" de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde-MT. *Ciênc. Saúde colet*. 12 (1):105-114. 2007.

RAWLINGS N, COOK S, WALDBILLING D. Effects of the pesticides carbofuran, chlorpyrifos, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2-3-D, and pentachlorophenol on

metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. *J. Toxicol. Environ Health.* 54:21-36. 1998.

REEDER A.; RUIZ M. O.; PESSIER A.; BROWN L. E.; LEVENGOOD J. M.; PHILLIPS C. A.; et al. Intersexuality and the cricket frog decline: Historic and geographic trends. *Environ Health Perspect*, 113(3):261–5. 2005.

ROSSI G, BUCCIONE R, BALDASSARE M, MACCHIARELLI G, PALMERINI M G, CECOONI S. Mancozeb exposure in vivo impairs mouse oocyte fertilizability. *Reproductive toxicology.* 21(2):216-119. 2006.

SANTOS, T. C. C.; CÂMARA, J. B. D. (Org.). *GEO Brasil 2002: perspectivas do meio ambiente no Brasil.* Brasília, DF: IBAMA, 2002.. 447p. il. Classificação: 333.715 Cutter: S237g

SASAKI Y F, IZUMIYAMA F, NISHIDATE E, ISHIBASHI S, TSUDA S, MATSUSAKA N, ASANO N, SAOTOME K, SOFUNI T, HAYASHI M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and alkaline single-cell-gel eletrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. *Mutation Res.* 393(1):133-139.1997.

SINGH N P, MCCOY M T, TICE R R, and SCHNEIDER E L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184-191. 1988.

SILVIA E J. Avaliação dos efeitos gentóxicos de agrotóxicos: Risco ocupacional e Alimentar. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, UFPE-CAV, 2012.

SILVIA J M, NOVATO-SILVA E, FARIAS H P, PINHEIRO T M M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. *Ciência e Saúde Coletiva.* 10:891-903. 2005.

SILVA J, et al. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis.* 23:1-8. 2008.

SILVA LR. Histórico da regulação dos agrotóxicos. 2007.

SHILS, J. & SHIKE, M. Modern Nutrition in health and disease. *Biological Trace Element Research.* 29: 133-136. 1994.

SHIMIDT W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: *Priciples and Methods for Their Detection* (Hollanender, A,Ed). 4:31-53.1976

SHUKLA Y, ANTONY M, KUMAR S, MEHROTRA N K. Carcinogenic activity of carbamate fungicide, mancozeb, on mouse skin. *Cancer Letters.* 53:191-195.1990.

SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. Petrópolis: Vozes. 56-59.2006.

SIMONIELLO M F, KLEINSORGE E C, SCAGNETTI J A, GRIGOLATO R A, POLETTA G L, CARBALLO M A. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures, *J. Appl. Toxicol*, 28:957–965. 2008.

SOLOMON, K. R.; STEPHENSON, G. R.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Praguicidas e o Meio Ambiente. ILSI Brasil, São Paulo, 2010.

SOUZA M V. Resíduos de agrotóxico ditiocarbomatos e organofosforados em alimentos consumidos no restaurante universitário - UNB: Avaliação da exposição humana. Monografia especialização em ciências da saúde- Universidade de Brasília. 2006.

SPADOTTO, C. A. Agricultura, tecnologia e meio ambiente. *Jornal do Engenheiro Agrônomo*, n. 242, p. 11, 2007. Classificação: Aq5 G2 Cutter: PAT 2007.

SRIVASTAVA A K, SRIVASTAVA P K, MUSARRAT J, AL-KHEDHAIRY A A, SHUKLA Y. Allethrin-induced genotoxicity and oxidative stress in Swiss albino mice. *Mutat Res* 747:22–28. 2012.

STEERENBERG P, AMELSVOORT L V, COLOSIO C, CORSINI E, FUSTINONI S, VERGIEVA T, ZAIKOV C, PENNANEN S, LIESIVUORI J and H Van Loveren. Toxicological evaluation of the immune function of pesticide workers, a European wide assessment. *Human & Experimental Toxicology* .27: 701–707. 2008.

STOPPER H, MULLER S O. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. *Toxicology in vivo*. 11:661-667.1997.

STÜTZER, G.; GUIMARÃES, G. Aspectos toxicológicos e ambientais relacionados com o uso de produtos fitossanitários. In: ZAMBOLIM, L. O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários. Viçosa: UFV, p.69-84. 2003.

SUCEN- SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS: Formulação dos praguicidas. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/>, acessado em 20 nov 2013

TICE R R, et al. The single cell gel assay: A sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci*. v.53, p.291–301, 1990.

TOMYTA RY. Legislação de Agrotóxicos e suas contribuições ára a proteção da qualidade do meio ambiente. São Paulo. Rocca. 89-101. 2005

UMBUZEIRO G A, ROUBICEK D A. Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATTO, BERTOLETTI P A. Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa. 4:327-346. 2006.

United States Environmental Protection Agency. Office of pesticide programs biennial report for fiscal year 1998 and 1999. Washington (DC); 1999.

WHO- World Health Organization. Public health impact of pesticides used in agriculture. Geneva; 1990.

YAMASHITA MGN. Análise de rótulos e bulas de agrotóxicos segundo dados exigidos pela legislação Federal de agrotóxicos e afins e de acordo com parâmetros de legibilidade tipográfica. 108. Dissertação de Mestrado, USP, Bauru. 2008

YOUNES M, GALAL-GORCHEV H. Food chemistry. Toxicology. 38:587. 2000

ZAMBRONE F A D. Perigosa família. Ciência Hoje. 4:44-47. 1986

## ANEXOS



*There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage <http://www.gmb.org.br>.*

**1. Manuscripts must be submitted through our online submission platform hosted at: <http://mc.manuscriptcentral.com/gmb>.** The cover letter should be addressed to: Carlos C. F. Menck, Editor-in-Chief, Genetics and Molecular Biology

**2. For submission the following instructions must be observed:**

- The manuscript must be submitted by the Corresponding Author. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for any payment that may incur during the editorial process.
- Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the manuscript file. Furthermore, a cover letter addressed to the Editor is required. It must be edited by the corresponding author inserted within the reserved data field.
- Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed.

- The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office.
- In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and not-preferred reviewer(s).
- Files must be uploaded separately and identified according to file types. The main text file must include references and, if applicable, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.h).
- Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed. Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

### **3. Categories of Contribution**

#### **3.1. Research Articles**

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page. The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the

corresponding author's name, full postal, and email address.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text. The text includes the following elements:

*Introduction* - Description of the background that led to the study.

*Material (or Subjects) and Methods* - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

*Results* - Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only *P*-values should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results by the reviewers and readers. Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

*Discussion* - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) **The References Section:** References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by *et al.* Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>). Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. “Personal communication” refers to information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

**Sample journal article citation:**

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.  
 Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophtalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

**Sample book citation:**

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

**Sample chapter-in-book citation:**

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

**Sample electronic article citation:**

Gotzek D, Ross KG (2009) *Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants. PLoS One 4:e7713.*

f) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, as well as software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.  
*Sample Internet resource citation:* Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2009)  
 LEM Software, [http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid\\_design.htm](http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm) (September 4, 2009)

g) **Tables:** must be in Word format prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator). A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

h) **Figures** must be numbered consecutively using Arabic numerals. Images should be in TIFF or JPEG format. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file, that is the size in which it will appear printed in the journal; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted. Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure.

Figure legends must be included at the end of the main text file and should be typed on a new page.

i) **Nomenclature:** Taxonomic names should be in accordance with current international standards. For rules concerning gene names and gene symbols, please see separate Instruction form.

j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will inadvertently delay publication.

k) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) **Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a statement in the text that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must be uploaded during manuscript submission.

m) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. At publication, this material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement:

*Supplementary material - the following online material is available for this article:*

- *Table S1 – < short title >*
- *Figure S1 – < short title >*

*This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>*

### **3.2 Short Communications**

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications;

- should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited;
- should include an Abstract;
- but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion; all in a single section and without headers.
- up to four items (tables and/or figures) may be submitted;

Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.m.

### **3.3 Letters to the Editor**

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

### **3.4 Review Articles**

Review Articles are welcome. The Editor must be contacted prior to submission. Please, provide an Abstract and a list of your recent publications in the area.

### **3.5 Book Reviews**

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

### **3.6 History, Story and Memories**

These are accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

## **4. Articles accepted for publication**

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the highlighted corrections will be returned to the corresponding author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the

editorial

Office.

After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

Together with the proofs, a form of consent to publish and transfer of copyright is sent to the corresponding author. The latter will have to sign this form, also on behalf of any co-authors, and send it by fax to the Editorial Office.

## **5. Reprints**

Reprints are free of charge and will be provided as a pdf-file.