

**Centro Universitário Feevale  
Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental  
Mestrado em Qualidade Ambiental**

**Rosangela Angelise Krüger**

**ANÁLISE DA TOXICIDADE E DA  
GENOTOXICIDADE DE AGROTÓXICOS  
UTILIZADOS NA AGRICULTURA UTILIZANDO  
BIOENSAIOS COM *Allium cepa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental como requisito para a obtenção do título de mestre em Qualidade Ambiental.

**Orientador:** Prof. Dr. Luciano Basso da Silva

Novo Hamburgo, 2009

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Krüger, Rosangela Angelise

Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa* / Rosangela Angelise Krüger. – 2009.

x, 43f.: il ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) – Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2009.

Inclui bibliografia.

“Orientador: Prof. Dr. Luciano Basso da Silva”.

1. Meio ambiente – produtos químicos agrícolas. 2. Toxicidade - Testes – Produtos químicos agrícolas. 3. Genética. I. Título.

Bibliotecária responsável: Rosângela Terezinha Silva – CRB 10/1591

**Centro Universitário Feevale  
Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental  
Mestrado em Qualidade Ambiental**

**Rosangela Angelise Krüger**

**ANÁLISE DA TOXICIDADE E DA  
GENOTOXICIDADE DE AGROTÓXICOS  
UTILIZADOS NA AGRICULTURA UTILIZANDO  
BIOENSAIOS COM *Allium cepa***

Dissertação de mestrado aprovada pela banca examinadora em 27 de fevereiro de 2009,  
conferindo ao autor o título de mestre em Qualidade Ambiental.

**Componentes da Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Luciano Basso da Silva (Orientador)  
Centro Universitário Feevale

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fabiana Michelsen de Andrade  
Centro Universitário Feevale

Prof. Dr. Daniel Simon  
Universidade Luterana do Brasil

Agradecimentos:

À Feevale pela oportunidade de realizar este sonho de me tornar Mestre, a CAPES pela concessão de bolsa de mestrado, ao meu orientador Prof. Dr. Luciano Basso da Silva pela confiança e apoio, ao Prof. Dr. Sérgio Carvalho pela amizade e fé no meu desempenho, ao pessoal do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Feevale, e, principalmente, a Deus e aos meus familiares por compartilhar e me apoiar em todos os momentos.

## RESUMO:

O modelo de agricultura adotado no Brasil baseia-se no uso de agrotóxicos, entretanto, seu uso desordenado e excessivo vem provocando diversos impactos sobre o meio ambiente. Dependendo da natureza química e da concentração, os agrotóxicos lançados no ambiente podem causar danos diversos na biota a eles expostos. Vários estudos têm demonstrado em diferentes organismos que alguns agrotóxicos podem ser tóxicos e/ou genotóxicos e influenciar na sobrevivência, fertilidade e composição genética das populações. A partir desse contexto, torna-se importante que o conhecimento sobre a toxicidade e a genotoxicidade dos agrotóxicos utilizados nas culturas brasileiras seja ampliado. Os bioensaios com vegetais são testes eficientes para o monitoramento da toxicidade e da genotoxicidade de poluentes ambientais. O objetivo geral do presente trabalho foi utilizar bioensaios com cebola (*Allium cepa*) para avaliar a toxicidade e a genotoxicidade das formulações comerciais dos agrotóxicos cujos ingredientes ativos são o glifosato, o mancozeb, o fention e a beta-ciflutrina. Para cada concentração testada e para o controle negativo (água) foram utilizados cinco bulbos de *Allium cepa*. Os bulbos foram inicialmente colocados em água destilada, durante 24 horas a temperatura ambiente, para estimular o desenvolvimento do meristema radicular. Após este período, os bulbos foram colocados nas soluções-teste por um período de 48 horas. As concentrações utilizadas para cada tratamento variaram de 1 a 20 µL/L para o glifosato; 25 a 250 µL/L para o fention; 0,25 a 2 µL/L para a beta-ciflutrina e, de 250 a 1500 mg/L para o mancozeb. Foram avaliados parâmetros macroscópicos e microscópicos. Como parâmetro macroscópico, o comprimento das raízes foi utilizado como índice de toxicidade. Os parâmetros microscópicos utilizados foram as frequências de micronúcleos e de anormalidades da anáfase-telófase, utilizados como indicadores de genotoxicidade. Foi observada redução significativa do crescimento das raízes, indicando toxicidade dos quatro agrotóxicos testados. No caso dos agrotóxicos cujos ingredientes ativos são o fention e o glifosato, há sugestão de toxicidade dependente da concentração. Além disso, os agrotóxicos contendo glifosato, beta-ciflutrina e fention apresentar aumento significativo das frequências de fragmentos cromossômicos, pontes, cromossomos retardatários e total de anormalidades da anáfase-telófase, bem como de micronúcleos, indicando ação genotóxica. O agrotóxico contendo glifosato apresentou aumento significativo da frequência de pontes e cromossomos retardatários na anáfase-telófase nas concentrações de 3 µL/L e 4 µL/L, mas não nas concentrações de 1 µL/L e 2 µL/L, sugerindo genotoxicidade dependente da concentração. Os resultados do presente estudo sugerem que os agrotóxicos analisados podem comprometer a sobrevivência e a estabilidade genética de populações expostas.

Palavras-chave: Micronúcleo, aberrações na anáfase-telófase, agrotóxico, *Allium cepa*.

## ABSTRACT:

The model of agriculture adopted in Brazil is based in the use of pesticides, however, his excessive and disorderly use is provoking diverse impacts in the environment. Depending on the chemical nature and of the concentration, the pesticides thrown in the environment can cause diverse damage in the exposed biota. Several studies have shown in different organisms that some pesticides can be toxic and/or genotoxic and influence in the survival, fertility and genetic composition of the populations. From that context, it is important that the knowledge about the toxicity and to genotoxicity of the pesticides utilized in the Brazilian cultures be extended. The bioassays with plants are efficient tests for the monitoring of the toxicity and of the genotoxicity of environmental pollutants. The general objective of the present work was use biassays with onion (*Allium cepa*) for evaluate the toxicity and the genotoxicity of the commercial formulations of the pesticides whose active ingredients are the glyphosate, the mancozeb, the fenthion and the beta-cyfluthrin. For each test concentration and for the negative control (water) were utilized five bulbs of *Allium cepa*. The bulbs initially were put in water distilled, during 24 hours at room temperature, for stimulate the development of the roots. After this period, the bulbs were put in the test solutions by a period of 48 hours. The concentrations utilized for each pesticide varied of 1 to 20  $\mu\text{L/L}$  for the glyphosate; 25 to 250  $\mu\text{L/L}$  for the fenthion; 0.25 to 2  $\mu\text{L/L}$  for the beta-cyfluthrin and, of 250 to 1500  $\text{mg/L}$  for the mancozeb. We evaluated macroscopic and microscopic parameters. As macroscopic parameter, the root length was utilized as toxicity index. The microscopic parameters utilized were the frequencies of micronuclei and of abnormalities of the anaphase-telophase, utilized as genotoxicity index. It was observed significant reduction of the growth of the roots, indicating toxicity of the four pesticides analyzed. In the case of the pesticides whose active ingredient are the fenthion and the glyphosate, there is suggestion of toxicity dependent of the concentration. Moreover, the pesticides containing glyphosate, beta-ciflutrina and fenthion present significant increase of the frequencies of chromosome fragments, bridges, vagrant chromosomes and total of abnormalities of the anaphase-telophase, as well micronuclei frequency, indicating genotoxic action. The pesticide containing glyphosate presented significant increase of the frequency of bridges and vagrant chromosomes in the anaphase-telophase in the concentrations of 3  $\mu\text{L/L}$  and 4  $\mu\text{L/L}$ , but not in the concentrations of 1  $\mu\text{L/L}$  and 2  $\mu\text{L/L}$ , suggesting genotoxicity dose-dependent. The results of the present study suggest that the pesticides analyzed can affect the survival and the genetic stability of exposed populations.

Keywords: Micronucleus, abnormalities in anaphase-telophase, pesticide, *Allium cepa*.

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1 - A) Anáfase normal. B) Cromossomo Retardatório. C) Fragmento e Cromossomo Retardatório. D) Ponte.....</b>	<b>26</b>
--	-----------

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agrotóxicos cujas formulações comerciais foram utilizadas para avaliações de citotoxicidade e genotoxicidade em <i>A. cepa</i> .....	23
Tabela 2 - Tratamentos com Glifosato nas concentrações de 5 µL/L a 20 µL/L observados em <i>A. cepa</i> .....	27
Tabela 3 - Tratamentos com Glifosato nas concentrações de 1 µL/L a 4 µL/L observados em <i>A. cepa</i> . ....	28
Tabela 4 - Tratamentos com Mancozeb nas concentrações de 250 mg/L a 1500 mg/L observados em <i>A. cepa</i> .....	29
Tabela 5 - Tratamentos com Beta - ciflutrina nas concentrações de 0,25 µL/L a 2 µL/L observados em <i>A. cepa</i> .....	30
Tabela 6 - Tratamentos com Fention nas concentrações de 50 µL/L a 500 µL/L observados em <i>A. cepa</i> .....	31
Tabela 7 - Tratamentos com Glifosato na concentração de 1 µL/L, Fention na concentração de 25 µL/L, Glifosato 1 µL/L + Fention 25 µL/L observados em <i>A. cepa</i> .....	32



## **LISTA DE SIGLAS**

**AC** - Aberrações cromossômicas

**AMPA** - Ácido aminometilfosfônico

**CHO** - Ovário de Hamster Chinês

**CO<sub>2</sub>** – Gás carbônico

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**EBDC** - Etileno-bis-ditiocarbamatos

**ETU** - Etilenotiouréia

**EPA** - Agência de proteção ambiental

**EPIs** - Equipamentos de proteção individual

**EPSPs** - 5 enolpiruvishiquimato-3-fosfato sintase

**FAO** - Food and Agriculture Organization of the United Nations

**FEPAM** - Fundação Estadual de Proteção Ambiental – RS

**HCl** – Ácido clorídrico

**IAA** - Ácido indol-acético

**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IPCS** - Programa Internacional de Segurança Química

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**OPAS** - Organização Pan-Americana de Saúde

**PCBs** – Organoclorados, Bifenilas Policloradas

**PETAR** - Parque Turístico do Alto Ribeira

**PND** - Plano Nacional de Desenvolvimento

**ROS** - Espécies reativas ao oxigênio

**RL** - Radicais livres

**SINDAG** - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

**SINITOX** - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

**UNEP** - Programa Ambiental das Nações Unidas

**UV** - Ultravioleta

**WHO** - Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

Resumo.....	V
<i>Abstract</i> .....	VI
Lista de ilustrações e figuras.....	VII
Lista de tabelas.....	VIII
Lista de símbolos e siglas.....	IX
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>2</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
3.1 AGROTÓXICOS E A AGRICULTURA.....	3
3.2 AGROTÓXICOS E O AMBIENTE.....	5
3.3 TOXICIDADE DOS AGROTÓXICOS.....	8
3.4 GENOTOXICIDADE DOS AGROTÓXICOS.....	10
<b>4. AGROTÓXICOS SELECIONADOS PARA O PRESENTE ESTUDO .....</b>	<b>14</b>
4.1. GLIFOSATO.....	14
4.1.1. TOXICIDADE DO GLIFOSATO.....	15
4.1.2. GENOTOXICIDADE DO GLIFOSATO.....	16
4.2. MANCOZEB.....	17
4.2.1. TOXICIDADE DO MANCOZEB.....	18
4.2.2. GENOTOXICIDADE DO MANCOZEB.....	18
4.3. $\beta$ -CIFLUTRINA.....	19
4.3.1. TOXICIDADE DOS PIRETRÓIDES.....	20
4.3.2. GENOTOXICIDADE DAS CIFLUTRINAS.....	21
4.4. FENTHION.....	22
4.4.1. TOXICIDADE DO FENTHION.....	22
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
5.1 MATERIAIS .....	23
5.2 BIOENSAIOS.....	24

5.3 ANÁLISE DA TOXICIDADE.....	25
5.4 ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE.....	25
5.4.1 COLETA E FIXAÇÃO DAS RAÍZES.....	25
5.4.2 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS.....	25
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
6.1. GLIFOSATO.....	27
6.2. MANCOZEB.....	28
6.3. BETA-CIFLUTRINA (TURBO) .....	29
6.4. FENTHION.....	30
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A agricultura, quando considerada num sentido mais amplo, é responsável direta pela alteração de mais de um terço da superfície terrestre do planeta, atingindo quase todos os biomas.

Nos últimos 40 anos, a agricultura brasileira sofreu inúmeras e profundas transformações que alteraram tanto a composição das culturas, como os processos de produção e padrões tecnológicos até então em vigor. O processo de modernização entendida como uma série de transformações tecnológicas nos processos produtivos intensificou o emprego de insumos, como máquinas, fertilizantes e agrotóxicos.

Por definição legal, lei 7802/89, agrotóxicos e afins são os produtos e os 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 implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (TOMITA, 2005).

Existem cerca de 15.000 formulações para 400 agrotóxicos diferentes, sendo que cerca de 8.000 encontram-se licenciadas no Brasil, que é um dos cinco maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (FEPAM, 2007).

O emprego de agrotóxicos tem implicado em uma série de problemas relacionados à contaminação ambiental e à saúde pública, pois eles dispersam-se no ambiente, contaminando a água, o solo e os alimentos, além de persistirem nas cadeias tróficas. Em relação à água, a agricultura é apontada como a maior contribuinte de poluentes de todas as categorias.

Dependendo da natureza química e da concentração, os agrotóxicos lançados no ambiente podem causar danos diversos na biota a eles expostos. Embora, na maioria dos casos, estes compostos não sejam capazes de provocar efeitos agudos e imediatos, podem, por outro lado, reduzir a sobrevivência destes organismos através de lesões crônicas que se manifestam, a médio e longo prazo, como desordens fisiológicas em diferentes tecidos e órgãos ou como alterações genéticas.

Vários estudos têm demonstrado em diferentes organismos que alguns agrotóxicos podem ser tóxicos e/ou genotóxicos e influenciar na sobrevivência, fertilidade e composição genética das populações. Os bioensaios com vegetais, os quais

são consideravelmente mais sensíveis e simples em relação aos bioensaios com animais, demonstraram ser testes eficientes para o monitoramento da genotoxicidade de poluentes ambientais.

A partir desse contexto, torna-se importante que o conhecimento sobre a toxicidade e a genotoxicidade dos agrotóxicos utilizados nas culturas brasileiras seja ampliado.

Por serem muito utilizados na agricultura, em vários tipos de cultivo, no presente estudo foram utilizados o glifosato, o mancozeb, a beta-ciflutrina e o fention.

## **2. OBJETIVOS:**

### OBJETIVO GERAL:

Utilizar bioensaios com cebola (*Allium cepa*) para avaliar a toxicidade e a genotoxicidade das formulações comerciais dos agrotóxicos cujos ingredientes ativos são o glifosato, o mancozeb, a beta-ciflutrina e o fention.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar o efeito citotóxico de diferentes concentrações dos agrotóxicos sobre o crescimento das raízes de cebola;
- Analisar a genotoxicidade e a possível relação entre concentração de agrotóxico e frequência de micronúcleos e de anormalidades da anáfase-telófase.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Agrotóxicos e a agricultura

Mudanças tecnológicas e organizacionais ocorreram no mundo durante o século 20. A agricultura que em um primeiro momento foi o meio sustentável de vida dos agricultores e suas famílias converteu-se numa atividade orientada para a produção comercial (SPADOTTO, 2006; RAMOS, 2001). O crescimento populacional e o aumento da demanda energética estimularam os processos de produção agrícola a buscarem tecnologias objetivando um aumento da produtividade (SILVA *et al.*, 2005). A substituição da mão-de-obra pela mecanização de diversas atividades agrícolas além da introdução de agrotóxicos a partir de 1930 bem como a utilização da biotecnologia, destacando-se os organismos geneticamente modificados (transgênicos), foram as principais mudanças tecnológicas que contribuíram para a alteração do processo agrícola (SILVA *et al.*, 2004; TRAPÉ, 1993).

A introdução de agrotóxicos organossintéticos no Brasil iniciou em 1943, com as primeiras amostras de DDT (SPADOTTO, 2006), sendo posteriormente prescrita e regulamentada pela LEI 7.802/89 e DECRETOS 98.816/90 e 4.074/2002 que resumidamente define agrotóxicos como produtos destinados a proteger culturas agrícolas das pragas, doenças e plantas daninhas visando elevar sua produtividade. Os termos pesticidas, praguicidas, biocidas, fitossanitários, defensivos agrícolas e agroquímicos expressam neste trabalho o mesmo grupo de substâncias químicas denominadas “agrotóxicos” (TOMITA, 2005).

A partir de 1975, o Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), estimulou o uso dos agrotóxicos através do financiamento agrícola, onde uma cota do valor era obrigatoriamente destinada para a aquisição de agrotóxicos (SILVA *et al.*, 2004). Além disso, a abertura para o comércio internacional desses produtos foi facilitada disseminando a aplicação de agrotóxicos no Brasil. De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), em 2006, o Brasil consumiu US\$ 3.919.841,00 em agrotóxicos, sendo 10,4% deste valor no estado do Rio Grande do Sul (SINDAG, 2008).

Os agrotóxicos são agrupados, de acordo com o tipo de praga a ser controlada, em pesticidas ou praguicidas (combatem insetos em geral); fungicidas (atingem os fungos); herbicidas (que matam as plantas invasoras ou daninhas). Também podem ser

classificados de acordo com os seguintes critérios: quanto à finalidade (ovicidas - atingem os ovos dos insetos, larvicidas - atacam as larvas, acaricidas - específicos para ácaros, formicidas - atacam formigas); quanto à maneira de agir: através de ingestão (a praga deve ingerir a planta com o produto), microbiano (o produto contém microorganismos que atacam a praga ou o agente causador da doença), por contato (ao tocar o corpo da praga o produto já faz efeito) e, quanto à origem: inorgânicos e orgânicos.

Os pesticidas inorgânicos foram muito utilizados no passado, porém, atualmente não representam mais do que 10% do total de pesticidas em uso. São eles produtos à base de arsênico e flúor e os compostos minerais que agem por contato matando a praga por asfixia (visto que os insetos respiram através da "pele"). Os pesticidas orgânicos compreendem os de origem vegetal e os organo-sintéticos. Os primeiros, muito utilizados por algumas correntes da Agroecologia são de baixa toxicidade e de curta permanência no ambiente (como o piretro contido no crisântemo e a rotenona extraída do timbó). Já os organo-sintéticos, além de persistirem muitos anos nos ecossistemas, contaminando-os, também trazem uma série de problemas de saúde para os seres humanos, o que torna seu uso proibido pelas correntes agroecológicas (OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2001; AGROFIT, 2000).

No Brasil, a agricultura envolve 26% do total dos trabalhadores com mais de 10 anos de idade no país, aumentando para 30% na região sul. O cultivo familiar abrange cerca de dois terços desta população, que foi alvo de profundas modificações nas práticas agrícolas e prejuízos a saúde do trabalhador (FARIA *et al.*, 2000).

No rótulo da embalagem dos agrotóxicos é apresentada uma faixa que, de acordo com a cor, indica a classe toxicológica, ou seja, o grau de toxicidade que apresenta (por exemplo, vermelho, extremamente tóxico) (GARRIDO & SONEGO, 2003). Quanto maior o nível de toxidez maior os perigos de intoxicação ao trabalhador e ao ambiente, caso não sejam tomados os devidos meios de proteção durante sua manipulação (SOUZA, 2006; ZAMBRONE, 2002). Os produtos agrotóxicos são divididos em quatro categorias quanto à sua Classificação Toxicológica:

- Classe I - Produtos Extremamente Tóxicos; apresentam uma tarja vermelha;
- Classe II - Produtos Altamente Tóxicos; apresentam uma tarja amarela;
- Classe III - Produtos Medianamente Tóxicos; apresentam uma tarja azul;
- Classe IV - Produtos Pouco Tóxicos; apresentam uma tarja verde.



Um estudo realizado no estado de São Paulo mostrou que 85% dos trabalhadores que aplicam agrotóxicos aprenderam com leigos a manuseá-los, 57% não receberam nenhum tipo de treinamento formal ou nenhuma orientação sanitária, somente 41% recebem alguma orientação, sendo 14% do técnico da revenda, 13% da cooperativa. Apesar da falta de informação, 72% dos aplicadores são responsáveis pela regulação do pulverizador usado na produção e em apenas 9% dos casos são regulados por técnico agrônomo (RAMOS, 2001). Isto tem reflexo na qualidade de aplicação dos agroquímicos e explica a ineficiência do processo de pulverização. A aplicação eficiente começa atingindo o alvo biológico corretamente seja uma planta daninha ou uma bactéria. Qualquer quantidade de produto que não atinja o alvo é considerada perda e potencial fonte de contaminação ambiental. Isto demonstra a necessidade de educação e de melhorar as tecnologias para que os procedimentos e equipamentos proporcionem maior proteção ao ambiente e ao trabalhador (SOUZA, 2007).

### 3.2 Agrotóxicos e o ambiente

O crescimento da população mundial e a demanda por alimentos têm exigido um sistema complexo de cultivo, transporte, estocagem e processamento de produtos agrícolas (OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2001). Em decorrência deste aumento, o amplo uso de praguicidas, sem os cuidados necessários, tem contribuído para a degradação ambiental e o aumento das intoxicações ocupacionais, incluindo casos de envenenamento humano (BRAGUINI, 2005).

Os efeitos de intoxicações pelos agrotóxicos não ocorrem apenas nos trabalhadores expostos, mas também, a contaminação do solo, da atmosfera, das águas e alimentos, coloca em risco a população que consome o que é produzido no campo, assim como pode alterar o funcionamento dos ecossistemas (FEHLBERG *et al.*, 2003). Além disso, muitas vezes ocorre a combinação de vários produtos biocidas que devido à mistura podem alterar o seu comportamento tóxico e não se tem conhecimento dos efeitos destas associações sobre os organismos (SPADOTTO, 2006).

Os poluentes, quando introduzidos no ambiente, podem causar dois tipos de efeitos nos organismos expostos: efeito agudo e crônico. O efeito agudo é facilmente

detectado no ecossistema, sendo de curta duração, possibilitando uma grande capacidade de recuperação. Os efeitos crônicos são mais difíceis de serem avaliados, pois são detectados em longo prazo e as respostas do ambiente em relação a estes são lentas. O efeito crônico é resultante de uma exposição longa e de baixa intensidade, que interfere na reprodução e sobrevivência dos organismos. No caso do estresse crônico, os contaminantes são transferidos através da cadeia trófica, e deste fator depende sua ação e persistência no ecossistema. Os poluentes também podem ser acumulados nos tecidos dos organismos com o tempo, chegando a um nível danoso (SOUZA, 2006; SILVA *et al.*, 2005; RAMOS, 2001).

A duração e a frequência da exposição dos organismos ao agente químico também afetará a toxicidade. Na exposição aguda, os organismos entram em contato com o composto químico num evento único ou em eventos múltiplos que ocorrem num pequeno período de tempo, geralmente variando de horas a dias. Nestes casos, o agente químico é rapidamente absorvido, normalmente os efeitos são imediatos, embora seja possível a produção de efeitos retardados similares àqueles resultantes de casos crônicos. Na exposição crônica normalmente os organismos são expostos a baixas concentrações do agente tóxico que é liberado continuamente ou com alguma periodicidade num longo período de tempo (semanas, meses ou anos). Exposição crônica a compostos químicos pode também induzir a efeitos rápidos e imediatos, como nos casos agudos, em adição aos efeitos que se desenvolvem lentamente (ZAMBRONE, 2009).

Não se pode negar que os agrotóxicos possibilitaram o aumento da produtividade agrícola e têm auxiliado no controle de vetores de diversas doenças, entretanto, seu uso desordenado e excessivo vem provocando diversos impactos sobre o meio ambiente. Datam da década de 50 os primeiros relatos sobre resíduos de inseticidas organoclorados no ambiente e nos alimentos, onde se observou a ocorrência de bioconcentração e bioacumulação na cadeia alimentar, que resultou em altos teores no homem (RAMOS, 2001).

Em relação à água, embora a agricultura seja apenas uma das inúmeras fontes não-pontuais de poluição, geralmente é apontada como a maior contribuinte de todas as categorias de poluentes. A lixiviação dos agrotóxicos através do perfil dos solos pode ocasionar a contaminação de lençóis freáticos (EDWARDS, 1987). Portanto, além de afetar os próprios cursos de água superficiais, os agrotóxicos podem alcançar os lençóis freáticos cuja descontaminação apresenta grande dificuldade. Certas práticas agrícolas

ligadas ao modelo de produção agrícola predominante, como o uso excessivo e inadequado de agrotóxicos, a destruição da cobertura vegetal dos solos para plantio, a não-preservação das matas ciliares e das vegetações protetoras de nascentes, dentre outros fatores, são responsáveis por grande parte dos problemas com os recursos hídricos (ZAMBRONE, 2009).

Uma vez na água, dependendo das características físico-químicas o resíduo do agrotóxico pode tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositar no sedimento do fundo ou ser absorvido por organismos, podendo então ser detoxificados ou acumulados. Eles podem ser transportados através do sistema aquático por difusão nas correntes de água ou nos corpos dos organismos aquáticos. Alguns agrotóxicos e/ou metabólitos podem também retornar à atmosfera por volatilização. Assim, fica evidenciado que há uma interação contínua dos agrotóxicos entre sedimento e água, influenciada pelo movimento da água, turbulência e temperatura (WHITE & RASMUSSEN, 1985). Desta interação, pode resultar inclusive maior tempo de exposição dos organismos aquáticos aos compostos tóxicos. Os agrotóxicos podem alcançar os ambientes aquáticos através da aplicação intencional, deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações (ZAMBRONE, 2009).

Os agrotóxicos presentes em corpos d'água podem penetrar nos organismos aquáticos de diversas formas e seu grau de acumulação depende do tipo de cadeia alimentar, da disponibilidade e persistência do contaminante na água e especialmente de suas características físicas e químicas (PHILIP & REDDY, 1985). Os peixes e invertebrados podem acumular os agrotóxicos em concentrações muito acima daquelas encontradas nas águas nas quais eles vivem, pois estes compostos podem se ligar ao material particulado em suspensão e ser ingeridos pelos organismos aquáticos, dentre outros processos (WHITE & RASMUSSEN, 1985).

DALLEGRAVE (2006) encontraram resíduos de vários agrotóxicos nas duas espécies de peixes usados como bioindicadores, coletados no lago Kolleru, Índia. Os resultados demonstraram que os peixes continham resíduos de agrotóxicos em níveis superiores aos padrões estabelecidos pela Food and Agriculture Organization (FAO), organismo das Nações Unidas, se constituindo em mais uma fonte de exposição dos habitantes da região aos agrotóxicos. Os resultados refletiram também o nível de poluição por estes compostos naquele lago bem como o perigo ao qual os habitantes estavam expostos ao consumirem os peixes contaminados.

Num estudo realizado no Parque Turístico do Alto Ribeira (PETAR) localizado no Vale do Ribeira (São Paulo), EL-SHAHABY (2003) analisou amostras de água, sedimento e peixe no período das chuvas, em janeiro de 2000 e seus resultados indicaram que a fauna e flora do PETAR estão expostas a diferentes agrotóxicos que se encontram dissolvidos na água ou presentes no sedimento, sendo que dos 20 agrotóxicos detectados na água, sete eram considerados altamente tóxicos para peixes e outros organismos aquáticos e os demais eram considerados moderadamente tóxicos.

ZAMBRONE (2003) considerando organismos expostos ao herbicida simazina em meio terrestre e meio aquático, relataram inúmeros efeitos ecológicos, dentre eles a bioacumulação deste composto em organismos aquáticos, a diminuição de densidade e diversidade de algumas espécies de organismos de solo expostos ao herbicida. Embora tenha sido um estudo efetuado com dados sobre os pesticidas retirados da literatura internacional, e, portanto, obtidos em clima diferente do local, este estudo demonstrou a necessidade e a possibilidade de utilizarem-se análises preliminares deste tipo para se priorizar estudos mais aprofundados de comportamento ambiental e toxicidade de agrotóxicos. FILIZOLA *et al.* (2002) também concluem que avaliações preliminares da possibilidade de contaminação das águas superficiais, subsuperficiais e subterrâneas por pesticidas de uma dada área agrícola, podem se constituir em instrumentos importantes para avaliação de risco ambiental, sendo vantajoso inclusive devido ao alto custo das análises químicas de resíduos de pesticidas.

FILIZOLA *et al.* (2002), demonstraram que na área da bacia do Pantanal, a atmosfera representa importante porta de entrada de agrotóxicos nos ecossistemas, inclusive na água, diferentemente do que ocorre em regiões temperadas, reafirmando a necessidade de estudos em condições ambientais brasileiras. Outra lacuna importante relaciona-se à realização de estudos como o desenvolvido por CONCEIÇÃO (2002) aliando-se testes toxicológicos com organismos e as análises químicas quantitativas e qualitativas, permitindo assim o levantamento de dados químicos como concentração e dose real, juntamente com a verificação dos efeitos toxicológicos para os organismos, de forma a embasar avaliações globais.

YOUNES & GALAL-GORCHEV (2000) ressaltam que a capacidade dos agrotóxicos persistir e produzir efeitos tóxicos sobre a saúde humana e sobre o meio ambiente é muito variado em função das inúmeras classes químicas existentes. Além disto, em função de seu amplo uso, os agrotóxicos podem estar presentes inclusive em água de abastecimento.

### 3.3 Toxicidade dos agrotóxicos

A toxicidade e o modo de ação dos defensivos agrícolas nos seres vivos variam largamente, estando diretamente relacionados com sua estrutura química e concentração (DALLEGRAVE *et al.*, 2006).

Quando lançados no ambiente, os agrotóxicos são capazes de interagir com o organismo vivo, causando múltiplas alterações que podem gerar graves desequilíbrios ecológicos, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição. Tradicionalmente, as técnicas para a avaliação destes impactos utilizando bioindicadores vêm sendo divididas em duas abordagens principais: aquelas associadas aos níveis superiores de organização, tais como populações, comunidades e ecossistemas ou no nível individual – que trata de alterações comportamentais, malformações, mudanças nas taxas de crescimento, reprodução, alimentação, alterações bioquímica e fisiológica – que inclui alterações na integridade da membrana celular, no transporte de íons, no metabolismo celular e em atividades enzimáticas. Os componentes dessa última abordagem são também chamados de bioindicadores, e são definidos como componentes biológicos, células, processos bioquímicos, estruturas e funções biológicas, alteradas quando em contato com compostos xenobióticos (YOUNES, 2000). Em geral, quanto maior a concentração de pesticidas e mais longo o tempo de exposição, maiores as chances dos impactos negativos atingirem níveis superiores de organização biológica, como comunidades e ecossistemas. Quando um estresse dura tempo suficiente para levar à morte uma população de organismos, afetando as taxas de crescimento e de reprodução e impedindo o recrutamento de novas espécies, ela é então capaz de alterar a estrutura da comunidade (AGROFIT, 2009).

Quaisquer fenômenos (estressores, tóxicos, citotóxicos, mutagênicos ou teratogênicos) que possam alterar o comportamento dos indivíduos, dificultando seu desempenho na população podem causar impactos drásticos sobre a reprodução destes. A partir destes fatos, pode haver uma interferência no equilíbrio genético das populações, propiciando a vulnerabilidade dos organismos, o declive da diversidade e possivelmente a extinção da espécie (DALLEGRAVE *et al.*, 2006).

No caso dos humanos, os sintomas de trabalhadores expostos a agrotóxicos geralmente são apoiados em variações de questionários ocupacionais e avaliam uma ampla faixa de sintomas, incluindo, entre outros, a cefaléia, vertigem, fadiga, insônia,

náusea, vômitos, ruídos crepitantes respiratórios e dispnéia; assim como sintomatologia sugestiva de distúrbios cognitivos (dificuldade de concentração, esquecimento, confusão mental, etc.); motores (fraqueza, tremores, câibras, miofasciculação), disfunção neurossensorial (formigamento, parestesia, visão turva e outros distúrbios visuais) e reprodutiva (AGROFIT, 2009).

Aproximadamente 20% de todos os pesticidas conhecidos são suspeitos de serem carcinogênicos. Além desses efeitos adversos, os pesticidas podem afetar também o sistema imunológico, ou ainda apresentar atividade teratogênica e mutagênica (ECOBICHON, 1996).

### 3.4 Genotoxicidade dos agrotóxicos

Embora o uso de agrotóxicos tenha aspectos positivos, como controlar as pragas existentes em diversas culturas, existe o risco inerente de contaminação ambiental e a necessidade de conhecer seus efeitos nas células, pois os agrotóxicos podem interferir na homeostase dos sistemas biológicos (GIOVANNINI, 1997).

Todos os organismos vivos estão em interação com o meio ambiente. Assim, o seu genoma fica exposto às interferências que esse ambiente sofre. A interação entre o meio e o organismo resulta em modificações que, quando positivas, refletem na adaptação do organismo à melhor exploração desse meio, o que decorre também na própria modificação do ambiente pelo organismo (YOUNES, 2000).

As substâncias utilizadas como defensivos agrícolas podem possuir em sua composição moléculas com poder oxidante que podem vir a formar radicais livres nos sistemas biológicos (LUZ *et al.*, 2003). Os radicais livres são moléculas altamente instáveis, que reagem com as estruturas celulares modificando a estrutura de lipídios e proteínas de membrana, alterando a permeabilidade da célula (ANDRADE Jr., 2005). Estas alterações podem chegar ao núcleo celular e atingir a dupla fita de ácido desoxirribonucléico, acarretando no desenvolvimento de danos no DNA, os quais podem desencadear doenças graves e até a carcinogênese (FERREIRA, 1997). Além

disso, vários agrotóxicos foram submetidos a testes e revelaram-se potencialmente genotóxicos (BOLOGNESI, 2003).

Os agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando adutos, alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA. Na grande maioria dos casos o dano é reparado pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. Caso essa lesão seja fixada, provocando alterações hereditárias (mutações), que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é denominado mutagênico (OBE *et al.*, 2004; WHITE & RASMUSSEN 1998). Embora ocorram mutações espontâneas, a maioria delas é induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais os seres humanos e outros organismos podem ser expostos (CALVIELLOA *et al.*, 2005).

A análise da genotoxicidade dos agrotóxicos é importante para acessar o risco genético não somente dos seres humanos expostos, mas de toda a biota nativa de determinado local. Desta maneira, a detecção e o entendimento das propriedades desses agentes permitem avaliar os efeitos hereditários deletérios, ou mesmo letais, para os organismos (DALLEGRAVE, 2006).

O dano citogenético induzido pelos agrotóxicos ocorre dependendo do grau de exposição, da quantidade, da natureza química e das possíveis combinações entre os pesticidas utilizados, além das características e condições do ambiente. 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 em baixas doses é cumulativa e também pode induzir tais danos (BOLOGNESI, 2003).

Durante os últimos anos, tem havido um grande interesse em desenvolver testes rápidos e simples para identificar substâncias com atividade genotóxica. Atualmente existe um grande número de testes, sendo que o organismo de prova varia desde vírus, bactérias, fungos, plantas e insetos até mamíferos, incluindo células humanas. A utilização de organismos experimentais e bioensaios para a detecção de danos no material genético têm permitido a quantificação e reconhecimento de uma ampla gama de substâncias com atividade genotóxica (OBE *et al.*, 2004).

Os bioensaios com vegetais, os quais são consideravelmente mais sensíveis e simples em relação aos estudos com animais, demonstraram ser testes eficientes para o monitoramento da genotoxicidade de poluentes da água e do solo, incluindo os agrotóxicos (GRANT, 1999; MA, 1999). A atividade mutagênica de compostos

químicos tem sido analisada com diferentes sistemas vegetais tais como *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Arabidopsis thaliana* e *Hordeum vulgare* (FISKEJÖ & LEVAN, 1994).

Entre as plantas superiores, *Allium cepa* tem sido considerada como excelente bioindicadora de efeitos genotóxicos e mutagêncios de poluentes ambientais (GRANT, 1999; GRANT, 1982). Além da simplicidade, alta sensibilidade e baixo custo, os testes com *A. cepa* têm sido selecionados por alguns pesquisadores devido à alta correlação observada com os resultados de outros bioensaios. Esta característica é essencial para se acessar corretamente os riscos ambientais, bem como para realizar extrapolações dos resultados obtidos para outras espécies (MA *et al.*, 1995). Por exemplo, RANK *et al.* (1997) observaram uma correlação de 82% entre os testes com *Allium cepa* e os ensaios de carcinogenicidade em roedores. Em outros estudos há uma concordância entre os teste em sistemas vegetais e em sistemas mamíferos de 75 a 91,5% (GROVER *et al.*, 1990; GRANT, 1982; GRANT, 1978). Além disso, estudos de sensibilidade entre as plantas superiores têm demonstrado que *A. cepa* é mais sensível que outras espécies, tais como *Vicia faba* (MA *et al.*, 1995).

Nos bioensaios com *A. cepa*, após a exposição dos bulbos de cebola à solução-teste por um determinado período, é possível avaliar tanto efeitos citotóxicos, através da redução do crescimento das raízes ou da diminuição do índice mitótico, como efeitos genotóxicos, geralmente através da análise de micronúcleos ou de anormalidades da anáfase-telófase (FISKEJÖ & LEVAN, 1994).

O micronúcleo é semelhante ao núcleo em forma, estrutura e propriedades de coloração, e pode variar grandemente em tamanho (EL-SHAHABY, 2003). O micronúcleo é o 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, ou por agentes que afetam o fuso mitótico. Os fragmentos ou cromossomos inteiros que não se orientam para os núcleos filhos de uma célula em divisão ficam perdidos no citoplasma e formam a própria membrana nuclear, originando os micronúcleos. Assim, a presença de micronúcleos em células somáticas é indicativa de quebras cromossômicas (clastogênese) e/ou de distúrbios do fuso mitótico (aneugênese) (NATARAJAN, 2002). Devido ao grande número de células que pode ser analisada, a técnica de micronúcleos representa uma maneira simples e precisa de se estimar dano genético induzido, constituindo-se em uma ferramenta amplamente



aplicável para testar o efeito de compostos químicos sobre as células (EL-SHAHABY, 2003).

Entre as anormalidades de anáfase-telófase analisadas em *A. cepa*, podem ser identificados separadamente os efeitos clastogênicos, pela presença de pontes e fragmentos cromossômicos, e os efeitos aneugênicos, devido a alterações do fuso mitótico, pela presença de cromossomos retardatários (FISKEJÖ, 1985).

EL SHAHABY *et al.* (2003), consideraram o teste de *A. cepa* o mais adequado para detecção de toxicidade/genotoxicidade na avaliação de níveis de poluição ambiental, os quais representam riscos diretos ou indiretos para a população humana. Utilizando-se de células meristemáticas de *Allium cepa*, CHAUAN *et al.* (1999), estudaram o potencial genotóxico dos agrotóxicos Cypermethrim e Fenvalerate, sendo que os resultados obtidos tiveram boa correlação com o sistema teste de mamíferos, indicando o uso do teste de *Allium cepa* como uma alternativa para o monitoramento do potencial genotóxico de vários compostos químicos.

Com o aumento da utilização de vegetais em genotoxicologia e avaliação de riscos, o interesse por sistemas botânicos está fortalecido em meio à comunidade científica e autoridades políticas, pois proporcionam mais conhecimento da genotoxicidade e especialmente das anormalidades mitóticas em eucariontes (FISKEJÖ, 1993).

FISKEJÖ (1994), defendendo a importância e a utilidade de sistemas vegetais na avaliação de riscos genotóxicos, salienta que embora existam diferenças entre os metabolismos de plantas e animais, há também similaridades, tais como o importante sistema de oxidase e, que a ativação de pró-mutagenos em plantas tem alta relevância, uma vez que seres humanos consomem plantas tratadas com agentes químicos. Dessa forma, de acordo com RODRIGUES, (1998), o método de avaliação citogenética em raízes de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento “*in situ*” da genotoxicidade de contaminantes ambientais.

## 4. AGROTÓXICOS SELECIONADOS PARA O PRESENTE ESTUDO

### 4.1. GLIFOSATO

O glifosato ácido,  $C_3H_8NO_5P$ , é um herbicida pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, o qual foi sintetizado a partir da substituição de um hidrogênio amínico do aminoácido glicina, pelo radical metilfosfônico. O glifosato foi sintetizado pela primeira vez em 1950. Somente vinte anos mais tarde, em 1970, J. E. Franz da empresa Monsanto Agricultural descobriu a propriedade de herbicida desta molécula (AGROFIT, 2009).

Essa molécula participa como ingrediente ativo de diversas formulações e elas são fabricadas e vendidas aos agricultores sob diversas marcas, sendo a mais consumida a Roundup® da Monsanto (AGROFIT, 2009). A maioria dos produtos à base de glifosato são feitos ou usados com um surfactante, produto que auxilia o glifosato a penetrar no tecido celular das plantas (BRAGUINI, 2005). O Glifosato Atanor, cuja composição é sal de isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina (GLIFOSATO), 48% m/v; (equivalente em ácido de GLIFOSATO, 36% m/v) e concentração dos ingredientes inertes, 67,9% m/v; é de Classe Toxicológica III - medianamente tóxico e classificado, quanto ao potencial de periculosidade ambiental, como Classe III – perigoso ao meio ambiente (AGROFIT, 2009).

Todos os processos de adsorção, fotodegradação e biodegradação dos herbicidas fosforados são modificados pela presença de metais devido à formação de complexos que podem ser solúveis ou insolúveis (BARJA *et al.*, 2001; PICCOLO *et al.*, 1996).

Por ser um herbicida de amplo espectro, o glifosato, é muito usado para eliminar plantas indesejáveis nos setores agrícolas e não - agrícolas. Estima-se que os EUA utilizem anualmente de 17 a 21 mil toneladas do produto. Também é um dos herbicidas mais consumidos no Brasil e com perspectivas de aumento deste consumo, diante da expansão do plantio direto e do plantio de culturas geneticamente modificadas com resistência a esse herbicida. Porém, pesquisas com esta molécula são ainda incipientes em solos de clima tropical. O consumo do produto avançou 79,6% no período 2000-

2005. No Rio Grande do Sul, primeiro Estado a plantar transgênicos, o consumo de glifosato cresceu 85% - e a área semeada, 30,8% (SINDAG, 2008).

O glifosato pode ser utilizado nas culturas de café, citrus, cana-de-açúcar, pastagens, arroz, milho, soja e trigo maçã, uva, eucalipto, pinus, algodão, ameixa, coco, fumo, mamão, pêra, pêssego, nectarina, cacau, banana, seringueira, azevém, aveia preta (SINDAG, 2008).

O glifosato controla efetivamente uma grande variedade de gramíneas e plantas dicotiledôneas inibindo a síntese dos aminoácidos aromáticos como tirosina, fenilalanina e triptofano por atuar na enzima precursora EPSPs (5-enolpiruvishiquimato-3-fosfato sintase) evitando a transformação do chiquimato em corismato. Influencia também outros processos, como a inibição da síntese de clorofila, estimula a produção de etileno, reduz a síntese de proteínas e eleva a concentração do ácido indol-acético (IAA). A rota do chiquimato é ausente em animais, mas é fundamental no metabolismo de plantas, fungos e bactérias para biossíntese dos aminoácidos aromáticos essenciais. Estima-se que mais de 20% de todo o carbono fixado pela biossíntese passe por essa rota, destinado à síntese de aminoácidos aromáticos (SILVA *et al.*, 2005).

Os microrganismos são os principais responsáveis pela degradação do Glifosato. Segundo a literatura, aproximadamente 50% das moléculas originais são metabolizadas em 28 dias, atingindo 90% em 90 dias (RODRIGUES, 1998).

BRAGUINI (2005) isolou fungos e bactérias degradadoras de Glifosato em solos cultivados com arroz irrigado em semeadura direta. Por essa razão, vários metabólitos ou produtos da degradação do Glifosato têm sido identificados. Segundo BRAGUINI (2005), o ácido aminometilfosfônico (AMPA) é o primeiro e o principal produto da degradação do herbicida Glifosato no solo. Glifosato e AMPA são altamente solúveis em água e podem entrar em ambientes aquáticos por meio de escoamento superficial, ou transporte de massa nas áreas em que o herbicida é aplicado. LIOI *et al.* (1998) detectaram a ocorrência de Glifosato em águas de irrigação e drenagem de lavoura de arroz no Rio Grande do Sul.

#### 4.1.1. Toxicidade do Glifosato

A toxicidade aguda do glifosato é considerada baixa. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2008), a dose letal 50 (DL<sub>50</sub>) oral do glifosato puro em ratos é de 4.230 mg kg<sup>-1</sup>. Segundo (SILVA *et al.*, 2005), a baixa toxicidade desta molécula pode ser devida à sua modalidade bioquímica de ação em um caminho metabólico nas plantas, chamado mecanismo do ácido chiquímico, similar ao existente em alguns microorganismos, não existindo, entretanto, em animais. Porém o glifosato pode impedir a ação de funções enzimáticas nos animais.

De acordo com a classificação da Agência de proteção ambiental (EPA) dos EUA, o glifosato encontra-se incluído no grupo D, o que significa que “o agente provavelmente não é carcinogênico para o ser humano”, isto baseado na evidência de oncogenicidade em animais (BRAGUINI, 2005).

Na degradação do glifosato, o metabólito AMPA é mais nocivo que o próprio glifosato e foi encontrado em carpas 90 dias após a aplicação do herbicida. Um recente estudo na UNICAMP demonstrou que 61% das intoxicações com agrotóxico no Brasil, entre 1996 e 2000, são devido a manipulações com glifosato (BOLOGNESI, 2003).

Embora o glifosato seja considerado um herbicida relativamente seguro e de baixa toxicidade, vários casos de intoxicação com o uso deste herbicida já foram relatados. Dentre eles destacam-se alguns intencionais, 80 casos, onde os efeitos observados foram hemorragia e erosão do trato gastrointestinal (66%) além de alterações em outros órgãos como: pulmão (23%), fígado (19%), sistema cardiovascular (18%), sistema renal (14%) e sistema nervoso central (12%). A quantidade estimada de Roundup (41%) ingerida pelas pessoas que não sobreviveram foi de 184 ± 70 mL. A maioria das mortes ocorreu dentro de algumas horas após a ingestão do herbicida (SILVA *et al.*, 2005; TALBOT *et al.*, 1991; MCCONNEL & HOSSNER, 1989).

#### 4.1.2. Genotoxicidade do Glifosato

Segundo ANVISA, (2008), ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade têm sido negativos para glifosato. Estes incluíram o Teste Ames, outros ensaios bacteriológicos, cultura de células do ovário de Hamster Chinês (CHO), teste do

Micronúcleo e ensaios de dominantes letais em camundongos. Pelos estudos apresentados o glifosato não foi considerado mutagênico. WILLIAMS *et al.* (2000) abordaram aspectos relacionados a absorção oral e dérmica, bioacumulação nos tecidos, genotoxicidade, danos ao DNA, entre outros, e concluíram que dentro dos padrões estabelecidos, o herbicida não ofereceu risco à saúde humana.

Entretanto, LIOI *et al.* (1998) verificaram atividade citotóxica e estímulo da atividade da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase em cultura de linfócitos bovinos sugerindo que o Glifosato induz estresse oxidativo ou efeito mutagênico nesta espécie. Reforçam ainda a hipótese de indução de estresse oxidativo os resultados obtidos por PELUSO *et al.* (1998) e HIETANEN *et al.*, (1983) onde os autores verificaram a indução da formação de adutos de DNA no rim e fígado de camundongos e aumento da atividade da catalase hepática em ratos tratados com glifosato comercial. Foram observadas também diminuição da atividade da citocromo P-450 e atividade monooxigenase hepática (em ratos tratados com glifosato (Roundup®)).

#### 4.2. MANCOZEB

O Dithane NT,  $C_4H_6N_2S_4MNX.(ZN)Y$ , é um fungicida pertencente ao grupo químico ditiocarbamato, que tem como ingrediente ativo o mancozeb (CAS 8018-01-7): 80 % (p/p); o lignosulfonato de cálcio (CAS 8061-52-7): 20 % (p/p); e lubrificantes. É utilizado no cultivo de batata, tomate, abóbora, pepino, melancia, melão, cebola, alho, amendoim, fumo, trigo, arroz, café, feijão, citros, figo, maçã, manga, pêsego, uva, berinjela, beterraba, cenoura, brócolis, pimentão, ervilha, couve, couve-flor, feijão-vagem, cravo, rosa, gladiolo, crisântemo (SEAB, 2009).

Os fungicidas constituem um dos principais produtos utilizados na agricultura. De acordo com a FAO, os fungicidas são insumos importantes para a produção mundial de alimentos. Além de atacarem os fungos, sem prejudicar as culturas, eles contribuem também para a manutenção da germinação e vigor das sementes e para o prolongamento da vida útil dos frutos na pós-colheita (AZEVEDO, 2001).

Os fungicidas da classe dos ditiocarbamatos são compostos derivados do ácido ditiocarbâmico que apresentam baixa toxicidade aguda, baixa volatilidade e insolubilidade na maioria dos solventes orgânicos. Apresentam-se fisicamente como sólidos brancos ou amarelo-claros. Os compostos desse grupo registrados no Brasil são o Mancozeb, Metiram, Metam, Tiram e Propinebe (ANVISA, 2008).

#### 4.2.1. Toxicidade do Mancozeb

Os etileno-bis-ditiocarbamatos (EBDC) mancozeb, metiram e o propinebe apresentam riscos associados aos seus produtos de degradação e metabólitos, a etilenotiuréia (ETU) e a propilenotiuréia, respectivamente. Evidências de teratogenia, oncogenia, tumorogenia e neurotoxicidade têm sido relatados em animais de laboratório expostos a esses compostos (AHMAD *et al.*, 1995). Adicionalmente, alimentos tratados com EBDC, quando processados ou cozidos, podem favorecer as reações de decomposição dos seus resíduos levando à formação de ETU (CALDAS *et al.*, 2006).

Alguns desses compostos contêm manganês na sua composição (Maneb, Dithane), podendo determinar parkinsonismo pela ação do manganês no sistema nervoso central. As intoxicações por esses compostos frequentemente ocorrem através das vias oral e respiratória, podendo também ser absorvidos por via cutânea. Nos casos de exposição intensa provocam dermatite, faringite, bronquite e conjuntivite (SEAB, 2009).

Estudos alimentares de dois anos com ETU indicaram tumores de tiróide em ratos com concentrações de 83 ppm ou maiores na dieta. Da mesma forma, tumores de pituitária, do fígado e da tiróide em camundongos com concentrações de 330 ppm ou maiores na dieta. Os efeitos carcinogênicos são considerados como sendo secundários a inibição de síntese da tiróide e a quebra do equilíbrio hormonal (SEAB, 2009).

#### 4.2.2. Genotoxicidade do Mancozeb

Tanto o mancozeb quanto o ETU foram adequadamente testados com uma grande variedade de testes mutagênicos *in vivo* e *in vitro*. Os resultados destes testes indicam que ambos não são mutagênicos para sistemas mamíferos (SEAB, 2009).

#### 4.3. BETA - CIFLUTRINA

Segundo a ANVISA, (2008) a Beta-Ciflutrina,  $C_{22} H_{18} Cl_2 F N O_3$ , é um inseticida, piretróide que atua por contato e ingestão, de classificação toxicológica Classe II, utilizada no cultivo de abacaxi, alface algodão, alho, amendoim, arroz, batata, berinjela, café, cebola, citros, couve, feijão, fumo, mandioca, melão, milho, soja, tomate e trigo.

Inicialmente, os piretróides eram extraídos de flores secas de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. O extrato obtido desta flor contém ésteres crisantêmicos (piretrina I) e ácido pirétrico (piretrina II) em quantidades aproximadamente iguais (DAVIES, 1985). Os piretróides, ou seja, os análogos sintéticos da piretrina são produzidos desde 1940 (ELLIOT, 1980; ELLIOT *et al.*, 1973), e dividem-se em duas categorias distintas: piretróides do Tipo I e piretróides do Tipo II. Esta classificação é baseada nos sintomas produzidos em animais experimentais que receberam doses agudas tóxicas dos piretróides (VERSCHOYLE & ALDRIDGE, 1990), e também na presença ou ausência do grupo alfa-ciano na molécula destes praguicidas. Os piretróides do Tipo I, como a permetrina e a aletrina, não apresentam um grupo alfa-ciano. Em geral os piretróides do Tipo II como a cipermetrina e o fenvalerato são inseticidas mais potentes devido à presença do grupo alfa-ciano em suas estruturas (TABAREAN & NARAHASHI, 1998; VIJVERBERG *et al.*, 1982, GLICKMAN & CASIDA, 1982).

Piretróides são venenos axônicos que trabalham por manter os canais de sódio abertos nas membranas neurais dos insetos. Sua ação, como quase todos os inseticidas,

é sobre o sistema nervoso, provocando uma interrupção da transmissão do impulso nervoso (MYAMOTO *et al.*, 1995; MYAMOTO, 1993).

Como são usados em baixas quantidades, os piretróides são a mais importante ferramenta no combate aos mosquitos. Diferentemente dos organoclorados, organofosforados e carbamatos, não há muitos casos de resistência a piretróides em insetos (ALDRIDGE, 1990).

Os piretróides sintéticos têm boa estabilidade sob luz e temperatura ambiente. Degradam-se por hidrólise e oxidação, sendo caracterizados também pela rápida degradação por microrganismos do ambiente, não se registrando acumulação de resíduos ou esta alcança níveis não detectáveis (MYAMOTO *et al.*, 1995; KANEKO *et al.*, 1981).

#### 4.3.1. Toxicidade dos Piretróides

O caráter lipofílico dos piretróides favorece um rápido acesso destes compostos aos tecidos, incluindo o sistema nervoso central. A administração intraperitoneal de 5-8 mg.kg<sup>-1</sup> de deltametrina, piretróide do tipo II, resultou em concentrações de 0,12 - 0,45 nmol.g<sup>-1</sup> de tecido no cérebro de rato, causando o aparecimento dos primeiros sintomas neurotóxicos na exposição aguda (ALDRIDGE, 1990).

Alguns estudos relatam casos de envenenamento sistêmico de humanos com piretróides, e que a farmacoterapia para estes casos é difícil, e a duração do envenenamento pode ser longa (MYAMOTO, 1993).

Em seres humanos expostos a piretróides, existem poucas evidências de reações alérgicas. A parestesia cutânea tem sido relatada como forma de toxicidade de piretróides sintéticos contendo um grupo alfa-ciano, observada em aplicadores de piretróides na forma de aerossol (HE *et al.*, 1989). Entre os sintomas relatados estão a perda de sensibilidade dérmica facial e discinesia, combinados com queimação e prurido da área da pele exposta. Os sinais e sintomas desapareceram após 24 horas da exposição (TUCKER *et al.*, 1984).

A aletrina, outro piretróide sintético, diminuiu a amplitude do inchamento de mitocôndrias de fígado de camundongo e estimulou o consumo de oxigênio mitocondrial (SETTLEMIRE *et al.*, 1974). O fenvalerato diminui o consumo de



oxigênio por peixes vivos e de seus tecidos (músculo, fígado, e cérebro) (REDDY & PHILIP, 1992) e a cipermetrina inibiu enzimas de preparações mitocondriais isoladas de fígado de peixe (PHILIP *et al.*, 1995).

SHAN & HAMMOCK (2001), MAITI *et al.* (1995), WHO (1990), mostraram que ratos tratados com fenvalerato apresentaram uma disfunção na tireóide e um aumento na lipoperoxidação no rim e fígado. Estes efeitos foram relacionados com a geração de radicais livres. A clivagem de piretróides, contendo o grupo alfa-ciano, e seus ésteres metabólicos, geram cianohidrinás, as quais são instáveis sob condições fisiológicas e se decompõem em cianeto e aldeído. Segundo KALE *et al.* (1999), os aldeídos e outros conjugados lipofílicos também podem levar ao estresse oxidativo durante a intoxicação por piretróide.

YÁÑEZ *et al.* (2002) analisaram amostras de urina coletadas de crianças que haviam sido expostas à aplicação de deltametrina com pulverizadores, durante o combate a malária em Oaxaca no México. Os autores verificaram que 50% do grupo de crianças expostas tinham níveis urinários de um metabólito da deltametrina, o ácido 3-fenoxibenzóico acima do limite de detecção do método empregado, e 6% tinham níveis acima de 25 mg×L<sup>-1</sup>, isto é, cinco vezes o limite de detecção. Segundo estes autores, o consumo de peixes, e de leite materno estariam entre os fatores que contribuíram para este nível de exposição.

ANDRADE *et al.* (2002) investigaram os possíveis efeitos da exposição à deltametrina de ratas grávidas e durante a lactação. Os resultados mostraram que a exposição a baixas doses de deltametrina (1, 2, e 4 mg×kg<sup>-1</sup>) induziu súbitas alterações no comportamento reprodutivo e na fisiologia dos filhotes machos, enquanto que as mães não foram afetadas. Entre os parâmetros avaliados verificaram que o ganho de peso das mães não foi alterado. Nenhum sinal clínico de intoxicação pelo piretróide foi observado durante o período de tratamento, indicando ausência de toxicidade materna com as doses testadas. Segundo DALSENTER (1999) variáveis como a descida dos testículos e a separação prepucial dos filhotes machos também não foram afetadas. Estas variáveis são padrões externos de desenvolvimento sexual em ratos machos e são eventos andrógeno-dependentes. O peso testicular e do epidídimo foi significativamente reduzido nos filhotes machos expostos à dose de 4 mg×kg<sup>-1</sup>.

#### 4.3.2. Genotoxicidade das Ciflutrinás

A genotoxicidade da ciflutrina foi detectada tanto *in vitro*, em cultura de linfócitos humanos, quanto *in vivo*, em células da médula óssea de *Rattus norvegicus var. Albinos* por WHO (2008). Estes autores demonstraram também efeitos sobre a genotoxicidade tanto da concentração como do tempo de exposição.

#### 4.4. FENTION

O Lebycid 500,  $C_{10}H_{15}O_3PS_2$ , é um inseticida organofosforado com nome técnico de Fention, de classe toxicológica II, utilizado no cultivo de maçã, goiaba, manga, abóbora, melancia, melão, pepino, algodão, ameixa, nêspira, café, caqui, citros, cupim de montículo, fumo (CONCEIÇÃO, 2002).

Os inseticidas organofosforados são derivados do ácido fosfórico. São sólidos brancos ou líquidos amarelados com odor semelhante às mercaptanas, de elevada pressão de vapor e solúveis nos solventes orgânicos mais polares (CONCEIÇÃO, 2002).

##### 4.4.1. Toxicidade do Fention

Os sinais de intoxicação aguda devido à exposição aos organofosforados incluem transtornos de visão, vômitos, ansiedade, confusão mental, hipertensão arterial, efeitos neurológicos diversos e até mesmo a morte. A exposição crônica tem sido relacionada ao câncer, efeitos teratogênicos, esterilidade, aborto espontâneo e

deficiência cognitiva. Os organofosforados inibem a ação da acetilcolinesterase, enzima responsável pela inativação do neurotransmissor acetilcolina. (ECOBICHON, 1996).

Segundo DALLEGRAVE (2006), a toxicidade depende da concentração, via e do tempo de exposição ao produto. Em animais a absorção se dá por via oral, inalatória ou dérmica; a presença de solvente orgânico intensifica absorção, a temperatura se eleva e ocorre presença de dermatites que potencializam a absorção. Sua distribuição é ampla, mas não se acumulam por tempo prolongado; além de serem altamente lipofílicos, são armazenados no tecido adiposo, liberados gradualmente durante vários dias de exposição.

No organismo sofrem biotransformações por enzimas oxidases, hidrolases e transferases, principalmente hepáticas; alguns metabólitos tem maior toxicidade que o composto original, por transformação do grupo “tion” em metabólito “oxon” (paration, malation, diazinon). A excreção ocorre principalmente por via urinária, menor quantidade nas fezes e ar expirado; excreção máxima em mais ou menos dois dias, após diminui rapidamente (DALLEGRAVE, 2006; EL-AZIZ *et al.*, 1994).

## **5. Materiais e métodos**

### 5.1 Materiais

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Feevale, Campus II de novembro de 2007 a dezembro de 2008. Foram utilizados bulbos de *Allium cepa* adquiridos comercialmente, sendo que em todos os bioensaios, foram utilizadas cebolas da mesma procedência. Os agrotóxicos utilizados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. – Agrotóxicos cujas formulações comerciais foram utilizadas para avaliações de citotoxicidade e genotoxicidade em *A. cepa*.

<b>Ingrediente ativo</b>	<b>Nome Comercial</b>	<b>Grupo Químico</b>	<b>Classe</b>	<b>Classe Toxicológica</b>
Glifosato	Glifosato	Fosfometilglicinas	Herbicida	Classe III
Mancozeb	Dithane	Ditiocarbamato	Fungicida Acaricida de Contato	Classe III
Beta-ciflutrina	Turbo (Bulldock 125 SC)	Piretróide	Inseticida	Classe II
Fention	Lebaycid	Fentiona Organofosforado	Acaricidas/Inseticidas	Classe II

Fonte: ANVISA, 2008.

O Glifosato é composto de: Sal de isopropilamina de N-(fosfometil) glicina (GLIFOSATO) 48% m/v (equivalente em ácido de GLIFOSATO 36% m/v) e concentração dos ingredientes inertes 67,9% m/v (1 a 3 l/ha) e, conforme o fabricante, a dose varia de acordo com o tipo de cultura, sendo que para plantio direto de soja e milho a dose máxima recomendada é de 1,5 l/ha.

O Dithane NT é composto de Complexo (polymeric) do ethylenebis do manganês (ditiocarbamate) com sal do zinco (MANCOZEBE) 800 g/Kg (80% m/m) Ingredientes Inertes 200 g/Kg (20% m/m), são indicadas dosagens entre 2 a 3,5 Kg/ha.

O Turbo é composto de (RS)- $\alpha$ -cyano-4-fluoro-3-phenoxybenzyl (1RS, 3RS, 1RS, 3 SR)-3-(2,2-diclorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (BETA-CIFLUTRINA) 50 g/L (5% m/v) ingredientes inertes 850 g/L (85% m/v) e deve ser utilizado de 50 a 200 ml/ha., dependendo da cultura que está sendo cultivada.

O Lebaycid 500 é composto de: O,O- dimethyl O- 4- methylthio- m- tolyl phosphorothioate (FENTIONA) 50,0% m/v (500 g/L) e ingredientes inertes 55,0% m/v (550 g/L). É indicado utilizar de 1000 a 2000 ml por ha.

## 5.2 Bioensaios

Para cada concentração testada e para o controle negativo (água) foram utilizados seis bulbos de *A. cepa*. Os bulbos foram inicialmente preparados e colocados em água destilada durante 24 horas a temperatura ambiente, para estimular o desenvolvimento do meristema radicular. Após este período, os bulbos foram colocados nas soluções-teste por um período de 48 horas (RANK *et al.* , 1997).

As concentrações utilizadas para cada tratamento variaram de 1 a 20  $\mu\text{L/L}$  para o glifosato; 250 a 1500 mg/L para o Mancozeb; 0,25 a 2  $\mu\text{L/L}$  para a Beta-ciflutrina e, 25 a 250  $\mu\text{L/L}$  para o Fention.

Após o período de exposição, o bulbo com menor desenvolvimento radicular em cada tratamento e no controle negativo foi descartado.

Os bioensaios para cada agrotóxico foram realizados separadamente e com seu respectivo controle negativo.

### 5.3 Análise da toxicidade

O comprimento das raízes foi utilizado como índice de toxicidade, como referência padrão foram utilizadas três raízes. Para cada bulbo, o comprimento das três raízes maiores foi medido com auxílio de uma régua e, então estimado o comprimento médio. Cada tratamento foi comparado com o controle negativo e a ocorrência de toxicidade (inibição do crescimento) foi considerada quando a diferença entre tratamento e controle negativo foi estatisticamente significativa. Como teste estatístico foi utilizado o teste ANOVA.

### 5.4 Análise da Genotoxicidade

#### 5.4.1 Coleta e fixação das raízes

Após o período de exposição, os bulbos de cebola foram retirados das soluções-teste e cerca 8 a 10 raízes de cada bulbo foram coletadas, fixadas em etanol:ácido acético (3:1) durante aproximadamente 6 horas e armazenadas em etanol 70% a 4°C para posterior preparação e observação de lâminas.

#### 5.4.2 Preparação das lâminas

Para a preparação das lâminas, as raízes foram retiradas do etanol 70%, lavadas em água destilada, submetidas à hidrólise ácida com HCl 1N durante 8 minutos a 60°C,

lavadas novamente em água destilada, coradas durante 1 hora em orceína-acética 1% aquecida e então, preparadas em uma lâmina de citologia através de esmagamento manual.

Para cada bulbo foram preparadas pelo menos duas lâminas, contendo uma raiz cada uma. Para cada bulbo, foi estimado o número de micronúcleos em 2.000 células e o número de anormalidades (cromossomos retardatários, pontes cromossômicas e fragmentos) em 100 anáfases-telófases (Figura 1). Para as análises, as lâminas foram codificadas e examinadas pela mesma pessoa.

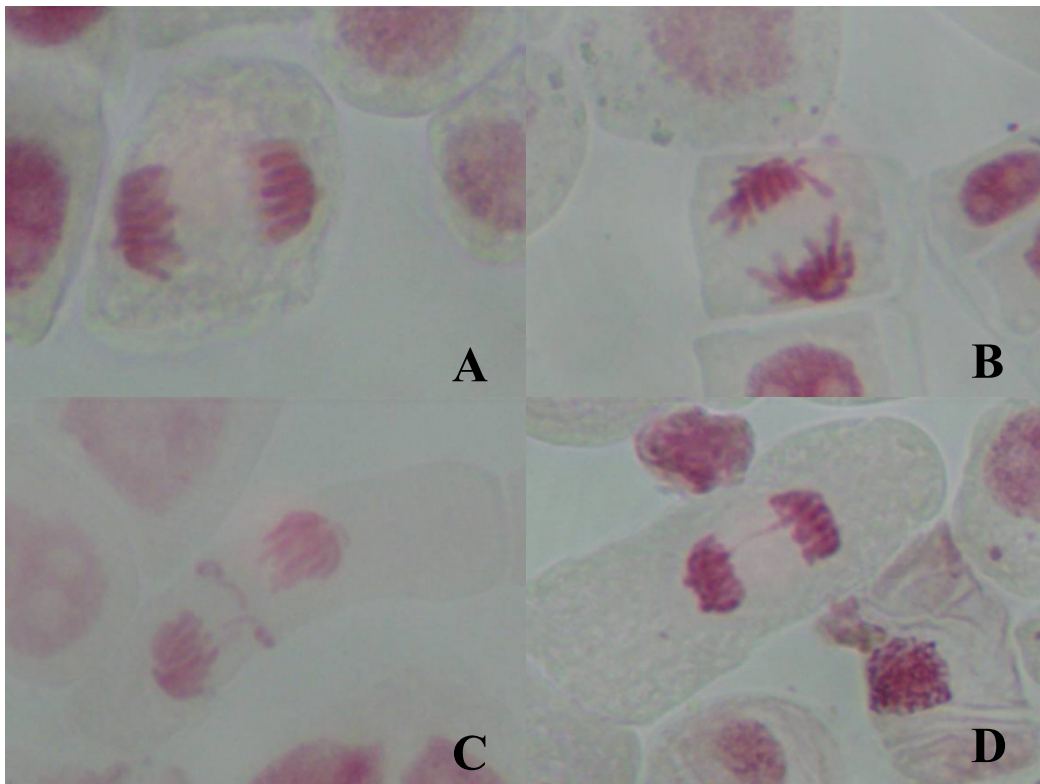


Figura 1. A) Anáfase normal. B) Cromossomo Retardatário. C) Fragmento e Cromossomo Retardatário. D) Ponte.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. GLIFOSATO

Na primeira série de bioensaios com o Glifosato, utilizando as concentrações de 20 µL/L, 15 µL/L, 10 µL/L e 5 µL/L houve inibição significativa do crescimento das raízes (Tabela 2). A taxa de crescimento radicular dos bulbos expostos ao Glifosato foi entre 79% e 83% inferior ao observado no controle negativo. Dessa forma, o número de células que apresentavam divisões celulares (anáfases e telófases) foi muito baixo, impossibilitando a realização das análises microscópicas.

Tabela 2 - Tratamentos com Glifosato nas concentrações de 5 µL/L a 20 µL/L observados em *A. cepa*.

	Tratamento				
	Controle	5 µL/L	10 µL/L	15 µL/L	20 µL/L
Comprimento Raiz	4,3 ± 0,4	0,8 ± 0,1*	0,8 ± 0,3*	0,9 ± 0,3*	0,8 ± 0,4*
% Crescimento	100	19	18	21	17

\* Valor significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ )

Foi realizada então uma segunda série de bioensaios com o Glifosato, nas concentrações de 1 µL/L, 2 µL/L, 3 µL/L e 4 µL/L (Tabela 3). Da mesma forma que nas concentrações anteriores, houve redução significativa do crescimento das raízes (37% a 58%). Entretanto, nestes bioensaios foi possível realizar as análises microscópicas. Considerando a análise de anormalidades da anáfase-telófase, o número total de anormalidades foi significativamente maior nas quatro concentrações testadas quando comparadas com o controle. Todas as concentrações apresentaram maior número de fragmentos cromossômicos, porém, somente as concentrações 3 µL/L e 4 µL/L resultaram em aumento no número de pontes e cromossomos retardatários. O número médio de micronúcleos em 2.000 células analisadas foi significativamente maior nas cebolas expostas ao glifosato, com um aparente aumento de MN com o aumento da concentração.



Tabela 3 - Tratamentos com Glifosato nas concentrações de 1 µL/L a 4 µL/L observados em *A. cepa*.

	Tratamento				
	Controle	1 µL/L	2 µL/L	3 µL/L	4 µL/L
Comprimento Raiz	3,8 ± 0,7	2,4 ± 0,4*	1,9 ± 0,4*	2,0 ± 0,3*	1,6 ± 0,2*
% Crescimento	100	63	50	51	42
Fragmento	0,8 ± 1,8	11,4 ± 2,9*	5,8 ± 2,6*	14,8 ± 3,83*	17,4 ± 5,5*
Retardatário	7,0 ± 1,7	11,6 ± 1,5	12,8 ± 3,1	19,4 ± 5,8*	22,8 ± 4,5*
Ponte	4,6 ± 2,1	4,8 ± 3,3	4,8 ± 2,0	12,2 ± 3,3*	10,6 ± 4,2*
Total de anormalidades	12,4 ± 3,3	27,8 ± 2,8*	23,4 ± 2,0*	46,4 ± 1,1*	51,0 ± 4,1*
MN	0,4 ± 0,5	2,6 ± 0,9*	6,2 ± 3,3*	9,4 ± 0,5*	14,0 ± 2,0*

\* Valor significativamente diferente do controle negativo (p<0,05)

## 6.2. MANCOZEB

O agrotóxico com o princípio ativo Mancozeb foi testado nas concentrações de 250 mg/L, 500 mg/L, 1000 mg/L e 1500 mg/L. As quatro concentrações inibiram significativamente o crescimento das raízes, bem como resultaram em aumento significativo em todos os parâmetros de genotoxicidade analisados (Tabela 4). Não foram realizadas análises de micronúcleos para este agrotóxico.

Tabela 4 - Tratamentos com Mancozeb nas concentrações de 250 mg/L a 1500 mg/L observados em *A. cepa*.

	Tratamento				
	Controle	250 mg/L	500 mg/L	1000 mg/L	1500 mg/L
Comprimento Raiz	2,4 ± 1,0	1,0 ± 0,6*	1,5 ± 0,8*	1,6 ± 0,9*	1,2 ± 0,6*
% Crescimento	100	45	61	66	48
Fragmento	0,2 ± 0,4	1,2 ± 0,4*	11,0 ± 5,7*	25,2 ± 8,5*	24,4 ± 5,8*
Retardatário	1,0 ± 1,0	1,0 ± 0,7	21,8 ± 8,1*	36,8 ± 8,8*	43,4 ± 2,7*
Ponte	0,6 ± 0,5	2,4 ± 0,9*	7,4 ± 1,1*	10,8 ± 5,5*	8,4 ± 1,1*
Total Anormalidades	1,8 ± 0,8	4,6 ± 0,9*	40,2 ± 10,8*	72,8 ± 7,6*	76,2 ± 7,1*

\* Valor significativamente diferente do controle negativo (p<0,05)

### 6.3. BETA – CIFLUTRINA (TURBO)

A Tabela 4 apresenta os dados obtidos na análise do piretróide  $\beta$  – ciflutrina, nas concentrações de 0,25  $\mu$ L/L a 2  $\mu$ L/L. Pode-se observar uma ação citotóxica deste agrotóxico, resultando em redução significativa do crescimento das raízes, com exceção da maior concentração testada (2  $\mu$ L/L). Todas as cinco concentrações testadas resultaram em aumento na frequência de pontes, cromossomos retardatários, fragmentos e total de anormalidades da anáfase-telófase, bem como na taxa de micronúcleos.

Tabela 5 - Tratamentos com Beta - ciflutrina nas concentrações de 0,25 µL/L a 2 µL/L observados em *A. cepa*.

	Tratamento					
	Controle	0,25 µL/L	0,5 µL/L	0,75 µL/L	1 µL/L	2 µL/L
Comprimento Raiz	3,1 ± 0,6	1,4 ± 0,3*	2,1 ± 0,2*	2,0 ± 1,3*	1,4 ± 0,2*	2,4 ± 0,9
% Crescimento	100	44	68	66	46	78
Fragmento	0,8 ± 1,0	5,6 ± 3,0*	6,0 ± 2,0*	5,8 ± 3,6*	6,2 ± 3,7*	5,4 ± 3,9*
Retardatório	6,6 ± 2,4	29,4± 3,6*	28,4 ± 9,4*	37,6±4,2*	43,4± 2,5*	49,4 ± 7,4*
Ponte	2,0 ± 1,2	7,2 ± 1,1*	7,8 ± 2,2*	9,2 ± 3,3*	6,0 ± 4,0*	8,0 ± 5,1*
Total de anormalidades	9,4 ± 2,9	42,2± 1,5*	42,2± 11,5*	50,8± 7,7*	55,6± 3,0*	62,8 ± 4,8*
MN	1,6 ± 0,9	7,2 ± 1,8*	9,4 ± 2,5*	9,6 ± 0,6*	11,2±0,5*	11,4 ± 0,6*

\* Valor significativamente diferente do controle negativo (p<0,05)

#### 6.4. FENTION

Em uma primeira série de testes, utilizando quatro concentrações de Fention (de 50 µL/L a 500 µL/L) pode-se verificar a toxicidade deste inseticida organofosforado, pois os bulbos de cebola expostos apresentaram baixa taxa de crescimento das raízes (Tabela 6). Não foi possível realizar análises microscópicas para estes tratamentos, devido ao baixo número de divisões celulares observado nas raízes expostas ao agrotóxico

Tabela 6 - Tratamentos com Fention nas concentrações de 50 µL/L a 500 µL/L observados em *A. cepa*.

	Tratamento				
	Controle	50 µL/L	100 µL/L	250 µL/L	500 µL/L
Comprimento Raiz	2,5 ± 1,0	0,6 ± 0,1*	0,3 ± 0,2*	0,7 ± 0,3*	0,5 ± 0,2*
% Crescimento	100	28	12	29	18

\* Valor significativamente diferente do controle negativo (p<0,05)

Foram realizados, então, bioensaios com Fention na concentração de 25 µL/L, juntamente com um tratamento com Glifosato, na concentração de 1 µL/L, e um tratamento misto, contendo Glifosato (concentração de 25 µL/L) e Fention (concentração de 1 µL/L), além do controle negativo. Os resultados são apresentados na Tabela 7. O Fention não inibiu significativamente o crescimento das raízes, diferentemente dos tratamentos com Glifosato e Glifosato + Fention. Os tratamentos com Fention e Glifosato + Fention resultaram em aumento significativo em todos os parâmetros de genotoxicidade, incluindo micronúcleos. Já o tratamento com Glifosato diferiu significativamente do controle no número médio de fragmentos, no total de anormalidades da anáfase-telófase e na frequência de micronúcleos. Os resultados do tratamento Glifosato + Fention foram mais semelhantes ao Glifosato quanto à toxicidade e ao Fention quanto à genotoxicidade, com exceção da frequência de pontes.

Tabela 7 - Tratamentos com Glifosato na concentração de 1 µL/L, Fention na concentração de 25 µL/L, Glifosato 1 µL/L + Fention 25 µL/L observados em *A. cepa*.

	Tratamento			
	Controle	Fention 25 µL/L	Glifosato 1 µL/L	Glifosato 1 µL/L + Fention 25 µL/L
Comprimento Raiz	2,2 ± 1,0	1,1 ± 0,4	0,7 ± 0,2*	0,7 ± 0,1*
% Crescimento	100	51	30	32
Fragmento	0,4 ± 0,5	11,4 ± 4,0*	3,0 ± 1,6*	15,8 ± 4,9*
Retardatário	1,8 ± 1,9	56,6 ± 8,2*	5,4 ± 2,5	40,4 ± 3,8*
Ponte	1,4 ± 1,1	11,2 ± 4,8*	2,6 ± 0,6	22,4 ± 4,4*
Total Anormalidades	3,6 ± 2,3	79,2 ± 1,6*	10,8 ± 4,1*	78,6 ± 3,4*
MN	1,6 ± 1,1	9,0 ± 0,7*	4,6 ± 1,7*	10,0 ± 1,0*

\* Valor significativamente diferente do controle negativo (p<0,05).G=Glifosato; F= Fention

## 7. DISCUSSÃO

As alterações cromossômicas são reconhecidas como importantes conseqüências de ações genotóxicas de agentes químicos (NATARAJAN, 2002), aos quais muitos organismos, inclusive o homem, estão expostos. Estudos epidemiológicos têm mostrado que pessoas com freqüências elevadas de danos citogenéticos apresentam maiores riscos de desenvolvimento de câncer (OBE *et al.*, 2002). Por estas razões, testes biológicos para avaliação de danos ao DNA provocados por agentes químicos têm sido desenvolvidos com a finalidade de garantir um ambiente seguro. Dentre estes sistemas-teste, o teste de *Allium cepa* tem se caracterizado como um modelo rápido e eficiente na avaliação da genotoxicidade causada por poluentes ambientais (GRANT, 1999; FISKESJÖ e LEVAN, 1994; FISKESJÖ, 1993; FISKESJÖ, 1988; FISKESJÖ, 1985). Estudos de sistemas de ativação metabólica em plantas vêm sendo realizados, há anos, e a capacidade de vegetais superiores ativarem promutágenos em mutágenos já foi demonstrada por vários pesquisadores (CONCEIÇÃO, 2002).

Os dados sobre a toxicidade e genotoxicidade dos agrotóxicos, são de uma forma geral, raros no Brasil e controversos na literatura internacional. No presente estudo foram avaliadas a toxicidade e a genotoxicidade das formulações comerciais dos agrotóxicos cujos ingredientes ativos são o glifosato, o mancozeb, o fention e a beta-ciflutrina.

Alguns estudos com agrotóxicos têm demonstrado diferenças com relação à toxicidade e genotoxicidade entre o ingrediente ativo e as formulações comerciais. Os surfactantes e outros componentes chamados “inertes”, geralmente aumentam a toxicidade destas formulações BENDER *et al.* (2006). NONDILLO *et al.*, 2007, demonstraram que os componentes inertes, tais como os surfactantes, contribuem com cerca de 50% da toxicidade total da formulação completa do agrotóxico. Assim, para os dados do presente estudo é mais apropriado considerar as formulações comerciais dos agrotóxicos, do que apenas seus ingredientes ativos.

O Glifosato (N-phosphonomethylglycine) é um herbicida eficaz que atua na síntese de ácidos aminados aromáticos nas plantas. Os potenciais genotóxico deste herbicida em resultados disponíveis na literatura revelam uma atividade fraca da formulação técnica. Em geral, os dados disponíveis na literatura científica mostram uma baixa toxicidade aguda e crônica do glifosato na concentração normalmente usada na

agricultura ou encontrada em produtos tratados (BOLOGNESI *et al.*, 2003). Segundo RANK *et al.* (1997) há formulações técnicas que demonstram alguma atividade genotóxica, e BOLOGNESI *et al.*, 2003 confirma estes dados e mostra o efeito da dose com glifosato. De acordo com BRAGUINI (2005) o agrotóxico Roundup®, formulação comercial contendo glifosato, produziu efeitos genotóxicos em algumas espécies de peixes. Na presente pesquisa sobre o glifosato ocorreu a inibição do crescimento da raiz, demonstrando toxicidade, e também um aumento significativo de anormalidades da anáfase-talófase e de MN, confirmando os dados anteriores sobre a genotoxicidade deste agrotóxico.

Os dados do presente estudo demonstraram citotoxicidade e genotoxicidade para a beta-ciflutrina. Nos estudos em que foram testados os piretróides, a ciflutrina mostrou genotoxicidade tanto *in vitro* como *in vivo* (TISCH *et al.*, 2005; ELIK *et al.*, 2005). A ciflutrina é uma substância clastogênica que tem efeitos citotóxicos em sistemas de mamíferos, de acordo com BENDER *et al.* (2006). Entretanto, a ciflutrina não mostrou uma genotoxicidade dependente da dose. Os efeitos citotóxicos dos piretróides foram relatados por CABALLO *et al.* (1992) e FISHEL *et al.* (2005).

O dano oxidativo e genotóxico observado nos agrotóxicos contendo mancozeb pode estar envolvido na patogênese das várias patologias associadas com a exposição crônica do mesmo, incluindo o câncer. A baixa toxicidade e persistência ambiental do fungicida mancozeb, permitiram seu uso mundial na agricultura, mesmo que os efeitos da exposição subcrônica ou crônica fossem relatados. Em particular, foram observadas a indução da esterilidade em ratos fêmeas, a alteração de seu ciclo, diminuição no número de folículos e o tamanho do ovário, junto com a implantação alterada do embrião (BINDALI E KALIWAL, 2002). Nos animais masculinos, a contagem de esperma diminuída e a frequência aumentada do esperma com morfologia principal aberrante foram relatadas (KHAN E SINHA, 1996). Além disso, a capacidade de mancozeb para alterar a secreção da glândula endócrina (BISSON E HONTELA, 2002) e para induzir a degeneração neuronal (JARRARD *et al.*, 2004), junto com o potencial carcinogênico (BELPOGGI *et al.*, 2002) deste composto, tem sido descrita recentemente. Os resultados aqui apresentados sugerem atividade citotóxica e genotóxica em *Allium cepa* da formulação contendo mancozeb. Ação genotóxica também foi observada em linfócitos de trabalhadores expostos ao Mancozeb (BINDALI E KALIWAL, 2002).

Os agrotóxicos contendo fention apresentam restrições quanto à toxicidade para inimigos naturais e carência elevada (21 dias) (GUTIERREZ & ETTENE 1981). O

presente estudo mostra evidências de toxicidade e genotoxicidade para os agrotóxicos contendo este componente.

As misturas químicas são um problema sempre atual em todos os países, devido aos efeitos sinérgicos ou antagônicos que podem resultar de tais misturas. Desta maneira, efeitos genotóxicos que podem às vezes ser insignificantes quando os produtos químicos individuais são considerados, pode tornar-se significativo quando integrado nestas misturas. Em face disto, alguns autores têm sugerido a avaliação das misturas de agrotóxicos utilizadas no campo, além das análises individuais (SCOZ *et al.*, 2004). No presente estudo, foi feita uma tentativa neste sentido, utilizando uma combinação de Glifosato e Fention. Os resultados desta mistura quanto à toxicidade foram semelhantes ao Glifosato e mais similares ao Fention quanto à genotoxicidade. Entretanto a frequência de pontes foi cerca de duas vezes maior na mistura contendo Glifosato e Fention (média de 22,4) do que aquela observada no Fention (média de 11,2), sugerindo algum sinergismo entre os componentes da mistura. Entretanto, estes dados devem ser considerados como preliminares e necessitam de confirmação.

De um modo geral, os estudos *in vivo* realizados com mamíferos apresentam resultados negativos, quando a exposição é realizada em peixes, anfíbios e, mais recentemente em répteis, são encontrados resultados positivos consistentes.(SCOZ *et al.*, 2004). Isto demonstra a importância de se realizar estudos com diferentes grupos de organismos, animais e vegetais. O presente trabalho ampliou o conhecimento sobre os efeitos de quatro agrotóxicos sobre as células de *Allium cepa*, e de espécies vegetais de uma maneira geral, sendo que a possibilidade de extrapolações para outros grupos de organismos ainda requer mais estudos.

O dano genético provocado pelos contaminantes ambientais, entre os quais os agrotóxicos, tem conseqüências significativas para sobrevivência em longo prazo da biota natural. A manutenção da biodiversidade pode estar ameaçada devido à exposição constante aos produtos químicos tóxicos e seus efeitos deletérios cumulativos. O modelo agrícola convencional, centrado no uso abusivo de recursos naturais e de agroquímicos sintéticos, permitiu aumentar a produção e produtividade de alguns cultivos em certas regiões, mas vem causando forte agressão ao ambiente, sendo insustentável a longo prazo. Uma verdadeira modernização da agricultura exige que os princípios de manejo dos recursos naturais e a seleção de tecnologias usadas no processo produtivo sejam compatíveis com a heterogeneidade dos agroecossistemas,



levando-se em conta os conhecimentos locais, os avanços científicos e a socialização e o uso de tecnologias menos agressivas ao ambiente e à saúde das pessoas (NONDILLO *et al.*, 2007).

## 8. CONCLUSÃO

Os bioensaios com *Allium cepa* revelaram que os agrotóxicos contendo o glifosato, o mancozeb, a  $\beta$  – ciflutrina, e o fenthion são significativamente citotóxicos e genotóxicos, nas concentrações utilizadas: glifosato (1  $\mu\text{L/L}$  a 4  $\mu\text{L/L}$ ); mancozeb (250 mg/L a 1500 mg/L);  $\beta$  – ciflutrina (0,25  $\mu\text{L/L}$  a 2  $\mu\text{L/L}$ ); fention (50  $\mu\text{L/L}$  a 500  $\mu\text{L/L}$ ) e glifosato (1  $\mu\text{L/L}$ ), fention (25  $\mu\text{L/L}$ ), glifosato (1  $\mu\text{L/L}$ ) + fention (25  $\mu\text{L/L}$ ) em comparação com o controle negativo. Os resultados demonstram que há alteração citogenética causada por defensivos agrícolas, mesmo em concentrações muito mais baixas das utilizadas no campo.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. São Paulo: Agrofit, 2000. p. 1 e 2. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> Acesso em: 19 jan. 2009.

AHMAD, N. *et al.* Determination of Dithiocarbamate and its breakdown product ethylenethiourea in fruits and vegetables. **Journal Assoc. Off. Anal. Chem**, Houston, v.78, p. 1238-1243, Sep. 1995.

ALDRIDGE, W. N. An Assesment of the Toxicological Properties of Pyrethroids and their Neurotoxicology. **Crit. Rev. Toxicol.** Boca Raton, v.21, p. 89-104, Sep. 1990.

ANDRADE, A. J. M. *et al.* Reproductive Effects of Deltamethrin on Male Offspring of Rats Exposed during Pregnancy and Lactation. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v. 36, p. 310-317, Mar 2002.

ANDRADE JR., D. R. *et al.* Os Radicais Livres de Oxigênio e as Doenças Pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Rio de Janeiro, v.31, n.1, Jan. 2005.

ANVISA. **Agrotóxicos**. Brasília: ANVISA, 2005. p. 25-58. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm> > Acesso em: 10 dez. 2008.

AZEVEDO, L. A. S. **Proteção Integrada de Plantas com Fungicidas: Teoria, Prática e Manejo**. São Paulo: Roca, 2001. p.10 – 230.

BARJA, B C.; HERSZAGE, M.; AFONSO, M. S. **Iron: Phosphonate Complexes**. 3<sup>th</sup> ed Oxon: Polyhedron, 2001. v.20, p.1821-1830.

BELPOGGI, F. *et al.* Results of Long-Term Experimental Studies on the Carcinogenicity of Ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in Rats. **Ann. New York Acad. Sci.** New York, v. 982, p. 123- 136, Jan. 2002.

BENDER, R. P. *et al.* Polychlorinated Biphenyl Quinone Metabolites Poison Human Topoisomerase II Alpha: Altering Enzymefunction by Blocking The N-Termnal Protein Gate.

**Biochemistry**, New York, v. 45, n. 33, p. 10140-10152, Sep. 2006.

BINDALI, B. B.; KALIWAL, B. B. Anti-Implantation Effect of a Carbamate Fungicide Mancozeb in Albino Mice. **Ind. Health**, v. 40, p. 191-197, Jan. 2002.

BISSON, M.; HONTELA, A. Cytotoxic and Endocrine-Disrupting Potnetial of Atrazine, Diazinon, Endosulfan and Mancozeb in Adrenocortical Steroidogenic Cells of Rainbow Trout Exposed in vitro. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 180, p. 110-117, May 2002.

BOLOGNESI, C. *et al.* Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup. **J. Agric. Food Chem**, Baltimore, v. 45, n. 5, p. 1957 – 1962, Dec. 2003

BRAGUINI, W. L. **Efeitos da Deltametrina e do Glifosato, sobre Parâmetros do Metabolismo Energético Mitocondrial, sobre Membranas Artificiais e Naturais em Experimentos “in vivo”**. 2005, 191 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Bioquímicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CABALLO, C. *et al.* Analysis of Cytogenetic Damage Induced in CHO Cells by the Pyrethroid Insecticide Fenvalerate: Teratogen., Carcinogen., Mutagen. **Toxicology**, Houston, v 12, n. 6, p. 243-249, Sep. 1992.

CALDAS, E. D.; BOON, P. E.; TRESSOU, J. Probabilistic of the Cumulative Acute Exposure to Organophosphorus and Carbamate Insecticides in Brazilian Diet. **Toxicology**, Houston, v 222, p. 132-142, Sep. 2006.

CALVIELLO, G. *et al.* DNA Damage and Apoptosis Induction by the Pesticide Mancozeb in Rat Cells: Involvement of the Oxidative Mechanism. **JANO**, Rome, v. 63, n. 14, p. 39 – 46, July 2005.

CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic Effects of Cypermethrin and Fenvalerate on the Root Meristem Cell of *Allium Cepa*. **Environ. Exp. Bot.**, Philadelphia, v. 42, p. 181 – 189. Jan. 1999.

CONCEIÇÃO, M. H. **Resíduos de Pesticidas em Tomates: Metodologia Analítica e Avaliação da Exposição Humana**. 2002, 185 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2002.

DALLEGRAVE, E. **Toxicologia Clínica: Aspectos Teórico-Práticos**. Porto Alegre: UFRGS, 2006. p. 44 – 61.

DALSENTER, P.R. Reproductive Effects of Endosulfan on Male Offspring of Rats Exposed During Pregnancy and Lactation. **Human Exp. Toxicol**, Basingstoke, v. 18, n. 9, p. 307-310, Mar. 1999.

DAVIES, J. H. The Pyrethroids: na Historical Intoducion. In: **The Pyrethroid Inseticides**. Londres: Taylor & Francis, 1985. chap. 1, p. 1-31.

ECOBICHON, D. J. **Toxicology – The Basic Science of Poisons**. 5<sup>th</sup> ed Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. p.1026-82.

EDWARDS, C. A. The Concept of Integrated Systems in Lower Imput/Sustainable Agriculture. **American Journal of Alternative Agriculture**, Baltimore, v. 2, n.1, p. 148-152. Jan. 1987.

EL-AZIZ, A.; SAHLAB, A. M.; EL KHALIL, A.. Influence of Diazinon and Deltamethrin on Reproductive Organs and Fertility of Male Rats. **Dtsch. Tieraerztl. Wochenschr.**, Leine, v. 101, p. 230 - 232, Feb. 1994.

ELLIOT, M. *et al.* A.Phosphotable Pyrethroid. **Nature**, London, v. 246, n.. 9, p. 169-170, out 1973.

ELLIOT, T. Established Pyrethroid Insecticides. **Pestic. Sci.**, Chichester, v.11, n. 3, p. 119 – 128, Mar. 1980.

ELIK, A. C. *et al.* Evaluation of Cytogenetic Effects of Lambda-Cyhalothrin on Wistar Rat Bone Marrow by Gavage Administration. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, Charlottesville, v. 61, n.7, p. 128-133, Oct. 2005.

EL-SHAHABY, A. O. *et al.* Genotoxicity Screening of Industrial Wasterwater Using the Allium Cepa Chromosome Aberration Assay. **Pak. Journ. Biol. Sci.**, Baltimore, v. 42, n. 6, p. 181-189, Dec. 2003.

FARIA, N. M. X.; FACCHINI, L. I.; TOMASI, E. Processo de Produção Rural e Saúde na Serra Gaúcha: Um Estudo Descritivo. **Caderno de Saúde Pública**, Porto Alegre, v. 16, n. 1, Jan. 2000.

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, v. 1, n. 2, p. 51-55, Sep.2003.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: Conceitos, Doenças Relacionadas, Sistema de Defesa e Estresse Oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 61-68, Jan. 1997.

FEPAM. **Efluentes Líquidos Industriais: Cargas Poluidoras Lançadas nos Corpos Hídricos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler, 2007. 145 p.

FILIZOLA, H. F. *et al.* Monitoramento e Avaliação de Risco de Contaminação por Pesticidas em Água Superficial e Subterrânea na Região de Guairá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 5, p. 659 – 667, 2002.

FISKEJÖ, G. The *Allium cepa* test in a Wasterwater Monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 8, p.291 – 298, Aug. 1993.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test as a Standard in Environmental Monitoring. **Hereditas**, New York, v. 102, p.99 – 112, Sep. 1985.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test as an Alternative in Environmental Studies: The Relative Toxicity of Metal Ions. **Mutation Research**, Orlando, v. 197, n.21, p. 243-260 Oct. 1988.

FISKEJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the Firstten MeIC Chemicals in the *Allium cepa*. **Atlas**, New York, v. 21, p.139 – 149, Dec. 1994.

FISHEL, F. M. Pesticide Toxicity Profile: Synthetic Pyrethroid Pesticides. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, Charlottesville, v. 60, n.5, p. 118-123, July. 2005.

GARRIDO, L. R.; SONEGO, O. R. **Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado**. Porto Alegre: EMBRAPA, 2003, p. 10 -16.

GIOVANNINI, E. Toxidez por Cobre em Vinhedos. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 3, n.2, p. 5 – 10, Mar.1997.

GLICKMAN, A. H.; CASIDA, J. E. Species and Structural Variations Affecting Pyrethroi Neurotoxicity. **Neurobehav. Toxicol. Teratol.**, Tarrytown, v.4, n. 3, p. 793–799, Mar. 1982.

GRANT, W. F. Chromosome Aberration Assays in *Allium*. **Mutation Research**, Orlando, v. 99, n.3, p. 273 -29, Sep. 1982.

GRANT, W. F. Chromosome Aberration in Plants as a Monitoring System. **Environ. Health Persp.**, New York, v. 27, n.1, p. 37 -43, Sep. 1978.

GRANT, W. F. Higher Plant Assays for the Detection of Chromosomal Aberations and Gene Mutations – a Brief Historical Background on Their Use for Screening and Monitoring Environmental Chemicals. **Mutation Research**, Orlando, v. 426, n.6, p. 107 -112, Oct. 1999.

GROVER, I. S. *et al.* Genotoxic Effects of Some Organophosphorous Pesticides – In vivo Chromosomal Aberration Bioassay in Root Meristems of *Allium* and *Hordeum*. **Citology**. Saint Louis, v. 53, n.9, p. 181 -191, Oct. 1990.

GUTIERREZ, J; ETTENNE, J. Some Data On The Tetranychid Mites Attacking Cultivated Plants In Senegal. **Agronomie Tropicale**, Madrid, v. 36, n. 14, p. 391 – 394, Nov. 1981.

HIETANEIN, E; LINNAINMAA, K.; VAINIO, H. Effects of Phenoxyherbicides and Glyphosate on the Hepatic and Intestinal Biotransformation Activities in the Rat. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v. 53, n. 2 p. 103 - 112, Jan. 1983.

JARRARD, H. E. *et al.* Impacts of Carbamate Pesticides on Olfactory Neurophysiology Cholinesterase Activity in Coho Salmon ( *Oncorhynchus Kisutch*). **Aquat. Toxicol.** Boston, v. 69, p. 133 – 148, Jan. 2004.

KALE, M.; *et al.* Lipid Peroxidative Damage on Pyrethroid Exposure and Alterations in Antioxidant Status in Rats Erythrocytes: as Possible Involvement of Reactive Oxygen Species. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v. 105, p. 197 – 205, Nov. 1999.

KANEKO, H.; OHKAWA, H.; MYAMOTO, J.. Comparative Metabolism of Fenvalerate and the (2S, alfaS)-isomer in Rats and Mice. **J. Pestic. Sci.**, Toshima-ku, v. 6, p. 317-326 Sep. 1981.

KHAN, P. K .; SINHA, S. P. Ameliorating Effect of Vitamin C on Murine Sperm Toxicity Induced by Three Pesticides ( Endosulfan, Phophomison and Mancozeb). **Mutagenesis**, London, v. 11, p. 33 – 36, July 1996.

LIOI, M. B. *et al.* Cytogenetic Damage and Induction of Pro-oxidant State in Human Lymphocyte Exposed in vitro to Glyphosate, Vinclozolin, Atrazine and DPX-E9636. **Environ Mol Mutagen.**, New York, v. 32, n. 1 p. 39 -46, Jan. 1998.

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 Matéria Orgânica. In: ANAIS DO SBSR, 11, 2003, Belo Horizontes. **Resumos**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2003. p. 2343-2349.

MA, T. H. *et al.* The Improved Allium/Vicia Root Tip Micronucleus Assay for Clastogenicity of Environmental Polluants. **Mutation Research**, Orlando, v. 334, n.5, p. 185 -195, Oct.1995.

McCONNEL, J. S.; HOSSNER, L. R. X-ray Diffraction and Spectroscopic Studies of Absorbed Glyphosate. **Journal Agric. Fod Chem.**, Washington, v. 37, p.555-560, July 1989.

MAITI, P. K. *et al.* Loss of Membrana Integrity and Inhibition of Type – I Iodothyronine 5'-monodeiodinase Activity by Fenvalerate in Female Mouse. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 214, p. 905 - 909, Mar. 1995.

MYAMOTO, J. A Risk Assessment of Household Inseticides. **Summoto Pyrethroid World**, Kita-ku, v.20, n. 2, p. 14 - 19, Mar. 1993.

MYAMOTO, J. *et al.* Pyrethroids, Nerve Poisons: How their Risks to Human Health Should be Assessed. **Toxicol. Lett.** Shanon, v.82, n.83, p. 933 - 940, Mar. 1995.

NATARAJAN, A. T. Chromosome Aberration: Past, Present And Future. **Mutation Research**, Orlando, v. 504, n.6, p. 3 -16, Oct. 2002.

NONDILLO, M. *et al.* Efeito de Inseticidas Neonicotinóides Sobre a Mosca-Das-Frutas Sul-Americana *Anastrepha Fraterculus* na Cultura da Videira. **BioAssay**, Bento Gonçalves, v. 2, n. 9, p. 5-14, Feb. 2007.

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

OLIVEIRA-SILVA, J. J. *et al.* Influência de Fatores Sócio-econômicos na Contaminação por Agrotóxicos. **Revista Brasileira de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 130-135, Jul.2005.

PELUSO, M. *et al.* 32P-postlabeling Detection of DNA Adducts in Mice Treated with the Herbicide Roundup. **Environ. Mol. Mutagen.**, New York, v. 31, n. 1 p. 55-59, Jan. 1998.

PHILIP, G. H.; REDDY, P. M.; SRIDEVI, G. Cypermethrin-Induced “*in vivo*” Alterations in the Carbohydrate metabolism of Freshwater fish, *Labeo rohita*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, Orlando, v.31, n.2, p. 173 –178, Oct. 1995.

PICCOLO, A.; CELANO, G.; CONTE, P. Adsorption of glyphosate by Humic Substances. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2442-2446, July 1996.

RAMOS, H. H. Perdas Ligadas à Má Aplicação de Agrotóxicos. In: ANAIS DO SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE APLICAÇÃO DE AGROTÓXICOS, 2., 2001, Jundiaí. **Resumos**. Jundiaí: EMBRAPA, 2001. p. 403-404.

RANK, J. *et al.* Genotoxicity Testing of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient Glyphosate Isopropylamine Using the Mouse Bone Marrow Micronucleus Test, Salmonella Mutagenicity Test, and Allium Anaphase-Telophase Test. **Mutation Research**, Orlando, v. 300, n.5, p. 29-36, Oct. 1997.

REDDY, P. M.; PHILLIP, G. H. Changes in the Levels of Respiration and Ions in the Tissues of Freshwater Fish, *Labeo rohita* Under Fenvalerate Stress. **Chemosphere**, Kidlington, v. 25, n. 12, p. 843 - 852, Mar. 1992.

RODRIGUES, A. F. Os Caminhos das Águas. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 22-26, Nov. 1998.

SCOZ, P. L. *et al.* Controle Químico de *Anastrepha Fraterculus* em Laboratório. **Ciência Rural**, São Paulo, v. 34, p. 1689-1690, Oct. 2004.

SEAB. **Indicadores**. Porto Alegre: Secretaria Estadual de Agricultura e Abastecimento, 2009. p.2. Disponível em: <<http://www.saa.rs.gov.br>> Acesso em: 14 jan. 2009.

SHAN, G.; HAMMOCK, B. D. Development of Sensitive Assays Based on Alpha-cyanocontaining esters. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 299, n. 5, p. 54 – 62, Nov. 2001.

SILVA, E. N. *et al.* Educação para a Saúde: O Conhecimento Como Ferramenta de Redução dos Riscos da Exposição Ocupacional a Agrotóxicos. In: ANAIS DO ENCONTRO DE EXTENSÃO DA UFMG, 7. 2004, Belo Horizonte. **Resumos**. Belo Horizonte: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2004. p. 48-49.

SILVA, J. M. *et al.* Agrotóxicos e Trabalho: Uma Combinação Perigosa Para a Saúde do Trabalhador Rural. **Ciência & Saúde**, São Paulo, v. 10, n.4, Abr. 2005.

SINDAG. **Sindicato nacional da indústria de produtos para defesa agrícola**. Santa Maria. SINDAG, 2006. p. 5 Disponível em: < <http://www.cesnors.ufsm.br/professores/arcj/Defensivos%20Comercializados%20no%20Brasil-2006.xls> > Acesso em: 20 dez. 2008.

SETTLEMIRE, C. T. *et al.* Action of some Inseticides on Membranes of Mouse Liver Mitochondria. **Bull. Environ. Contam. Toxiol.**, New York, v. 11, n. 3, p. 169 - 173, Mar. 1974.

SOUZA, R. T. **Tecnologia Para Aplicação de Produtos Fitossanitários em Videira**. Porto Alegre: EMBRAPA, 2007, p. 10 -14. Disponível em: < <http://www.cnpuv.embrapa.br> > Acesso em: 16 out. 2007.



SOUZA, R. T. **Uso de Equipamentos de Proteção Individual na Pulverização de Videiras**. Porto Alegre: EMBRAPA, 2006, p. 8 -10. Disponível em: < <http://www.cnpuv.embrapa.br> > Acesso em: 13 out. 2007.

SPADOTTO, C. A. Abordagem Interdisciplinar na Avaliação Ambiental de Agrotóxicos. Petrópolis: Vozes, 2006, p. 56 – 59.

TABAREAN, I. V.; NARAHASHI, T. Potent Modulation of Tetrodotoxin-sensitive and Tetrodotoxin-resistant Sodium Channels by the Type II Pyrethroid Deltamethrin. **J. Pharmacol. Ther.**, Bethesda, v. 284, p 958-965, July 1998.

TALBOT, A. R. *et al.* Acute Poisoning with a Glyphosate-surfactant Herbicide (“Roundup”): a Review of 93 cases. **Human Exp. Toxicology.**, Basingstoke, v.10, n. 1, p. 1 – 8. Jan. 1991.

TISCH, M. *et al.* Genotoxic Effects of Pentachlorophenol, Lindane, Transfluthrin, Cyfluthrin, And Natural Pyrethrum on Human Mucosal Cells Of The Inferior And Middle Nasal **Conchae. Am. J. Rhinol.** New York, v. 19, n. 29, p. 141-151, Dec. 2005.

TOMYTA, R. Y **Legislação de Agrotóxicos e sua Contribuição para a Proteção da Qualidade do Meio Ambiente**. São Paulo: Roca, 2005, p.89 – 101.

TRAPÉ, A. Z. O Caso dos Agrotóxicos. In: ROCHA, S. *et al.* **Isto é trabalho de gente? Vida, Doença e Trabalho no Brasil**. Petrópolis: Vozes, 1993. cap. 1, p. 568 - 593.

TUCKER, S. B.; FLANNIGAN, S. A.; ROSS, C. E. . Inhibition of Cutaneous Paresthesia Resulting from Synthetic Pyrethroid exposure. **Int. Journal Dermatol.**, Oxford, v. 23, p. 686-689, dec. 1984

VERSCHOYLE, R. D.; ALDRIDGE, W. N. Structure-activity Relationships of some Pyrethroids in Rats. **Arch. Toxicol.**, Berlin, v. 45, p. 325 – 329, Sep. 1980.

VIJVERBERG, H. P. M.; VAN DER ZALM, J. M.; VAN DER BERCKEN, J. Similar Mode of Action of Pyrethroids and DDT on Sodium Channel Gating in Myelinated Nerves. **Nature**, London, v. 295, n. 10, p. 601- 603, out 1982.

WHITE, P. A; RASMUSSEN, J. B. The Genotoxic Wastes in Surface Waters. **Mutat Res.**, Madrid, v. 410, p. 223-236, Jan. 1998.

WHO. **Deltamethrin, Environmental health Criteria 97: International Program on Chemical Safety**. Geneva: World Health Organization, 1990. p. 2. Disponível em: <<http://www.who.com/planet/deh97.html> > Acesso em: 14 abr. 2008.

WHO. **Principles for Evaluating Health Risks to Reproduction Associated with Exposure to Chemicals: Environmental Health Criteria**. Geneva: World Health Organization, 2001. p. 1-187 . Disponível em: <<http://www.who.com/planet/pehracs.html> > Acesso em: 14 abr. 2008.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C.. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. **Reg. Toxicol. Pharmacol.** Orlando, v. 31, p. 117-165, Feb. 2000.

YAÑEZ, L. *et al.* Levels of dichloropiphenyltrichloroethane and deltamethrin in humans and environmental samples en malarious areas of Mexico. **Environ. Res.**, Orlando v. 88, p. 174-181, Aug. 2002.

YOUNES, M.; GALAL-GORCHEV, H. Food Chemisty. **Toxicology.**, Philadelphia, v.38, p. 587, Dec. 2000.

ZAMBRONE, F. A. D. **SINTOX: Sistema de Informação Toxicológica.** Rio de janeiro: Fiocruz, 2002, p.2-43. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/cict.oque.estrut.dect/sintox.kitbrasil.html> > Acesso em 2 jan. 2009.