
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS, CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E
MUTAGÊNICOS DO INSETICIDA CURBIX® 200SC (ETHIPROLE) EM
ORGANISMOS NÃO ALVOS**

THAYS DE ANDRADE GUEDES

**Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Biologia
Celular e Molecular)**

Fevereiro - 2015

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS, CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS
E MUTAGÊNICOS DO INSETICIDA CURBIX® 200SC (ETHIPROLE) EM
ORGANISMOS NÃO ALVOS**

THAYS DE ANDRADE GUEDES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual
Paulista, Campus de Rio Claro, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas,
área de Biologia Celular e Molecular

Fevereiro/2015

543.5 Guedes, Thays de Andrade
G924i Investigação dos efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Curbix® 200SC (ethiprole) em organismos não alvos / Thays de Andrade Guedes. - Rio Claro, 2015
80 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

1. Inseticidas. 2. Fenilpirazol. 3. Allium cepa. 4. Oreochromis niloticus. 5. Aberrações cromossômicas. 6. Anormalidades nucleares. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Investigação dos efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Curbix(R) 200SC (Ethiprole) em organismos não alvos

AUTORA: THAYS DE ANDRADE GUEDES

ORIENTADORA: Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

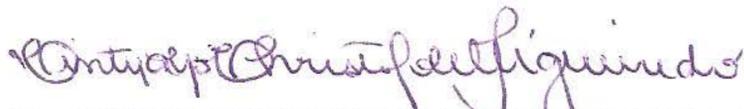
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Profa. Dra. MÁRCIA MIYUKI HOSHINA
Pós-doutoranda do Departamento de Biologia, UNESP, Instituto de Biociências de Rio Claro/SP



Profa. Dra. CINTYA APARECIDA CHRISTOFOLETTI DE FIGUEIREDO
Centro Universitário Hermínio Ometto, Araras/SP

Data da realização: 27 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, que me amou primeiro e me ensinou, através da sua Palavra, a buscar insistentemente a felicidade. Que me permitiu vencer os meus obstáculos que, muitas vezes, achei que seria incapaz e que tem cuidado de mim e me guiado para as ótimas oportunidades de tenho vivido e que ainda irei viver.

Aos meus pais, que me deram a vida, que me ensinaram o respeito, a gratidão e o perdão. Que diversas vezes se sacrificaram para que eu pudesse ter as melhores formas de educação. Que me deram os melhores amigos do mundo, os meus irmãos. Lucas, Camila, Elis, Flávia e Mel – sou completamente apaixonada e agradecida por ter vocês! Por me ensinarem a importância da família e me apresentarem à Veruza e ao Petrônio. Pessoas que escolheram dividir suas vidas e que, independente dos “drasto(a)”, também são integrantes da minha família.

À Amanda Prina, amiga espontânea e verdadeira que tem sido minha maior companheira aqui em Rio Claro. Ao W. Kyusk, pelo respeito, pelo carinho e por cuidar tão bem do meu coração. Aos meus amigos João, Douglas, Léo, André, Francisco, Mirian, Carlos e Barbara.

Aos fofotes, Cleiton, Luiza, Matraca, Maria Paula, Annelise, Yadira, Jorge, Cristina, Júlia, Bairral, Vini, Cintya e Camila, pessoas lindas que tenho a honra de dividir a orientação da Profa. Dra. Carmem e que têm me ensinado e me ajudado a crescer como pós-graduanda. Em especial a Yadira, Jorge, Cintya e Matraca pela parceria nos experimentos.

Aos amigos da mutagênese ambiental, Michele, Lais, Cris, Livia, Leo, Nádia, Raquel, Maria, Matheus e Márcia, pelos ótimos momentos juntos. Ao Lu, sempre do outro lado do corredor.

À minha orientadora Carmem, por me acolher, pela paciência, por ser muito mais que uma orientadora. Por ser psicóloga, mãe e disciplinadora. A quem eu tenho muito orgulho de ser orientada!

A todos os professores do departamento de biologia, da biologia celular e molecular, pela transmissão de conhecimento durante o mestrado. A todos os colegas do departamento de biologia pelo convívio agradável de todos os dias.

RESUMO

Os inseticidas representam uma grande proporção dos compostos sintetizados pela indústria química para uso doméstico e na agricultura. Devido ao aumento da resistência das pragas aos antigos pesticidas e sua delicada implicação para a saúde pública, está havendo uma substituição progressiva por novas famílias de inseticidas. Nos últimos anos, o fipronil deixou de ser uma das melhores alternativas dentre os inseticidas e passou a ser alvo de órgãos governamentais e da comunidade científica, para progressiva supressão mundial por conta de seus efeitos deletérios sobre o meio ambiente. Estudos comparados sobre a eficiência de um novo membro da família fenilpirazol, demonstram que, o ethiprole, mesmo com sua menor lipofilicidade e menor toxicidade, é basicamente tão efetivo quanto seu análogo fipronil. Este composto tem sido largamente utilizado em monoculturas como cana-de-açúcar e arroz e comercializado como um inseticida foliar e de solo e para o uso do tratamento de sementes. No entanto, pouco se sabe sobre a ação do ethiprole nos organismos não alvos e se a incidência luminosa influencia sua ação. Este trabalho teve por objetivo investigar a potencialidade tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do Curbix®, produto comercial do ethiprole. As avaliações foram feitas pelos testes de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN) em *Allium cepa* (cebola) e pelos testes do MN e ensaio do cometa em *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo). Os testes com *A. cepa* indicaram genotoxicidade para as todas as concentrações de ethiprole e citotoxicidade em todas as concentrações expostas a luz. A maior indução de brotos nucleares sugeriu uma ação aneugênica para o inseticida. Os testes com *O. niloticus* apontaram genotoxicidade do inseticida apenas para a menor concentração testada, demonstrando menor sensibilidade desses organismos teste às concentrações testadas do ethiprole em relação a cebola.

Palavras-chave: fenilpirazol, *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus*, aberrações cromossômicas, anormalidades nucleares

ABSTRACT

Pesticides represent a large proportion of the compounds synthesized by the chemical industry for domestic and agriculture use. The oldest families are being progressively replaced by new families of insecticides due to increased resistance to the old pesticides and their delicate implication for public health. In recent years, fipronil is no longer one of the best alternatives among the insecticides and happened to be in the crosshairs of government agencies and the scientific community for progressive global suppression because of its deleterious effects on the environment. Comparative studies on the efficiency of a new member of the phenylpyrazole family show that the ethiprole is basically as effective as analog fipronil, even with its lower lipophilicity and lower toxicity. This compound has been widely used in crops like cane sugar and rice and marketed as a foliar and soil insecticide and the use of seed treatment. However, little is known about the action of ethiprole on non-target organisms and the light incidence influence their action. This study aimed to investigate the potential toxic, cytotoxic and genotoxic of Curbix®, commercial product ethiprole. The evaluations were made by chromosome aberration test (CA) and micronuclei (MN) in *Allium cepa* (onion) and the MN test and comet assay in *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). The *A. cepa* tests indicated genotoxicity for all ethiprole concentrations and cytotoxicity at all concentrations exposed to light. The most induction of nuclear buds suggested aneugenic action for the insecticide. The *O. niloticus* tests pointed pesticide genotoxicity only for the lowest concentration tested, it shows lower sensitivity of these organisms than the onion.

Keyword: phenylpyrazol, *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus*, chromosome aberration, nuclear abnormalities

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 Organismos testes e ensaios utilizados na detecção de danos no DNA	11
3.2 Família fenilpirazol e seus efeitos sobre os organismos expostos	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Composto testado	39
4.2 Material biológico	39
4.3 Bioensaio com <i>A. cepa</i>	39
4.3.1 Testes de aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas	40
4.4 Bioensaio com <i>O. niloticus</i>	41
4.4.1 Teste do micronúcleo	41
4.4.2 Ensaio do cometa	43
5. RESULTADOS	45
ARTIGO 1. Investigação dos efeitos do Curbix 200SC (ethiprole) em <i>Allium</i> <i>cepa</i>	46
ARTIGO 2. Uso de <i>Oreochromis niloticus</i> na detecção dos potenciais genotóxicos do inseticida Curbix 200SC (ethiprole)	59
6. CONCLUSÕES FINAIS	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO GERAL

A liberação de um número cada vez maior de químicos sintéticos no meio ambiente leva a possíveis efeitos prejudiciais como poluição do solo, da água e do ar. Além do mais, esses agentes não permanecem limitados às áreas nos quais são aplicados, podem alcançar regiões onde causem efeitos adversos nos organismos vivos (HOLT, 2000). Por isso, as agências governamentais e as comunidades civil e científica têm se preocupado com o impacto que esses contaminantes vêm causando ao ambiente e, conseqüentemente, sobre as populações humanas (AU; RIBEIRO, 2003).

Segundo Holt (2000), as fontes de poluição podem ser classificadas em pontuais e não pontuais. As emissões de fontes não pontuais são de difícil controle e variam com o tempo e espaço. Um exemplo típico de fonte não pontual é a utilização de agrotóxicos no solo. Os agrotóxicos têm como propriedade comum o bloqueio de um processo metabólico vital de organismos alvos, agindo diretamente na eliminação ou no controle desses organismos para os quais são tóxicos (GRISOLIA, 2005). No Brasil, estima-se que dois terços da população estejam expostos a contaminação ambiental ou ocupacional, em diferentes níveis, aos efeitos nocivos desses agentes químicos (BOLOGNESI, 2003; PERES et al., 2005).

Uma boa parcela dessa contaminação se dá pelo manuseio e a aplicação do produto sem o uso de equipamentos de segurança adequados. Para Londres (2011), o “uso seguro”, artifício usado pela indústria agroquímica para mascarar os perigos de seus produtos, mostrou-se absolutamente impossível. Isso se deve a fatores como dificuldade em seguir as recomendações de segurança no campo e a própria incapacidade desses métodos fornecerem real segurança.

Além disso, é importante destacar que alguns agrotóxicos podem contribuir para a ocorrência de intoxicações e desenvolvimento de doenças respiratórias, cardíacas, alérgicas, reprodutivas, degenerativas e de câncer. Estas adversidades decorrem do fato de alguns componentes químicos, presentes nos agrotóxicos, apresentarem características genotóxicas e/ou mutagênicas, que os tornam capazes de interagir com o DNA, o que pode promover nos organismos expostos, por exemplo, alterações numéricas ou estruturais nos cromossomos e ativação ou inativação de genes (VENTURA-CAMARGO et al., 2008; RODRÍGUEZ et al., 2015).

Para a investigação dos possíveis efeitos dos agrotóxicos, é interessante que se utilize diferentes ferramentas de análises que juntas possam dar um diagnóstico mais preciso e completo para posteriores pareceres sobre o químico estudado. No entanto, para tais análises é

pertinente que sejam mensurados os efeitos que essas substâncias causam nos organismos vivos. Neste contexto, indicadores biológicos – ou bioindicadores – são necessários para determinar o grau de impacto que estes agentes possam causar no meio.

Os bioensaios com plantas superiores também têm sido recomendados para detecção de contaminantes no meio (GRANT, 1982). A utilização de *Allium cepa* (cebola comum) é considerada ferramenta útil para a pesquisa básica do potencial genotóxico e citotóxico de produtos químicos devido a sua elevada sensibilidade, baixo custo, rapidez, facilidade de manipulação e da utilização de amostras sem tratamento prévio (LEVAN, 1938; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Uma das mais antigas ferramentas utilizadas para estudos de avaliação em *A. cepa*, o teste de aberrações cromossômicas (AC), permite quantificar uma série de parâmetros como determinação de índice mitótico e indução de micronúcleos e de anormalidades no ciclo celular (GRANT, 1994).

Devido a sua capacidade de resposta a agentes xenobióticos equiparadas aos mamíferos, os peixes têm sido muito utilizados em testes de genotoxicidade de agentes químicos e físicos (AL-SABTI, 1986). A espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) possui grande uso em diversos tipos de avaliações de componentes químicos no ambiente (GRISOLIA et al., 2005). Entre as diferentes ferramentas utilizadas nestes peixes, o teste de micronúcleo (MN) é de grande valia por ser um teste rápido, confiável, sensível e se abstém de equipamentos caros para sua realização (BARŠIENE; LOVEJOY, 2000). Os MN são formados por meio de quebras cromossômicas (clastogênese) e distúrbios no fuso mitótico (aneugênese) fazendo com que os fragmentos consequentes desses eventos não sejam incorporados ao núcleo das células filhas durante a divisão celular (ARKHIPCHUK; GARANKO, 2005; BOLOGNESI; FENECH, 2012). Juntamente com os MN, as anormalidades nucleares (AN) também podem ser observadas nos eritrócitos de peixes como um *endpoint* de genotoxicidade. Elas são classificadas em “blebbed”, “lobed”, “notched” (CARRASCO et al., 1990) e se distinguem de acordo com a morfologia que o núcleo apresenta.

Outro teste amplamente usado em peixes é o ensaio do cometa – eletroforese em gel de célula única. Quando comparado com outros testes de genotoxicidade, o ensaio do cometa se destaca por consistir na detecção de pequenos danos no DNA. O teste ainda apresenta vantagens como requerimento de pequeno número de células, flexibilidade, precisão, fácil aplicação, reprodutibilidade e curto período de tempo para a realização do experimento. Por este motivo, este método tem sido utilizado a mais de duas décadas como ferramenta para

investigação de genotoxicidade no ambiente aquático (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; COLLINS, 2004; SOUZA; FONTANETTI, 2012).

Os inseticidas representam uma grande proporção dos compostos sintetizados pela indústria química para uso doméstico e na agricultura. No entanto, devido ao aumento da resistência das pragas aos antigos pesticidas e sua delicada implicação para a saúde pública, as famílias mais antigas estão sendo progressivamente substituídas por novas famílias de inseticidas. Em menos de 10 anos, o fipronil, representante da família fenilpirazol, foi considerado como uma das melhores alternativas dentre os inseticidas (RAP-AL URUGUAY, 2004), contemplou o posto de um dos agrotóxicos mais utilizados no mundo e, hoje, é alvo de órgãos governamentais e da comunidade científica para sua progressiva supressão mundial por conta de seus efeitos deletérios sobre o meio ambiente (BIJLEVELD VAN LEXMOND et al., 2015; BONMATIN et al., 2015; PISA et al., 2015; SIMON-DELISO et al., 2015; VAN DER SLUIJS et al., 2015).

Neste sentido, Arthur (2002) e Caboni et al. (2003) realizaram estudos comparados sobre a eficiência de um novo membro da família fenilpirazol, o ethiprole. Segundo os autores, mesmo com sua menor lipofilicidade e menor toxicidade, o inseticida se apresentou basicamente tão efetivo quanto seu análogo fipronil. Então, em 2010 foi produzido o Curbix®, composto comercial do ethiprole, que segundo o fabricante conta com três grandes diferenciais: rápido efeito de choque, manutenção dos níveis de infestação da praga, além de pertencer a um novo grupo químico para controle de cigarrinhas (*Mahanarva fimbriolata*). O fabricante recomenda que o inseticida seja utilizado sem exposição à luz.

Este inseticida tem sido largamente utilizado em monoculturas como cana-de-açúcar e arroz e comercializado como um inseticida foliar e de solo e para o uso do tratamento de sementes (USEPA, 2011; LAMBERTH; DINGES, 2012). Ele atua nos receptores GABA (ácido gama-aminobutírico) dos insetos, de forma a hiperexcitar o sistema nervoso central e levar o organismo a morte (COLE, 1993). No entanto, até hoje não há na literatura estudos que investiguem a ação do ethiprole nos organismos não alvos a nível celular e o quanto a incidência luminosa influencia sobre isso.

Assim, este trabalho teve por objetivo investigar a potencialidade tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do Curbix®, produto comercial do ethiprole, por meio dos sistemas testes *A. cepa* (cebola) e *O. niloticus* (tilápia do Nilo), expostos a diferentes concentrações do inseticida, tomando como base, a dose utilizada em solo na cultura de cana-de-açúcar. Também foi testada a influência da incidência da luz sobre o resultado.

2. OBJETIVOS

Diante do grande uso agrícola do inseticida Curbix®, o presente trabalho teve por objetivo:

- Investigar o potencial tóxico, citotóxico genotóxico e mutagênico do inseticida Curbix®, utilizando o teste de aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa* (cebola), tanto em ensaios de germinação realizados na ausência de luz, quanto na presença de luz.
- Determinar a frequência de micronúcleos em células da região F1 de *A. cepa*, visando a avaliação da permanência destes no sistema.
- Analisar, identificar e quantificar os principais tipos de aberrações mitóticas induzidas pelo inseticida Curbix®, sob o sistema teste *A. cepa*.
- Avaliar o potencial genotóxico deste pesticida em *O. niloticus* (tilápia), por meio do teste do micronúcleo associado à anormalidades nucleares e ensaio do cometa em sangue periférico destes animais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Organismos testes e ensaios utilizados na detecção de danos no DNA

O potencial de indução de danos genéticos por diferentes compostos químicos pode ser avaliado por meio de diferentes ferramentas e organismos testes. Há uma grande quantidade de organismos utilizados como teste, a escolha de um organismo específico varia de acordo com o objetivo do estudo. É importante salientar que espécies distintas podem, muitas vezes, produzir resultados diferentes tanto pelas diferenças de suas taxas metabólicas quanto por suas condições fisiológicas específicas (CAMPANA et al., 2003). Já as ferramentas mais indicadas para estudos de monitoramento ambiental devem ser aquelas com maior facilidade de execução e com capacidade de gerar resultados rápidos e reprodutíveis (FISKEJÖ, 1985).

As plantas superiores têm sido consideradas sensíveis e simples e, segundo Grant (1994), os testes que as utilizam produzem poucos resultados falsos. Ma et al. (1995) ressaltam que os vegetais são receptores biológicos diretos e, por isso, são importantes para testes genéticos e de monitoramento ambiental. As plantas mais utilizadas na avaliação de toxicidade de diferentes compostos são *Allium cepa*, *Tradescantia* spp e *Vicia faba*. Por meio desses sistemas podem ser realizados ensaios de aberrações cromossômicas e de micronúcleo (FERNANDES et al., 2007; STA et al., 2012; RODRÍGUEZ et al., 2015).

A espécie *A. cepa* foi um dos primeiros sistemas a serem utilizados para análises dos efeitos de compostos químicos sobre o material genético. Seu início se deu por Levan, em 1938, ao demonstrar a toxicidade da colchicina em células meristemáticas de raízes. Após passar por alterações em sua metodologia para abranger maior número de químicos (FISKEJÖ, 1985; MA et al., 1995); atualmente, o teste de aberrações cromossômicas e de micronúcleo nessa espécie oferece bons resultados para avaliação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de várias substâncias (MATSUMOTO et al., 2006; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Esta espécie é frequentemente utilizada por apresentar células meristemáticas homogêneas, cromossomos grandes e em número baixo (16 cromossomos), grande número de células em divisão, alta tolerância a diferentes condições de cultivo, disponibilidade durante o ano todo, baixo custo, fácil manuseio e por serem facilmente coradas e observadas (MATSUMOTO et al., 2006; KURÁS et al., 2006).

Dentre os contaminantes, os agentes genotóxicos e mutagênicos são os mais preocupantes e têm sido foco de inúmeros estudos. Eles são capazes de induzir alterações no material genético, podendo colocar em risco as futuras gerações por apresentarem característica de herdabilidade e promoverem efeitos imediatos como o comprometimento da saúde dos organismos expostos (RIBEIRO, 2003). Uma das ferramentas mais utilizadas para avaliação desses poluentes é o teste de aberrações cromossômicas (AC). Este teste é um dos poucos métodos diretos capazes de medir alterações em organismos expostos a potenciais agentes carcinogênicos (RANK et al., 2002).

As AC são decorrentes de mudanças cromossômicas, numéricas ou estruturais, podendo ser espontâneas ou por meio da exposição a agentes químicos e físicos (RUSSEL, 2002). A alteração estrutural pode ser resultado de quebras ou troca de material genético (SWIERENGA et al., 1991). Quebras cromossômicas, comumente induzidas por agentes clastogênicos (indutores de quebra no DNA), devem ser consideradas como um sinal de alerta para a ocorrência de danos herdáveis no material genético (NICHOLS, 1973). No entanto, algumas quebras podem ser reparadas ou levar a célula à morte, deixando de causar mutações herdáveis. Os agentes aneugênicos interferem no fuso mitótico, causando erro durante a segregação mitótica (GRANT, 1982) e associam-se a estruturas que fazem parte do ciclo celular e as moléculas presentes no aparato do fuso mitótico (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002).

Outra ferramenta muito utilizada é o teste do micronúcleo (MN). Este teste é vantajoso pela simplicidade da análise dos resultados e por ser capaz de ser aplicado em qualquer sistema em proliferação (HAYASHI et al., 1998). Em plantas, como *A. cepa*, o teste do micronúcleo é avaliado em células da região F1 (região não meristemática) ou ainda conjuntamente, com as aberrações cromossômicas em células meristemáticas como um indicativo de mutagenicidade (YI et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009; CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

O mecanismo de formação dos micronúcleos é o mesmo para todos os organismos. Os MN são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que, durante a divisão celular não são incluídos no núcleo principal da célula (FENECH, 1997). Também podem ser formados a partir do processo de poliploidização espontânea ou por ação de xenobiontes. Na tentativa de restaurar as condições normais do núcleo, esse excesso de DNA é eliminado do núcleo principal (FERNANDES et al., 2007). Estes MN podem ser reparados ou não pela célula; caso estes permaneçam, podem induzir uma mutação (FENECH et al., 2011).

O ambiente aquático está a todo o momento exposto a um grande número de substâncias tóxicas que nele são lançadas. Há diversas vias de contaminação da água: poluição natural, não associada à atividade humana; poluição industrial, causada nos processos industriais pelos resíduos líquidos, sólidos e gasosos; poluição urbana, por meio dos esgotos domésticos; poluição agropastoril, causada pelo uso de defensivos agrícolas, fertilizantes, excremento de animais e erosão; poluição acidental, através do derramamento de substâncias poluentes, que acabam por chegar a rios e mares, gerando a contaminação dos ecossistemas aquáticos (DERÍSIO, 1992; RASHED, 2001).

Dentre os vertebrados, os peixes são considerados organismos modelo para o monitoramento da genotoxicidade aquática e da qualidade das águas residuais, devido sua capacidade de metabolizar xenobiontes e acumular poluentes (GRISOLIA; CORDEIRO, 2000). Além disso, os peixes representam o último nível trófico na cadeia alimentar aquática e são muito sensíveis a mudanças ambientais (LAKRA; NAGPURE, 2009). As espécies de peixes mais comumente utilizadas em avaliações da toxicidade de xenobiontes são *Rhamdia quelen* e *Oreochromis niloticus*.

Oreochromis niloticus (Perciformes, Cichlidae) é uma espécie de peixe comercialmente importante no sudeste do Brasil, particularmente no estado de São Paulo. Popularmente chamada de tilápia do Nilo, esta espécie é também comumente encontrada em estuários de todo o mundo, sendo reconhecida pela sua sensibilidade em responder, rapidamente, às alterações ambientais (VIJAYAN et al., 1996). Por isso, é muito utilizada para estudar o efeito das mais diversas substâncias tóxicas presentes no meio aquático (GRISOLIA; CORDEIRO, 2000; GRISOLIA et al., 2005).

Entre as diversas técnicas existentes para detectar efeitos genotóxicos e mutagênicos de diferentes substâncias em peixes, o teste do micronúcleo associado às anormalidades nucleares e o ensaio do cometa têm sido frequentemente utilizados pela comunidade científica (GHISI et al., 2011; FUZINATTO et al., 2013).

O teste de micronúcleo (MN) era uma ferramenta aplicada somente em camundongos. A partir de 1982, passou a ser utilizada em peixes devido a modificações na sua metodologia (HOOFTMAN; DE RAAT, 1982) e atualmente é de grande valia, por ser um teste rápido, confiável, sensível e por se abster de equipamentos caros para sua realização (BARŠIENE, LOVEJOY, 2000). Os eritrócitos de peixes são especialmente preferidos para este teste, pois sendo nucleados, os micronúcleos podem ser marcados facilmente como resultado de atividade clastogênica dos xenobiontes (AL-SABTI; METCLAFE, 1995; LEMOS et al., 2005).

Em eritrócitos de peixes, além do teste de mutagenicidade por meio da análise de micronúcleos, outras anormalidades nucleares podem ser observadas. Carrasco et al. (1990) classificaram essas anormalidades como: “blebbed”, “lobed” e “notched”; ainda pode ser observada durante a análise dos eritrócitos a presença de brotos nucleares. Essas anormalidades são contabilizadas no momento da análise do micronúcleo. Portanto, como ainda não estão esclarecidos os mecanismos de formação de tais anomalias, não há um consenso sobre a analogia dos tipos de irregularidades nucleares e o micronúcleo (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003); com isso, as anormalidades nucleares vêm sendo usadas por vários autores como biomarcador de genotoxicidade (CAMPANA et al., 2003; ERGENE et al., 2007; AHMED et al., 2011; ÇAVAS, 2011).

O ensaio do cometa é uma técnica que permite detectar lesões transitórias no DNA (RIBEIRO et al., 2003). Essas lesões podem ser reparadas ou resultarem em mutação gênica (PFUHLER et al., 2011). A imagem resultante após aplicação do teste, vista pelo microscópio, lembra a figura de um cometa, com uma cabeça distinta, composta por DNA intacto e uma cauda proeminente, composta por fragmentos de DNA (KASUBA et al., 2012).

A incidência de dano está relacionada com o tamanho da cauda, ou seja, quanto maior os danos induzidos no DNA analisado, maior é a cauda do cometa. Assim, células sem cauda apresentam nenhum ou pouco dano (TICE, 1995). Já células mortas ou em processo de morte resultam em cometas com uma cabeça pequena ou inexistente e uma cauda grande e difusa, contendo quase todo o DNA do nucleóide (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005).

Segundo Frenzilli et al. (2008), as vantagens do ensaio do cometa incluem capacidade de detectar danos genotóxicos a nível celular individual; necessidade de pequeno número de células para sua realização; é um método relativamente fácil de se conduzir e mais sensível que outras ferramentas que avaliem quebra cromossômica; ainda, respostas rápidas após exposição genotóxica.

3.2. Família fenilpirazol e seus efeitos sobre os organismos expostos

A revisão referente a este item foi compilada na forma de um artigo de revisão, apresentado a seguir:

**Fenilpirazóis: principais representantes e seus impactos sobre os organismos
expostos**

Thays de Andrade Guedes e Carmem Silvia Fontanetti

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Av. 24-A, nº1515, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

*Autora para correspondência: Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264135.

E-mail: fontanet@rc.unesp.br

RESUMO

Os agrotóxicos tem como propriedade a eliminação ou o controle de organismos alvos para os quais são tóxicos. Eles podem ser fungicidas, inseticidas, herbicidas, nematicidas, entre outros. Os inseticidas têm a função de controlar insetos pragas da agricultura, um dos fatores redutores de produtividade, sem injuriar as culturas agrícolas. Dentre os inseticidas, a classe dos fenilpirazóis vem se destacando na indústria agroquímica nos últimos dez anos. A ação deste inseticida se dá pela sua ligação ao canal de cloro, bloqueando a ativação da condução dos estímulos nervosos, pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), causando a hiperexcitação do sistema nervoso e acarretando, assim, na morte do animal. Fipronil, ethiprole e buteno-fipronil são análogos pertencentes aos fenilpirazóis e merecem atenção pela sua crescente utilização pela indústria agroquímica. Estudos demonstram eficácia em organismos alvos. Em controvérsia, investigações estão sendo realizadas a respeito dos potenciais danos que estes químicos causam em organismos não alvos expostos aos mesmos. Porém, pouco se sabe sobre essa classe de inseticidas, o que reforça a necessidade de maiores esclarecimentos a respeito dos fenilpirazóis e seus efeitos nos organismos não alvos. Assim, essa revisão teve por objetivo reunir estudos realizados com três de seus representantes enfocando sua toxicidade nos mais diversos organismos.

Palavras-chave: toxicidade, ethiprole, fipronil, buteno-fipronil

1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos têm como propriedade comum o bloqueio de um processo metabólico vital de organismos alvos, agindo diretamente na eliminação ou no controle desses organismos para os quais são tóxicos. Nesse grupo de compostos químicos, encontram-se os fungicidas, inseticidas, herbicidas, nematicidas, entre outros, considerados extremamente agressivos ao meio ambiente e à saúde humana (GRISOLIA, 2005). De acordo com a Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, art. 2º inciso I, agrotóxicos 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”.

É inegável o aumento da produtividade agrícola e o auxílio no controle de vetores de diversas doenças que os agrotóxicos possibilitaram. Porém seu uso indiscriminado tem provocado diversos impactos sobre o meio ambiente. Dentre os efeitos nocivos, pode ser citada a presença de resíduos no solo, na água, no ar, nas plantas e animais. Além da contaminação ambiental, estes resíduos podem chegar ao homem através da cadeia alimentar e ocasionar danos à saúde (EDWARDS, 1973; HOLT, 2000). Diante disso, é cada vez mais crescente a preocupação de pesquisadores em relação à potencialidade dos agrotóxicos na contaminação do ambiente.

Esses químicos podem ser classificados quanto ao seu potencial de periculosidade ambiental (PPA), baseado no Decreto nº 98.816/90, levando-se em consideração as seguintes variáveis: bioacumulação, persistência, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico. Os produtos foram subdivididos nas classes I, II, III e IV, definidos como altamente perigoso, muito perigoso, perigoso e pouco perigoso, respectivamente (ANDREI, E. 1996). Outra classificação existente para os agrotóxicos acontece segundo seu potencial toxicológico, tendo em vista sua utilização e seu modo de ação (BRASIL, 1998).

Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos baseada nas DL₅₀ (mg/kg) e CL₅₀ (mg/L).

Classe	Grau de toxicidade	DL₅₀; CL₅₀
I	Extremamente tóxico	≤10; ≤0,2
II	Altamente tóxico	10-100; 0,2-2
III	Medianamente tóxico	>100-1000; >2-20
IV	Pouco tóxico	>1000; >20

A toxicidade é uma propriedade que reflete o potencial de uma substância em causar um efeito danoso a um organismo vivo. Ela depende da concentração e das propriedades da substância química à qual o organismo é exposto e também do tempo de exposição (RAND et al., 1995). Assim, é recomendável avaliar o efeito de uma substância para mais de uma espécie para que, por meio do resultado obtido com o organismo mais sensível, seja possível estimar com mais segurança o impacto do contaminante no meio ambiente (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990).

Os testes de toxicidade podem ser classificados em agudos e crônicos. Normalmente, o efeito medido em estudos de toxicidade aguda é a letalidade ou alguma outra manifestação do organismo que a antecede como, por exemplo, o estado de imobilidade. Este teste permite que sejam determinados os valores de CL₅₀ e DL₅₀, concentração e dose de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos, em um período de 24 a 96 horas (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990).

Há ainda testes que avaliem os efeitos de um agente químico ou físico a nível celular. Estas ferramentas são frequentemente utilizadas para detecção de lesões induzidas no DNA dos organismos, que podem ser genotóxicas ou mutagênicas. O termo genotoxicidade é caracterizado como uma alteração na molécula de DNA (formação de adutos, lesões na fita, síntese de DNA não programada e trocas entre cromátides irmãs). Esses efeitos podem ser transitórios, pois seu DNA pode ser reparado pelo próprio organismo. Já o termo mutagenicidade caracteriza-se pela indução de mutações gênicas ou cromossômicas, causando uma alteração permanente no material genético dos organismos (DEARFIELD et al., 2002).

Dentre os agrotóxicos, o grupo dos inseticidas merece destaque pelo amplo uso em culturas que ocupam grandes extensões de terra, em especial, a cana-de-açúcar, segundo maior sistema de cultivo, responsável por 10,1% do consumo de defensivos no Brasil (IEA, 2015). Segundo dados da União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido pela Índia, Tailândia e Austrália (UNICA,

2015). A partir de 2008, o país passou a liderar o ranking de maior consumidor de agrotóxicos, passando os Estados Unidos que, até então, era o líder.

Em 2013, a classe de inseticidas foi a que respondeu pelo maior valor das vendas, sendo responsável por 39,8% do faturamento total, ou seja, US\$ 4,55 bilhões Brasil (IEA, 2015). Do total de inseticidas comercializados, 93,8% foram de inseticidas de aplicação foliar e 6,2% para tratamento de sementes (IEA, 2015). Esses compostos têm como função o controle de insetos pragas da agricultura, um dos fatores redutores de produtividade, sem injuriar as culturas agrícolas e, de acordo com suas estruturas, são classificados nos seguintes grupos: inseticidas de origem vegetal, inseticidas inorgânicos e inseticidas organossintéticos (ANDREI, 2005; LARINI, 1999).

Os inseticidas organossintéticos pertencem, na sua maioria, aos seguintes grupos químicos (ANDREI, 2005; LARINI, 1999):

1. Organoclorados: compostos à base de carbono, com radicais de cloro. São derivados do clorobenzeno, do ciclohexano ou do ciclodieno
2. Organofosforados: compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido diotiofosfórico.
3. Carbamatos: derivados do ácido carbônico.
4. Benzoiluréias: compostos que apresentam como fórmula geral a estrutura 3-(2,6-difluorbenzoil) ureia
5. Piretróides: compostos que apresentam estruturas semelhantes à piretrina às piretrinas I e II, naturais nas flores de *Chrysanthemum cinerariifolium*.

Os inseticidas são liderança ao que se refere à fabricação de compostos químicos para a agricultura e para uso doméstico. Contudo, através da pressão de seleção causada pelo uso extensivo dos antigos inseticidas e o desenvolvimento de resistência em muitos insetos (organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides), essas famílias estão sendo gradativamente substituídas por novas famílias de inseticidas. Entre as consequências drásticas da evolução da resistência estão a aplicação mais frequente de pesticidas, o aumento na dosagem do produto e, eventualmente, a perda de um produto ou de uma classe inteira de produtos (GEORGHIU, 1990).

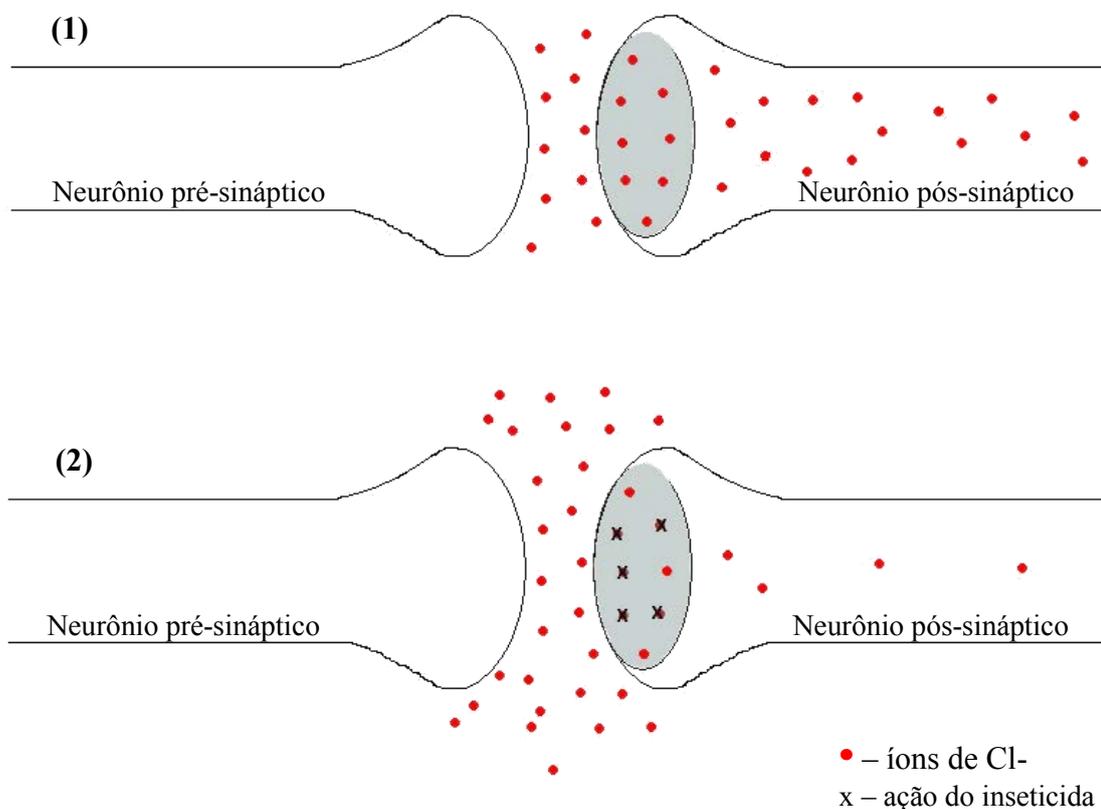
Com isso, duas famílias relativamente novas estão sendo utilizadas como alternativa, os neonicotinóides e os fenilpirazóis. Dentre eles, os fenilpirazóis vêm se destacando na indústria agroquímica nos últimos dez anos, chegando a ser hoje uma das famílias mais utilizadas entre os inseticidas por todo o mundo. A introdução de novos compostos químicos

no meio ambiente, principalmente os inseticidas, tem contribuído substancialmente para o aumento nas taxas de alterações genéticas em organismos não alvos. Diante disso, a presente revisão tem como objetivo apresentar diversos estudos em que são abordados os principais representantes da classe fenilpirazol e seus efeitos deletérios sobre os organismos não alvos.

2. CARACTERIZAÇÃO DA CLASSE FENILPIRAZOL

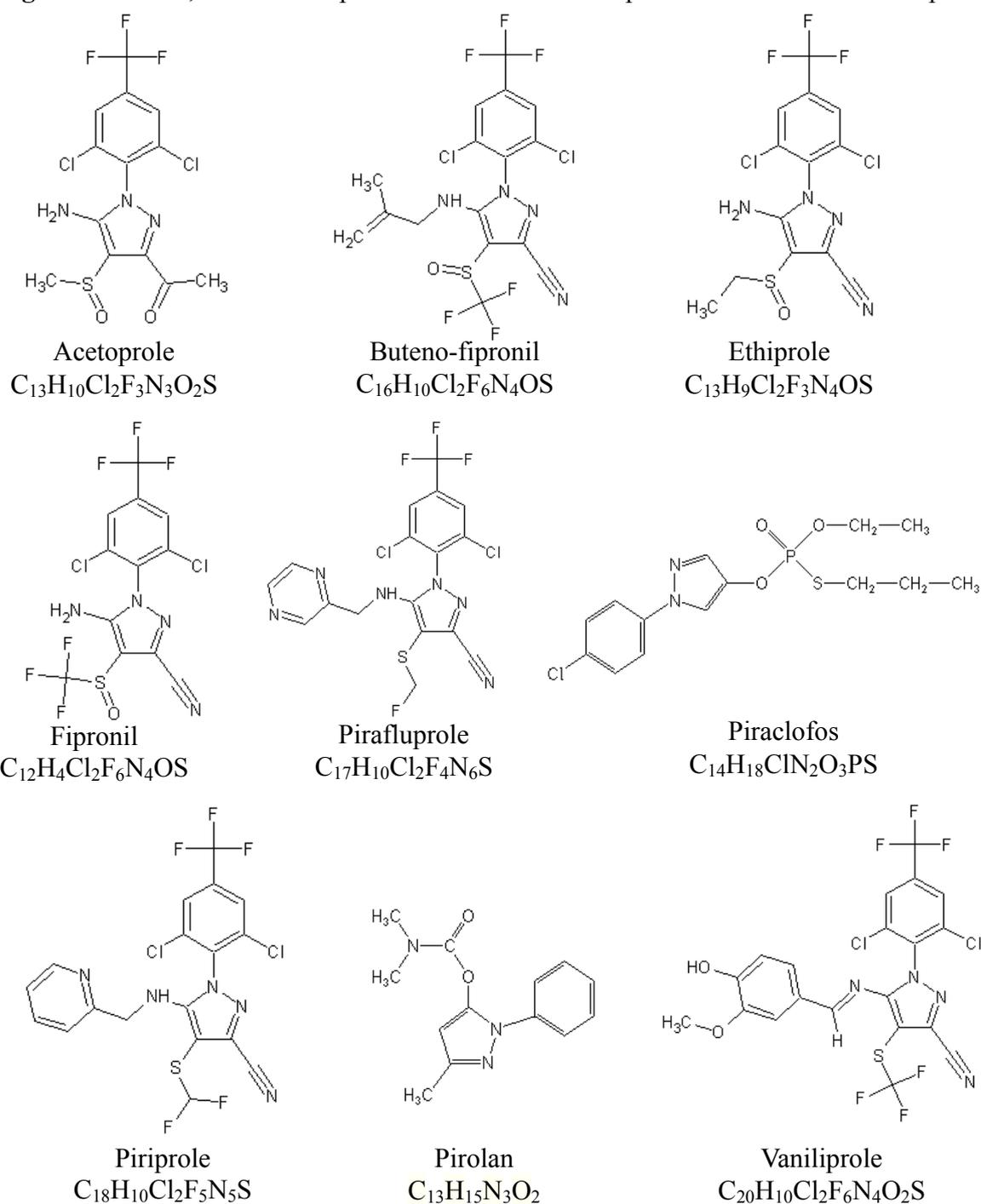
A família fenilpirazol tem como constituintes estruturais aminas aromáticas e heterocíclicas. É representada por inseticidas sistêmicos que atuam sobre os receptores GABA (ácido gama-aminobutírico) de insetos, responsáveis pelo relaxamento do neurônio após o impulso nervoso, bloqueando a passagem de íons de cloreto pelas membranas pós-sinápticas dessas células nervosas. A ausência da inibição sináptica causa uma hiperexcitação do sistema nervoso central, levando a morte do organismo (figura 1) (COLE et al., 1993).

Figura 1. Ação dos inseticidas fenilpirazóis sobre os insetos. **(1)** Função “calmante” dos receptores GABA (ácido gama-aminobutírico) de insetos, por meio do aumento da permeabilidade da membrana do neurônio pós-sináptico após o impulso nervoso; **(2)** ação dos fenilpirazóis sobre os GABA, provocando hiperexcitabilidade do sistema nervoso central.



Fonte: Ilustração das autoras.

Esta família surgiu como uma alternativa aos inseticidas organoclorados, por apresentar uma menor toxicidade sem interferir em sua efetividade no controle e combate dos insetos alvos (TINGLE et al., 2003). Atualmente, esse grupo possui 10 compostos como representantes. São eles: acetoprole, buteno-fipronil (ou flufiprole), ethiprole, fipronil, piraclófos, pirafluprole, piriprole, pirolan e vaniliprole (figura 2).

Figura 2. Nomes, fórmulas empíricas e estruturais dos representantes da classe Fenilpirazol.

Fonte: Ilustração das autoras

Dentre os fenilpirazóis, destacam-se três representantes que atualmente têm sido muito utilizados no Brasil na agricultura e nas residências para combate de insetos praga, tanto de vegetais como de animais. São eles: fipronil, ethiprole e buteno-fipronil.

3. PRINCIPAIS REPRESENTANTES DA CLASSE FENILPIRAZOL

3.1. Fipronil

O fipronil foi descoberto e desenvolvido entre os anos 1985 e 1987 (TINGLE et al., 2003), chegando ao mercado em 1993 (TOMLIN, 2000). Foi o primeiro inseticida fenilpirazol introduzido para controle de pragas e considerado um dos inseticidas mais bem sucedidos a mais de uma década por ser altamente versátil. Pertencente à segunda geração de inseticidas que atuam no bloqueio do canal clorídrico do receptor GABA, o fipronil é comercialmente registrado sob diversas formas e denominações (Quadro 1):

Quadro 1. Algumas formas e denominações do inseticida fipronil, disponível comercialmente no Brasil e no mundo.

Princípio ativo	Nome comercial	Concentração do princípio	Titular do registro
Fipronil	Fipronil Nortox	80% m/v	NORTOX
Fipronil	Frontline Topspot	10% m/v	MERIAL
Fipronil	Topline	1% m/v	MERIAL
Fipronil	Regent 800WG	80% m/m	BASF
Fipronil	Tuit Florestal	80% m/m	BASF
Fipronil	Klap	20% m/v	BASF
Fipronil	Belure	25% m/v	BASF
Fipronil	Termidor	2,5% m/v	BASF
Fipronil	Shelter	25% m/v	ADAMA

É um inseticida cuja classificação toxicológica é de classe II (altamente tóxico), caracterizado como um composto de contato e ingestão, com modo de ação que varia de espécie para espécie, em algumas sendo mais importante o efeito da ingestão, enquanto em outras a ação de contato é a mais considerável. Este produto foi o primeiro fenilpirazol indicado como alternativa aos inseticidas organofosforados, por apresentar toxicidade menor que estes químicos. Ele é utilizado para controle de insetos pragas em culturas de

algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, cevada, feijão, milho, pastagens e trigo, na agricultura e tratamento de ectoparasitas de animais, como pulgas e carrapatos, em residências (IKEDA, 2001; TINGLE et al., 2003; THEODORIDIS, 2006).

O produto ativo fipronil é também encontrado em formulações utilizadas na veterinária no qual é aplicado nos pelos de animais e tem sua ação prolongada pelo seu efeito reservatório nas glândulas sebáceas. Segundo o fabricante, o Frontline[®] não é sistêmico. Desta forma, não é transportado pela corrente sanguínea, o que o caracteriza como pouco tóxico e indicado para uso em pequenos animais. O produto pode ser aplicado em filhotes de cães e gatos, portadores de Dermatite Alérgica a Picadas de Pulgas (DAPP).

3.1.1. Impactos nos organismos não alvos

Em busca de novos inseticidas para substituição das famílias antigas e comprovadamente tóxicas aos organismos não alvos, o fipronil surgiu como uma excelente escolha, pois era menos tóxico que os utilizados na época e pertencia a outro grupo de pesticidas. Com isso, foram necessários estudos de investigação de seu potencial tóxico sobre os organismos não alvos. Portanto, a partir de 1996 foram reportados estudos sobre os efeitos adversos do fipronil em diferentes organismos, inclusive o homem (Tabelas 3 e 4). A classificação toxicológica apresentada na tabela 4 foi realizada pelos autores deste trabalho, baseada nas CL_{50} e DL_{50} estipuladas nos estudos de toxicidade em organismos não alvos, juntamente com os valores e classificações definidos de acordo com a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 que dispõe sobre a pesquisa, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins.

Tabela 2. Estudos dos efeitos adversos do fipronil nos organismos não alvos

Táxon	Espécie	Concentração de dose avaliada	Principais efeitos observados	Referências
Algas unicelulares	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	0,08 e 0,16mg/L	Inibição e redução da taxa de crescimento	ACP, 1999
Abelhas	<i>Apis mellifera</i>	0,01 ng/abelha	Injúria na atividade metabólica dos neurônios	Roat et al., 2013
Leguminosas	<i>Cicer arietinum</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Lens esculentus</i> e <i>Vigna radiata</i>	0,2 mg/ kg	Redução no crescimento de raiz e parte aérea; interferência nas características simbióticas	Ahemad e Khan, 2011
Crustáceos	<i>Crassostrea virginica</i>	1,2 mg/L	Redução da produção fecal	ACP, 1999
	<i>Amphiascus tenuiremis</i>	0,00042 mg/L	Atraso no desenvolvimento; comprometimento na reprodução	Chandler et al., 2004
Peixes	<i>Danio rerio</i>	0,33 mg/L	Perda de resposta de fuga; encurtamento do eixo longitudinal do corpo; degeneração da notocorda dos embriões	Stehr et al., 2006
	<i>Rhamdia quelen</i>	0,0002 mg/L	Dano nos eritrócitos; não houve genotoxicidade	Ghisi et al., 2011
	<i>Pimephales promelas</i>	0, 14 mg/L	Natação prejudicada	Beggel et al., 2010
Roedores	<i>Rattus norvegicus</i>	0, 03 mg/L	Mudança na transcrição dos genes	Beggel et al., 2012
		280 mg/kg	Redução no nível de gravidez	Ohi et al., 2004
	<i>Mus musculus</i>	26-28 mg/kg/dia	Fertilidade, consumo alimentar, tamanho da leitegada e ganho de peso reduzidos	Tingle et al., 2003
		50 mg/kg	Efeito genotóxico	Oliveira et al., 2012 ^a
Aves	<i>Colinus virginianus</i> <i>Gallus gallus domesticus</i>	15-50 mg/kg	Processos autofágicos; esteatose; morte celular por necrose	Oliveira et al., 2012b
		11 mg/kg	Perda de massa corporal	Kitulagodage et al., 2011a
Humanos	<i>Homo sapiens</i>	37,5 mg/kg	Redução da massa corporal; anormalidades no desenvolvimento e comportamento dos filhotes	Kitulagodage et al., 2011b
		8 mg/kg	Baixa interferência nos receptores GABA	Hainzl et al., 1998
		1 mM/mL	Genotoxicidade em células da tonsila palatina	Tish et al., 2007

Tabela 3. Estudos da toxicidade (DL₅₀ e CL₅₀) do fipronil em organismos não alvos

Táxon	Espécie	Classificação toxicológica	Referências
Crustáceos	<i>Daphnia pulex</i>	Classe I	Stark; Vargas, 2005
	<i>Amphiascus tenuiremis</i>	Classe I	Chandler et al., 2004
	<i>Procambarus clarkii</i>	Classe I	Schlenk et al., 2001
	<i>P. zonangulus</i>	Classe I	Schlenk et al., 2001
	<i>Diaptomus castor</i>	Classe III	Chaton et al., 2002
	<i>Mysidopsis bahia</i>	Classe I	ACP, 1999
	<i>Streptocephalus sudanicus</i>	Classe I	Lahr et al., 2001
Abelhas	<i>Melipona scutellaris</i>	Classe II	Oliveira et al., 2012a
	<i>Scaptotrigona postica</i>	Classe II	Jacob et al., 2013
Roedores	<i>Mus musculus</i>	Classe II	mConnelly, 2011
	<i>Rattus norvegicus</i>	Classe II	Tingle et al., 2003
Aves	<i>Anas platyrhynchos</i>	Classe IV	Tingle et al., 2003
	<i>Phasianus colchicus</i>	Classe II	Tingle et al., 2003
	<i>Alectoris rufa</i>	Classe II	Tingle et al., 2003
	<i>Colinus virginianus</i>	Classe II	Tingle et al., 2003
	<i>Columba livia</i>	Classe IV	Tingle et al., 2003
	<i>Spizella pusilla</i>	Classe IV	Tingle et al., 2003
Peixes	<i>Taeniopygia guttata</i>	Classe III	Kitulagodage et al., 2008
	<i>Lepomis macrochirus</i>	Classe I	USEPA, 1996
	<i>Cyprinus carpio</i>	Classe II	Tingle et al., 2003
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Classe I	Tingle et al., 2003
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Classe II	USEPA, 1996
Répteis	<i>Cyprinodon variegatus</i>	Classe I	USEPA, 1996
	<i>Acanthodactylus dumerili</i>	Classe II	Peveling; Demba, 2003

DL₅₀ para abelhas, roedores, aves e répteis – mg/kg; CL₅₀ para peixes e crustáceos – mg/L. Note que kg em DL₅₀ refere-se ao peso do corpo do animal tratado. Classe I: extremamente tóxico; classe II: altamente tóxico; classe III: medianamente tóxico; classe IV: pouco tóxico.

Pesquisas sobre a dinâmica da degradação do fipronil foram desenvolvidas por vários autores, como descrito por Tingle et al. (2003) e Pei et al. (2004). Os autores discutiram que em contato com o ambiente, o fipronil pode ser degradado em diversos metabólitos, dependendo das condições ambientais onde ele foi aplicado, tais como: MB46513 (desulfínil-fipronil), MB45950 (sulfido-fipronil), MB46136 (sulfono-fipronil) e RPA200766 (amino-fipronil) provenientes das reações de fotólise, hidrólise, oxidação e redução.

Em invertebrados marinhos como a espécie *Daphnia pulex*, metabólitos do fipronil também superam a sua toxicidade. O sulfido-fipronil possui ação tóxica 6,6 vezes maior e o sulfono-fipronil 1,9 maior (USEPA, 1996).

Investigações com o metabólito desulfínil-fipronil em peixes de água doce demonstraram uma maior toxicidade que o próprio inseticida, sendo 6,3 vezes mais tóxico em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e 3,3 vezes mais tóxico para o peixe sol (*Lepomis macrochirus*) (USEPA, 1996; RAVETON et al., 2007). Do mesmo modo, o metabólito sulfono-fipronil se apresentou com maior toxicidade que o fipronil em aves. Os resultados demonstraram extrema toxicidade em aves de caça e toxicidade moderada em aves aquáticas (USEPA, 1996).

3.2. Ethiprole

O ethiprole (apresentado comercialmente como Curbix®) é caracterizado pelo fabricante como um inseticida de contato e ingestão de classificação toxicológica III (medianamente tóxico). Este agente é comercializado para o controle de pulgões, gafanhotos, bicho mineiro, vaquinha, percevejos, cupins, tripes e gorgulhos como um inseticida foliar e de solo, e para o uso do tratamento de sementes (LAMBERTH; DINGES, 2012).

Arthur (2002) averiguou a ação do ethiprole no controle de pragas em sementes armazenadas de trigo e milho. De acordo com os resultados obtidos em sua pesquisa, constatou a eficácia do inseticida no controle de curculionídeos em grãos armazenados tanto quando administrado sozinho como em combinação com outros inseticidas. Isto ocorreu devido à ação do ethiprole em exterminar as larvas antes que chegassem à fase adulta.

Quando avaliado com outros representantes de sua classe, o ethiprole é considerado o inseticida com menor toxicidade de contato (WANG et al., 2012a,b; 2013a,b). Porém, apesar de possuir uma atividade menor que o fipronil em lepidópteros, seu espectro de ação é maior em insetos sugadores (LAMBERTH; DINGES, 2012).

3.2.1. Impactos nos organismos não alvos

Poucos estudos que avaliem os impactos do ethiprole sobre os organismos não alvos são encontrados na literatura.

Vidau et al. (2009), investigaram o potencial citotóxico dos fenilpirazóis em células epiteliais humanas. Depois de 72 horas de exposição, o ethiprole não foi citotóxico para estas células, expostas a 150 µM do produto. Os autores explicaram que o ethiprole, produzido a partir do fipronil, é menos danoso às células devido a sua lipofilicidade mais baixa e a substituição do radical trifluorometil-sulfinil, presente no fipronil, pelo grupo etil-sulfinil para a formulação deste inseticida.

Estudo da influência de vários inseticidas em predadores naturais de insetos pragas em cultura de arroz demonstrou que o Ethiprole 10SC, na concentração de 25 g/ha, possui menor toxicidade para insetos predadores da espécie *Cyrtorrhinus lividipennis* (KUMARAN et al., 2009). Com o mesmo objetivo, Kurar et al. (2010) combinaram o ethiprole com o inseticida imidaclopride (ethiprole 40% + imidaclopride 40%) e estudaram seus efeitos em aranhas e insetos predadores. De acordo com os resultados encontrados, o tratamento com essa

combinação de inseticidas foi instituído como mais seguro para predadores encontrados em culturas de arroz.

Zhao et al. (2012) avaliaram os riscos tóxicos de vários inseticidas utilizados em organismos normalmente encontrados em culturas de arroz. Os parasitóides de ovos de lepidópteros da espécie *Trichogramma japonicum* são muito utilizados nessas culturas como controle biológico. Por meio da CL_{50} do ethiprole para esses organismos, o inseticida foi considerado menos tóxico que seus análogos (fipronil e buteno-fipronil).

O ethiprole ainda pode influenciar sobre o comportamento de forrageamento e a polinização de abelhas. Foi o que Sharma e Abrol (2014) estudaram com espécimes de abelhas africanizadas, *A. mellifera*. Os autores observaram que o ethiprole apresentou alta atividade residual após 24 horas que as flores foram pulverizadas. Nesse sentido, é descrito na literatura que a pulverização de agrotóxicos pode causar atrasos no forrageamento e comportamentos alterados como agitação, agressividade e crescimento na auto limpeza das abelhas (VAIDYA et al., 1996).

3.3. Buteno-fipronil

O inseticida buteno-fipronil foi desenvolvido na China como uma possível alternativa ao fipronil. Não há registros sobre sua classificação toxicológica por meio de bula ou nos bancos de dados disponíveis. No entanto, estudos mostraram que ele é um excelente inseticida para controle efetivo de diversas espécies de pragas como Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera e Orthoptera (NIU et al., 2008; LIU et al., 2009; YUAN et al., 2009). Sua toxicidade de contato foi investigada por Niu et al. (2007) em larvas de traças-das-crucíferas (*Plutella xylostella*). Os resultados do teste de campo demonstraram que o composto buteno-fipronil foi um inseticida de rápida toxicidade de contato, com eficácia em longo prazo.

Devido intensiva administração do fipronil por muitos anos, muitos insetos têm desenvolvido resistência a este inseticida. Com isso estudos com compostos análogos ao fipronil tornam-se necessários. Estudando a resistência cruzada dos fenilpirazóis fipronil, buteno-fipronil e ethiprole em insetos sugadores da espécie *Nilaparvata lugens*, Zhao et al. (2011) inferiram que o ethiprole não serve como alternativa ao fipronil, para uso no solo, pois os insetos pragas resistentes ao fipronil são, conseqüentemente, também resistentes ao ethiprole. Já o buteno-fipronil serve como uma potencial alternativa, mesmo pertencente à mesma classe dos anteriores.

3.3.1. Impactos nos organismos não alvos

Segundo Wang et al. (2012a), as vespas sem ferrão, parasitas do gênero *Trichogramma*, desempenham um papel importante como inimigos naturais de muitos lepidópteros em uma ampla gama de culturas agrícolas. Em estudos comparados com 30 inseticidas comumente utilizados na agricultura de diferentes classes químicas, o buteno-fipronil foi considerado medianamente tóxico para *T. ostriniae* (WANG et al., 2012a); altamente tóxico para *T. nubilale* (WANG et al., 2012b); tóxico para *T. evanescens* (WANG et al., 2013a). Os autores ainda demonstraram que este inseticida apresentou uma maior toxicidade de contato entre todos os inseticidas testados e, conseqüentemente, o mais tóxico entre os fenilpirazóis. Porém, o buteno-fipronil foi considerado seguro para parasitas da espécie *T. confusum* (WANG et al., 2013b).

Arain et al. (2014) investigaram os efeitos do buteno-fipronil em insetos dípteros da espécie *Drosophila melanogaster*. Através dos resultados, puderam concluir que este inseticida é menos tóxico em indivíduos adultos que em larvas. Ainda sugeriu que, como o buteno-fipronil é pulverizado durante o forrageamento e/ou postura, é altamente eficiente no controle de insetos praga e relativamente seguro para insetos não alvos. Este estudo concordou com os resultados de Yu et al. (2012) que, ao investigarem a toxicidade do buteno-fipronil em mariposas da espécie *Bombyx mori*, pode inferir que tal inseticida é seguro para insetos não alvos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como foi possível observar por meio do levantamento bibliográfico, os representantes da família fenilpirazol foram desenvolvidos como alternativas a antigos inseticidas que, após vários estudos, foram restritos ou até banidos por serem considerados perigosos ao meio ambiente; o mesmo ocorreu com o fipronil. Depois de anos sendo considerado um bom inseticida de substituição, foi banido em países como no Uruguai, China e Reino Unido e tem seu uso restrito aos aplicadores certificados ou sob a supervisão direta de um aplicador certificado pela Agência dos Estados Unidos de Proteção Ambiental (EPA). Não possui registro na Alemanha, sendo, no entanto, permitido apenas o uso emergencial para a cultura da batata.

Os trabalhos citados nessa revisão vêm reafirmar a potencialidade do fipronil em causar alterações deletérias no comportamento e no material genético dos organismos não

alvos. Além disso, foi constatado em peixes de água doce que o metabólico MB46513, proveniente de sua degradação, pode ser até 30 vezes mais tóxico que o próprio fipronil.

Ainda que sejam escassos, os estudos com o ethiprole demonstraram que ele é um inseticida eficaz contra pragas e relativamente seguro para organismos não alvos. No entanto, um estudo mostrou alta presença de seus resíduos 24h após a pulverização em flores, podendo comprometer o forrageamento e a polinização de abelhas africanizadas. Da mesma forma, o buteno-fipronil está conquistando o meio agrícola por ser eficaz na sua ação inseticida e, como exposto em um estudo, pode ser usado como uma alternativa ao fipronil, pois não apresenta resistência cruzada com este inseticida.

Por fim, por meio dessa revisão fica clara a necessidade de maiores estudos com variados organismos teste para uma maior elucidação dos químicos que estão sendo utilizados, seja no campo ou de forma doméstica e seus efeitos nos organismos não alvos que estão a eles expostos direta ou indiretamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Comparative study of the growth parameters of legumes grown in fipronil-stressed soils. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 5, p. 29-36, 2011.

ACP - Evaluation of the fipronil use as a public hygiene insecticide. Advisory Committee on Pesticides. Food and Environment Protection Act 1985, part III. Control of Pesticides Regulations 1986. No. 187. Issue No. 52. Pesticides Safety Directorate, MAFF, York, UK, July, 1999.

ANDREI, E. (Coord.) **Compêndio de defensivos agrícolas**. 7. ed. São Paulo: Andrei, 2005.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. 5. ed. rev. atual. São Paulo: Organização Andrei, 1996. 506 p.

ARAIN, M. S.; HU, X.; LI, G. Assessment of Toxicity and Potential Risk of Butene-fipronil Using *Drosophila melanogaster*, in Comparison to Nine Conventional Insecticides. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 92, p. 190-195, 2014.

ARTHUR, F.H. Efficacy of Ethiprole applied alone and in combination with conventional insecticides for protection of stored wheat and stored corn. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, p. 1314-1418, 2002.

BEGGEL, S.; WERNER, I.; CONNON, R. E.; GEIST, J. P. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 3169-3175, 2010.

- BEGGEL, S.; WERNER, I.; CONNON, R. E.; GEIST, J. P. Impacts of the phenylpyrazole insecticide fipronil on larval fish: time-series gene transcription responses in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following short-term exposure. **Science of the Total Environment**, v. 426, p. 160-165, 2012.
- BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. In: Legislação federal de agrotóxicos e afins. Brasília (DF): **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**; 1998. p. 7-13.
- CHANDLER, G. T.; CARY, T. L.; VOLZ, D. C.; WALSE, S. S.; FERRY, J. L.; KLOSTERHAUS, S. L. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: A rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. **Environmental Toxicology Chemical**, v. 23, p. 117-124, 2004.
- 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.
- COLE, L.M.; NICHOLSON, R.A.; CASIDA, J.E. Action of phenyl-pyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 46, p. 47, 1993.
- DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L. R. Genotoxicity risk assessment a proposed classification strategy. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 521, p.121-135, 2002.
- EDWARDS, C.A. **Persistent pesticides in the environment**. Second Edition. U.S.A.: CRC Press. 170p, 1973.
- EVANS, J.; SEIDEL, J.; O'CONNOR, G. E.; WATT, J.; SUTHERLAND, M. Using omethoate insecticide and legume inoculant on seed. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 31, p. 71-76, 1991.
- GEORGHIOU, G. P. Overview of Insecticide Resistance, p. 18-41. In. GREEN, M. B.; LEBARON, H. M.; MOBERG, W. K. Managing Resistance to Agrochemicals: from fundamental research to practical strategies. **American Chemical Society Symposium Series**, n. 421, Washington D. C, 1990.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, R. P. A.; RAMOS, M. L. L. C.; **Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no**

Controle de Efluentes Líquidos, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB): São Paulo, 1990.

GHISI, N.C.; RAMSDORF, W.A.; VINÍCIUS, M.; FERRARO, M.; ALMEIDA, M. I. M.; RIBEIRO, C. A. O.; CESTARI, M. M. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, p. 589-599, 2011.

GIBBONS, D.; MORRISSEY, C.; MINEAU, P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 103–118, 2015.

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

HAINZL, D.; COLE, L. M.; CASIDA, J. E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfanyl photoproduct. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, p. 1529-1535, 1998.

HOLT, M. S. Sources of Chemical Contaminants and Routes into the Freshwater Environment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 21-27, 2000.

IEA – INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Defensivos Agrícolas: comercialização recorde em 2013 e expectativas de acréscimo nas vendas em 2014, São Paulo: IEA, 2014. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=13467>>. Acesso em: 18 janeiro de 2015.

IKEDA, T.; ZHAO, X.; NAGATA, K.; KONO, Y.; SHONO, T.; YEH, J. Z.; NARAHASHI, T., Fipronil modulation of gamma-aminobutyric acid receptors in rat dorsal root ganglion neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 296, p. 914–921, 2001.

JACOB, C. R. O.; SOARES, M. H.; CARVALHO, S. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Acute Toxicity of Fipronil to the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 90, p. 69-72, 2013.

KITULAGODAGE, M.; ISANHART, J.; BUTTEMER, W. A.; HOOPER, M. J.; ASTHEIMER, L. B. Fipronil toxicity in northern bobwhite quail *Colinus virginianus*: Reduced feeding behaviour and sulfone metabolite formation. **Chemosphere**, v. 83, p. 524-530, 2010.

KITULAGODAGE, M.; BUTTEMER, W. A.; ASTHEIMER, L. B. Adverse effects of fipronil on avian reproduction and development: maternal transfer of fipronil to eggs in zebra

finch *Taeniopygia guttata* and in ovo exposure in chickens *Gallus domesticus*. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 653-660, 2011a.

KITULAGODAGE, M.; ISANHART, J.; BUTTEMER, W. A.; HOOPER, M. J.; ASTHEIMER, L. B. Fipronil toxicity in northern bobwhite quail *Colinus virginianus*: reduced feeding behaviour and sulfone metabolite formation. **Chemosphere**, v. 83, p. 524-530, 2011b.

KUMAR, B. V.; BOOMATHI, N.; KUMARAN, N.; KUTTALAM, S. Non Target Effect of Ethiprole + Imidacloprid 80 WG on Predators of Rice Planthoppers. **The Madras Agricultural Journal**, v. 97, p. 153-156, 2010.

KUMARAN, N.; VINOTH KUMAR, B.; BOOMATHI, N.; KUTTALAM, S.; GUNASEKARAN, K. Non-target Effect of Ethiprole 10 SC to Predators of Rice Planthoppers. **The Madras Agricultural Journal**, v. 96, p. 208-212, 2009.

LAMBERTH, C.; DINGES, J. Bioactive Heterocyclic Compound Classes. **Pharmaceuticals and Agrochemicals**, v. 2, p. 156-233, 2012.

LAHR, J.; BADJI, A.; MARQUENIE, S.; SCHUILING, E.; NDOUR, K. B.; DIALLO, A. O.; EVERTS, J. W. Acute Toxicity of Locust Insecticides to Two Indigenous Invertebrates from Sahelian Temporary Ponds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, p. 66-75, 2001.

LOURENÇO, C.T.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Determination of fipronil LD50 for the Brazilian bee *Melipona scutellaris*. **Julius Kühn-Archiv**, v. 437, p. 174-178, 2012a.

LOURENÇO, C.T.; CARVALHO, S.M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R.C.F. Oral Toxicity of Fipronil Insecticide Against the Stingless Bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, p. 921-924, 2012b.

LIU, S.; NIU, H.; XIAO, T.; XUE, C.; LIU, Z.; LUO, W. Does phenoloxidase contributed to the resistance? Selection with butane-fipronil enhanced its activities from diamondback moths. **The Open Biochemistry Journal**, v. 3, p. 9-13, 2009.

NIU, H. T.; LUO, W. C.; JIANG, G. Q.; ZHU, X. F. Bioactivity of butene-fipronil and its field efficacy again diamondback moth, *Plutella xylostella* L. **Acta Phytophylacica Sinica**, v. 34, p. 316-320, 2007.

NIU, H. T.; LUO, W.; ZONG J.; WEI, S.; WANG, H.; PAN, Z. Realized heritability of resistance to butene-fipronil in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Acta Phytophylacica Sinica**, v. 35, p. 165-168, 2008.

- OHI, M.; DALSENTER, P. R.; ANDRADE, A. J.; NASCIMENTO, A. J. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 46, p. 121-7, 2004.
- OLIVEIRA, R. P.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MATHIAS, M. I. C. Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, p. 569-573, 2012a.
- OLIVEIRA, R. P.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MATHIAS, M. I. C. Cytotoxicity of Fipronil on Mice Liver Cells. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 28-35, 2012b.
- 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.
- PEVELING, R.; DEMBA, S. A. Toxicity and pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) and fipronil to the fringe-toed lizard *Acanthodactylus dumerili* (Squamata: Lacertidae). **Environmental Toxicology Chemical**, v. 22, p. 1437-1447, 2003.
- RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. In **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**; RAND, G. M., ed.; 2nd ed., Taylor & Francis: Washington, 1995, cap. 1.
- RAVETON, M.; AAJOUD, 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.
- ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; NOCELLI, R. C. F.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Effects of Sublethal Dose of Fipronil on Neuron Metabolic Activity of Africanized Honeybees. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, p. 456-466, 2013.
- SHARMA, D.; ABROL, D. P. Effect of insecticides on foraging behaviour and pollination role of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) on toria (*Brassica campestris* var. toria) crop. **Egyptian Journal of Biology**, v. 16, p. 79-86, 2014.
- SCHLENK, D.; HUGGETT, D. B.; ALLGOOD, J.; BENNETT, E.; RIMOLDI, J.; BEELER, AB.; BLOCK, D.; HOLDER, A. W.; HOVINGA, R.; BEDIENT, P. Toxicity of fipronil and its degradation products to *Procambarus* sp.: field and laboratory studies. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, p. 325-32, 2001.
- STARK, D. J.; VARGAS, R. I. Toxicity and hazard assessment of fipronil to *Daphnia pulex*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 11-16, 2005.

- STEHR, C. M.; LIMBO, 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, p. 270-278, 2006.
- THEODORIDIS, G. Fluorine-Containing Agrochemicals: An Overview of Recent Developments. **Fluorine and The Environment**, v. 2, p. 121-175, 2006.
- TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology and Human Health Concerns. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 176, p. 1-66, 2003.
- TISCH M.; FAULDE, M; MAIER, H. Genotoxic effects of insecticides in current use on mucosal epithelial cells from human tonsil tissue. **HNO**, v. 1, p. 15-22, 2007.
- TOMLIN, C. D. S. The pesticide manual. **British Crop Production Council**, Surrey, UK, v. 12, p. 413-415, 2000.
- UNICA - **União da Agroindústria Canavieira de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2015.
- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Pesticide Fact Sheet: Fipronil Technical; Chipco Choice Insecticide. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, 1996.
- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Pesticide Fact Sheet: Ethiprole: New Chemical; Import Tolerances Established. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, 2011.
- VAIDYA, D. N.; KUMAR, S.; METHA, P. K. Repellency of some insecticides to *Apis mellifera* L. foragers on treated bloom of sarson, *Brassica campestris* L. var. brown sarson. **Annals of Biology**, v. 12, p. 134–138, 1996.
- 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, p. 589-597, 2009.
- WANG, Y.; CHEN, L.; YU, R.; ZHAO, X.; WU, C.; CANG, T.; WANG, Q. Insecticide toxic effects on *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Pest Management Science**. v. 68, p. 1564-1571, 2012a.
- WANG, Y.; YU, R.; ZHAO, X.; CHEN, L.; WU, C.; CANG, T.; WANG, Q. Susceptibility of adult *Trichogramma nubilale* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to selected insecticides with different modes of action. **Crop Protection**, v. 34, p. 76-82, 2012b.

- WANG, Y.; WU, C.; CHEN, L.; YANG, L.; YU, W.; ZHAO, X.; WANG, Q.; CAI, L. Toxicity risk of insecticides to the insect egg parasitoid *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Pest management science**, 2013a.
- WANG, Y.; CHEN, L.; AN, X.; JIANG, J.; WANG, Q.; CAI, L.; ZHAO, X. Susceptibility to selected insecticides and risk assessment in the insect egg parasitoid *Trichogramma confusum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 106, p. 142-149, 2013b.
- YU, R.; WANG, Y.; WU, C.; CANG, T.; CHEN, L.; WU, S.; ZHAO, X. Acute toxicity and risk assessment of butene-fipronil to silkworm, *Bombyx mori*. **Asian Journal of Ecotoxicology**, v. 7, p. 639–645, 2012.
- YUAN, Z.; WANG, X.; HAO, X.; LAI, Z.; DENG, X. Formulation development of butene-fipronil 20% WG. **Agrochem Res Appl**, v. 13, p. 14–17, 2009.
- ZHAO, X.; NING, Z.; HE, Y.; SHEN, J.; SU, J.; GAO, C.; ZHU, Y. C. Differential Resistance and Cross-Resistance to Three Phenylpyrazole Insecticides in the Planthopper *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). **Entomological Society of America**, v. 104, p. 1364-1368, 2011.
- ZHAO, X.; WU, C.; WANG, Y.; CANG, T.; CHEN, L.; YU, R.; WANG, Q. Assessment of Toxicity Risk of Insecticides used in Rice Ecosystem on *Trichogramma japonicum*, an Egg Parasitoid of Rice Lepidopterans. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, p. 92-101, 2012.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Composto testado

Neste estudo foi utilizado o produto comercial Curbix® 200SC (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-trifluorometil]fenil]-4-[(etil)-sulfinil]-1H-pirazol-3carbonitrila), N° CAS: 181587-01-9, no qual contém a concentração de 200 g/L de ethiprole.

4.2. Material biológico

Para realização dos bioensaios, foram utilizados dois organismos teste:

- Sementes de cebola (*Allium cepa*, Liliaceae) do mesmo lote (32443-S2) e variedade (Baia Periforme). As sementes foram estocadas no escuro a 6-10°C até serem utilizadas.
- Peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), também conhecido como tilápia do Nilo. No total foram utilizados 50 peixes com tamanho médio de 10 cm, a fim de evitar diferenças intraespecíficas relacionadas ao tamanho e idade dos indivíduos. Os espécimes foram oriundos de piscicultura, foram mantidos no Jardim Experimental do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Rio Claro. Os tanques tiveram aeração constante e os animais alimentados com ração comercial.

4.3. Bioensaio com *A. cepa*

Sementes de *A. cepa* foram colocadas para germinar em placas de Petri (n= 100 para cada amostra) forradas com papel filtro contendo os controles negativo e positivo e as concentrações testadas (1µL/L, 0,5 µL/L e 0,25 µL/L) de ethiprole. O controle negativo foi montado com água destilada. Para o controle positivo, foi utilizado o herbicida aneugênico Trifluralina® (CAS 1582-09-8) na concentração de 0,019 ppm (FERNANDES et al., 2007). Os ensaios foram desenvolvidos com sementes expostas à germinação tanto em ambiente com presença de luz como com ausência de luz, uma vez que, segundo informação do fabricante, este produto é degradado pela luz.

As sementes foram expostas por um período de 96 horas, quando as radículas atingiram cerca de 1,5 centímetros. Decorrido este tempo, as sementes que não germinaram foram contabilizadas e foram coletadas todas as raízes das sementes que germinaram. Então, as raízes foram fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de álcool etílico PA:1 parte de ácido acético

glacial PA – v:v) por 6 h, sendo, após este período, transferidas para um novo Carnoy, onde foram mantidas em geladeira até sua utilização para a confecção das lâminas e posterior análise citológica.

4.3.1. Testes de aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas

Para os testes de aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas de raiz de cebola foi adotado o protocolo Sax; Sax (1968) com adaptações. As raízes foram submetidas à hidrólise ácida em HCl 1N a 60° C por 9 minutos e, novamente, lavadas em água destilada (3 banhos de 5 minutos cada). Após essa etapa, as raízes foram transferidas para frascos escuros contendo reativo de Schiff por 2 horas. Efetuada a reação, as raízes foram novamente lavadas com água destilada para retirar o excesso de reativo.

Para a confecção das lâminas, o material foi colocado sobre a lâmina, recoberto com lamínula e suavemente esmagado em uma gota de carmim acético (2%). As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas, permanentemente, com Permunt para posterior análise.

Para o estudo dos efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos foram confeccionadas 15 lâminas para cada tratamento. Foram contadas, no mínimo, 300 células de cada lâmina analisada, totalizando 4.500 células por grupo experimental.

A avaliação de toxicidade foi baseada no número de sementes germinadas pelo total de sementes utilizadas. A avaliação do potencial citotóxico foi baseada no índice mitótico (IM), sendo consideradas as porcentagens das células em divisão e das células em intérfase, seguindo a aplicação da fórmula a seguir:

$$\text{IM (índice mitótico)} = \frac{\text{n.º de células em divisão}}{\text{n.º total de células observadas}} \times 100$$

A genotoxicidade foi baseada no índice de aberrações cromossômicas, calculado pela fórmula:

$$\text{IAC} = \frac{\text{n.º de células com aberrações cromossômicas}}{\text{n.º total de células observadas}} \times 100.$$

As células portadoras de micronúcleos e quebras cromossômicas foram contabilizadas como um *endpoint* de mutagenicidade, sendo:

$$\text{IMT} = \frac{\text{n.º total de células com MN e quebras}}{\text{n.º total de células observadas}} \times 100.$$

A investigação em células da região F1 de *A. cepa* tem como objetivo investigar a permanência dos efeitos do inseticida ethiprole, sobre o material genético do organismo testado. A região F1 localiza-se cerca de 1mm acima da região meristemática; foi seguido o mesmo procedimento realizado para as células da região meristemática.

Após a obtenção dos resultados dos efeitos deletérios do ethiprole, foi realizada análise estatística através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e post hoc de Dunn com significância de $p < 0,05$, no qual foi feita a comparação das concentrações testadas com o controle negativo (MARÔCO, 2014).

4.4. Bioensaio com *O. niloticus*

Para a montagem dos bioensaios com peixes, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animal da UNESP, Rio Claro, SP (CEUA-IB- UNESP) sob protocolo nº 2001/2013.

Os espécimes foram aclimatados por um período de 15 dias em tanques com sistemas de aeração e filtragem, a temperatura média de 23°C. Após o período de adaptação, foram utilizados cinco aquários, com capacidade de 40 litros cada (40x40x25), previamente aerados por 48 horas. Os peixes foram subdivididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais, cada grupo com cinco indivíduos. Para o controle negativo (CN) foi utilizada água de poço artesiano, para o controle positivo (CP), os animais receberam, por injeção com 20 mg/Kg de ciclofosfamida (KRISHNA; HAYASHI, 2000)

Nos demais tratamentos, o Curbix 200SC (ethiprole) foi diluído em três concentrações: 1µL/L (T1), dose indicada do produto comercial para aplicação em cultivo de cana-de-açúcar; 0,5 µL/L (T2), metade da dose para simular diluição natural; 0,25 µL/L (T3), um quarto da dose recomendada para simulação da sua ação residual. Todos os aquários foram cobertos por lona preta para evitar possível degradação do produto.

4.4.1. Teste do Micronúcleo

De cada peixe vivo retirou-se aproximadamente 0,3 mL de sangue, através de punção cardíaca, utilizando seringas heparinizadas, a fim de evitar a coagulação do sangue coletado. Após a punção, limpou-se a agulha com papel, com a finalidade de evitar a contaminação do sangue com líquido corporal e muco. A primeira gota foi descartada para evitar à contaminação do sangue, usando somente as gotas posteriores para a confecção das lâminas,

obtidas por meio da técnica de esfregaço sanguíneo. Três extensões sanguíneas foram realizadas para cada indivíduo. O material foi fixado em etanol absoluto por 10 minutos. Após 24 horas, as lâminas foram submetidas à hidrólise ácida de 11 minutos, em banho-maria, a 60°C e posteriormente à reação de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978).

Para cada indivíduo foram analisados 3.000 eritrócitos, sob objetiva de imersão (100x), para a determinação da frequência de células micronucleadas. Na classificação de micronúcleos, alguns critérios foram adotados segundo Huber et al. (1983): micronúcleo e o núcleo principal dentro do mesmo citoplasma; boa preservação e coloração do citoplasma e do núcleo; o diâmetro máximo do micronúcleo não deve ultrapassar a metade do núcleo; ausência de conexão entre núcleo e micronúcleo; manutenção da esfericidade do núcleo e micronúcleo.

Considerou-se também a presença de anormalidades nucleares, seguindo a classificação de Carrasco et al. (1990), juntamente com a observação de brotos nucleares (broken eggs):

- “blebbed nuclei”, que corresponde a uma evaginação relativamente pequena do envoltório nuclear, o qual aparenta conter eucromatina ou, algumas vezes, heterocromatina;
- “lobed nuclei”, correspondendo a núcleos com evaginações maiores, mas sem a mesma delimitação. Alterações morfológicas do núcleo foram incluídas nesta categoria, por exemplo, aumento da superfície nuclear, formando múltiplos lóbulos, caracterizando um núcleo disforme;
- “notched nuclei”, descrito como uma invaginação da membrana. Ainda de acordo com este autor, núcleos “notched” parecem não conter material nuclear no local invaginado.
- “broken eggs” podem estar unidos ao núcleo da célula principal por uma estrutura nucleoplasmática;

Tais anormalidades foram conjuntamente consideradas para a análise estatística.

Para o teste estatístico foi realizada comparação dos resultados de cada tratamento com controle negativo; a normalidade dos dados foi testada pelo teste Shapiro Wilk e a significância entre os grupos foi obtida das seguintes formas: a. dados com distribuição normal foram analisados por meio do teste paramétrico ANOVA e post hoc de Tukey com significância de $p < 0,05$; b. dados com distribuição anormal foram analisados por meio do não-paramétrico de Kruskal-Wallis e post hoc de Dunn, com $p < 0,05$ (MARÔCO, 2014).

4.4.2. Ensaio do cometa

As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal 1,5%. Por meio de punção cardíaca, com seringas heparinizadas, retirou-se 0,3 mL de sangue dos peixes. Depois da punção cardíaca, 5 μ L do sangue foram diluídos em 1000 μ L de PBS (tampão fosfato-salino). Sobre as lâminas pré-gelatinizadas foram gotejadas 10 μ L da suspensão celular misturadas a 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão 0,5%, à 37°C, cobertas com lamínula e colocadas no refrigerador, por 5 minutos, para que o gel fosse solidificado. As lamínulas foram retiradas e as lâminas foram submetidas à solução de lise recém-preparada (1 mL de triton-X 100, 20 mL de DMSO e 79 mL de solução lise estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM, pH 10,0- 10,5) com duração de uma hora, à 4°C. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese. Para as duas primeiras corridas, adicionou-se tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH 12,1) por 20 minutos.

Passado o tempo de relaxamento, submeteu-se as lâminas à eletroforese por 15 minutos à 39V e 300mA (0,8V.cm⁻¹); para a última corrida, seguiu-se a mesma metodologia, porém com tampão alcalino (NaOH 300mM e EDTA 1mM, pH>13). Toda a metodologia acima foi conduzida sob luz indireta. Ao término da eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba. A neutralização foi feita em três banhos de 5 minutos com tampão neutro (Tris-HCl 0,4M, pH 7,5), para a remoção de sais e detergentes, secas à temperatura ambiente.

Para a análise das lâminas foram observados 100 cometas por lâmina, utilizando a classificação visual baseada na migração dos fragmentos de DNA do núcleo, segundo Rigonato et al. (2005). Os cometas obtidos foram classificados em quatro classes: classe 0 (sem dano), classe 1 (pouco dano – nucleóides apresentando um tamanho de cauda inferior ao diâmetro da cabeça), classe 2 (dano médio – nucleóides apresentando um tamanho de cauda equivalente a uma ou duas vezes o tamanho do diâmetro da cabeça) e classe 3 (dano intenso – nucleóides apresentando o tamanho da cauda superior a duas vezes o diâmetro da cabeça). Os dados foram apresentados como frequência de células com dano, a distribuição de classes e o escore de dano, calculado como a soma do número de células em cada classe e o total da classe multiplicado pelo valor da mesma (0-3). Logo, os escores podem variar de zero (todas as células sem dano - 0x100) a 300 (todas as células com dano máximo 3x100), segundo Rigonato et al. (2005).

Para realização do teste estatístico foi feita comparação do escore de cada tratamento com o controle negativo. A normalidade dos dados foi testada pelo teste Shapiro Wilk e a

significância entre os grupos foi obtida através do teste paramétrico ANOVA e post hoc de Tukey com significância de $p < 0,05$ (MARÔCO, 2014).

5. RESULTADOS

ARTIGO 1. Investigação dos efeitos do Curbix 200SC (ethiprole) em *Allium cepa*

Thays de Andrade Guedes; Carmem Silvia Fontanetti

ARTIGO 2. Uso de *Oreochromis niloticus* na detecção dos potenciais genotóxicos do inseticida Curbix 200SC (ethiprole)

Thays de Andrade Guedes; Ana Claudia Marcato; Cintya Aparecida Christofolletti; Jorge Evangelista Correia; Yadira Ansoar Rodríguez; Carmem Silvia Fontanetti

Investigação dos efeitos do Curbix 200SC (ethiprole) em *Allium cepa*

Thays de Andrade Guedes e Carmem Silvia Fontanetti*

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Av. 24-A, nº1515, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

*Autora para correspondência: Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264135.

E-mail: fontanet@rc.unesp.br

Resumo

O ethiprole, um inseticida fenilpirazol, está entre os pesticidas mais utilizados no Brasil em culturas de cana-de-açúcar, como uma alternativa ao uso de antigos inseticidas comprovadamente tóxicos ao meio ambiente, como por exemplo, seu análogo fipronil. A toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade de diferentes concentrações de seu composto comercial foram testadas em *Allium cepa* (cebola) por meio do teste de micronúcleo (MN) e aberrações cromossômicas (AC), em células meristemáticas e micronúcleos em células de geração F1. As concentrações testadas foram 1, 0,5 e 0,25 $\mu\text{L/L}$ em bioensaios realizados com e sem a presença de luz. Os resultados demonstraram incidência significativa de AC, mas não significativa de MN, quando comparadas com o controle negativo. Observou-se pouca influência da luz nos resultados obtidos quando comparados os bioensaios. Diante destes resultados, pode-se inferir que o ethiprole possui ação genotóxica quando utilizado nas concentrações aqui estudadas.

Palavras-chave: Teste do micronúcleo, citotoxicidade e genotoxicidade

1. INTRODUÇÃO

É evidente o benefício que o uso de agrotóxico trouxe ao homem a partir do século XIX. Neste século, além do desenvolvimento da maquinaria agrícola e de fertilizantes, iniciou-se o emprego de pesticidas, como o DDT, um inseticida clorado. Com essas descobertas, foi possível distinguir a produtividade agrícola antes e depois da utilização dos primeiros defensivos (KNUTSON, 1999). Seus benefícios não se restringem ao meio agrícola, também são encontrados na indústria farmacêutica e em residências. No entanto, o uso destes pesticidas tem sido indiscriminado e trouxe consigo a necessidade de se estudar seus efeitos sobre os diferentes organismos a eles expostos (OLIVEIRA et al., 2012; MARCATO et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2015).

Inúmeros testes toxicológicos são utilizados para avaliar os efeitos adversos que os agrotóxicos produzem sobre os organismos. As plantas superiores são organismos adequados para estudos de toxicidade geral, devido à possibilidade de avaliar a indução de alterações genéticas como aberrações cromossômicas (AC) e formação de micronúcleos (MN) (FERETTI et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009; AUIB; FELZENSWALB, 2011). Dentre elas, a espécie *Allium cepa* (cebola) tem sido amplamente utilizada por conter células meristemáticas homogêneas com grandes e poucos cromossomos ($2n = 16$), bem visíveis e facilmente corados, permitindo uma melhor avaliação dos danos cromossômicos e/ou distúrbios na divisão celular (GRANT, 1982; FISKEJÖ, 1985; KURAS et al., 2006).

Os inseticidas podem ter diversos efeitos sobre os organismos. O fenilpirazol ethiprole é um inseticida de contato e ingestão de classificação toxicológica III (medianamente tóxico). Foi produzido para ser uma alternativa menos tóxica aos inseticidas que dominavam o meio agrícola, mas que hoje têm sido amplamente estudados e comprovadamente tóxicos aos organismos. É o caso do seu análogo fipronil, primeiro inseticida fenilpirazol introduzido para controle de pragas e considerado um dos inseticidas mais bem sucedidos a mais de uma década por ser altamente versátil, mas que hoje tem sido restrito ou banido em diversos países.

Este agente é antagonista competitivo do GABA (ácido gama-aminobutírico) de insetos. Age no bloqueio da passagem de íons de cloreto dos canais de glutamato-cloro (GluCl) impedindo a inibição sináptica. Isso causa uma hiperexcitação do sistema nervoso central e leva a morte do organismo (COLE et al., 1993). O ethiprole é comercializado como um inseticida foliar e de solo e para o uso do tratamento de sementes (LAMBERTH; DINGES, 2012).

No Brasil, o ethiprole é comumente utilizado em culturas de algodão, arroz e cana-de-açúcar (USEPA, 2011; DOU, 2012). O país, além de maior produtor da cultura de cana-de-açúcar, seguido por Índia e China, é também o maior produtor de açúcar e etanol de cana, responsável por mais de 50% do açúcar comercializado no mundo. A área cultivada com cana-de-açúcar que tem sido colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2014/15 é estimada em aproximadamente 9.004,5 mil hectares, distribuídas em todos estados produtores (CONAB, 2014). Tais dados sugerem a demanda de grande quantidade deste pesticida no auxílio de monoculturas como a de cana-de-açúcar. Contudo, seus efeitos não se restringem às espécies alvos. Como é aplicado através de pulverização, pode atingir outros organismos levado pelos ventos ou lixiviado pelas chuvas.

Segundo o fabricante, é necessária a cobertura imediata após aplicação do produto, ainda que não haja estudos sobre os subprodutos advindos da degradação do ethiprole. Porém, baseado na prévia orientação em bula e da capacidade já comprovada de seu análogo fipronil em gerar metabólitos que podem ser até 30 vezes mais tóxicos (RAVETON et al., 2007), faz-se necessária a investigação da influência da luz sobre a capacidade do ethiprole em causar ou não dano no material genético dos organismos expostos a ele.

Com isso, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos de diferentes concentrações do inseticida Curbix 200SC, produto comercial do ethiprole, em um organismo não alvo, sob a presença e a ausência de luz, por meio dos testes de aberrações cromossômicas e micronúcleo, utilizando *A. cepa* como organismo teste.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Composto testado

Foi utilizado o composto comercial Curbix 200SC, contendo como ingrediente ativo 200 g/L de ethiprole (5-amino-1-(2,6-dicloro- α,α,α -(trifluoro-p-tolil)-4-etilsulfinilpirazol-3-carbonitrila) (CAS 181587-01-9), Bayer CropScience Ltda.

2.2. Solução do tratamento

O inseticida foi diluído em água ultrapura e as concentrações estudadas foram baseadas na menor dose indicada do produto comercial para aplicação em cultivo de cana-de-

açúcar (T1 – 1µL/L), a metade da dose para simular diluição natural (T2 – 0,5 µL/L) e um quarto da dose recomendada para simulação da sua ação residual (T3 – 0,25 µL/L).

2.3. Material biológico

Os bioensaios foram conduzidos com sementes de cebola (*A. cepa*, Liliaceae), de mesmo lote (32443-S2) e variedade (Baia Periforme). As sementes foram estocadas no escuro a 6-10°C até serem utilizadas.

2.4. Bioensaio

Foram usadas 100 sementes de *A. cepa* em cada bioensaio, de acordo com o protocolo de Sax; Sax (1968) com adaptações, para avaliar os potenciais tóxico, citotóxico e genotóxico do produto. As sementes foram dispostas em placas de Petri com papel filtro em temperatura constante de 23°C por 96 horas. O controle positivo (CP) consistiu na exposição das sementes ao herbicida aneugênico Trifluralina® (CAS 1582-09-8) na concentração de 0.019 ppm (FERNANDES et al. 2007). O controle negativo (CN) consistiu na disposição das sementes para germinação em água ultrapura. Para investigação da fotodegradação do produto, foram realizados bioensaios com a presença de luz e sem a presença de luz, sendo estes compostos por placas envoltas em papel alumínio.

Para preparação das lâminas, pontas de raízes foram coletadas e fixadas em solução Carnoy (3:1, etanol: ácido acético glacial) por 6 horas, em seguida transferidas para um novo fixador e, então, mantidas em geladeira até serem usadas. Para análises citogenéticas, as raízes foram submetidas à reação de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978), que consiste na hidrólise ácida com HCl 1N à 60°C por 9 minutos, seguida de três banhos com água destilada por 5 minutos e posterior imersão do material no reagente de Schiff por duas horas.

Na montagem das lâminas, foi utilizado carmin acético 2% para coloração do citoplasma celular. As radículas foram levemente esmagadas entre lâminas e lamínulas, que posteriormente foram removidas com nitrogênio líquido e montadas com Permout para análise. Em cada lâmina foram analisadas 300 células, totalizando 4500 células por tratamento. As análises foram realizadas sob microscopia de luz.

A avaliação de toxicidade foi baseada no número de sementes germinadas pelo total de sementes utilizadas. A avaliação do potencial citotóxico foi baseada no índice mitótico (IM), calculado através da fórmula $IM = (\text{número de células em divisão} / \text{número total de$

células observadas) x 100. A genotoxicidade foi baseada no índice de aberrações cromossômicas (IAC), calculado pela fórmula $IAC = (\text{número de células com aberrações cromossômicas} / \text{número total de células observadas}) \times 100$. As células portadoras de micronúcleos e quebras cromossômicas foram contabilizadas como um *endpoint* de genotoxicidade e instabilidade cromossômica, porém se essas alterações não forem reparadas, podem resultar em mutação e, portanto, este parâmetro foi calculado como índice de mutagenicidade, sendo $IMT = (\text{número total de células com MN e quebras} / \text{número total de células observadas}) \times 100$.

Para investigação da fixação dos danos observados nas células meristemáticas, foram contabilizados os MN presentes nas células da região F1, seguindo a mesma metodologia.

Os resultados obtidos nas concentrações testadas foram comparados com o controle negativo através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e post hoc de Dunn com significância de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Comparando a média das frequências do índice germinativo, foi possível observar que os resultados obtidos nas concentrações testadas foram parecidos com o CN, independente da incidência de luz, não sendo, portanto, observada toxicidade do inseticida sobre as sementes dos grupos experimentais (tabela 1).

Tabela 1 – Frequência da toxicidade do Curbix 200SC em raízes de *A. cepa* expostas por 96 horas.

Tratamento	Claro	Escuro
CN	0,50±0,16	0,63±0,02
CP	x	0,47±0,07
T1	0,6±0,03	0,59±0,01
T2	0,6±0,04	0,63±0,06
T3	0,63±0,01	0,68±0,03

CN: controle negativo; CP: controle positivo; T1: concentração 1 µL/L de Curbix; T2: concentração de 0,5 µL/L; T3: concentração de 0,25 µL/L; x: teste não realizado devido ao produto fotodegradável.

Todas as concentrações de ethiprole demonstraram-se citotóxicas em cebolas que receberam incidência luminosa, com médias de IM entre 11,23 (T3) e 11,77 (T2), enquanto o CN apresentou IM com média de 9,30 (tabela 2).

Tabela 2 – Valores de média e desvio padrão dos índices mitótico, genotóxico e mutagênico em células meristemáticas de *A. cepa* expostas a Curbix 200SC por 96 horas.

Tratamento	Claro			Escuro		
	IM	IG	IMT	IM	IG	IMT
CN	9,30±4,18	0,07±0,13	0,12±0,22	10,8±4,07	0,28±0,26	0,37±0,48
CP	x	x	x	6,92±2,72*	2,19±2,10*	1,67±1,41*
T1	11,75±4,49*	0,39±0,39*	0,12±0,17	10,03±3	0,4±0,45	0,46±0,53
T2	11,77±2,58*	0,23±0,28	0,06±0,12	9,68±3,81	0,6±0,46*	0,25±0,29
T3	11,23±2,78*	0,26±0,28*	0,19±0,28	11,85±3,84	0,7±0,56*	0,34±0,5

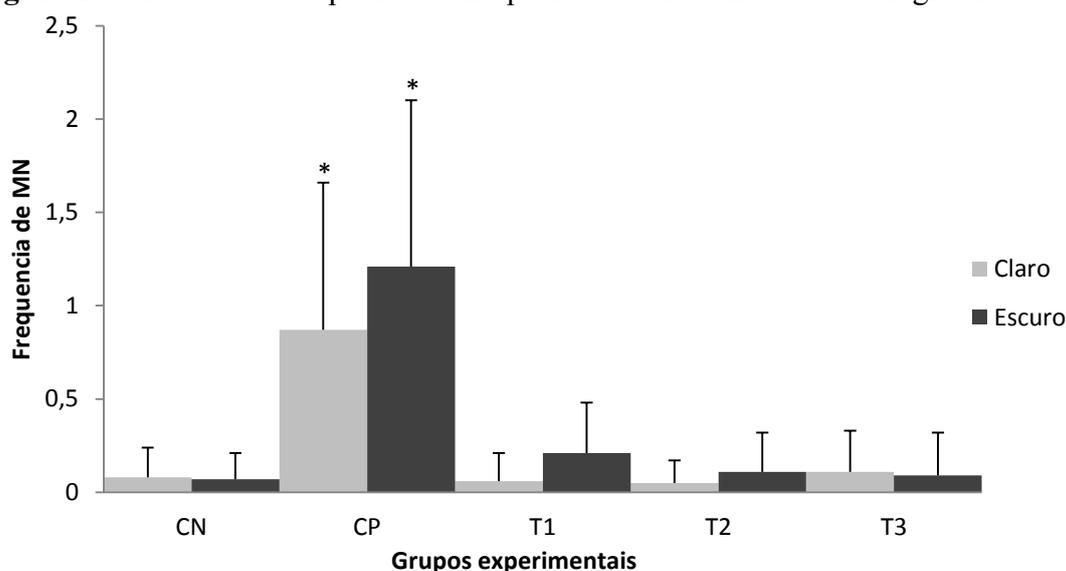
IM: índice mitótico; **IG:** índice de genotoxicidade; **IMT:** índice de mutagenicidade; **CN:** controle negativo; **CP:** controle positivo; **T1:** concentração de 1 µL/L de Curbix; **T2:** concentração de (0,5 µL/L); **T3:** concentração de 0,25 µL/L; x: teste não realizado devido ao produto fotodegradável.

* valores estatisticamente significativos, pelo método de Kruskal-Wallis e post hoc de Dunn, com $p < 0,05$, quando comparados ao controle negativo.

Todos os grupos expostos ao ethiprole apresentaram danos no DNA quando comparados com o controle negativo. As aberrações com maior incidência foram os brotos nucleares (BNs). O inseticida apresentou genotoxicidade na menor concentração (T3) de ambos os experimentos (claro e escuro). Com a presença de luz, o composto foi significativamente genotóxico no grupo com concentração indicada para utilização em campo (T1), o que não aconteceu com o mesmo na ausência de luz. Em contrapartida, quando os grupos T2 claro e T2 escuro foram comparados entre si, somente o grupo T2 escuro demonstrou resultados significativos de genotoxicidade (Tabela 2).

Nenhuma das concentrações de ethiprole testadas nos dois experimentos apresentou presença significativa de MN, tanto na região meristemática (Tabela 1) quanto nas células da região F1 em cebolas (figura 1). A ocorrência de MN foi semelhante ou menor que a observada no controle negativo.

Figura 1 – Média e desvio padrão da frequência de MN em células da região F1.



CN: controle negativo; **CP:** controle positivo; **T1:** [1 $\mu\text{L/L}$] de Curbix; **T2:** [0,5 $\mu\text{L/L}$]; **T3:** [0,25 $\mu\text{L/L}$] de Curbix.

* valores estatisticamente significativos, pelo método de Kruskal-Wallis e post hoc de Dunn, com $p < 0,05$, quando comparados ao controle negativo.

4. DISCUSSÃO

O inseticida ethiprole foi fabricado com o intuito de substituir antigos inseticidas tóxicos ao ambiente como o fipronil, análogo do qual foi criado. Ele tem sido cada vez mais utilizado em vários sistemas de monoculturas e, por isso, torna-se importante o conhecimento dos efeitos deste agente em organismos não alvos. O presente estudo almejou investigar os potenciais efeitos do ethiprole em *A. cepa*. Esta espécie tem sido considerada bastante favorável para avaliar os danos cromossômicos e os distúrbios no ciclo mitótico induzidos por agentes tóxicos (LEVAN, 1938). Por meio dos testes de aberrações cromossômicas e de micronúcleo, tem-se obtido bons resultados em estudos de efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de várias substâncias (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; RODRÍGUEZ et al., 2015).

A frequência da germinação das sementes foi utilizada para investigar a possível toxicidade do ethiprole. Os dados apontaram para uma não toxicidade do ethiprole em sementes de *A. cepa*, de modo que, nas concentrações testadas para o inseticida, os resultados de toxicidade não diferiram dos encontrados no controle negativo, para nenhum dos ensaios realizados. Em estudos do efeito tóxico do fipronil em cebolas foram observados resultados

parecidos a este estudo, demonstrando que o fipronil também não apresentou toxicidade a essa espécie nas concentrações de 1,25 g/L, 0,625 g/L, 0,312 g/L e 0,156 g/L (PEDRO, 2008).

A citotoxicidade é demonstrada por meio do IM. Este parâmetro estima a frequência de divisão celular e é usado para identificar a presença de substâncias tóxicas no ambiente (FISKESJÖ, 1985). Segundo Hoshina (2002), o nível de citotoxicidade de um agente pode ser determinado pela variação do IM. IMs superiores ao controle negativo são consequentes do aumento da divisão celular. Este evento pode ser prejudicial para as células, pois pode levar à proliferação descontrolada e, ainda, à formação de tumor. As análises realizadas com o inseticida ethiprole nas diversas concentrações testadas revelaram valores não significativos de morte celular, porém houve aumento significativo no IM das concentrações de ethiprole expostas à luz. Com isso, é possível inferir que o ethiprole apresenta citotoxicidade em cebolas quando, após aplicação, é mantido exposto à luz. Em contrapartida, Pedro (2008) afirmou que o fipronil não apresentou citotoxicidade para essa espécie.

Agentes químicos são capazes de induzir aberrações cromossômicas por diversos mecanismos, dentre eles as ações clastogênica e aneugênica. A ação clastogênica é caracterizada pela quebra de cromossomo durante a divisão celular e a ação aneugênica é a perda de um ou mais cromossomos através da inativação de uma estrutura citoplasmática promovida por um agente (FENECH, 2000).

Pela análise das células meristemáticas de *A. cepa*, submetidas à ação do inseticida ethiprole, pode-se perceber que houve indução de alterações cromossômicas, para as diversas concentrações testadas do inseticida. Anomalias como aderência, perda e ponte foram frequentemente observadas. Porém, os brotos nucleares (BNs) foram as aberrações com maior incidência. BNs são caracterizados por terem a mesma morfologia do MN com a exceção de estarem conectados ao núcleo. No entanto, segundo Lindbergh et al. (2007), eles possuem mecanismos de origens diferentes. Os BNs representam o processo de eliminação de DNA amplificado, os complexos de reparo de DNA e, possivelmente, o excesso de cromossomo de células aneuplóides (WANG et al., 2004; MANSILLA et al., 2009; DUTRA et al., 2010). Esta aberração ocorre transitoriamente após ruptura das pontes cromossômicas (FENECH et al., 2011) sendo, portanto, de origem aneugênica.

Pelos resultados comparativos, obtidos entre os testes realizados na ausência de luz e na presença de luz, observamos que o produto possui ação genotóxica em ambos os casos. Resultados divergentes foram encontrados na avaliação da genotoxicidade do fipronil em *A. cepa*. O produto teve uma ação genotóxica maior na presença da luz, reforçando hipóteses da

possível ação de seus metabólitos advindos da fotodegradação, dando maior periculosidade a este inseticida (PEDRO, 2008).

Neste estudo, a presença de MN tanto nas células meristemáticas quanto nas células da região F1 não foi significativa. Como a presença de MN em células do meristema tem servido como um indicativo de mutagenicidade, a análise das células F1 é importante ferramenta de avaliação de permanência de dano e, portanto, de efeito mutagênico. Desta forma podemos inferir que o inseticida ethiprole tem ação no material genético, acarretando aberrações cromossômicas, porém, como esses danos não foram fixados nas células da próxima geração, assim, pode-se inferir que este inseticida não é mutagênico para *A. cepa*. Pedro (2008) investigou o potencial do fipronil em causar instabilidade cromossômica em células meristemáticas dessa espécie; os resultados foram mais significativos para as concentrações mais baixas e para os testes realizados na presença de luz; a autora salienta que, isso acontece devido a fotodegradação do inseticida, produzindo subprodutos mais genotóxicos que o próprio fipronil (PEDRO, 2008).

5. CONCLUSÕES

Neste estudo foi investigada a influência da luz sobre a ação do inseticida ethiprole em um organismo não alvo. Os resultados obtidos demonstraram que o IM apresentou dados diferentes quando foram comparados os bioensaios com presença e ausência de luz. No entanto, os parâmetros toxicidade e genotoxicidade agiram independentemente da influência luminosa. Com isso, podemos inferir que o composto testado pode apresentar potencial citotóxico quando estiver exposto a luz.

Os resultados demonstraram que o ethiprole apresentou efeito genotóxico nas três concentrações aqui estudadas, independente da influência da luz e efeito citotóxico apenas nos bioensaios com presença de luz. Quando comparado com o seu análogo fipronil, demonstrou semelhança quanto à ausência de toxicidade. No entanto, diferente do fipronil, não se mostrou capaz de induzir quantidade de MN significativa em nenhuma das concentrações testadas. Isso demonstra que, mesmo que o ethiprole tenha causado danos no DNA e interferido no ciclo celular de *A. cepa*, este é mais seguro que o fipronil, pois não apresenta capacidade de causar danos fixáveis às próximas gerações.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo suporte financeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIUB, C. A. F.; FELZENSWALB, I. O uso de *Allium cepa* como modelo experimental para investigar genotoxicidade de substâncias usadas em conservantes alimentares. **Revista Genética na Escola**, v. 6, n. 1, p. 12-15, 2011.

COLE, L.M.; NICHOLSON, R.A.; CASIDA, J.E. Action of phenyl-pyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 46, p. 47, 1993.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2014 - Companhia Nacional de Abastecimento – Brasília, 29p, 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_12_19_09_02_49_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_2014-15.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2015.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Assessment of the Genotoxicity of Two Agricultural Residues After Processing by Diplopods Using the *Allium cepa* Assay. **Water, Air and Soil Pollution** (Dordrecht. Online), v. 224, p. 1523, 2013.

DOU - DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO 13/12/91. Portaria nº 3, de 16 de janeiro de 1992. Adequação da "Relação de monografias dos ingredientes ativos de agrotóxicos, domissanitários e preservantes de madeira" – nº 240, p. 202, de 13 de dezembro de 2012.

DUTRA, A.; PAK, E.; WINCOVITCH, S.; JOHN, K.; POIRIER, M. C.; OLIVERO, O. A. Nuclear bud formation: a novel manifestation of Zidovudine genotoxicity. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 128, p. 105–110, 2010.

FENECH, M.; The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLE, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, Y. H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125–132, 2011.

- FERETTI, D.; ZERBINI, I.; ZANI, C.; CERETTI, E.; MORETTI, M.; MONARCA, S. *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. **Food Additives & Contaminants**, v. 24, n. 6, p. 561-572, 2007.
- 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**, v. 88, p. 252–259, 2007.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99–112, 1985.
- HOSHINA, M.M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro, município de Rio Claro, pertencente à Bacia do Rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa***. 2002. 52f. Monografia. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.
- KNUTSON, R. D. Economic impacts of reduced pesticide use in the United States: Measurement of costs and benefits. **Agricultural and Food Policy Center**. AFPC, v. 99 - 2, 21p, 1999.
- KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWIŃSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K.; Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* Test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, p.211–221, 2006.
- LAMBERTH, C.; DINGES, J. Bioactive Heterocyclic Compound Classes. **Pharmaceuticals and Agrochemicals**, v. 2, p. 156-233, 2012.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A.; *Allium cepa* Test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mut. Res.**, v. 682, p. 71-81, 2009.
- LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, n. 4 p. 471-486, 1938.
- LINDBERG, H. K.; WANG, X.; JÄRVENTAUUS, H.; FALCK, G. C.; NORPPA, H.; FENECH, M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 617, p. 33–45, 2007.
- MANSILLA, S.; BATALLER, M.; PORTUGAL, J. A nuclear budding mechanism in transiently arrested cells generates drug-sensitive and drug-resistant cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 123–132, 2009.

- MARCATO, A. C. C.; YABUKI, A. T.; FONTANETTI, C. S. Nickel exposure promotes osmoregulatory disturbances in *Oreochromis niloticus* gills: histopathological and energy dispersive spectrometry analysis. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 21, p. 13095-13102, 2014.
- MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Revista Ciência e Cultura**, v. 30, p. 665–676, 1978.
- OLIVEIRA, R. P.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MATHIAS, M. I. C. Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, p. 569-573, 2012.
- PEDRO, J. **Avaliação dos efeitos citotóxicos e mutagênico do inseticida Fipronil (Regente), usando sistema teste de *Allium cepa***. 2008. 117f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.
- 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.
- RODRÍGUEZ, Y. A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; FERREIRA, R. A. C.; FONTANETTI, C. S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere (Oxford)**, v. 120, p. 438-442, 2015.
- SAX, K.; SAX, W. J. Possible mutagenic hazards of some food additives, beverages and insecticides. **The Japanese Journal of Genetics**, v. 43, p. 89-94, 1968.
- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. PesticideFactSheet: Ethiprole: New Chemical; Import Tolerances Established. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, 2011.
- WANG, X.; THOMAS, P.; XUE, J.; FENECH, M. Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro-evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21. **Mutation Research**, v. 551, p. 167–180, 2004

**Uso de *Oreochromis niloticus* na detecção dos potenciais genotóxico do inseticida
Curbix 200SC (ethiprole)**

Thays de Andrade Guedes¹; Ana Claudia Marcato¹; Cintya Aparecida Christofollet²; Jorge Evangelista Correia¹; Yadira Ansoar Rodríguez¹; Carmem Silvia Fontanetti^{1*}

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, nº1515, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

² Fundação Hermínio Ometto (UNIARARAS), Av. Dr. João Maximiliano Baruto, 500, Jardim Universitário, CEP 13607-339, Araras, SP, Brasil.

*Autora para correspondência: Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264135.

E-mail: fontanet@rc.unesp.br

RESUMO

O ethiprole é um inseticida neurotóxico que tem sido visado como composto substituinte de antigos químicos perigosos ao meio ambiente. É encontrado nos campos agrícolas, em monoculturas como cana-de-açúcar, algodão e arroz como um inseticida foliar e de solo e para o uso do tratamento de sementes. No entanto, assim como outros pesticidas, é possível que seu uso gere resíduos que contaminam o meio, podendo alcançar o ambiente aquático. Com isso, são necessários testes que avaliem seus potenciais efeitos e, ainda, organismos que sejam sensíveis à presença de possíveis contaminantes. O teste do micronúcleo e o ensaio do cometa foram aplicados em eritrócitos de peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, para avaliação dos efeitos do ethiprole em diferentes concentrações. Foram utilizadas três concentrações do produto: concentração de campo (1 µL/L), sua metade (0,5 µL/L) e um quarto (0,25 µL/L). O inseticida demonstrou-se genotóxico para *O. niloticus* na concentração de 0,25 µL/L. Com isso, foi possível observar a ação residual do produto nos organismos aquáticos.

Palavras-chave: fenilpirazol, teste do micronúcleo, ação residual, ensaio do cometa

1. INTRODUÇÃO

Fontes difusas de poluição, especialmente a agricultura, tem sido objeto de atenção em muitos países devido a grande demanda de produção desses químicos e a dificuldade de se estabelecer procedimentos de avaliação de impactos ambientais. Os sistemas aquáticos naturais são abertos e dinâmicos e por isso sofrem modificações contínuas na sua composição. Como agravante, as atividades agrícolas são grandes geradoras de resíduos de inúmeros compostos sintéticos que contaminam rios, lagos, nascentes e oceanos podendo ser retidos nos organismos e provocar efeitos deletérios quando níveis elevados são atingidos. Por esta razão, é necessário que se utilize técnicas que avaliem os potenciais danos desses agentes xenobiontes, tendo como indicadores biológicos organismos que sejam sensíveis a presença de possíveis estressores.

Dentre os vertebrados, os peixes são considerados organismos modelo para o monitoramento da genotoxicidade aquática e da qualidade das águas residuais, devido sua capacidade de metabolizar xenobióticos e acumular poluentes (GRISOLIA; CORDEIRO, 2000). A espécie *Oreochromis niloticus* (Cichlidae), conhecida como tilápia do Nilo, constitui um excelente sistema-teste para ensaios laboratoriais, sendo, frequentemente, utilizada para a investigação da toxicidade de poluentes de ecossistemas aquáticos. Os eritrócitos desses teleósteos são nucleados e servem de ferramenta para a detecção de substâncias elastogênicas e aneugênicas na água.

O teste do micronúcleo associado a anormalidades nucleares é conhecido como um método de rápida, eficiente e fácil condução. Estudos mostram que ele tem sido importante ferramenta para a avaliação de diversas substâncias (MATSUMOTO et al., 2006; FONTANETTI et al., 2012; FUZINATTO et al., 2013). Outra ferramenta utilizada para investigação dos efeitos dos xenobiontes a nível celular é o ensaio cometa, referido como método capaz de detecção de pequenas alterações na estrutura do DNA induzidas por diversos agentes (CHRISTOFOLETTI et al., 2009; SOUZA; FONTANETTI, 2012).

Os representantes fenilpirazóis mais conhecidos e utilizados no meio agrícola são o fipronil e o ethiprole. No entanto, muitos estudos demonstram a toxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e teratogenicidade que o fipronil tem apresentado em diferentes organismos não alvos (CHATON, 2002; STEHR et al., 2006; BICHON et al., 2008; GHISI et al., 2011; LORENÇO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012a, 2012b) e, ainda, a capacidade dos produtos gerados de sua metabolização em induzir danos no DNA podendo apresentar uma maior toxicidade que o próprio inseticida (TINGLE et al., 2003; RAVETON et al., 2007;

OLIVEIRA et al., 2012a). Diante disso, o ethiprole tem sido visado como uma alternativa menos tóxica ao seu análogo.

O ethiprole (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-trifluorometil]fenil]-4-[(etil)-sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila) é um inseticida largamente utilizado nos campos agrícolas em monoculturas como cana-de-açúcar, algodão e arroz. Ele é considerado um inseticida neurotóxico e sináptico de junções glutanéricas (COLE et al., 1993), ou seja, age no sistema nervoso central e nas junções neuromusculares a fim de hiperexcitá-los e eliminar espécies como pulgões, gafanhotos, bicho mineiro, percevejos, cupins e outros insetos praga (LAMBERTH; DINGES, 2012). Este composto pode chegar ao ambiente aquático pelo seu tempo de permanência no solo, contaminando o lençol freático ou através do lixiviamento pelas chuvas, por meio de plantios indevidos próximos a corpos d'água.

Diante do exposto acima, o presente estudo teve como objetivo detectar os potenciais genotóxico do ethiprole, utilizando o composto comercial Curbix 200SC, por meio dos testes de micronúcleo e ensaio do cometa aplicados em sangue periférico da espécie *O. niloticus*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Composto testado

Foi avaliado neste estudo o composto comercial Curbix 200SC, contendo como ingrediente ativo 20% de ethiprole (5-amino-1-(2,6-dicloro- α,α,α -(trifluoro-*p*-tolil)-4-etilsulfinilpirazol-3-carbonitrila) (CAS 181587-01-9), Bayer CropScience Ltda, de lote 32443-S2.

2.2. Material biológico

Neste estudo, foram utilizados como organismos teste 50 indivíduos da espécie *O. niloticus* (Perciformes: Cichlidae), conhecido popularmente como tilápia do Nilo, com tamanho médio de 10 cm para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimes, oriundos de piscicultura, foram trazidos ao Departamento de Biologia, UNESP – campus de Rio Claro, onde foram aclimatados por um período de 15 dias em tanque com sistemas de aeração e filtragem, a temperatura média de 23°C.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animal da UNESP, Rio Claro, SP (CEUA-IB- UNESP), sob protocolo nº 2001/2013.

2.3. Bioensaios

Após o período de aclimação, os peixes foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais, cada grupo com cinco indivíduos. Cada grupo foi mantido em aquário com capacidade de 40 litros cada, previamente aerado por 48 horas. Para o CN foi utilizada água de poço artesiano. Já para o CP, foi injetada intraperitonealmente a substância ciclofosfamida na concentração de 20 mg/Kg (KRISHNA; HAYASHI, 2000). Os peixes também foram colocados em aquário com água de poço artesiano. Nos demais tratamentos, o Curbix 200SC foi diluído em três concentrações - dose indicada do produto comercial para aplicação em cultivo de cana-de-açúcar (1µL/L; T1), a metade da dose para simular diluição natural (0,5 µL/L; T2) e um quarto da dose recomendada para simulação da sua ação residual (0,25 µL/L; T3).

O experimento foi realizado em repetição para maior clareza dos resultados.

2.4. Teste do micronúcleo (MN) associado a anormalidades nucleares (AN)

Para confecção das lâminas foi retirado aproximadamente 0,3 cm³ de sangue, de cada peixe vivo, por meio de punção cardíaca, utilizando seringas heparinizadas. Após a punção, a agulha foi limpa com papel absorvente, a fim de se evitar a contaminação do sangue com líquido corporal e/ou muco. A primeira gota foi descartada, também para evitar a contaminação do sangue, sendo utilizadas as gotas posteriores para a confecção das lâminas, por meio da técnica de esfregaço sanguíneo. Três extensões sanguíneas, pela técnica de esfregaço sanguíneo, foram realizadas para cada indivíduo. O material foi fixado em etanol absoluto por 10 minutos e seco à temperatura ambiente. Após a fixação, as lâminas foram submetidas à reação de Feulgen, com uma hidrólise ácida de 11 minutos, a 60°C em banho-maria (MELLO; VIDAL, 1978). Foram observadas 3000 células por tratamento para a determinação da frequência de células micronucleadas. Na classificação de micronúcleos, alguns critérios foram adotados segundo Huber et al. (1983): micronúcleo e o núcleo principal dentro do mesmo citoplasma; boa preservação e coloração do citoplasma e do núcleo; o diâmetro máximo do micronúcleo não deve ultrapassar a metade do núcleo; ausência de conexão entre núcleo e micronúcleo; manutenção da esfericidade do núcleo e micronúcleo.

Considerou-se também a presença de anormalidades nucleares, de acordo com a classificação de Carrasco et al. (1990), juntamente com a observação de brotos nucleares (broken eggs):

- “blebbed nuclei”, que corresponde a uma evaginação relativamente pequena do envoltório nuclear, o qual aparenta conter eucromatina ou, algumas vezes, heterocromatina;
- “lobed nuclei”, correspondendo a núcleos com evaginações maiores, mas sem a mesma delimitação. Alterações morfológicas do núcleo foram incluídas nesta categoria, por exemplo, aumento da superfície nuclear, formando múltiplos lóbulos, caracterizando um núcleo disforme;
- “notched nuclei”, descrito como uma invaginação da membrana. Ainda de acordo com este autor, núcleos “notched” parecem não conter material nuclear no local invaginado.
- “broken eggs” podem estar unidos ao núcleo da célula principal por uma estrutura nucleoplasmática;

Tais anormalidades foram conjuntamente consideradas para a análise estatística.

2.5. Ensaio do cometa

Para o ensaio do cometa, foi utilizada a técnica alcalina baseada em Christofolletti et al. (2009). Inicialmente, as lâminas foram mergulhadas em agarose normal (ponto de fusão normal) 1,5% à 60°C, e então, secas e armazenadas. Após a punção cardíaca, com seringas devidamente heparinizadas, uma amostra de 5 µL do sangue dos peixes foi diluída em 1.000 µL de PBS (tampão fosfato-salino). As lâminas pré-gelatinizadas foram montadas com 10 µL da suspensão celular + 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) à 37°C. Posteriormente, foi adicionada uma lamínula sobre cada lâmina, levando-as à geladeira, por 20 minutos, para solidificação do gel. Decorrido este tempo, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram mantidas em solução de lise gelada e recém-preparada (1 mL de triton X-100, 20 mL de sulfóxido de dimetilo - DMSO e 79 mL de solução de lise estoque: NaCl 2,5M, ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA 100mM, Tris 10mM, pH 10,0-10,5), em geladeira, por no mínimo uma hora, protegidas da luz.

A solução de lise possui propriedades detergentes e contém altas concentrações de sais, que promovem a desintegração das membranas celulares. Após a lise, as lâminas foram

transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese contendo tampão alcalino (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH~13) à 4°C. A cuba foi disposta em um banho de gelo e a corrida de eletroforese foi realizada com voltagem constante (39V) e amperagem de 280-300 mA, por 20 minutos. Durante o tratamento alcalino, ocorreu o relaxamento e a desespiralização dos sítios de rompimento da molécula de DNA. As lâminas foram, então, neutralizadas com tampão (Tris-HCl 0,4M, pH 7,5) em três lavagens de 5 minutos cada, para a remoção de sais e detergentes, secas a temperatura ambiente e fixadas em etanol 100%, por 10 minutos, para precipitar o DNA e secar a agarose. Toda a metodologia acima foi realizada na ausência de luz. As lâminas foram acondicionadas à temperatura ambiente para a secagem e estocadas a seguir, para posterior análise.

Foram observados 100 cometas por lâmina, utilizando como base a migração dos fragmentos de DNA do núcleo. Os cometas obtidos foram classificados em quatro classes: classe 0 (sem dano), classe 1 (pouco dano – nucleóides apresentando um tamanho de cauda inferior ao diâmetro da cabeça), classe 2 (dano médio – nucleóides apresentando um tamanho de cauda equivalente a uma ou duas vezes o tamanho do diâmetro da cabeça) e classe 3 (dano intenso – nucleóides apresentando o tamanho da cauda superior a duas vezes o diâmetro da cabeça). Os dados foram apresentados como frequência de células com dano, a distribuição de classes e o escore de dano, calculado como a soma do número de células em cada classe e o total da classe multiplicado pelo valor da mesma (0-3). Logo, os escores podem variar de zero (todas as células sem dano - 0x100) a 300 (todas as células com dano máximo 3x100), segundo Rigonato et al. (2005).

A normalidade dos dados de ambos os testes foi testada pelo teste Shapiro Wilk e a significância entre os grupos foi obtida das seguintes formas: a. dados com distribuição normal foram analisados por meio do teste paramétrico Anova e post hoc de Tukey com significância de $p < 0,05$; b. dados com distribuição anormal foram analisados por meio do não-paramétrico de Kruskal-Wallis e post hoc de Dunn, com $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

As frequências de MN e de AN observadas nos eritrócitos de tilápias do Nilo expostas ao ethiprole e aos controles negativo e positivo estão dispostas na tabela 1. Não foi observada a indução de formação de MN nos grupos testados.

Tabela 1. Valores de média e desvio padrão de micronúcleos e anormalidades nucleares, realizados em repetição, observados em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos a Curbix 200SC, por 96 horas.

Exp. 1	MN	AN	Exp. 2	MN	AN
CN	0,25±0,5	40,5±15,08	CN	0±0	48,25±55,53
CP	1±0,81 ^a	116,25±77,44	CP	2±1,41 ^a	153,25±29,23 ^b
T1	0,75±1,5	101,75±41,93	T1	0±0	90±57,17
T2	0	83,5±20,72	T2	0,5±1	80±27,04
T3	0	137,25±38,13 ^b	T3	0,25±0,5	138±24,04 ^b

MN: micronúcleo; **AN:** anormalidades nucleares; **CN:** controle negativo; **CP:** controle positivo; **T1:** [1 µL/L] de Curbix; **T2:** [0,5 µL/L]; **T3:** [0,25 µL/L] de Curbix.

^a valores estatisticamente significativos, pelo método de Kruskal-Wallis e post hoc de Dunn, com $p < 0,05$, comparados ao controle negativo.

^b valores estatisticamente significativos, pelo método ANOVA e post hoc de Tukey, com $p < 0,05$, comparados ao controle negativo.

As frequências de anormalidades nucleares observadas demonstraram maior incidência de alterações morfológicas nucleares nos eritrócitos de todos os grupos expostos ao ethiprole quando comparadas com o controle negativo (tabela 1, 2 e 3); no entanto, apenas o grupo T3, contendo a menor concentração testada, apresentou frequência de AN estatisticamente significativa. Dentre as AN observadas, “lobed” foi a anormalidade encontrada com maior frequência. Ela se caracteriza por núcleos com grandes evaginações, pouco delimitados, com aumento da superfície nuclear, formando múltiplos lóbulos, caracterizando um núcleo disforme (CARRASCO et al., 1990).

Tabela 2: Média e desvio padrão de nucleóides com cometa e escore de danos em *O. niloticus* expostos às diferentes doses de Curbix 200SC, por 96 horas (Experimento 1).

Tratamento	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore
CN	21,5±6,75	32,5±11	36,25±1,5	15,75±11,35	152,25±25,61
CP	10,25±1,70	13,25±2,98*	27,25±8,18*	50,75±11,41*	220±15,49*
100%	21,5±12,15	26,75±10,68	44±11,34	11,25±6,18	151±25,88
50%	6,75±3,30*	30±5,09	46±8,60	17,75±8,01	172,25±14,93
25%	8,25±2,50	33±2,16	40,5±1,91	22,75±3,40	182,25±9,74

CN: controle negativo; **CP:** controle positivo; **T1:** [1 µL/L] de Curbix; **T2:** [0,5 µL/L]; **T3:** [0,25 µL/L] de Curbix.

* valores estatisticamente significativos, pelo método ANOVA e post hoc de Tukey, com $p < 0,05$, comparados ao controle negativo.

O ensaio do cometa detectou pequenos danos no DNA. Os escores resultantes deste teste demonstraram que o inseticida causou danos, no entanto, não apresentaram valores estatisticamente significativos. Assim como na análise de AN, o grupo com menor concentração (T3) apresentou maior incidência de fragmentação do material genético. Além disso, foi possível notar que houve um aumento de dano em quase todas as classes de todas as concentrações, principalmente da classe 2 (Tabela 2). No entanto, esse evento não foi estatisticamente significativo.

Da mesma maneira, foi observada maior ocorrência de dano nos eritrócitos dos animais expostos ao produto do segundo experimento (Tabela 3) na maioria das concentrações, em especial dano de classe 2 – dano médio.

Tabela 3: Média e desvio padrão de nucleóides com cometa e escore de danos em *O. niloticus* expostos às diferentes doses de Curbix 200SC, por 96 horas (Experimento 2).

Tratamento	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore
CN	35,25±5,90	55,5±8,88	11,75±6,02	2,5±1,73	86,5±17,40
CP	10,5±9,57*	30,5±3,10*	29,75±3,20*	31,75±8,26*	185,25±30,31*
100%	20,5±3,87	55±5,35	27,25±5,56*	0,5±0,57	111±9,38
50%	31,25±8,80	46,25±5,56	26,5±5,32*	1,75±3,5	104,5±21,29
25%	22,25±4,57	49,25±8,65	29,75±2,5*	3,75±3,09	120±7,07

CN: controle negativo; **CP:** controle positivo; **T1:** [1 µL/L] de Curbix; **T2:** [0,5 µL/L]; **T3:** [0,25 µL/L] de Curbix.

* valores estatisticamente significativos, pelo método ANOVA e post hoc de Tukey, com $p < 0,05$, comparados ao controle negativo.

Foi realizado um teste com alta dose de ethiprole em tilápias a fim de simular o uso indiscriminado do inseticida. A dose utilizada foi de 10 µL/L de Curbix. Após 96 horas, foi constatada ação neurotóxica do produto por meio do comportamento dos organismos expostos como alteração no equilíbrio, perda de resposta de fuga, encurtamento do eixo longitudinal do corpo e espasmo muscular.

4. DISCUSSÃO

O fipronil é um fenilpirazol altamente versátil e muito bem conhecido no meio agrícola e veterinário, por isso, seus efeitos sobre os organismos em geral foram largamente estudados e demonstraram que este inseticida é extremamente danoso a diversos organismos não alvos. A partir de sua fórmula estrutural foi produzido o ethiprole. Segundo Tingle (2003), este inseticida é basicamente tão eficiente quanto o fipronil, porém menos tóxico; contudo, poucos estudos que investiguem sua ação em organismos não alvos são encontrados na literatura.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo investigar os potenciais efeitos do ethiprole em peixes da espécie *O. niloticus*. Esta espécie é comumente encontrada em estuários de todo o mundo, sendo reconhecida pela sua sensibilidade em responder, rapidamente, às alterações ambientais. Por isso, constitui excelente sistema-teste para ensaios laboratoriais para a investigação da toxicidade de poluentes de ecossistemas aquáticos (VIJAYAN et al., 1996; ALVES-COSTA, 2001).

O experimento foi realizado em repetição para evitar qualquer dúvida quanto à resposta do organismo-teste. Em ambos os ensaios, todas as concentrações testadas apresentaram pouca incidência de MN, demonstrando frequência semelhante ao controle negativo.

Em análise das anormalidades nucleares encontradas nas tilápias expostas ao ethiprole, foi possível observar que as maiores frequências de dano no material genético ocorreram nos grupos T1 e T3. Além disso, foram observados valores estatisticamente significativos apenas no grupo T3. Com isso é possível inferir que o ethiprole é genotóxico para *O. niloticus* na concentração de 0,25 µL/L. Nesse mesmo contexto, Ghisi et al. (2011) investigaram a genotoxicidade do fipronil em peixes da espécie *Rhamdia quelen*, onde observaram que o inseticida foi capaz de causar danos no DNA por meio de concentrações menores que as aqui testadas, sendo elas 0,10 e 0,23 µg/L. Já em camundongos da espécie *Mus musculus*, Oliveira et al. (2012a) detectaram efeitos genotóxicos do fipronil na concentração de 50 mg/kg.

As observações comportamentais dos animais expostos às altas doses de ethiprole revelou a neurotoxicidade do inseticida para vertebrados. Estudos equivalentes investigando o potencial neurotóxico do fipronil em peixes foram feitos por meio de diferentes concentrações do produto. Ao estudar seus efeitos em *Danio rerio*, Stehr et al. (2006) observaram respostas similares como perda de resposta de fuga, encurtamento do eixo longitudinal do corpo e degeneração da notocorda dos embriões expostos em 0,33 mg/L do produto. Já em peixes da espécie *Pimephales promelas*, foi relatada natação prejudicada dos organismos expostos a 0,14 mg/L de fipronil (BEGGEL et al., 2010).

É possível extrapolar o perigo do composto estudado ao ser humano, já que a menor dose investigada apresentou genotoxicidade e a superdosagem demonstrou neurotoxicidade no organismo testado. Grande parte das adversidades causadas por agrotóxicos como o ethiprole e o fipronil é causada pelo manuseio e aplicação do produto sem equipamentos adequados (LONDRES, 2011). Dessa forma, não se tem controle da concentração que o indivíduo é exposto, podendo alcançar altas doses.

Por outro lado, é muito comum que, devido à contaminação do lençol freático ou lixiviamento pela chuva em plantios realizados em locais próximos a corpos d'água, químicos como o ethiprole possam alcançar esses ambientes em doses muito menores que as utilizadas em campo causando, assim, efeitos deletérios ao DNA como observadas neste estudo.

5. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que o Curbix 200SC apresenta influência negativa sobre o organismo testado. A repetição do experimento nos deu maior segurança para afirmar que este inseticida pode ser considerado genotóxico em peixes da espécie *O. niloticus* numa concentração de 0,25 µL/L. Assim como foi demonstrada a genotoxicidade do fipronil em diferentes bioindicadores animais, o ethiprole apresentou genotoxicidade em tilápias do Nilo. Além disso, foi possível observar neotoxicidade do produto em vertebrados quando administradas altas doses. No entanto, novos estudos com outros organismos são necessários para maior clareza de seus efeitos sobre os organismos não alvos.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo suporte financeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-COSTA, J. R. M. Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus*. 2001. 125f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

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**, v. 1201, p. 91–99, 2008.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MAYERS, M. S. Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Ottawa, v.47, p.2123-2136, 1990.

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.

- COLE, L.M.; NICHOLSON, R.A.; CASIDA, J.E. Action of phenyl-pyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 46, p. 47, 1993.
- CHRISTOFOLETTI, C. A.; DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C. S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 1, p. 155-158, 2009.
- FONTANETTI, C. S.; PEREZ, D. G.; NOGAROL, L. R.; SOUZA, R. B.; BOZZATTO, V. Biomonitoring of substrates containing sewage sludge: Assessment of the feasibility in using the *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda) as Bioindicador. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 7, p. 49-54, 2012.
- FUZINATTO, C. F.; FLOHR, L.; MELEGARI, S. P.; MATIAS, W. G. Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 103-109, 2013.
- GHISI, N.C.; RAMSDORF, W.A.; VINÍCIUS, M.; FERRARO, M.; ALMEIDA, M. I. M.; RIBEIRO, C. A. O.; CESTARI, M. M. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, p. 589-599, 2011.
- GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, no. 1, p. 235-239, 2000.
- HUBER, R.; STRENT, S.; BAUCHINGER, M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. **Mutation Research**, Amsterdam, v.111, p.185-193, 1983.
- KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v. 455, p. 155-166, 2000.
- LAMBERTH, C.; DINGES, J. Bioactive Heterocyclic Compound Classes. **Pharmaceuticals and Agrochemicals**, v. 2, p. 156-233, 2012.
- LOURENÇO, C.T.; CARVALHO, S.M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R.C.F. Oral Toxicity of Fipronil Insecticide Against the Stingless Bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, p. 921-924, 2012.
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay

using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion roottips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. A reação de Feulgen. **Revista Ciência e Cultura**, v. 30, p. 665–676, 1978.

OLIVEIRA, R. P.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MATHIAS, M. I. C. Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, p. 569-573, 2012a.

OLIVEIRA, R. P.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MATHIAS, M. I. C. Cytotoxicity of Fipronil on Mice Liver Cells. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 28-35, 2012b.

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.

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M. S.; JORDÃO, B. Q. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.3, p.464-468, 2005.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. DNA damage of erythrocytes of *Oreochromis niloticus*, after acute exposure to river water receiving effluent from an oil refinery. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology-JBSE**, v. 7, p. 17-22, 2012.

STEHR, C. M.; LIMBO, 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, p. 270-278, 2006.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology and Human Health Concerns. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 176, p. 1-66, 2003.

VIJAYAN, M.; MORGAN, J.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E.; IWAMA, G. Food-deprivation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 2467-2475, 1996.

6. CONCLUSÕES FINAIS

A partir dos seguintes resultados obtidos, foi concluído que:

- Através da germinação das sementes de *A. cepa*, foi possível observar que o inseticida não apresentou toxicidade. Por meio do índice mitótico em células de *A. cepa*, apenas os grupos expostos à luz apresentaram citotoxicidade. O inseticida apresentou genotoxicidade em quase todas as concentrações testadas, sendo elas T1 e T3 (claro) e T2 e T3 (escuro). Nas análises de incidência de MN em células de cebola da geração F1, as concentrações testadas do inseticida não foram capazes de provocar aumento no número de micronúcleos nas células F1, assim como foi observado nas células meristemáticas, evidenciando que o agrotóxico avaliado não é mutagênico para células de cebola.
- Em eritrócitos de tilápias, foi observada ação genotóxica do produto na menor concentração (T3). Todas as concentrações testadas apresentaram pouca incidência de MN, demonstrando frequência semelhante ao controle negativo.
- A incidência de luz provocou pouca influência na ação do ethiprole, ao contrário de outros achados com fipronil.
- Diante dos dados encontrados na literatura realizados com o fipronil, o ethiprole se mostrou menos tóxico. Porém são necessários mais estudos para uma comparação efetiva.
- Foi observada toxicidade do produto em dose residual nos organismos testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, Md. K.; HABIBULLAH-AL-MAMUN, Md.; HOSSAIN, M. A.; ARIF, M.; PARVIN, E.; AKTER, M. S.; KHAN, M. S.; ISLAM, Md. M. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline cometa ssay and micronucleus test. **Chemosphere**, v. 84, p. 143–149, 2011.

AL-SABTI, K. Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio L.*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 85C, p.5-9, 1986.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 343, p. 121-135, 1995.

ARKHIPCHUK, V. V.; GARANKO, N. N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 62, p. 42–52, 2005.

ARTHUR, F.H. Efficacy of Ethiprole applied alone and in combination with conventional insecticides for protection of stored wheat and stored corn. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, p. 1314-1418, 2002.

AU, W. W.; RIBEIRO, L. R. Estratégias para a condução de estudos em monitoramento genotóxico de populações humanas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.) **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, 356p.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of fish micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 467, p. 177-186, 2000.

BARŠIENE, J.; LOVEJOY, D. B. Environmental genotoxicity in Klaipeda port area. **International Review of Hydrobiology**, Berlin, v. 85, p. 663–672, 2000.

BIJLEVELD VAN LEXMOND, M.; BONMATIN, J. M.; GOULSON, D.; NOOME, D. A. Worldwide integrated assessment on systemic pesticides – Global collapse of the entomofauna: exploring the role of systemic insecticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 1-4, 2015.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 543, p. 251-272, 2003.

BOLOGNESI, C; FENECH, M. Mussel micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 7, p. 1125-1137, 2012.

BONMATIN, J-M.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MARZARO, M.; MITCHELL, E. A. D.; NOOME, D. A.; SIMON-DELISO, N.; TAPPARO, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p 35-67, 2015.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, p. 245-254, 2005.

CABONI, P.; SAMMELSON, R. E.; CASIDA, J. E. Phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABAergic action: ethiprole compared with fipronil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7055–7061, 2003.

CAMPANA, M. A.; PANZERI, A. M.; MORENO, V. J.; DULOUT, F. N. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **General Molecular Biology**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 99-103. 2003.

CARRASCO, K. R., TILBURY, K. L., MAYERS, M. S. Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Ottawa, v.47, p.2123-2136, 1990.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silverstained nucleolar regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 538, p. 81-91, 2003.

ÇAVAS, T. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1431–1435, 2011.

COLE, L.M.; NICHOLSON, R.A.; CASIDA, J.E. Action of phenyl-pyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 46, p. 47, 1993.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249–261, 2004.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Assessment of the Genotoxicity of Two Agricultural Residues After Processing by Diplopods Using the *Allium cepa* Assay. **Water, Air and Soil Pollution** (Dordrecht. Online), v. 224, p. 1523, 2013.

DERÍSIO, J. C. **Introdução ao controle de poluição ambiental**. São Paulo: CETESB, 1992.

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; ÇELİK, A.; KÖLEİL, N.; AYMAK, C. Evaluation of river water Genotoxicity using the piscine micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, p. 421–429, 2007.

FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S.; BOEDECKER, R. H.; MANN, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 566, p. 209–229, 2004.

FENECH, M. The advantage and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v. 392, p. 11-18, 1997.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLES, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 125-32, 2011.

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**, v. 88, p. 252–259, 2007.

FISKEJO, G. The *Allium* test as standard environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

FRENZILLI, G.; FALLENI, A.; SCARCELLI, V.; DEL BARGA, I.; PELLEGRINI, S.; SAVARINO, G.; MARIOTTI, V.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; REGOLI, F.; NIGRO, M. Cellular responses in the cyprinid *Leuciscus cephalus* from a contaminated freshwater ecosystem. **Aquatic Toxicology**, v. 89, p. 188–196, 2008.

FUZINATTO, C. F.; FLOHR, L.; MELEGARI, S. P.; MATIAS, W. G. Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 103-109, 2013.

GHISI, N. C.; RAMSDORF, W. A.; VINÍCIUS, M.; FERRARO, M.; ALMEIDA, M. I. M.; RIBEIRO, C. A. O.; CESTARI, M. M. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, p. 589-599, 2011.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**, v. 99, p. 273–291, 1982.

GRANT, W. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 310, n. 2, p. 175-85, 1994.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, no. 1, p. 235-239, 2000.

GRISOLIA, C. K., OLIVEIRA, A. B. B., BONFIM, H.; KLAUTAU-GUIMARÃES, N. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal waste-water treatment plant. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, p. 334-338, 2005.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y. F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, v. 399, n. 2, p. 125-133, 1998.

HOLT, M. S. Sources of Chemical Contaminants and Routes into the Freshwater Environment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 21-27, 2000.

- HOOFTMAN, R. N.; DE RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pigmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 104, p. 147–152, 1982.
- HUBER, R.; STRENT, S.; BAUCHINGER, M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. **Mutation Research**, Amsterdam, v.111, p.185-193, 1983.
- KASUBA, V.; ROZGAJ R., MILIC, M.; ZELJEZIC, D.; KOPJAR, N.; PIZENT, A.; KLJAKOVIC-GASPIC, Z.; JAZBEC, A. Evaluation of genotoxic effects of lead in potteryglaze workers using micronucleus assay, alkaline comet assay and DNA diffusion assay. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 85, p. 807–818, 2012.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504, p. 137-148, 2002.
- KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v. 455, p. 155-166, 2000.
- KURÁS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; GULEWICZ, K.. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Chemosphere**, Oxford. v. 107, p. 211-221, 2006.
- LAKRA, W. S.; NAGPURE, N. S. Genotoxicological studies in fishes: a review. **Indian Journal of Animal Science**, v. 79,p. 93–98, 2009.
- LAMBERTH, C.; DINGES, J. Bioactive Heterocyclic Compound Classes. **Pharmaceuticals and Agrochemicals**, v. 2, p. 156-233, 2012.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A.; *Allium cepa* Test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mut. Res.**, v.682, p.71-81, 2009.
- LEMOS, N. G.; DIAS, A. L.; SILVA-SOUZA, A. T.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 19, p. 197-201, 2005.
- LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, n. 4 p. 471-486, 1938.
- LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 190 p, 2011.
- MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MC CONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MARÔCO, J. **Análise Estatística com o SPSS Statistics**. ReportNumber. 6.^a ed., 2014, 990 p.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion roottips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. A reação de Feulgen. **Revista Ciência e Cultura**, v. 30, p. 665-676, 1978.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v. 399, p. 135-147, 1998.

NICHOLS, W.W. Significance of various type chromosome aberrations for man. **Environmental Health Perspectives**, v.6, p. 1769-183, 1973.

PERES, F.; ROZEMBERG, B.; LUCCA, S. R. Percepção de riscos no trabalho rural em uma região agrícola do estado do Rio de Janeiro, Brasil: agrotóxicos, saúde e ambiente. **Caderno da Saúde Pública**, v.21, n.6, p. 1836-1844, 2005.

PFUHLER, S.; FELLOWS, M.; VAN BENTHEM, J.; CORVI, R.; CURREN, R.; DEARFIELD, K.; FOWLER, P.; FRÖTSCHL, R.; ELHAJOUJI, A.; LE HÉGARAT, L.; KASAMATSU, T.; KOJIMA, H.; OUÉDRAOGO, G.; SCOTT, A.; SPEIT, G. In vitro genotoxicity test approaches with better predictivity: summary of an IWGT workshop. **Mutation Research**, v. 723, p. 101-107, 2011.

PISA, L. W.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J-M.; DOWNS, C. A.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; MCFIELD, M.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; SETTELE, J.; SIMON-DELSON, N.; STARK, J. D.; VAN DER SLUIJS, J. P.; VAN DYCK, H.; WIEMERS, M. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 68-102, 2015.

RANK, J.; LOPEZ, L.C.; NIELSEN, M. H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP, in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, v. 136, p. 13-18, 2002.

RAP-AL URUGUAY: Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina, Uruguay. El MGAP prohíbe un hormiguicida peligroso y lo sustituye con dos hormiguicidas peligrosos, 9 de Julio, 2004. Disponível em:
http://webs.chasque.net/~rapaluy1/Comunicados/Comunicado_Mirex.htm

RASHED, M. N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environment International**, v. 27, n. 1, p. 27-33, 2001.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p.173-200.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003, 356p.

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M. S.; JORDÃO, B. Q. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.3, p.464-468, 2005.

RODRÍGUEZ, Y. A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; FERREIRA, R. A. C.; FONTANETTI, C. S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere (Oxford)**, v. 120, p. 438-442, 2015.

RUSSEL, P. J. Chromosomal mutation. In: CUMMINGS, B. (Org.), **Genetics**. San Francisco: Pearson Education Inc, 2002, p. 595-621.

SAX, K.; SAX, W. J. Possible mutagenic hazards of some food additives, beverages and insecticides. **The Japanese Journal of Genetics**, v. 43, p. 89-94, 1968.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. DNA damage of erythrocytes of *Oreochromis niloticus*, after acute exposure to river water receiving effluent from an oil refinery. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology-JBSE**, v. 7, p. 17-22, 2012.

STA, C.; LEDOIGT, G.; FERJANI, E.; GOUPIL, P. Exposure of *Vicia faba* to sulcotrione pesticide induced genotoxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 9-14, 2012.

SIMON-DELISO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J-M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C. H.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A. D.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; VAN DER SLUIJS, J. P.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 5-34, 2015.

SWIERENGA, S. H. H; HEDDLE, J. A.; SIGAL, E. A.; GILMAN, J. P. W.; BRILLINGER, R. L.; DOUGLAS, G. R.; NESTMANN, E. R. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories. IV. Chromosome aberrations and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 246, p. 301-322, 1991.

TICE, R. R. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoresis technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D. H.; VENITT, S. (Ed.). **Environmental mutagenesis**. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers, 1995, p. 315-339.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Pesticide Fact Sheet: Ethiprole: New Chemical; Import Tolerances Established, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, 2011.

VAN DER SLUIJS, J. P.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BIJLEVELD VAN LEXMOND, M. F. I. J.; BONMATIN, J-M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C. A.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A. D.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; SIMON-DELISO, N.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 148-154, 2015.

VENTURA-CAMARGO, B. C.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 42-51, 2008.

VIJAYAN, M.; MORGAN, J.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E.; IWAMA, G. Food-deprivation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 2467-2475, 1996.

YI, H.; WU, L.; JIANG, L. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 383, p. 232-236, 2007.