
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LIVIA LOUREIRO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS,
GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DO
INSETICIDA FIPRONIL, APÓS
FOTODEGRADAÇÃO, UTILIZANDO
Allium cepa COMO ORGANISMO TESTE**

A large, abstract geometric pattern in the bottom half of the page, consisting of various shades of blue and white triangles and polygons arranged in a complex, overlapping design.

Rio Claro
2010

LIVIA LOUREIRO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E
MUTAGÊNICOS DO FIPRONIL, APÓS FOTODEGRADAÇÃO,
UTILIZANDO *Allium cepa* COMO ORGANISMO TESTE**

Orientador: Maria Aparecida Marin-Morales

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharelado em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2010

543.5
S729a

Souza, Livia Loureiro de

Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do
fipronil, após fotodegradação, utilizando allium cepa como organismo
teste / Livia Loureiro de Souza. - Rio Claro : [s.n.], 2010
44 f. : il., figs., gráfs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Aparecida Marin-Morales

1. Inseticidas. 2. Mutagênese ambiental. 3. Aberrações cromossômicas.
4. Micronúcleos. 5. Toxicidade de metabólitos. I. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Neide e José Roberto, aos quais sou eternamente grata por darem a mim, a oportunidade de existir!

Dedico também a todos os seres do universo, que encontrarem aqui, formas úteis de conhecimento que os auxiliem a evoluírem durante suas jornadas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa de apoio financeiro (proc. 2009/01685-1), que foi muito importante durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro.

Ao Instituto de Biociências e ao Departamento de Biologia, envolvendo todos os professores e funcionários que muito contribuíram para minha formação.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais - CEIS, pela disponibilização de equipamentos e de espaço para a preparação das soluções.

À Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Marin-Morales, primeiramente por ser minha eterna professora, e pela orientação, tanto na vida profissional quanto na vida pessoal.

À Prof^a. Dr^a. Dejanira Franceschi de Angelis que possibilita o desenvolvimento de inúmeras atividades no Laboratório de Mutagênese.

Ao Prof. Dr. Odair Correia Bueno que forneceu espaço no CEIS para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha companheira de trabalho e amiga, Janaína, que, com muita doçura, me ajudou muito durante os experimentos.

À técnica de laboratório do CEIS, Itamar, que me ajudou atenciosamente em todos os experimentos que desenvolvi durante este trabalho.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Biologia, Sandra, Gerson e Anderson por todo o apoio.

Às funcionárias mais divertidas do Departamento de Biologia, Maria da Graça (Nêga) e Neusa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente, agradeço a Deus, por sua infinita bondade. Creio que não tenho tamanho suficiente para falar sobre Deus, no entanto, tenho tamanho suficiente para reconhecer uma pequena parte de sua obra e agradecê-lo em todos os instantes da minha minúscula existência por ser o amor, o equilíbrio, a paz, a justiça e a bondade do universo que aquece as profundezas dos corações terrestres, ainda humanos.

À mãe Terra, por gentilmente me abrigar em seus braços, aos animais por encherem a minha vida de alegria e a música por dar o tom da minha existência.

Aos grandes filósofos, pensadores, cientistas e compositores da história humana, por muito contribuírem para a compreensão dos mistérios do universo.

À minha mãe, Neide, por ser uma pessoa fantástica, carinhosa e companheira. Eu a amo muito e sou imensamente grata a ela por sempre me dar o melhor de si em minha formação como pessoa. Obrigada por ser minha amiga, por sempre fazer o possível e o impossível para me fazer feliz, por me apoiar nos meus planos, por comemorar comigo as minhas conquistas e por ter uma paciência **ENORME** comigo. Obrigada por todo carinho, amor e atenção que você me dá todos os dias.

Ao meu pai, José Roberto, que me ensinou muito sobre a construção do caráter e que não permitiu que meus medos tomassem as rédeas da minha vida. Obrigada por me ensinar o verdadeiro valor do conhecimento, e por sempre me dar meios para que eu conseguisse obter estudos de qualidade. Se hoje eu alcanço uma conquista, devo muito a você, pai. Obrigada por sempre me ensinar a aprender.

Ao meu namorado, Tomaz, pelo amor, pela confiança, atenção e amizade. Obrigada por acreditar em mim e ouvir sobre os meus planos e projetos. Graças aos seus conselhos eu tive grande ajuda para realizar boas escolhas. Obrigada pelas ótimas conversas intermináveis e por nem sempre concordar comigo, obrigada por puxar minha orelha quando eu preciso e por sempre me tratar tão bem.

Agradeço a minha avó materna, Maria Aurora (Dona Lóla), por ser uma vovó maravilhosa e por ter muita paciência para ouvir sobre todas as coisas que eu penso.

À minha tia, Maria Áurea e minha prima, Rafaela, pela grande admiração, embora eu não mereça nem metade.

As minhas melhores amizades, Bruno, Débora, Lídia, Luciano, Mariana, Marcos, Natália, Ricardo, Tânia pelo apoio em todos os momentos da minha vida, pelas risadas e por todas as ótimas lembranças.

Aos amigos e amigas do curso de Ciências Biológicas, especialmente, Bia, Betânia, Coragem, Danada, Dom, Formiga, Frodo, Hanson, Mari, Nádia, Siri, Socó, Pri, Pivete, Pulga, Ursão, Vivi, pela ótima convivência, por toda a diversão e tudo o que deixou o nosso curso de biologia bem mais gostoso!

À Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Marin-Morales por ser minha professora, orientadora e amiga, e pela grande aprendizagem que ela proporcionou durante esses quatro anos de iniciação científica. Sempre me guiando por ótimos caminhos, desde meu ingresso no curso de Ecologia, durante o momento das dúvidas e incertezas (quando transferi para o curso de Ciências Biológicas), até o momento de hoje, que com muito orgulho, me aproximo do fim de mais um ciclo da minha vida, com a felicidade de alcançar um dos objetivos que almejo desde a minha infância.

À Prof^a. Dr^a. Carmem S. F. Christofolletti por sempre me ajudar quando preciso e por deixar o ambiente do departamento mais alegre.

Aos companheiros de laboratório Prof^a. Dr^a Doralice Maria Cella, Reinaldo, Simone, Thiago pela convivência gostosa.

Aos meus companheiros e amigos “mutagênicos”, Bárbara, Bruna, Cintya, Cris, Dânia, Dani, Gui, Jana, Jaque, Márcia, Matheus, Nádia, Raquel, Rê, Tati, Thaís e Sandra, pela **GRANDE** ajuda, cooperação e amizade, que torna nosso ambiente de laboratório um lugar muito agradável.

RESUMO

Compostos lançados ao meio ambiente
podem induzir alterações genéticas nos

I was looking back on my life,
and all the things I've done to me...
I'm still looking for the answers
I'm still searching for the key...

(Ozzy Osbourne)

seres vivos. Um grupo de químicos que apresenta toxicidade comprovada para os organismos é o dos agrotóxicos, sendo que os inseticidas se destacam nesta ação. Os inseticidas da família dos Fenil-pirazois têm ampla aplicação tanto na agricultura como nas residências. O fipronil, um inseticida deste grupo químico, é amplamente usado em diversas culturas e em residências, principalmente no combate a pulgas e carrapatos de cães e gatos. O uso de fipronil pode representar um risco para a saúde ambiental e humana, pois este inseticida apresenta uma potencialidade de indução de morte celular, independente do tipo de célula. O fipronil, quando em contato com o meio, pode sofrer vários processos de degradação, entre eles o processo de fotodegradação. O efeito tóxico de um de seus metabólitos derivado de fotodegradação, o sulfona-fipronil, é aproximadamente 20 vezes maior que o próprio fipronil. Este composto pode ainda interagir com outras substâncias presentes no meio ambiente e agir de forma sinérgica. Sementes de *Allium cepa* foram submetidas a soluções de fipronil, pré-expostas ou não à degradação pela luz solar, em testes de germinação realizados tanto no claro como no escuro. Foi avaliado o potencial acumulativo do inseticida, por meio de testes de recuperação de 48 e 72 horas. Os resultados mostraram que quando o fipronil foi previamente exposto ao sol, ele apresentou um maior potencial genotóxico e mutagênico, comprovando um efeito mais drástico dos metabólitos formados pela fotodegradação.

Palavras chaves: inseticida, aberrações cromossômicas, micronúcleo, toxicidade de metabólitos.

ABSTRACT

Compounds released into the environment can induce genetic alterations in living organisms. A group of chemicals that shows proven toxicity is the pesticides, and the insecticides are the most harmful. The insecticides of the family phenylpyrazole have wide application both in agriculture and in homes. Fipronil, an insecticide of this chemical group, is widely used in various cultures and in homes, mainly for fighting fleas and ticks on dogs and cats. The use of fipronil may represent a risk to man and the environmental health, since this pesticide can potentially induce cell death, regardless of cell type. Fipronil, when in contact with the environment, can undergo various degradation processes, including photodegradation. The toxic effect of one of its metabolites derived from photodegradation, sulfone-fipronil, is approximately 20 fold as great as fipronil itself. The *A. cepa* test system was used to evaluate cytotoxic, genotoxicity and mutagenic effects of fipronil before and after photodegradation. Seeds of *Allium cepa* were subjected to solutions of fipronil, pre-exposed or not exposed to degradation by sunlight. The germination tests were conducted both under the effect of light and in the dark. We evaluated the cumulative potential of this insecticide using 48 and 72-hours recovery tests. The results showed that when fipronil was previously exposed to the sun, it presented a greater genotoxic and mutagenic potential, showing that the metabolites formed by photodegradation can show more harmful effects.

Keywords: insecticide, chromosomal aberrations, micronuclei, metabolites toxicity.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4. RESULTADOS	23
4.1 Experimento 1	.23
4.2 Experimento 2	.24
4.3 Experimento 3	.26
5. DISCUSSÃO.	.34
6. CONCLUSÃO.	.38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	14
Figura 2	29
Figura 3	30
Figura 4	31
Figura 5	32
Figura 6	33

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, inúmeros compostos químicos são lançados no meio ambiente, como resultado da intensificação das atividades industriais e agrícolas e do intenso processo de urbanização. Os agentes químicos lançados no ambiente por efluentes industriais, urbanos e por atividades agrícolas são, potencialmente, contaminantes da água, do solo e do ar e podem induzir efeitos nocivos, decorrentes das interações dessas substâncias com os organismos expostos. A potencialidade tóxica destes descartes tem levado ao desenvolvimento de estudos que avaliam, de forma abrangente, os vários impactos que eles promovem no ambiente (CHASIN; PEDROZO, 2003).

Além do alto grau de toxicidade dos produtos químicos lançados ao ambiente, o que pode colocar em risco a vida de inúmeros organismos, eles também podem apresentar características mutagênicas, e levar a alterações na sequência das bases no DNA, acelerando ou aumentando o aparecimento de mutações que, se acumuladas, podem resultar no aparecimento de doenças degenerativas e do câncer. Uma vez agindo no material genético de uma espécie, pode também desencadear problemas semelhantes para toda a ecologia do planeta (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Segundo Cortez Filho (2005), a revolução agrícola, que teve seu início no Brasil na década 50, foi marcada por profundas mudanças na agricultura tradicional, decorrentes da aquisição de novas tecnologias, principalmente as baseadas no uso intenso de agrotóxicos. Em meados da década de 70, ocorreu uma grande expansão na produção agrícola, em decorrência do uso de agrotóxicos, intensificado pelos incentivos à produção e à política de exportação (KHOURI, 2007). No entanto, estes novos componentes utilizados na modernização da agricultura causam grandes impactos sobre o ambiente e à saúde humana (CORTEZ FILHO, 2005; KHOURI, 2007).

O impacto que cada agrotóxico promove sobre a biota do solo varia de acordo com as características do produto, as características físicas do ambiente e o tipo de microflora associada. A meia-vida dos agrotóxicos no solo e o risco de contaminação do lençol freático dependem, também, da interação desses diferentes fatores e das vias de degradação do produto (GRISOLIA, 2005). Embora a agricultura seja apenas uma das inúmeras fontes não-pontuais de poluição, ela geralmente é apontada

como a maior contribuinte de todas as categorias de poluentes (EDWIN, 1996; BAKORE, et al., 2004; POTTER et al., 2007). 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 ainda ser absorvido pelos organismos. Quando absorvidos, poderão ser detoxificados ou acumulados e, neste último caso, entrar na cadeia alimentar, atingindo também o homem (EDWARDS, 1973; NIMMO, 1985; HAMILTON; CROSSLEY, 2004; ZHOU et al., 2006).

Devido a ocorrência de efeitos danosos desses agentes químicos sobre o meio ambiente e sobre os seres humanos, vários países criaram normas que regulamentam o uso e a produção de agrotóxicos, com o objetivo de minimizar os danos na agricultura e ao ambiente. O Brasil é hoje o terceiro país que mais aplica agrotóxicos na agricultura, usando até mesmo produtos que já são proibidos em outros países (KHOURI, 2007).

Os agrotóxicos podem entrar em contato com a água de ecossistemas naturais, quando carregados até os rios por erosões/lixiviações, ou atingir a atmosfera, via evaporação/erosão eólica, e aí contaminar as águas superficiais, por meio das precipitações. As embalagens dos defensivos agrícolas também podem representar outra fonte de contaminação, tanto pelo descarte das embalagens como pela limpeza inapropriada das mesmas. A extensão da contaminação de um pesticida aplicado em um campo depende da combinação de fatores como: clima, tipo de solo, tipo da cultura e tipo de tratamento que cada campo recebe (ALTINOK et al., 2006). O uso contínuo e abusivo dos agrotóxicos deixa resíduos tóxicos nos alimentos, que podem provocar intoxicações agudas ou crônicas.

Os efeitos derivados da ação de agrotóxicos podem ser diversos, tais como reação direta com o DNA nuclear; incorporação no DNA durante a replicação celular; interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisões incorretas da célula (VEIGA, 1995; FERNANDES, 2005). Muitos estudos têm mostrado, ainda, que alguns agrotóxicos têm ação mutagênica, estando associado ao desenvolvimento de cânceres (KHOURI, 2007; GADEVA; DIMITROV, 2008) e a desequilíbrios endócrinos (BICHON et al., 2008; GADEVA; DIMITROV, 2008).

Tem sido empregados em avaliações ambientais bioensaios desenvolvidos com plantas, por estas serem mais sensíveis e de mais fácil execução, quando comparados aos bioensaios realizados com animais. Os ensaios com plantas são

amplamente utilizados em testes genéticos e de monitoramento de locais afetados, sendo usados em estudos de efeito mutagênico causado por agentes diversos (FERNANDES et al., 2007; LEME et al., 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2007; CARITÁ ; MARIN-MORALES, 2008; PEDRO, 2008). Dentre as plantas, a espécie *A. cepa* tem sido indicada como organismo teste nos estudos de biomonitoramento, pela eficiência de resposta a agentes citotóxicos e genotóxicos. (KOVALCHUK et al., 1998; FERNANDES et al., 2007; LEME ; MARIN-MORALES, 2007, CARITÁ ; MARIN-MORALES, 2008; PEDRO, 2008).

O teste de aberrações cromossômicas com *A. cepa* fornece um rápido diagnóstico dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de substâncias químicas dispostas no meio (GRANT, 1982; 1994; FISKEJÖ, 1985; 1988; 1993, RANK; NIELSEN, 1998). A sensibilidade deste teste deve-se, principalmente, ao grande tamanho e pequeno número de seus cromossomos. Os efeitos mutagênicos podem ser analisados por parâmetros microscópicos, tais como a frequência e tipos de aberrações cromossômicas, além de anormalidades celulares (KOVALCHUK et al., 1998).

Os resultados positivos, obtidos pelo teste de *A. cepa*, devem ser considerados como uma indicação de que o químico testado também pode causar danos biológicos em outros organismos (FISKESJÖ, 1985). Segundo Chauhan et al. (1999), *A. cepa* é um dos melhores sistemas-teste estabelecidos para avaliar o potencial genotóxico de químicos no ambiente, devido a sua boa correlação com sistemas-teste de mamíferos. Para Rank e Nielsen (1998), a sensibilidade do teste de mutagenicidade com *Allium* possui correlação em 82% aos resultados obtidos com roedores.

Os testes com micronúcleos são considerados uns dos mais promissores para a avaliação da mutagenicidade do ambiente, uma vez que são eficientes, simples e rápidos (FERRARI, 1991; FENECH, 2003; CARDOZO et al., 2006 apud FERNANDES et al., 2007). A ocorrência de micronúcleos, de acordo com muitos autores, tem sido interpretada como um indicador de efeitos clastogênicos ou aneugênicos (WALKER et al., 1996 apud FERNANDES, 2007).

Agentes químicos podem induzir micronúcleos, por meio de distúrbios do fuso ou de quebra cromossômicas. Esses micronúcleos originados de quebra cromossômica, são derivados de uma resposta clastogênica ao agente químico (SUDHAKAR, 1998 apud RIBEIRO; MARQUES, 2003). Outros químicos podem agir

no material genético despolimerizando os microtubulos e causando danos na formação do fuso mitótico. Isto pode determinar uma segregação inapropriada dos cromossomos, quando as células filhas são formadas, resultando em anormalidades. (SAUNDERS et al., 2000 apud FERNANDES et al., 2007). De acordo com FERNANDES et al. (2007), a ação clastogênica é confirmada pela presença de micronúcleos derivados de quebra cromossômica durante a divisão celular, e a ação aneugênica é consequência da inativação do fuso mitótico, que leva a perda de cromossomos inteiros.

O fipronil (nomenclatura IUPAC: (RS)-5-amino-1-(2,6-dicloro- $\alpha\alpha\alpha$ -trifluor-*p*-tolil)-4-trifluorometilsulfinil-pirazol-3-carbonitrila) é um inseticida do grupo dos fenil-pirazol, descoberto pela Rhône-Poulenc Agro (Figura 1), e entrou no mercado no início dos anos 90 (STEVENS et al. , 1998; TINGLE et al. , 2003; PEDRO, 2008; LIU et al., 2008) .

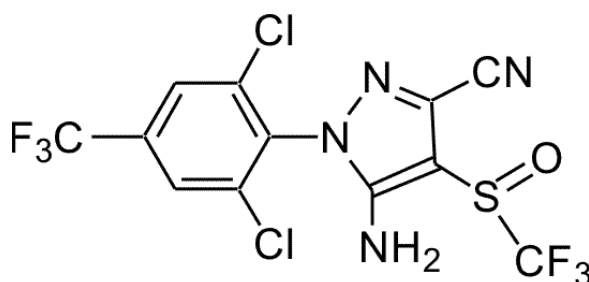


Figura 1. Fórmula estrutural do fipronil

O fipronil é um inseticida cuja classificação toxicológica é de classe II (altamente tóxico), pode ser caracterizado como um composto de contato e ingestão, com consequências que variam de espécie para espécie. Em algumas espécies, o efeito de ingestão é o mais importante, enquanto em outras a ação de contato é a mais pronunciada (TINGLE et al. , 2003).

O seu uso é indicado como alternativa aos inseticidas organofosforados, por apresentarem toxicidade menor que estes químicos (STEVENS et al. , 1998; TINGLE et al. , 2003).

Segundo Tingle et al. (2003) e Pedro (2008), o fipronil é utilizado na agricultura para o controle de insetos pragas, sendo aplicado, principalmente, em culturas de algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, cevada, feijão, milho, pastagens, soja e trigo. Em residências é usado no tratamento de ectoparasitas de animais, como pulgas e carrapatos.

O inseticida tem ação no sistema nervoso, sendo um potente bloqueador do ácido gama-aminobutírico (GABA), que é um neurotransmissor inibidor da transmissão pré-sináptica no sistema nervoso central e que controla o fluxo de cloro através da membrana da célula nervosa. O inseticida se liga ao canal de cloro tornando o sistema nervoso central hiperexcitado, devido a ausência da inibição sináptica, causando a morte do inseto. (STEVENS et al., 1998; TINGLE et al. , 2003; EL HASSANI et al. , 2005.; DAS et al. , 2006; CI et al. , 2007; PEDRO, 2008, BICHON et al. , 2008; LIU et al., 2008). Normalmente, o GABA é liberado nas terminações nervosas pré-sinápticas e se liga ao receptor da proteína pós-sináptico pelo canal de cloro intrínseco. Quando o GABA se liga ao receptor, o canal é aberto e íons de cloro fluem para dentro do neurônio pós-sináptico. Esta permeabilidade ao cloro pode hiperpolarizar o potencial de membrana, promovendo uma diminuição do impulso nervoso estimulado (BLOOMQUIST, 2009).

Em ratos, o fipronil é moderadamente tóxico, causando um aumento da excitação nervosa, efeito este considerado leve e temporário (BICHON et al., 2008; DAS et al., 2006). De acordo com Tingle et al., 2003 e Das et al., 2006, o inseticida fipronil é altamente tóxico em invertebrados aquáticos, peixes e algumas aves terrestres. Em humanos e mamíferos, o fipronil apresenta uma baixa interferência nos íons receptores de GABA, o que o caracteriza um baixo efeito neurotóxico, embora já tenha sido registrado alguns casos de intoxicações agudas. Foi observado um forte efeito genotóxico em células epiteliais e, mais recentemente, casos de desequilíbrio do sistema endócrino e da tireóide em humanos (BICHON et al., 2008).

Uma substância lançada ao meio ambiente pode sofrer alterações transformando-se em um agente inerte ou, até mesmo, em compostos ainda mais potentes que a fórmula original. Algumas substâncias não são degradadas, persistindo no ambiente, enquanto outras podem sofrer degradação biótica ou abiótica. A degradação ocorre quando a molécula de um dado agente químico é decomposta em moléculas menores, que, por vezes, podem se transformar, pelos processos naturais, em uma substância com maior disponibilidade para os organismos. A degradação de uma substância ocorre devido às suas propriedades intrínsecas e o produto degradado pode caracterizar um tipo de dano ambiental, associado à ação dos metabólitos formados (CHASIN; PEDROZO, 2003).

Em sistemas naturais, os processos fotoquímicos são importantes para a transformação de substâncias tóxicas que persistem no ambiente e que são pobremente biodegradadas. As reações fotoquímicas podem ocorrer por duas vias: a fotodegradação direta do composto, após a absorção de fótons pela radiação solar e a fotodegradação indireta, induzida por espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete, radicais hidroxilas e peroxilas (CHASIN; PEDROZO, 2003; OU et al., 2008).

Em estudos realizados por Mukherjee (2006), o fipronil pode contaminar o solo por aplicação direta ou por vias indiretas como, por exemplo, mecanismos de deriva, lixiviações ou pelo vento, caracterizando-se em um poluente persistente neste ambiente. Segundo o autor (2005), a persistência e disponibilidade do fipronil no solo são determinadas pela adsorção e dessorção desta substância com as partículas do solo, bem como por outros fatores dissipantes, como o transporte, a ação de microorganismos ou efeitos metabólicos da própria molécula não adsorvida.

O autor utilizou uma formulação de fipronil com 99% de pureza e observou que a adsorção do produto foi lenta e irreversível, ocorrendo dessorção em apenas 8-12% do total de partículas do pesticida adsorvidas nos solos, mostrando que a adsorção forma uma interação muito forte entre o pesticida e as partículas do solo. Interações hidrofóbicas entre moléculas não polares do fipronil e a matéria orgânica presente nos solos é mais forte que as forças de Van-der-Waals ou pontes de hidrogênio, sugerindo que a adsorção do fipronil ocorre na matéria orgânica do solo.

O fipronil é persistente, por cerca de um ano, em ambientes com temperaturas moderadas e ausência de íons metálicos. Porém, o inseticida pode degradar e levar a formação de um certo número de metabólitos, dependendo das condições em que se encontra. Sua meia-vida pode variar de 18 a 308 dias, em temperatura de 22 a 25°C, variando de acordo com o tipo de solo, pH e quantidade de matéria orgânica, sendo que na superfície do solo, ele ainda pode sofrer processos de fotodegradação (TINGLE et al., 2003).

O fipronil pode ser degradado no ambiente em MB46513 (desulfenil-fipronil), MB45950 (sulfido-fipronil), MB46136 (sulfono-fipronil) e RPA200766 (amido-fipronil), como resultado das reações de fotólise, redução, oxidação e hidrólise (TINGLE et al., 2003; RAVETON et al., 2007, LIU et al., 2008), mas, segundo Raveton et al. (2007), o metabólito mais encontrado, como derivado da ação da fotodegradação é o MB46513 (densulfenil-fipronil).

Segundo Tingle et al. (2003), a degradação do fipronil em solo argiloso é mais lenta, quando este é exposto à luz, apresentando uma meia-vida de 34 dias. Os três metabólitos do fipronil mais encontrados no solo são: RPA200766 (amido-fipronil), MB46513 (desulfonil-fipronil) e o RPA 104615. Na água, o fipronil tem meia-vida de 3,63 horas, quando exposto à luz, e se degrada em 43% no metabólito MB46513 (desulfonil-fipronil) e 8% no RPA 104615, não sendo encontrados compostos voláteis. A reação de fotólise é ainda mais rápida na presença de H_2O_2 .

Os metabólitos do fipronil, como, por exemplo, o MB46136 (sulfono-fipronil) e o MB45950 (sulfido-fipronil), podem ser ainda mais tóxicos que o próprio pesticida (TINGLE et al., 2003). De acordo com Everts (1997 apud TINGLE et al., 2003), em estudos realizados com *Daphnia* sp., esses metabólitos são mais tóxicos para este invertebrado do que para outros invertebrados de água doce.

Os metabólitos MB46136, MB45950 e RPA200766 (amido-fipronil), podem ser considerados de baixo risco para invertebrados aquáticos, exceto quando disponível por um longo período. Contudo, o metabólito MB46136 (sulfono-fipronil) mostrou-se muito mais tóxico para peixes de água doce do que o próprio inseticida, sendo seis vezes mais tóxico para truta arco-íris e 30 vezes mais tóxico para o peixe sol (EFSA, 2006 apud TINGLE et al., 2003).

Os estudos realizados por Pedro (2008) sugerem que os metabólitos do fipronil, quando fotodegradado, mostram maior genotoxicidade que o inseticida não degradado.

Leghait et al. (2009) observaram que, em ratos, o tratamento com fipronil foi associado com uma diminuição significativa das concentrações dos hormônios T3 e T4 totais no plasma destes organismos. As concentrações de hormônio tireoideano (TH) livre também diminuíram, significativamente, após tratamentos com fipronil, e este efeito foi associado a um aumento na concentração do hormônio tireoestimulante (TSH) no plasma. Os autores concluíram que o fipronil e seu principal metabólito MB46136 (sulfono-fipronil) podem interromper a função da tireóide, diminuindo as concentrações plasmáticas de T4, provavelmente devido à remoção deste hormônio do sangue. Os resultados observados indicaram que a ação do metabólito sulfono-fipronil foi 20 vezes maior que a do seu produto original (fipronil).

Segundo Hainzl e Casida (1996) (apud SCHLENK et al., 2001), o fipronil pode sofrer fotodegradação e resultar no metabólito densulfonil-fipronil que, em testes

realizados com *Daphnia*, se mostrou duas vezes mais letal que o próprio fipronil, além de ser também mais persistente. Para Schlenk et al. (2001), o fipronil também pode degradar, por oxidação ou redução biológica, nos metabólicos sulfono-fipronil ou sulfido-fipronil, que tem efeitos mais potentes que o fipronil e, em alguns casos (ex. *Daphnia*), maior toxicidade aguda que o próprio inseticida.

O fipronil é um produto ativo que apresenta diferentes formulações usadas como inseticidas, sendo o produto Icon 6.2 FS™ uma das formulações amplamente utilizada em culturas de arroz de campos inundados dos EUA, para combater o coleóptero parasita *Lissorhoptrus oryzophilus*. Após 24-72 horas da aplicação do inseticida, a água desse campo de arroz é drenada e usada para outros fins, como o cultivo da lagosta mármore (*Procambarus* sp.) (SCHLENK et al., 2001). O fipronil e seus derivados, por serem relativamente insolúveis em água, são rapidamente decantados nas matrizes orgânicas dos solos e sedimentos (USEPA, 1996 apud SCHLENK et al., 2001). Com a drenagem, parte do sedimento é deslocado com a água, que vai promover uma toxicidade seletiva aos artrópodes, inclusive para *Procambarus* sp, que é sensível aos seus metabólitos. Os resultados desses experimentos indicaram que o fipronil é altamente tóxico para os adultos das lagostas (100% de letalidade para um período de 48 horas de exposição).

No estudo desenvolvido por Chaton et al. (2002), foram utilizadas espécies aquáticas não-alvos, associadas com populações-alvo de larvas de mosquito, para avaliar o impacto ecológico do fipronil em hidro-sistemas naturais, bem como para avaliar a toxicidade e bioacumulação do produto. Baseado neste estudo foi possível observar que o fipronil apresenta diferentes efeitos tóxicos contra a fauna de artrópodes aquático não-alvo, com bioacumulação variada. Os resultados apontaram que os cladóceros parecem ser relativamente resistentes, ao contrário dos copépodos que são muito sensíveis ao fipronil. As espécies de crustáceos podem acumular, *in vivo*, grandes quantidades de fipronil, independente de sua sensibilidade ao inseticida.

Para examinar o efeito de concentrações de fipronil em um ambiente de ecossistema estuarino, foram feitas réplicas de mesocosmos contendo parcelas intactas de pântano e água do mar, que foram expostas a três diferentes tratamentos de fipronil (150, 355, e 5000 ng/L). Foram adicionados a estes ambientes, durante 28 dias, peixes juvenis (*Cyprinodon variegatus*), bivalves juvenis (*Mercenaria mercenaria*), ostras (*Crassostrea virginica*) e camarão grama

(*Palaemonetes pugio*). Os resultados indicaram que não houve efeito do fipronil sobre os bivalves, as ostras e os peixes, porém os camarões foram sensíveis às duas maiores concentrações testadas (40% de sobrevivência para 355 ng/L e 0% de sobrevivência para 5000 ng/L), com persistência de efeito, mesmo depois de cessada a exposição (2 semanas após a exposição de 28 dias). Estes resultados sugerem que o fipronil pode ter impacto na população de camarões, o que indica a necessidade de uma maior cautela, quanto ao uso deste produto em áreas costeiras (WIRTH et al., 2004).

Nos últimos anos tem havido uma grande preocupação com os efeitos de pesticidas e outras substâncias químicas, quanto à possibilidade destes compostos alterarem o funcionamento normal do sistema endócrino humano e de animais silvestres. Estes agentes, hormonalmente ativos, podem causar uma variedade de efeitos adversos à saúde, incluindo perigos de desenvolvimento comportamental e reprodutivos (USEPA, 1997, apud OHI et al., 2004). Dados baseados em estudos com animais indicam que as alterações do desenvolvimento sexual podem resultar da exposição a pesticidas e produtos químicos industriais, que são capazes de perturbar o sistema endócrino, imitando/bloqueando os hormônios naturais ou interferindo nos mecanismos que os regulam (GRAY, 1998 apud OHI et al., 2004).

O fipronil é um inseticida listado como um produto químico que pode causar possíveis perturbações do sistema endócrino (COLBORN, 1998, apud OHI et al., 2004). Em estudos realizados por Ohi et al. (2004), foi investigado possíveis efeitos adversos de diferentes concentrações do inseticida fipronil (70, 140 e 280 mg / kg) (Frontline®) na reprodução de fêmeas de ratos Wistar. Pelos resultados obtidos no estudo de acasalamento, foi observado que a maior concentração testada do fipronil (280 mg / kg) reduziu o índice de gravidez em 67%. Os níveis de progesterona e estradiol plasmáticos diferiram em relação aos grupos controles, 96 h após o tratamento com fipronil (70 mg / kg). Estes resultados indicaram que o fipronil pode alterar o funcionamento do sistema endócrino e causar efeitos adversos na reprodução de organismos expostos.

Segundo uma revisão feita por Vidau et al. (2009), o fipronil pode provocar, em mamíferos, efeitos fisiológicos adversos, independente de seu alvo neuronal. Neste trabalho é citado que o inseticida pode modificar o metabolismo de vários compostos endógenos e de xenobióticos pela modulação das enzimas do citocromo P450 e, em particular, pela indução da isoenzimas CYP3A4 em hepatócitos

humanos. Ainda segundo Vidau et al. (2009), esta modulação do citocromo P450 promoveu, em roedores, o desenvolvimento de tumores da tireóide, pela perturbação do metabolismo hepático e excreção dos hormônios da tireóide. Da mesma forma, é descrito que o fipronil pode induzir efeitos adversos para a reprodução, alterando o citocromo dependente de progesterona e estradiol no metabolismo feminino de ratos. No entanto, as alterações endócrinas observadas em ratos e em seres humanos não estão sistematicamente correlacionadas, havendo a necessidade de outras investigações, para uma melhor determinação da atividade de desregulação endócrina causada, em mamíferos, pelo fipronil. Por outro lado, nos seres humanos, independentemente da sua ação do sistema endócrino, o fipronil e seus metabólitos sulfonas podem induzir citotoxicidade em hepatócitos.

Ainda pelos estudos de Vidau et al. (2009), conduzidos com células epiteliais de intestino Caco-2, foi possível obter uma boa correlação da integridade estrutural dessas células. Foram utilizados o fipronil e alguns de seus análogos estruturais, seus metabólitos sulfeto e sulfona e outro composto pertencente à mesma classe dos fenilpirazol, o ethiprol. Nesse estudo foi observado que o fipronil e seus derivados causaram efeitos na integridade do epitélio de células intestinais, sendo que fipronil foi o composto mais potente na indução de lesão da monocamada do intestino, uma vez que o valor de integridade do epitélio caiu de 100% para $20 \pm 1\%$, em relação ao controle, enquanto que o seu metabólito sulfona e sulfeto apresentaram valores reduzidos para $42 \pm 3,1\%$ e $62 \pm 2\%$, respectivamente. O ethiprol, por sua vez, obteve uma ligeira diminuição no valor de integridade do tecido, que foi apenas significativa ($85 \pm 1,9\%$ do controle), após um maior tempo de exposição (72 h). Segundo este autor, o fipronil possui potencial para induzir morte celular, independentemente do fenótipo da célula, o que sugere que esse inseticida age sobre os componentes celulares comuns a vários tipos de células, se não de todos. O estudo de Vidau et al. (2009) também mostrou que a exposição oral à altas doses de fipronil resulta em um distúrbio da homeostase intestinal.

Stehr et al. (2006), observaram que o fipronil apresenta efeitos teratogênicos para *Danio rerio*. Embriões do peixe zebra expostos ao fipronil apresentaram uma indução, conforme as concentrações aplicadas, da perda da resposta de fuga, um encurtamento no eixo longitudinal do corpo e a degeneração da notocorda, sendo este último efeito confirmado por exames histológicos, confirmando que a morfologia da notocorda foi normal até 24 h e degenerativa a partir de 30 horas de exposição.

O presente estudo foi desenvolvido através de ensaios com o inseticida fipronil devido ao alto grau de toxicidade deste composto levando em consideração o seu amplo uso na agricultura e nos domicílios.

2. OBJETIVOS

Pelo alto grau de toxicidade do inseticida fipronil e seu amplo uso na agricultura e nos domicílios, foram desenvolvidos ensaios com o inseticida, com o objetivo de:

- avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida sobre o organismo-teste *A. cepa*;
- avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida, após exposição das sementes em diferentes concentrações do fipronil, tanto em ensaios de germinação realizados na ausência de luz como na presença de luz;
- avaliar a ação citotóxica, genotóxica e mutagênica do fipronil, após a exposição prévia deste inseticida à luz solar.
- avaliar o potencial de recuperação dos organismos expostos às concentrações testadas do fipronil, em todos os testes realizados com este produto, por meio de ensaios de recuperação em água por 48 e 72 horas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios para avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida fipronil foram realizados com o sistema-teste *A. cepa*. Sementes desta planta (variedade Baia periforme) foram submetidas à germinação em dois tipos de ensaios, com duas concentrações do inseticida: C1= 0, 312 g/L e C2 = 0, 625 g/L.

Os dois ensaios foram desenvolvidos com sementes expostas à germinação nas concentrações acima citadas, tanto em ambiente com presença de luz como com ausência de luz (C1C = concentração de 0,312 g/L testada na presença de luz, C1E = concentração de 0,312 g/L testada na ausência de luz; C2C = concentração de 0,625 g/L testada na presença de luz, C2E = concentração de 0,625 g/L testada na ausência de luz). As sementes foram dispostas em placas de Petri, sendo uma placa para cada tratamento. Outro teste foi realizado, expondo sementes às mesmas concentrações acima citadas, porém com exposição prévia da solução de fipronil à luz solar (24 horas de exposição). (C1SC = concentração de 0,312 g/L testada na

presença de luz e pré degradada pela luz solar; C1SE = concentração de 0,312 g/L testada na ausência de luz e pré degradada pela luz solar; C2SC = concentração de 0,625 g/L testada na presença de luz e pré degradada pelo sol; C2SE = concentração de 0,625 g/L testada na ausência de luz e pré degradada pela luz solar). Neste caso, a germinação também se deu tanto no claro como no escuro. Ambos os tratamentos foram realizados com exposição contínua, seguidos de períodos de recuperação de 48 e 72 horas.

Foram realizados dois controles positivos (CP1 e CP2), onde as sementes foram submetidas à germinação em metil metano sulfonato (MMS) (químico de ação clastogênica - CP1) e no herbicida trifluralina (químico de ação aneugênica -CP2). O controle negativo (CN) foi realizado com sementes submetidas à germinação em água ultra pura.

O teste de recuperação seguiu o seguinte protocolo: após a germinação das sementes e quando as raízes alcançaram cerca de 1,5 cm de comprimento, o material foi transferido para placa de Petri contendo água ultra pura, onde permaneceram por um período de recuperação de 48 e 74 horas. Este procedimento foi realizado em todos os tratamentos propostos. Todos os meristemas radiculares coletados foram fixados em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético- v/v), por um período de 6 a 18 horas.

Para a realização das análises de índice mitótico e de aberrações cromossômicas, as raízes foram submetidas a uma hidrólise ácida (HCl 1N a 60° C) por 8-9 minutos, seguido de uma lavagem com água destilada. Em seguida foram submetidas ao reativo de Schiff por 2 horas em local escuro. As lâminas foram confeccionadas pela técnica de esmagamento suave, usando as regiões meristemáticas e F₁ das raízes. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e, após secagem por 24 horas, as lâminas foram montadas com Enthelan®, para serem, posteriormente, analisadas em microscopia de luz, sob aumento de 400x.

Para a análise de citotoxicidade, foram avaliados os índices mitóticos das células de todos os ensaios realizados com fipronil. As análises de genotoxicidade foram realizadas, contabilizando as células que apresentarem anormalidades como aderências cromossômicas, C-metáfase, anáfases e telófases com pontes cromossômicas, anáfases multipolares, atrasos anafásicos e telofásicos e perdas. Para as análises de mutagenicidade contabilizou-se o número de células que apresentavam quebras cromossômicas e micronúcleos. Para todos os ensaios

descritos acima, foram contabilizadas um total de cinco mil células por tratamento, sendo analisadas 1.000 células por lâminas, num total de cinco lâminas/tratamento. Os resultados foram avaliados pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis, com nível de 5% de significância.

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO 1

Análise do Potencial Citotóxico

A análise do efeito citotóxico foi obtida pela avaliação dos índices mitóticos de células meristemáticas de raízes de *A. cepa* (Figura 2). Os meristemas radiculares submetidos às diversas concentrações do inseticida fipronil apresentaram valores significativos, em relação ao CN, para:

- Controles positivos: CP1_{48h}, CP2_{48h} e CP2_{72h} (Figuras 2B e 2C);
- Concentrações sem pré-degradação (sem exposição prévia da solução à luz solar): C2C, na presença e C2E, na ausência de luz (Figura 2A);
- Concentrações pré-degradadas (com exposição prévia da solução à luz solar): C2SE_{72h}, na ausência de luz (Figura 2 C).

Análise do Potencial Genotóxico e Mutagênico

A avaliação do potencial genotóxico do inseticida fipronil foi realizada com base nos resultados de aberrações cromossômicas (AC) presentes em células meristemáticas de *A. cepa* (Figuras 3, 4C, 4D, 4E, 4F e 4G). Os ensaios realizados com as diferentes concentrações de inseticida fipronil apresentaram índices de AC significativos, em relação ao CN, para:

- Controles positivos: CP1, CP1_{48h}, CP1_{72h}, CP2_{48h}, CP2_{72h} (Figuras 3A, 3B e 3C);
- Concentrações sem pré-fotodegradação (sem exposição prévia da solução à luz solar): C2C, C2C_{48h} e C2C_{72h}, todos resultantes de ensaios na presença de luz (Figuras 3A, 3B e 3C);
- Concentrações pré-fotodegradadas (com exposição prévia da solução à luz solar): C1SC, C2SC, C2SC_{48h}, e C2SC_{72h}, todos resultantes de ensaios na presença de luz (Figuras 3A, 3B e 3C).

As aberrações cromossômicas, consideradas como efeitos genotóxicos, observadas nas análises realizadas com o inseticida fipronil, foram: metáfase com aderências e metáfase com quebras cromossômicas; C-metáfases; anáfase com pontes cromossômicas; anáfase e telófase com atrasos cromossômicos; anáfase com perdas cromossômicas e anáfases multipolares (Figuras 4C, 4D, 4E, 4F e 4G).

Para a avaliação do potencial mutagênico, foram contabilizadas as células meristemáticas portadoras de aberrações cromossômicas do tipo quebras cromossômicas (metáfase com quebras cromossômicas; anáfase com quebras) e micronúcleos, obtidas nos ensaios realizados com as diferentes concentrações do inseticida fipronil (Figuras 4A, 4B, 4H e 5). Foram obtidos resultados significativos para mutagenicidade, em relação ao CN, os ensaios:

- Controles positivos: CP1, CP1_{48h}, CP1_{72h}, CP2, CP2_{48h} e CP2_{72h} (Figuras 5A, 5B e 5C);
- Concentrações sem pré-fotodegradação (sem exposição prévia da solução à luz solar): C2C_{48h} e C2C_{72h}, todos resultantes de ensaios na presença de luz (Figuras 5B e 5C);
- Concentrações pré-fotodegradadas (com exposição prévia da solução à luz solar): C1SC, C2SC, C2SC_{48h} e C2SC_{72h}, todos resultantes de ensaios na presença de luz (Figuras 5A, 5B e 5C).

Os resultados para micronúcleos em células F₁ (Figura 6), obtidos nos ensaios com o inseticida fipronil apresentaram-se significativo, em relação ao CN, para:

- Controles Positivos: CP1, CP1_{48h}, CP1_{72h}, CP2, CP2_{48h} e CP2_{72h} (Figuras 6A, 6B e 6C);
- Concentrações sem pré-fotodegradação (sem exposição prévia da solução à luz solar): C2C_{48h}, na presença de luz (Figura 6B);
- Concentrações pré-fotodegradadas (com exposição prévia da solução à luz solar): C2SC_{48h}, na presença de luz e C2SE_{72h}, na ausência de luz (Figuras 6B e 6C).

4.2. EXPERIMENTO 2

Análise do Potencial Citotóxico

A análise do efeito citotóxico foi obtida pela avaliação dos índices mitóticos de células meristemáticas de raízes de *A. cepa* (Figura 2). Os meristemas radiculares submetidos às diversas concentrações do inseticida fipronil apresentaram valores significativos, em relação ao CN, para:

- Controles positivos: CP1_{48h}, CP2_{48h}, CP1_{72h} e CP2_{72h} (Figuras 2B e 2C);
- Concentrações sem pré-fotodegradação (sem exposição prévia da solução à luz solar): C2C, na presença e C1E, C2E, na ausência de luz (Figura 2A);
- Concentrações pré-fotodegradadas (com exposição prévia da solução à luz solar): C2SC, C2SC_{48h} e C2SC_{72h} na presença de luz (Figura 2A, 2B e 2C).

Análise do Potencial Genotóxico e Mutagênico

A avaliação do potencial genotóxico do inseticida fipronil foi realizada com base nos resultados de AC presentes em células meristemáticas de *A. cepa* (Figuras 3, 4C, 4D, 4E, 4F e 4G). Os ensaios realizados com as diferentes concentrações de inseticida fipronil, apresentaram índices de AC significativos, em relação ao CN, para:

- Controles positivos: CP1, CP1_{48h}, CP1_{72h}, CP2, CP2_{48h}, CP2_{72h} (Figuras 3A, 3B e 3C);
- Concentrações sem pré-fotodegradação (sem exposição prévia da solução à luz solar): C2C_{48h} e C2C_{72h}, todos resultantes de ensaios na presença de luz (Figuras 3B e 3C);
- Concentrações pré-fotodegradadas (com exposição prévia da solução à luz solar): C1SC, C2SC, C2SC_{48h}, e C2SC_{72h}, todos resultantes de ensaios na presença de luz (Figuras 3A, 3B e 3C).

As aberrações cromossômicas, consideradas como efeitos genotóxicos, observadas nas análises realizadas com o inseticida fipronil, foram: metáfase com aderências cromossômicas; metáfase e perdas cromossômicas; C-metáfases; anáfase com pontes cromossômicas; anáfase e telófase com atrasos cromossômicos; anáfase e perdas cromossômicas e anáfases multipolares (Figuras 4C, 4D, 4E, 4F e 4G).

Para a avaliação do potencial mutagênico, foram contabilizadas as células meristemáticas portadoras de aberrações cromossômicas do tipo quebras cromossômicas (metáfase com perdas cromossômicas; anáfase com quebras) e micronúcleos, obtidas nos ensaios realizados com as diferentes concentrações do inseticida fipronil (Figuras 3, 4A, 4B, 4H). Foram obtidos resultados significativos para mutagenicidade, em relação ao CN, os ensaios:

- Controles positivos: CP1, CP1_{48h}, CP1_{72h}, CP2, CP2_{48h} e CP2_{72h} (Figuras 5A, 5B e 5C);
- Concentrações sem pré-fotodegradação (sem exposição prévia da solução à luz solar): C2C_{48h} e C2C_{72h}, todos resultantes de ensaios na presença de luz (Figuras 5B e 5C);
- Concentrações pré-fotodegradadas (com exposição prévia da solução à luz solar): C1SC, C2SC, C2SC_{48h} e C2SC_{72h}, todos resultantes de ensaios na presença de luz (Figuras 5A, 5B e 5C).

Os resultados para micronúcleos em células F₁ (Figura 6), obtidos nos ensaios com o inseticida fipronil apresentaram-se significativo, em relação ao CN, para:

- Controles Positivos: CP1, CP1_{48h}, CP1_{72h}, CP2, CP2_{48h} e CP2_{72h} (Figuras 6A, 6B e 6C);
- Concentrações sem pré-fotodegradação (sem exposição prévia da solução à luz solar): C2C, C2C_{48h} e C2C_{72h}, todos resultantes de ensaios na presença de luz (Figuras 6A, 6B e 6C).
- Concentrações pré-fotodegradadas (com exposição prévia da solução à luz solar): C1SC, C2SC, C2SC_{48h} e C2SC_{72h}, na presença de luz e C1SE_{72h} e C2SE_{72h}, (Figura 6B).

4.3. EXPERIMENTO 3

Análise do Potencial Citotóxico

A análise do efeito citotóxico foi obtida pela avaliação dos índices mitóticos de células meristemáticas de raízes de *A. cepa* (Figura 2). Os meristemas radiculares submetidos às diversas concentrações do inseticida fipronil apresentaram valores significativos, em relação ao CN, para:

- Controles positivos: CP1_{48h} e CP2_{48h} (Figuras 2B);

- Concentrações sem pré-fotodegradação (sem exposição prévia da solução à luz solar): C2C, na presença e C2E, na ausência de luz (Figura 2 A);
- Concentrações pré-fotodegradadas (com exposição prévia da solução à luz solar): C2SC, e C2SC_{72h} na presença e C2SE_{48h}, na ausência de luz (Figura 2A, 2B e 2C).

Análise do Potencial Genotóxico e Mutagênico

A avaliação do potencial genotóxico do inseticida fipronil foi realizada com base nos resultados de AC presentes em células meristemáticas de *A. cepa* (Figuras 3, 4C, 4D, 4E, 4F e 4G). Os ensaios realizados com as diferentes concentrações de inseticida fipronil, apresentaram índices de AC significativos, em relação ao CN, para:

- Controles positivos: CP1, CP1_{48h}, CP1_{72h}, CP2, CP2_{48h}, CP2_{72h} (Figuras 3A, 3B e 3C);
- Concentrações sem pré-fotodegradação (sem exposição prévia da solução à luz solar): C2C, C2C_{48h} e C2C_{72h}, todos resultantes de ensaios na presença de luz (Figuras 3A, 3B e 3C);
- Concentrações pré-fotodegradadas (com exposição prévia da solução ao à luz solar): C1SC, C2SC_{48h}, e C2SC_{72h}, todos resultantes de ensaios na presença de luz (Figuras 3A, 3B e 3C).

As aberrações cromossômicas, consideradas de efeito genotóxico, observadas nas análises realizadas com o inseticida fipronil, foram: metáfase com aderências cromossômicas; metáfase com perdas cromossômicas; C-metáfases; anáfase com pontes cromossômicas; anáfase e telófase com atrasos cromossômicos; anáfase com perdas cromossômicas e anáfases multipolares (Figuras 4C, 4D, 4E, 4F e 4G).

Para a avaliação do potencial mutagênico, foram contabilizadas as células meristemáticas portadoras de quebras cromossômicas (metáfase com quebras e anáfase com quebras) e micronúcleos, obtidas nos ensaios realizados com as diferentes concentrações do inseticida fipronil (Figuras 3 e 4A, 4B, 4H). Foram obtidos resultados significativos para mutagenicidade, em relação ao CN, os ensaios:

- Controles positivos: CP1, CP1_{48h}, CP1_{72h}, CP2, CP2_{48h} e CP2_{72h} (Figuras 5A, 5B e 5C);
- Concentrações sem pré-fotodegradação (sem exposição prévia da solução à luz solar): C2C_{48h} e C2C_{72h}, todos resultantes de ensaios na presença de luz (Figuras 5B e 5C);
- Concentrações pré-fotodegradadas (com exposição prévia da solução à luz solar): C2SC, C2SC_{48h} e C2SC_{72h}, todos resultantes de ensaios na presença de luz (Figuras 5A, 5B e 5C).

Os resultados para micronúcleos em células F₁ (Figura 6), obtidos nos ensaios com o inseticida fipronil apresentaram-se significativo, em relação ao CN, para:

- Controles Positivos: CP1, CP1_{48h}, CP1_{72h}, CP2, CP2_{48h} e CP2_{72h} (Figuras 6A, 6B e 6C);
- Concentrações sem pré-fotodegradação (sem exposição prévia da solução à luz solar): C2C_{48h} e C2C_{72h}, na presença de luz (Figura 6B);
- Concentrações pré-fotodegradadas (com exposição prévia da solução à luz solar): C2SC_{48h} e C2SC_{72h}, na presença de luz (Figuras 6B e 6C).

FIGURA 2

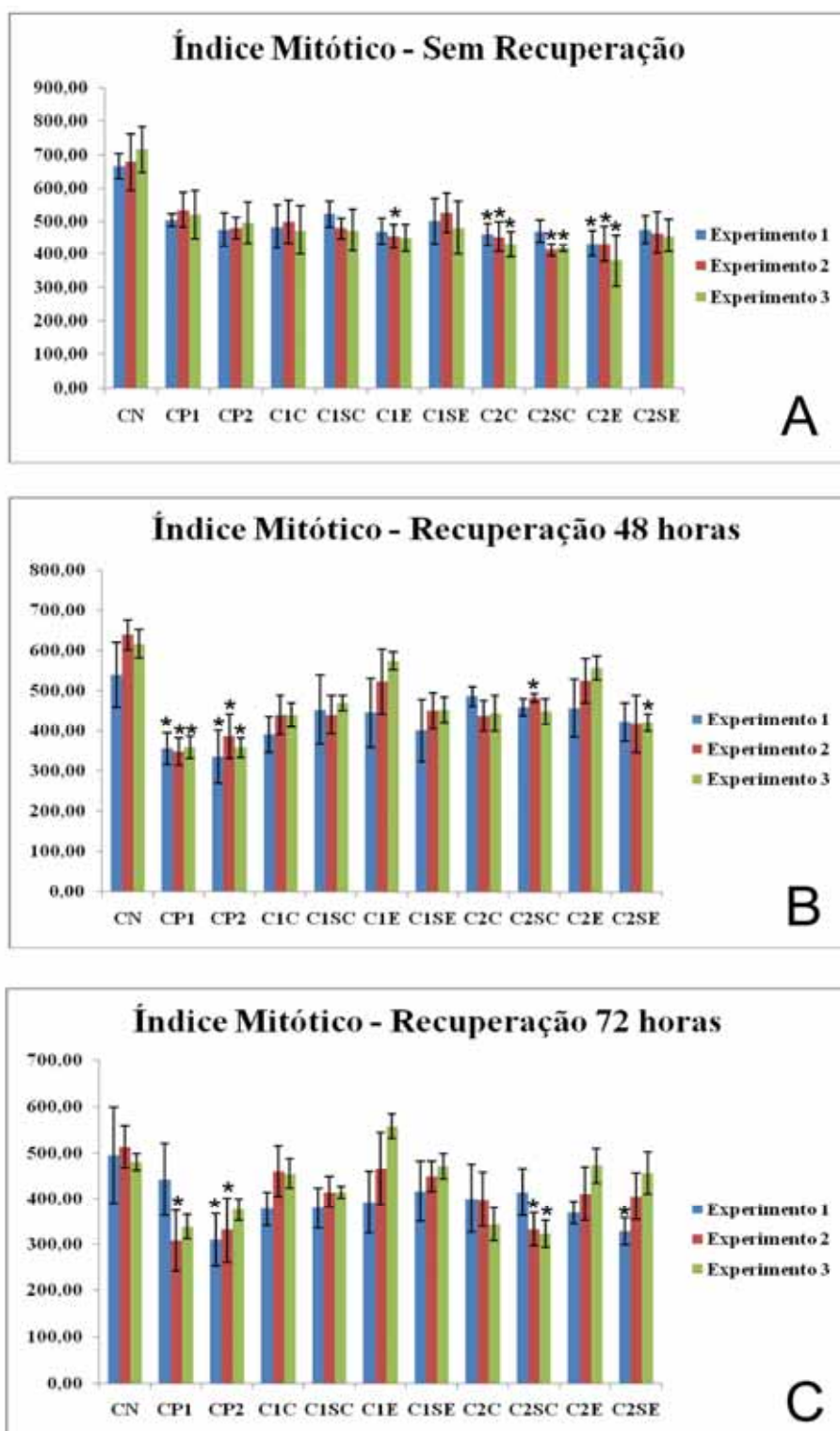


Figura 2: Avaliação do índice mitótico dos ensaios realizados, como segue, para A,B e C: CN. Controle negativo; CP1. Controle positivo com MMS; CP2. Controle positivo com trifluralina; C1C. concentração de 0,312 g/L testada na presença de luz; C1SC. concentração de 0,312 g/L testada na presença de luz e pré degradada pela luz solar; C1E. concentração de 0,312 g/L testada na ausência de luz; C1SE. concentração de 0,312 g/L testada na ausência de luz e pré degradada pela luz solar; C2C. concentração de 0,625 g/L testada na presença de luz, C2SC. concentração de 0,625 g/L testada na presença de luz e pré degradada pela luz solar; C2E. concentração de 0,625 g/L testada na ausência de luz; C2SE. concentração de 0,625 g/L testada na ausência de luz e pré degradada pela luz solar.

FIGURA 3

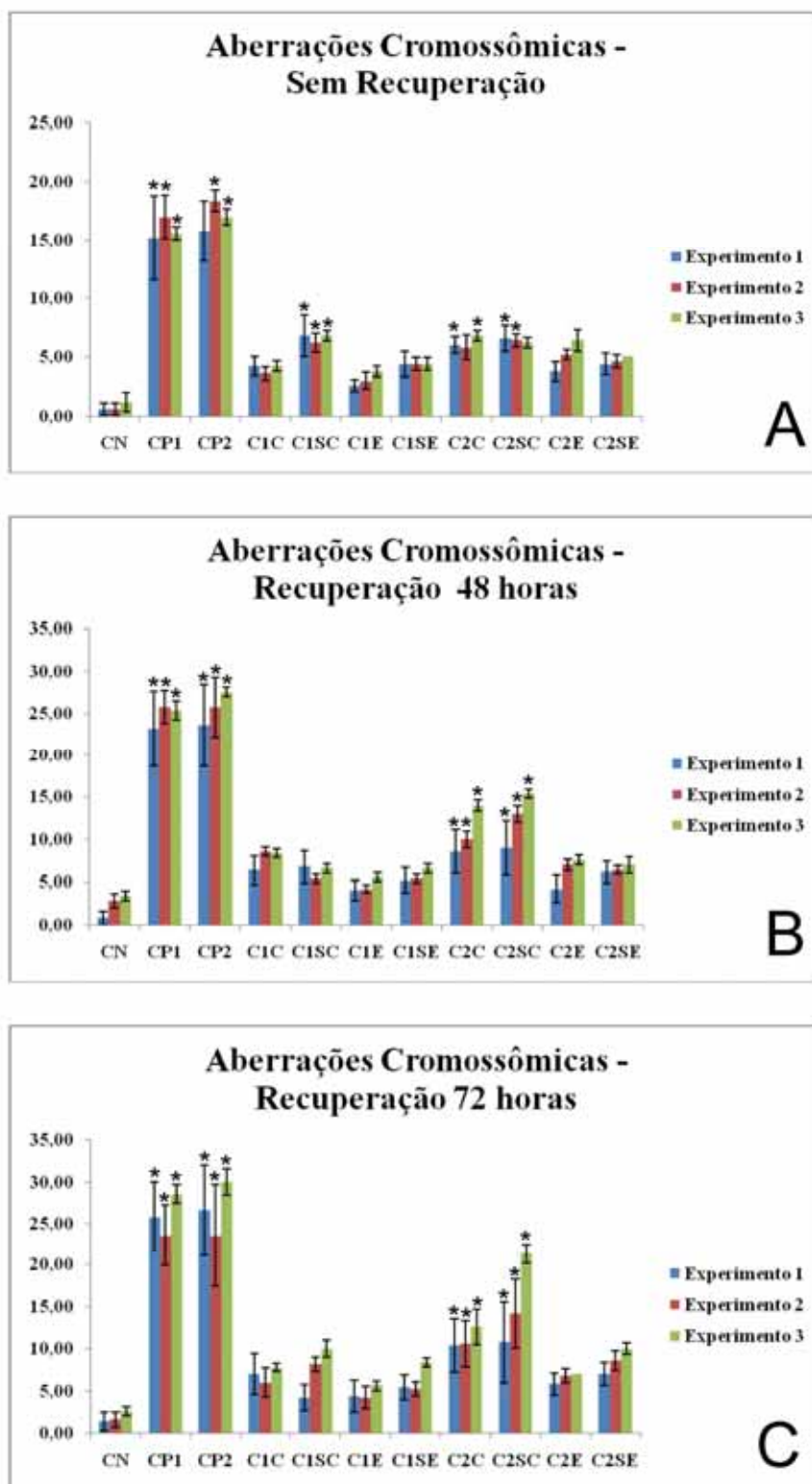


Figura 3: Avaliação do índice de aberrações dos ensaios realizados, como segue, para A,B e C: CN. Controle negativo; CP1. Controle positivo com MMS; CP2. Controle positivo com trifluralina; C1C. concentração de 0,312 g/L testada na presença de luz; C1SC. concentração de 0,312 g/L testada na presença de luz e pré degradada pela luz solar; C1E. concentração de 0,312 g/L testada na ausência de luz; C1SE. concentração de 0,312 g/L testada na ausência de luz e pré degradada pela luz solar; C2C. concentração de 0,625 g/L testada na presença de luz, C2SC. concentração de 0,625 g/L testada na presença de luz e pré degradada pela luz; C2E. concentração de 0,625 g/L testada na ausência de luz; C2SE. concentração de 0,625 g/L testada na ausência de luz e pré degradada pela luz solar.

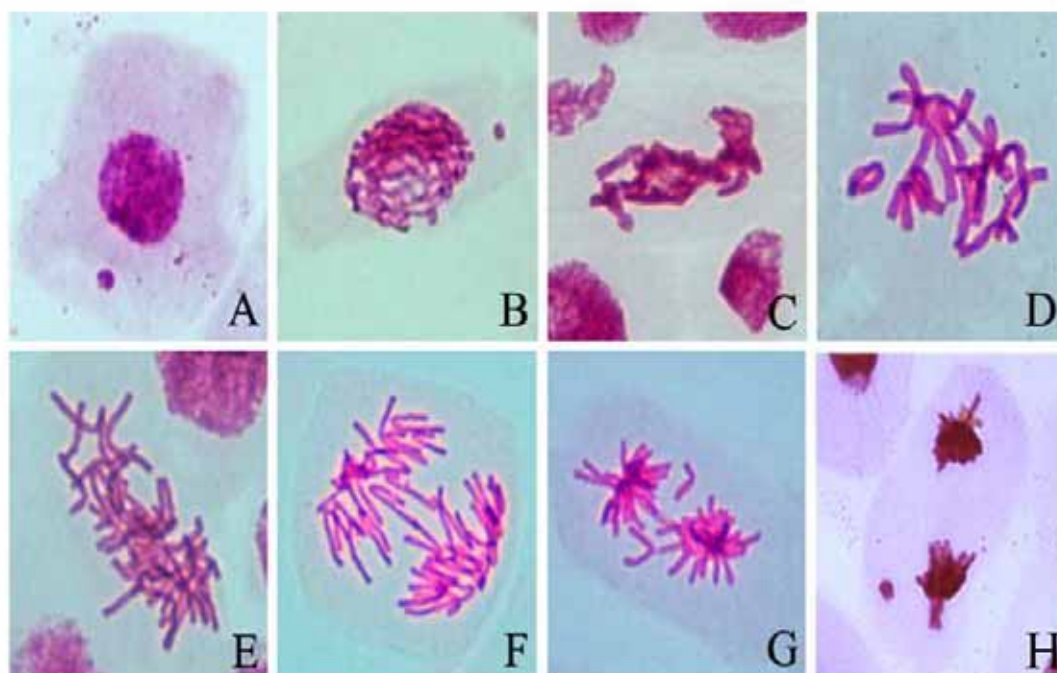
FIGURA 4

Figura 4: Alterações encontradas nos tratamentos com fipronil. A. Intérfase com micronúcleo; B. Prófase com micronúcleo; C. Metáfase com aderência cromossômica; D. C-Metáfase; E. Metáfase poliplóide; F. Anáfase com pontes cromossômicas; G. Anáfase com duas perdas; H. Telófase com micronúcleo.

FIGURA 5

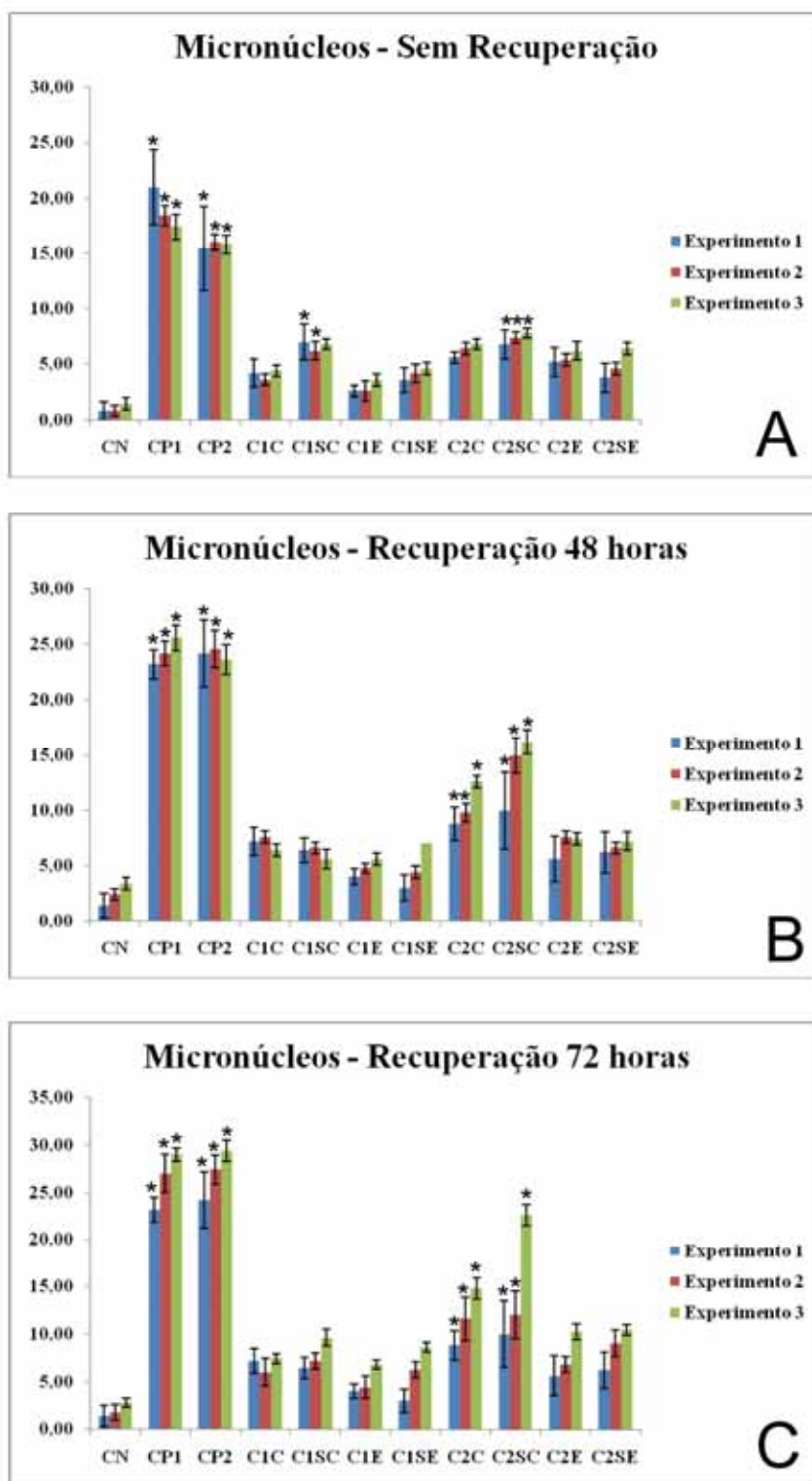


Figura 5: Avaliação do índice de micronúcleos dos ensaios realizados, como segue, para A, B e C: CN. Controle negativo; CP1. Controle positivo com MMS; CP2. Controle positivo com trifluralina; C1C. concentração de 0,312 g/L testada na presença de luz; C1SC. concentração de 0,312 g/L testada na presença de luz e pré degradada pela luz solar; C1E. concentração de 0,312 g/L testada na ausência de luz; C1SE. concentração de 0,312 g/L testada na ausência de luz e pré degradada pela luz solar; C2C. concentração de 0,625 g/L testada na presença de luz, C2SC. concentração de 0,625 g/L testada na presença de luz e pré degradada pela luz solar; C2E. concentração de 0,625 g/L testada na ausência de luz; C2SE. concentração de 0,625 g/L testada na ausência de luz e pré degradada pela luz solar.

FIGURA 6

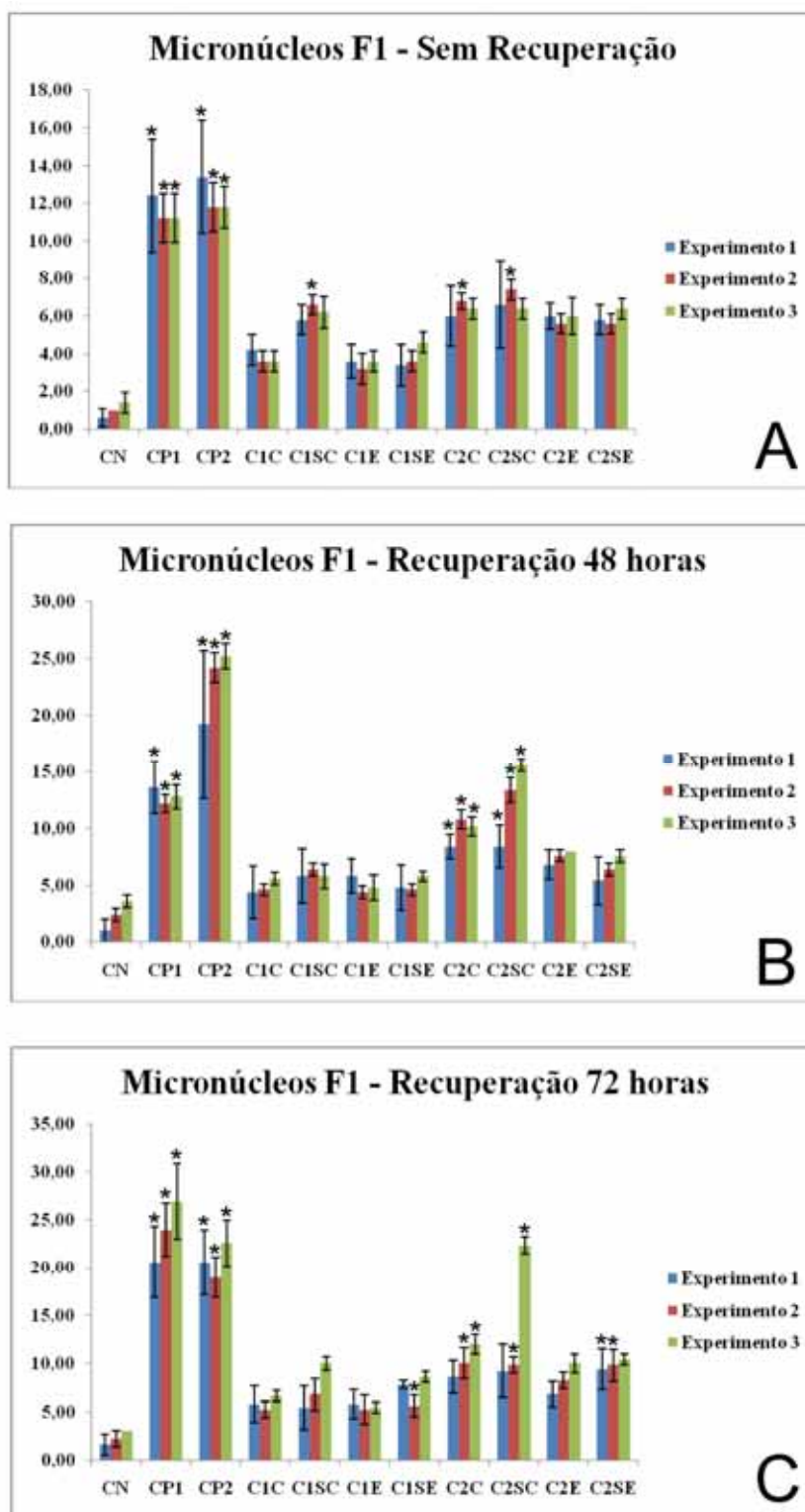


Figura 6: Avaliação do índice de micronúcleos em F1 dos ensaios realizados, como segue, para A, B e C: CN. Controle negativo; CP1. Controle positivo com MMS; CP2. Controle positivo com trifluralina; C1C. concentração de 0,312 g/L testada na presença de luz; C1SC. concentração de 0,312 g/L testada na presença de luz e pré degradada pela luz solar; C1E. concentração de 0,312 g/L testada na ausência de luz; C1SE. concentração de 0,312 g/L testada na ausência de luz e pré degradada pela luz solar; C2C. concentração de 0,625 g/L testada na presença de luz, C2SC. concentração de 0,625 g/L testada na presença de luz e pré degradada pela luz solar; C2E. concentração de 0,625 g/L testada na ausência de luz; C2SE. concentração de 0,625 g/L testada na ausência de luz e pré degradada pela luz solar.

5. DISCUSSÃO

O fipronil é um inseticida que merece um destaque especial dentre o grupo dos fenil-pirazol, principalmente pelo seu amplo uso em culturas que ocupam grandes extensões de terra. Este inseticida também é muito utilizado nas residências, para combater insetos praga, como pulgas e carrapatos de cães e gatos (TINGLE et al., 2003; ANVISA, 2002). O fipronil exerce um efeito direto não só em animais-alvo, mas também em organismos não-alvo. Assim, fica clara a necessidade de determinações toxicológicas deste composto, que possam aumentar o conhecimento sobre os seus efeitos ambientais e sobre a saúde humana (VARRÓ et al., 2007).

Os estudos de Berlayneh (1998, apud TINGLE et al., 2003), comprovam que, quando o inseticida fipronil não se degrada em metabólitos iônicos e está presente em ambientes com temperaturas moderadas, ele é estável por cerca de um ano. Porém, no ambiente, o fipronil pode ser degradado em diversos metabólitos, dependendo das condições ambientais onde ele foi aplicado, tais como: o metabólito MB 46513 (desulfinil-fipronil), MB 46136 (sulfona-fipronil), MB 45950 (sulfide-fipronil) e RPA 200766 (amide-fipronil), dentre outros (NGIM; CROSBY, 2001, apud TINGLE et al., 2003; PEI et al., 2006). Segundo Tingle et al. (2003), o fipronil é muito mais susceptível a degradação por fotólise do que por hidrólise em meio aquoso.

A indicação de que os metabólitos resultantes da degradação do fipronil apresentam uma atividade tóxica, associada com a falta de informações sobre a presença destes metabólitos no ambiente e ao amplo uso deste inseticida em culturas diversas, reforça a necessidade eminente de se dispensar uma maior atenção aos efeitos desse inseticida, bem como a avaliação do alcance destes efeitos no ambiente. Somado a isso, temos ainda uma situação de comprometimento da qualidade do ambiente doméstico, pelo uso do produto veterinário Frontline® que contém uma elevada concentração de fipronil (100 g / l), e que pode ser uma fonte especial de intoxicação, especialmente para as crianças (VIDAU et al., 2009).

O fipronil é estável para hidrólise em águas com pH entre 5 a 7 (ligeiramente ácidas), em condições de ausência de luz. Em soluções aquosas, sem a presença de luz e em ambientes com temperaturas de 22°C, 80% do inseticida permanece inalterado por 100 dias (USEPA, 2009). O fipronil, quando na presença de luz, tem uma persistência de baixa à moderada. Sob efeito de luz artificial, é rapidamente degradado na água, tendo como principais metabólitos, decorrentes desta

degradação, o MB 46513 e o RPA 104615 (USEPA, 2009), sendo o MB46513 o mais persistente no ambiente. O efeito do metabólito sulfona fipronil (MB 46136) é, aproximadamente, 20 vezes maior do que o próprio fipronil (ZHAO et al., 2005; LEGHAIT et al., 2009).

Segundo Tingle et al. (2003), o fipronil não é acumulado no meio ambiente, mas o autor cita que algumas acumulações temporárias do metabólito MB 46513 têm sido registradas em água. Porém, Mukherjee (2006) afirma que o fipronil se adsorve fortemente na matéria orgânica do solo, permanecendo adsorvido neste material, sendo dificilmente dessorvido.

O fipronil é considerado pela USEPA (1996, apud TINGLE et al., 2003) não tóxico para fanerógamas aquáticas e algas. Esta afirmação decorre dos estudos realizados com as espécies de algas de água doce *Anabaena flosaquae*, *Navicula pelliculosa* e *Selenastrum xapricornutum* que não indicam efeitos significativos de toxicidade sobre as alterações observadas no crescimento destes organismos, após a exposição ao inseticida. Porém, estes resultados não foram confirmados pelos ensaios realizados com a alga *Scenedesmus subspicatus*, pois, neste caso, foi registrado que o fipronil promoveu inibição e redução do crescimento, além de outras anormalidades. Quando solução de fipronil foi aplicada, continuamente, por quatro dias, em sementes de arroz, foi observado um prejuízo significativo na germinação. Quando as sementes foram expostas por uma hora ao fipronil, 48 h após a germinação, o crescimento pós-germinação também foi diminuído (STEVENS et al., 1998 apud TINGLE et al., 2003).

O uso de fipronil pode representar um risco para a saúde de seres humanos, pois é considerado tóxico, pela sua potencialidade de induzir morte celular, independente do fenótipo da célula. Isto sugere que esse inseticida age sobre os componentes celulares comuns a vários organismos, se não em todos os tipos celulares (VIDAU et al. 2009).

As análises dos índices mitóticos, obtidas dos meristemas radiculares tratados com o inseticida fipronil, não mostraram resultados conclusivos, reforçando as descrições de Matsumoto e Marin-Morales (2004; 2006), Fernandes et al. (2007) e Leme e Marin-Morales (2008), de que este parâmetro, índice mitótico, não confere um bom indicativo de citotoxicidade de agentes químicos.

Em relação às aberrações cromossômicas, é sabido que essas anormalidades podem levar a diversas alterações, que pode ter ou não ação

mutagênica. Dentre as aberrações cromossômicas, as C-metáfases são alterações que evidenciam a ação aneugênica de uma substância, por esta inativar, completamente, o fuso mitótico das células (FISKEJÖ, 1985; FISKEJÖ, 1993). Neste caso, nenhuma placa equatorial é organizada, podendo acarretar em um impedimento da divisão dos centrômeros. Segundo Krisch-Volders et al. (2002), a indução de C-metáfases pode levar a formação de núcleos poliplóides. Núcleos poliplóides podem, segundo Fernandes et al. (2007), resultar na formação de uma grande quantidade de micronúcleos.

Marcano e Del Campo (1995) e Marcano et al. (1998) consideram as aderências cromossômicas como uma AC sinalizadora de ação genotóxica tóxica de um químico. Esta aberração decorre, provavelmente, em efeitos irreversíveis para a célula, podendo levá-la à morte. Para Giacomelli (1999), estas alterações originam pontes e, conseqüentemente, quebras cromossômicas, afirmação esta corroborada por Marcano et al. (2004), que afirma que as pontes cromossômicas são decorrentes de aderências, acrescentando ainda que elas podem ser múltiplas e persistirem até a telófase.

Pela análise das células meristemáticas de *A. cepa*, submetidas à ação do inseticida fipronil, pôde-se perceber que houve indução de alterações cromossômicas, para as duas concentrações testadas do inseticida, com fotodegradação e sem fotodegradação, tanto na presença quanto na ausência de luz. Foram registradas metáfases e anáfases com perdas cromossômicas; C-metáfases; metáfases com aderências cromossômicas, telófase com pontes e células poliplóides. Dentre todas as aberrações observadas, as metáfases com aderência, anáfase com pontes e com perdas foram as alterações mais freqüentes. Desta forma, podemos inferir que o inseticida fipronil agiu mais no citoplasma do que no núcleo celular, pois as irregularidades mais encontradas foram as consideradas decorrentes de ação citoplasmática, especificamente as que alteram a polimerização das tubulinas, e não de ação direta no material genético. Nossos resultados corroboram os resultados apresentados por Pedro (2008), para a ação deste inseticida.

Pelos resultados obtidos, observamos que os testes realizados na ausência de luz, comparados com os na presença de luz, mostraram que o produto tem uma maior ação genotóxica na presença de luz, o que reforça a possível ação de um dos metabólitos do fipronil (MB 46513 - decorrente da degradação por fotólise) ser o

responsável pela indução das anormalidades cromossômicas acima descritas, confirmando as citações de Tingle et al. (2003) e Pedro (2008), para a periculosidade deste agente. Os resultados mais impactantes deste trabalho foram obtidos com as germinações realizadas no claro, tanto para os testes com a solução fotodegradada como não fotodegradada, embora a germinação realizada no claro com a solução fotodegradada ainda exibiu resultados mais significativos que a não fotodegradada.

Os resultados aqui obtidos para *A. cepa* são indicativos de que esta espécie caracteriza-se em um bom organismo teste para ensaios de genotoxicidade do fipronil, reforçando as descrições de outros autores para outros químicos ambientais, tais como herbicidas (FERNANDES et al., 2007), hidrocarbonetos (LEME, MARIN-MORALES, 2008) e metais pesados (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2005; 2006).

Quanto à persistência da ação deste inseticida sobre sistemas biológicos, podemos sugerir, pelas nossas observações obtidas nos testes de recuperação, que para as maiores concentrações, o fipronil continua agindo na célula, mesmo quando se interrompe a exposição a ele, indicando um efeito persistente do produto. Esta persistência deve estar relacionada com os metabólitos formados na sua degradação, principalmente as derivadas da fotólise. Como foi observado nos testes de recuperação, pode-se sugerir também, que o fipronil apresenta menor persistência nas menores concentrações. As irregularidades cromossômicas, citadas acima, são alterações que podem levar a formação de células com núcleos irregulares e/ou células micronucleadas. As células com micronúcleos, assim como as quebras cromossômicas, são consideradas indicativas da ação mutagênica de um produto. Segundo Ribeiro (2003), os micronúcleos são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim, os micronúcleos representam perdas da cromatina, em consequência de danos cromossômicos estruturais ou numéricos, sendo estes últimos decorrentes de danos no aparelho mitótico.

Uma substância capaz de induzir a formação de micronúcleos pode ser classificada como de ação clastogênica ou aneugênica. A ação clastogênica é comprovada pela presença de micronúcleos decorrentes de quebras cromossômicas, durante o processo de divisão celular, ao contrário da ação

aneugênica, que acontece pela inativação do fuso mitótico, acarretando em perda de cromossomos inteiros, ficando os mesmos ausentes no núcleo principal da célula.

6. CONCLUSÃO

As análises dos índices mitóticos, obtidas dos meristemas radiculares tratados com o inseticida fipronil, não mostraram resultados conclusivos mostrando que este parâmetro não confere um bom indicativo de citotoxicidade de agentes químicos.

A genotoxicidade e a mutagenicidade do inseticida foi estimada pelos registros de indução de AC, MN e quebras cromossômicas em células de *A. cepa*, após germinação de sementes desta planta em duas concentrações do inseticida fipronil. Os únicos resultados significativos para mutagenicidade do inseticida foram obtidos pelos índices aumentados de células micronucleadas.

Os parâmetros indicativos de genotoxicidade e mutagenicidade, observados pela ação do fipronil sob o sistema-teste de *A. cepa*, foram mais significativos para as concentrações testadas na presença de luz, tanto para a solução não previamente exposta como para a solução previamente exposta à luz solar, confirmando a ação do metabólito decorrente de fotodegradação. Assim, temos um indicativo de que, possivelmente, o metabólito MB 46513, formado pela fotólise do fipronil, seja o principal indutor de danos no DNA de *A. cepa*.

Pelos nossos resultados, podemos inferir que os testes de MN, realizados em células meristemáticas e F_1 do organismo-teste *A. cepa*, constituiu um bom parâmetro para a detecção da ação mutagênica do inseticida fipronil. Estes dados nos sugerem que resíduos de fipronil podem caracterizar-se em um perigo para espécies vegetais não alvo, principalmente, quando expostas às baixas concentrações, que podem ser decorrentes de resíduos de aplicações realizadas em solos de cultura. Estes dados reforçam a preocupação de diversas instituições ambientais e de pesquisadores, quanto à atual utilização indiscriminada do inseticida aqui estudado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Consultoria Pública de 11 de março de 2002. Disponível em: ANVISA www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/128-02re_2.htm. Acesso em: Set/2009.

ALTINOK, I.; CAPKIN, E.; KARAHAN, S.; BORAN, M. Effects of water quality and fish size on toxicity of methiocarb, a carbamate pesticide, to rainbow trout. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, p. 20-26, 2006.

BAKORE, N.; JOHN, P. J.; BHATNAGAR, P. Organochlorine pesticide residues in wheat and drinking water samples from Jaipur, Rajasthan, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht. v. 98, p. 181-189, 2004.

BLOOMQUIST, J. R. Insecticides: chemistries and characteristics. Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>>. Acesso em: set /2009.

BICHON, E.; RICHARD, C. A.; LE BIZEC, B. Development and validation of a method for fipronil residue determination in ovine plasma using 96-well plate solid-phase extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Nantes, v. 1201, p. 91-99, 2008.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Rio Claro, v. 72, p. 722-725, 2008.

CI, S.; REN, T.; SU, Z. Modeling the interaction of fipronil-related non-competitive antagonists with the GABA β 3-receptor. **J Mol Model**, Beijing, v. 13, p. 457–464, 2007.

CHASIN, A. A. M., PEDROSO, M. F. M. O Estudo da Toxicologia. In: CHASIN, A. A. M.; AZEVEDO, F. A. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 2003. São Paulo: Intertox, 2003.

CHATON, P. F.; RAVANEL, P.; TISSUT, M.; MEYRAN, J. C. Toxicity and Bioaccumulation of Fipronil in the Nontarget Arthropodan Fauna Associated with Subalpine Mosquito Breeding Sites. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, p. 8-12, 2002.

CHAUHAN, L. K.; SAVENA, P. M.; GUPTA, S. K.. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. **Environment and Experimente Botany**, v. 42, p. 191-189, 1999.

CORTEZ FILHO, A. **Uso do agrotóxico na cultura do arroz irrigado nos municípios de Taubaté e Tremembé – SP**. 2005. 39f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Ambientais) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade de Taubaté, Taubaté, 2005.

DAS, P. C.; CAO, Y.; CHERRINGTON, N.; HODGSON, E.; ROSE, R. L. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, Tucson, v. 164, p. 200-214, 2006.

EDWARDS, C. A. **Persistent pesticides in the environment**. 2. ed. U.S.A.: CRS Press, 1973, 170 p.

EDWIN, D. O. Control of water pollution from agriculture. **Irrigation and Drainage**, New York. v. 55, p. 1-101, 1996.

EL HASSANI, A. K.; DACHER, M.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, Toulouse, v. 82, p. 30-39, 2005.

FERNANDES, T. C. C. Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *A. cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste. Tese (Mestrado). 2005, 212 f., Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2005.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Rio Claro, v. 88, p. 252-259, 2007.

FENECH, M. The in vitro micronucleos technique. **Mutation Research**, Amsterdam. v.455, p.81-95, 2003.

FERRARI, I. **Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos**. In: Sociedade Brasileira de Genética, **Revista Brasileira de Genética**, p. 107-112, 1991.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lundskrona. v. 102, p. 99-112, 1985.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 197, p. 243-260, 1988.

FISKESJÖ, G. The *A. cepa* in wastewater monitoring. Environmental toxicology and water quality: **An International Journal**, New York. v. 8, p. 291 – 298, 1993.

GADEVA, P.; DIMITROV, B. Genotoxic effects of the pesticides Rubigan, Omite and Rovral in root-meristem cells of *Crepis capillaris* L. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Bulgária, v.652, p.191-197, 2008.

GIACOMELLI, F.R.B.. Avaliação do comportamento meiótico em variedades de Aveia (*Avensa sativa*) recomendadas para a região Sul. Dissertação (mestrado). Universidade de Maringá – Pr., 1999.

GRANT, W. F.. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 99, p. 273-291, 1982.

GRANT, W. F.. The present status of higehr plant biossays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 310, p. 175-185, 1994.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos; mutações, câncer e reprodução**. Brasília: ELBRA, 2005, 394 p.

HAMILTON, D.; CROSSLEY, S. Pesticide residue in food and drinking water: Human exposure and Risks, 2004. Disponível em: <http://www.chipsbooks.com/pestfood.htm>
Acesso em: set/2009.

KHOURI, A. G. **Análise de resíduos de atrazina e simazina em abacaxi no estado de Goiás**. 2007. 72f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável) – Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2007.

KOVALCHUK, O.; KOVALCHUK, I.; AKHIPOV, A.; TELYUNK, P.; HOHN, B.; KOVALCHUK, L. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 415, p. 47–57, 1998.

KRISCH-VOLDERS M.; VANHAUWAERT. A.; BOECK M. D., Importance of detecting numerical versus strutural chromonome aberrations. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 504, 2002.

LEGHAIT, J.; GAYRARD, V.; PICARD-HAGEN, N.; CAMP, M.; PERDU, E.; TOUTAIN. P.; VIGUIÉ, C. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**, v.255, 2009, p. 38–44.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – A case study. **Mutation Research**, Rio Claro, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spil on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, Rio Claro, v. 88, p. 214-219, 2008.

LIU, D.; WANG, P.; ZHU, W.; GU, X.; ZHOU, W.; ZHOU, Z. Enantioselective degradation of fipronil in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*). **Food Chemistry**, Beijing, v. 110, p. 399–405, 2008.

MARCANO, L.; BRACHO, M.; MONTIEL, X.; CARRUYO, I.; ATENCIO, L. Efecto mtotóxico y genotóxico del cadmio em poblaciones meristemáticas de *Allium cepa* L. (cebolla). **Ciência**, v.6, p.93-99, 1998.

MARCANO, L.; DEL CAMPO, A. Estudio ultraestructural del nucléolo en poblaciones meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L. tratadas con inhibidores metabólicos. **Ciencia**, v.3, p.73-82, 1995.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v.94, p.221-226, 2004.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Toxic and genotoxic effects of trivalente and hexavalent Chromium – A review. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo. v. 18, n. 1, p. 77-85, 2005.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A.. Mutagenic potencial evolution of the water of river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* system. **Cytologia**, Tokyo. v. 69, n. 4, p. 399-408, 2004.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronuclei test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto. v. 29, p. 148 – 158, 2006.

MUKHERJEE, K. Sorption of Fipronil in Tropical Soils. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 76, 2006, p.334–340.

NIMMO, D. R. Pesticides. In RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R.. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. **Chemosphere**. New York. p. 35-373, 1985.

OHI M.; DALSENTER, P. R.; ANDRADE, A. J. M.; NASCIMENTO, A. J. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 146, 2004, p. 121–127.

PEI, Z.; YITONG, L.; BAOFENG L.; GAN, J. J. Dynamics of fipronil residue in vegetable-field ecosystem. **Chemosphere**, Oxford,. v.57, p.1691-1696, 2004., 2006.

PEDRO, J. Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do inseticida fipronil no organismo teste *Allium cepa*. 2008. 104 p. **Dissertação de mestrado** (Mestre em Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

POTTER, T. L.; MOHAMED, M. A.; ALI, H. Solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry analysis of pesticides in water: method performance and application in a reconnaissance survey of residues in drinking water in Greater Cairo, Egypt. **Journal Agriculture Chemistry**, Washington. v. 22, n. 2. p. 204-210, 2007.

RANK, J.; NIELSEN, M. H.. *A. cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberrations assay on N-methyl-N-nitrosurea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 390, p. 121-127, 1997.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *A. cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 4148, n. 3. p. 113-119, 1998.

RAVETON, M.; AAJOUND, A.; WILLISON, J.; CHERIFI, M.; TISSUT, M.; RAVANEL, P. Soil distribution of fipronil and its metabolites originating from a seed-coated formulation. **Chemosphere**, Oxford, v. 69, p. 1124–1129, 2007.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A Importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

SCHLENK, D.; HUGGETT, D. B.; ALLGOOD, J.; BENNETT, E.; RIMOLDI, J.; BEELER, A. B.; BLOCK, D.; . HOLDER, A. W.; HOVINGA, R.; BEDIENT, P. Toxicity of Fipronil and Its Degradation Products to *Procambarus* sp.: Field and Laboratory Studies. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 41, p. 325–332, 2001.

STEHR, C. M.; LINBO, T. L.; INCARDONA, J. P.; SCHOLZ, N. L. The Developmental Neurotoxicity of Fipronil: Notochord Degeneration and Locomotor Defects in Zebrafish Embryos and Larvae. **Toxicological sciences**, v. 92(1), p. 270–278, 2006.

STEVENS, M. M.; HELLIWELL, S.; WARREN, G. N. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. **Field Crops Research**, v. 57, p. 195-207, 1998.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Fipronil: Environmental fate, ecotoxicology and human health concerns. **Rev Environ Contam Toxicol**, New York, v. 176, p. 1-66, 2003.

USEPA – United States Environmental Protection Agency, Fipronil Pesticide Tolerances U.S. **Environmental Protection Agency**, Washington, USA. 7 pp.
< <http://www.epa.gov/EPA-PEST/2007/August/Day-22/p16621.htm>>. Acesso em: set/2009.

VEIGA, A. B. O uso do teste de *A. cepa* para detectar a toxicidade do inseticida Nuvacron. Monografia (Conclusão do curso de Ciências Biológicas), 1995. 58 f. – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1995.

Varró, P.; Győri, J.; Világi, I. In vitro effects of fipronil on neuronal excitability in mammalian and molluscan nervous systems. **Ann Agric Environ Med**, v. 16, 2009, p. 71–77.

VIDAU, C.; BRUNET, J. L.; BADIOU, A.; BELZUNCES, L. P. Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. **Toxicology in Vitro**, v. 23, 2009, p. 589–597.

ZHOU, R.; ZHU, L.; YANG, K.; CHEN, Y. Distribution of organochlorine pesticides in surface water and sediments from Qiantang River, East China. **Journal Hazardous Materials**. Amsterdam. v. 137, p. 68-75, 2006.

ZHAO, X.; YEH, J. Z.; SALGADO, V. L.; NARAHASHI, T. Sulfone Metabolite of Fipronil Blocks Aminobutyric Acid- and Glutamate-Activated Chloride Channels in Mammalian and Insect Neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** vol. 314, no. 1 Copyright © 2005 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 77891/3038693JPET 314:363–373, 2005.

WIRTH, E. F.; PENNINGTON, P. L.; LAWTON, J. C.; DELORENZO, M.E.; BEARDEN, D. SHADDRIX, B.; SIVERTSEN, S.; FULTON, M. H. The effects of the contemporary-use insecticide (fipronil) in an estuarine mesocosm. **Environmental Pollution**, v. 131, 2004, p. 365-371.

ALUNA: Livia Loureiro de Souza

ORIENTADORA: Maria Aparecida Marin-Morales