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

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS FITOTÓXICOS E
CITOGENOTÓXICOS DO ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFÓS, POR MEIO
DE ENSAIOS IN VIVO E IN VITRO**

MARIANA SANTOS COSTA

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

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS FITOTÓXICOS E
CITOGENOTÓXICOS DO ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFÓS, POR MEIO
DE ENSAIOS IN VIVO E IN VITRO**

MARIANA SANTOS COSTA

Orientadora: Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN-MORALES

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

**Rio Claro – SP
2021**

C837c Costa, Mariana Santos
Caracterização e avaliação dos aspectos fitotóxicos e citogenotóxicos do organofosforado clorpirifós, por meio de ensaios in vivo e in vitro / Mariana Santos Costa. -- Rio Claro, 2022
119 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Maria Aparecida Marin-Morales

1. Toxicidade. 2. Inseticida. 3. Allium cepa. 4. Lactuca sativa. 5. Citotoxicidade. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

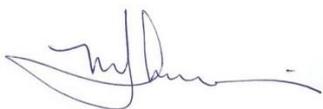
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS FITOTÓXICOS E CITOGENOTÓXICOS DO ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFÓS, POR MEIO DE ENSAIOS IN VIVO E IN VITRO

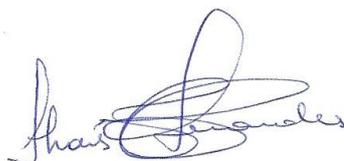
AUTORA: MARIANA SANTOS COSTA

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

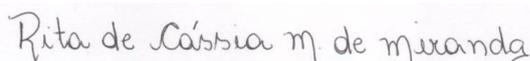
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES (Participação Virtual)



Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp -- Instituto de Biociências de Rio Claro
Profa. Dra. THAÍS CRISTINA CASIMIRO FERNANDES (Participação Virtual)



Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA MENDONÇA DE MIRANDA
(Participação Virtual) Campus Rensacença / Universidade CEUMA

Rio Claro, 04 de novembro de 2021

Não te ordenei que sejas forte e corajoso? Não tenhas medo, não te acovardes, pois o Senhor, teu Deus, estará contigo por onde quer que vás (Josué 1:9)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades e por sempre me dar forças e jamais ter me deixado desistir.

A meu pai Oberdan e minha mãe Selma por terem me proporcionado a melhor educação que poderiam dar e sempre me apoiarem em meus sonhos, sem medir esforços para a realização deles. O apoio de vocês foi fundamental em todo o processo.

A minha irmã, Luíza, que sempre me deu palavras de apoio principalmente quando eu sentia muita saudade de casa, me trazendo alegria e incentivo para seguir com minhas atividades. E as minhas tias e padrinhos, por todo o suporte que me deram.

Ao meu cachorro, Farofa, que se manteve sempre como minha companhia e trouxe felicidade a todos os meus dias, ajudando com que o desânimo não me atingisse mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradeço à professora Marin pela orientação e amizade durante a realização do trabalho. Por sempre tirar todas as dúvidas com muita paciência, sempre escutar e ajudar na resolução dos problemas com um olhar positivo, e pelos ótimos momentos compartilhados durante esses anos.

Expresso imensa gratidão à professora Rita, que foi minha orientadora durante a iniciação científica e no meu trabalho de conclusão de curso da faculdade, por ter sido o *link* entre mim e a professora Marin. Gratidão por sempre estar presente na minha vida, e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus amigos Queren, Rômulo, Léo e Ábia, que desde a graduação tem me dado apoio para seguir o mestrado, e por me ajudarem em discussões quando tive dúvidas também. Agradeço muito aos queridos Eduardo, Ásley e Karina, por todas as conversas e por me incentivarem sempre, por lerem meus trabalhos e tentarem entender quando eu apresentava para eles, e por sempre se colocarem em prontidão para ajudar.

Profunda gratidão aos mutagênicos Lais, Nádia, Dri, Kemelyn, Giovana, Gigeck, Lê Rocha, Jaque, e os demais integrantes do grupo, por toda ajuda e

aprendizado dentro do laboratório e durante as reuniões científicas realizadas. Em especial as meninas que entraram comigo no programa, a Maria, a Rosa, Ana Cris e Paulinha, por me ajudarem durante os experimentos, pelas risadas e pela amizade formada. Agradeço também a minha *rommmate* Camila, por todas as conversas científicas em casa, pela ajuda nos ensaios de apresentações e por todos os momentos divertidos.

Imensa gratidão a Jaque Bianchi, que escreveu comigo o artigo de revisão, que compõe essa dissertação, por ter acrescentado informações e enriquecido o trabalho.

A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus Rio Claro, o Instituto de Biociências e ao Laboratório de Mutagênese Ambiental por permitirem a realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Á todos que de alguma maneira contribuíram e que compartilharam momentos ao longo desses anos.

RESUMO

Os agrotóxicos são usados no Brasil como a principal estratégia para combater e/ou prevenir pragas agrícolas. O crescente uso desses químicos tornou o país um dos líderes mundiais no consumo dessa substância. O uso contínuo e irregular dos agrotóxicos pode gerar efeitos adversos tanto aos ecossistemas como uma ameaça à saúde pública. Dentre os agrotóxicos disponíveis para utilização, se destacam os pertencentes a classe dos organofosforados, considerados um dos principais responsáveis por intoxicações e óbitos por agrotóxicos registrados no Brasil. O organofosforado clorpirifós, que é muito utilizado no Brasil, exerce sua ação tóxica pela inibição da enzima acetilcolinesterase, o que resulta em excesso de acetilcolina nas sinapses colinérgicas, promovendo sinais e efeitos diversos. Tendo em vista o potencial que esse químico tem em causar alterações citogenotóxicas e mutagênicas, esse trabalho objetivou avaliar diferentes concentrações de clorpirifós, para investigar o seu potencial citogenotóxico e mutagênico, por testes com bioindicadores vegetais e com células de hepatoma humano (C3A). Os bioindicadores vegetais utilizados neste estudo foram *Lactuca sativa*, para avaliação do potencial fitotóxico (ensaios de germinação e de inibição do crescimento de radícula e hipocótilo), *Allium cepa*, para as avaliação dos potenciais tóxico e cito genotóxico (ensaios de germinação, de índice mitótico e de aberrações cromossômicas - AC) e investigação do potencial mutagênico (ensaio do micronúcleo – MN, em células F1). Para os ensaios com organismos vegetais, foram testadas seis concentrações do inseticida Clorpirifós: C1: 10 mg mL⁻¹ (concentração de uso na agricultura), C2: concentração de 5 mg mL⁻¹; C3: concentração de 2,5 mg mL⁻¹; C4: concentração de 1,25 mg mL⁻¹; C5: concentração de 0,625 mg mL⁻¹; C6: concentração de 0,3125 mg mL⁻¹. Os resultados com *Allium cepa* mostraram potencial fitotóxico para C1, C2 e C3. Já os ensaios de avaliação dos potenciais genotóxico e mutagênico, que foram avaliados apenas com C3, C4, C5 e C6, mostraram resultados estatisticamente diferentes do controle negativo para C3, C4, C5. Os ensaios com células HepG2 foram primeiramente realizados com as concentrações acima citadas (C1 a C6), mas, como todas as concentrações foram citotóxicas, pelo ensaio do MTT, houve a necessidade de diminuir as concentrações (C7: 0,15625 mg mL⁻¹; C8: 0,078 mg mL⁻¹; C9:

0,039 mg mL⁻¹ e C10: 0,019 mg mL⁻¹). Essas concentrações foram então utilizadas tanto no teste de citotoxicidade do MTT como nos demais ensaios colorimétricos (do Azul de Tripán e Resazurina). O teste do MTT mostrou que, somente C9 e C10 não foram citotóxicas. Quanto aos ensaios de resazurina, todas as concentrações foram citotóxicas. Pelo ensaio do azul de tripan, somente a concentração C7 foi tóxica. Adicionalmente aos ensaios realizados com os bioindicadores, foi feita uma ampla revisão bibliográfica em bases de dados científicas disponíveis, sobre o potencial poluidor dos organofosforados, o uso do inseticida clorpirifós na agricultura brasileira e os bioensaios mais utilizados e indicados para a avaliação da toxicidade desse grupo. Os dados desta pesquisa realizada na literatura científica foram compilados em um artigo de revisão, que também faz parte do conteúdo dessa dissertação.

Palavras chave: Toxicidade, Inseticida, *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, Citotoxicidade, C3A.

ABSTRACT

Pesticides are used in Brazil as the main strategy to combat and/or prevent agricultural pests. The growing chemical mineral use has made the country one of the global leaders in the consumption of this substance. The continuous and irregular use of pesticides can generate adverse effects on ecosystems as well as a threat to public health. Among the pesticides available for use, those belonging to the class of organophosphates stand out, considered one of the main causes of poisoning and deaths caused by pesticides registered in Brazil. The organophosphate chlorpyrifos, which is widely used in Brazil, exerts its toxic action by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase, which results in excess acetylcholine in cholinergic synapses, promoting different signs and effects. Considering the potential that this chemical has to cause cytogenotoxic and mutagenic changes, this work aimed to evaluate different options of chlorpyrifos, to investigate its cytogenotoxic and mutagenic potential, by testicles with plant bioindicators and with human hepatoma cells (C3A). The plant bioindicators used in this study were *Lactuca sativa*, for evaluation of phytotoxic potential (germination tests and inhibition of radicle and hypocotyl growth), *Allium cepa*, for the needs of toxic and cytogenotoxic potentials (germination tests, mitotic index and of chromosomal aberrations - AC) and investigation of the mutagenic potential (micronucleus assay - MN, in F1 cells). For tests with plant organisms, six requirements of the insecticide Chlorpyrifos were tested: C1: 1 mg mL⁻¹ (concentration of use in agriculture), C2: concentration of 5 mg mL⁻¹; C3: 2,5 mg mL⁻¹ concentration; C4: 1,25 mg mL⁻¹ concentration; C5: 0,625 mg mL⁻¹, concentration C6: concentration of 0,3125 mg mL⁻¹. The results with *Allium cepa* excellent phytotoxic potential for C1, C2 and C3. As for the assays for evaluating genotoxic and mutagenic potentials, which were evaluated only with C3, C4, C5 and C6, results were statistically different from the negative control for C3, C4, C5. Assays with HepG2 cells were first performed with the concentrations mentioned above (C1 to C6), but, as all concentrations were cytotoxic, by the MTT assay, it was necessary to decrease the concentrations (C7: 0.15625 mg mL⁻¹; C8: 0.078 mg mL⁻¹; C9: 0.039 mg mL⁻¹ and C10: 0.019 mg mL⁻¹). These concentrations were then used both in the MTT cytotoxicity test and in the other colorimetric assays (Trypan Blue and Resazurin). The MTT test showed that only C9 and C10 were not cytotoxic. As for for the resazurin assays, all concentrations were

for the resazurin assays, all concentrations were cytotoxic and according to the trypan blue assay, only the C7 concentration was toxic. In addition to the tests carried out with the bioindicators, an extensive literature review was carried out in available scientific databases, on the polluting potential of organophosphates, the use of the insecticide chlorpyrifos in Brazilian agriculture and the most used and indicated bioassays for the assessment of the toxicity of this group de The data from this research carried out in the scientific literature were compiled in a review article, which is also part of the content of this dissertation.

Keywords: Toxicity, Inseticide, *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, Cytotoxicity, C3A.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Fórmula estrutural do agrotóxico clorpirifós | 27 |
| ARTIGO 1 | |
| Figura 1. Gráfico do consumo de agotóxicoss e afins entre os anos 200-2017..... | 42 |
| Figura 2. Gráfico do registro anual de agrotóxicos no Brasil entre os anos 2000-220..... | 42 |
| Figura 3. Classificação dos agrotóxicos utilizado para fins de registro e reavaliação segundo a ANVISA | 43 |
| Figura 4. Estrutura geral dos OFs | 48 |
| Figua 5. Fórmula estrutural do agrotóxico clorpirifós | 49 |
| ARTIGO 2 | |
| Figura 1. Resultado do ensaio de germinação de <i>Allium cepa</i> | 73 |
| Figura 2. Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> em intérfase (seta) e prófase (cabeça de seta) com presença de brotos e micronúcleos | 75 |
| Figura 3. Células de F1 de <i>Allium cepa</i> apresentando micronúcleos. | 76 |
| Figura 4. Resultado do ensaio de germinação em <i>L. sativa</i> | 77 |
| Figura 5. Resultado do teste de alongamento radicular e do hipocótilo realizadas com o bioindicador <i>L. sativa</i> | 78 |
| ARTIGO 3 | |
| Figura 1. Resultado do teste do MTT | 95 |
| Figura 2. Resultado do teste do MTT realizado com baixas concentrações..... | 96 |
| Figura 3. Resultado do teste de resazurina | 97 |
| Figura 4. Resultado do ensaio do azul de tripan..... | 98 |

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Índice mitótico de células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> | 74 |
| Tabela 2- Frequência de aberrações cromossômicas obtidas em células de meristema de radícula de <i>A. cepa</i> | 74 |
| Tabela 3- Frequência de MNs na região F1 de raízes de <i>A. cepa</i> | 76 |
| Tabela 4- Frequência de MNs nas regiões meristemáticas e F1 de células de <i>Allium cepa</i> | 77 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL - Microlitros

ABRASCO- Associação Brasileira de Saúde Coletiva

ACs - Aberrações cromossômicas

Al_2O_3 - Óxido de Alumínio

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP - Adenosina tri fosfato

CCK-8 - *Cell Counting Kit - 8*

Cd - Cádmio

CN - Controle Negativo

CO_2 - Dióxido de carbono

COM - Centros organizadores de microtúbulos

CP - Controle Positivo

Cr - Cromo

Cu- Cobre

DDT - Dicloroo-Difenil-Tricloroetano

DL50-Dose letal 50

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EC - Concentrado Emulsionável

EPIs - Equipamentos de Proteção Individual

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

HCL – Ácido clorídrico

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IM – Índice mitótico

IPI- Imposto de Produtos Industrializados

LDH - Lactato Desidrogenase

MEM - Meio Mínimo Essencial Eagle

mg - Microgramas

mL - Mililitros

MNs - Micronúcleos

NIH - National Institute of Environmental Health

OC - Organoclorados

OF - Orfanofosforados

OMS - Organização Mundial da Saúde

ONU - Organização das Nações Unidas

OPAS - Organização Pan Americana de Saúde

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

pH - Potencial Hidrogeniônico

Ppm- Partes por milhão

SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação

UNEP - Nações Unidas para o Meio Ambiente

USEPA - U.S. Environmental Protection Agency

WHO - World Health Organization

ZnSO₄·7H₂O - Sulfato de zinco heptahidratado

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| 1. Introdução | 17 |
| 2. Objetivos | 21 |
| 3. Revisão de literatura | 22 |
| 4. Materiais e métodos | 31 |
| 4.1 Químico testado | 31 |
| 4.2 Sistemas-testes e tratamentos | 31 |
| 4.2.1 Bioensaios com bioindicadores vegetais..... | 31 |
| 4.2.2 Teste de germinação com <i>Lactuca sativa</i> e com <i>Allium cepa</i> | 31 |
| 4.2.3 Ensaio de citogenotoxicidade e mutagenicidade em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> | 32 |
| 4.2.4 Ensaio do micronúcleo em células F1 de <i>Allium cepa</i> | 33 |
| 4.2.5 Bioensaios com cultura de células (Linhagem HepG2/C3A)..... | 33 |
| 4.2.5 Teste do MTT | 33 |
| 4.2.6 Teste da Resazurina | 34 |
| 4.2.7 Ensaio do Azul de tripan | 35 |
| 5. Resultados | 36 |
| 5.1 Artigo 1..... | 37 |
| 5.2 Artigo 2..... | 65 |
| 5.3 Artigo 3..... | 89 |
| 6. Conclusões gerais..... | 111 |
| 7. Referências | 114 |

1. INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos na agricultura foi, inicialmente, relacionado à busca de soluções que atendessem as necessidades crescentes de alimentos da população. Assim, os agrotóxicos foram introduzidos na agricultura com a finalidade de combater pragas e, conseqüentemente, aumentar a produção agrícola (GOMES, 2014). Porém, o uso exagerado e indiscriminado desses químicos os tornaram uma das principais fontes de poluição ambiental, principalmente dos solos e dos corpos de água superficiais. Esses compostos são ainda responsáveis por intoxicações, não só dos trabalhadores rurais, que se expõem diretamente a eles, mas também da população em geral, que se expõe de maneira indireta, pela ingestão de resíduos contidos nos alimentos e por contaminação ambiental ou acidental (SILVA et al., 2006).

Adicionalmente aos problemas ambientais causados pelo próprio uso de agrotóxico, há também uma preocupação quanto à poluição gerada pelas indústrias de agrotóxicos, cujos efluentes contém compostos tóxicos que podem persistir no ambiente, mesmo após passarem por processos de tratamento. Ainda deve-se considerar nesse contexto os perigos relacionados à forma com esses produtos são descartadas no ambiente (LEÃO et al., 2018).

Os agrotóxicos possuem uma ampla variação de classificação toxicológica: 1. as que classificam um agente quanto a sua potencialidade tóxica (improváveis de causar dano agudo, pouco tóxico, moderadamente, altamente e extremamente tóxico) (ANVISA, 2019); 2. de acordo com o organismo alvo de sua ação (inseticida, herbicida, fungicida, dentre outros); 3. pelo grupo químico que estão inseridos (organoclorados, organofosforados, carbonatos, neonicotinóides, dentre outros (Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS).

De acordo com Vasconcelo (2018), o Brasil apresenta um consumo médio de cerca de 540 mil toneladas de agrotóxicos em suas culturas. Esse valor vem aumentando sistematicamente nos últimos anos, o que coloca o país como um dos principais consumidores de agrotóxicos do mundo e que mais registra novos agrotóxicos. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento afirma que, em 2021 (dados compilados até o mês de julho/21), foram registrados 126 novos

agrotóxicos, o que é preocupante, quando somados aos 226 novos químicos registrados no ano de 2020.

Uma das classes de agrotóxicos mais utilizadas na agricultura é a dos organofosforados. Esses compostos começaram a ser amplamente usados em substituição aos agrotóxicos organoclorados, que foram proibidos/banidos devido à sua persistência extensa no ambiente (LIU et al., 2001). Os organofosforados são ésteres e tio ésteres de ácido fosfórico e tiofosfórico, de característica lipofílica e muito volátil, que apresentam ação neurotóxica, (ANWAR et al., 2009). Dentro dessa classe, destaca-se o inseticida clorpirifós, que é amplamente usado para o controle de pragas de culturas economicamente importantes, como a soja (MORI, 2006).

A espécie *Lactuca sativa* é considerada um ótimo organismo modelo para avaliação de riscos de contaminação ambiental. Essa espécie é muito utilizada em testes macrocópicos, como os de germinação de sementes e alongamento da raiz e hipocótilo. Os ensaios de alongamento de raiz, realizados com esse bioindicador, são eficientes para avaliar a fitotoxicidade de um composto ou de amostras ambientais. Além da alta sensibilidade da espécie para avaliar ecotoxicidade, os testes com *L. sativa* apresentam ainda outras vantagens de aplicação, como rapidez na obtenção das respostas, facilidade de execução e baixo custo (SOBRERO; RONCO, 2004).

A espécie *A. cepa* é um bioindicador muito utilizado para avaliar danos celulares e genéticos promovidos por agentes tóxicos, como substâncias orgânicas e inorgânicas e amostras ambientais. Esse sistema teste é muito eficiente e, portanto muito utilizado para avaliar alterações no ciclo celular e danos cromossômicos, por possuírem cromossomos grandes e de tamanho reduzido, parâmetros esses muito importantes para a certificação de efeitos citogenotóxicos e mutagênicos. (LONGHIN, 2008; FISKESJO, 1985; SILVA et al., 2003). A avaliação do potencial genotóxico com *A. cepa* é feita pelos ensaios de aberrações cromossômicas e do micronúcleo (MN) em células de meristemas radiculares. Já o ensaio do MN com células F1, é considerado um excelente indicador de mutagenicidade (ÇAVAŞ; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005)

Ensaio *in vitro*, realizados com linhagens celulares mantidas em cultura, constituem uma importante ferramenta de investigação básica aplicada à toxicologia (LEWINSKA et al., 2007). Assim, os ensaios colorimétricos realizados com linhagens celulares são muito aplicados em avaliações do potencial citotóxico de substâncias químicas e de amostras ambientais (NEPOMUCENO et al., 2020). Existe uma variedade de técnicas descritas na literatura que utilizam linhagens celulares para avaliar efeitos citotóxicos de diferentes agentes químicos, se destacando nessas análises os ensaios do Azul de tripan, do MTT, e do ensaio de Resazurina (KROLL ET AL., 2009).

O teste do MTT se baseia na conversão de um corante amarelo, solúvel em água (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), em um sal roxo insolúvel em água, chamado formazan. Esse teste é usado para a avaliação de alteração da atividade mitocondrial (PENG et al., 2005).

A reação no ensaio de resazurina se baseia na redução de resazurina em resofurina. Nessa conversão, há uma alteração da cor azul da resazurina para rosa (resofurina), que acontece pela ação de enzimas mitocondriais e citoplasmáticas. Assim, com esse teste é possível avaliar a atividade da mitocôndria e de enzimas citoplasmáticas da classe das redutase ou diaforase (MENDES et al., 2019).

No ensaio do azul de tripan, é possível avaliar se um determinado agente tóxico causou danos às membranas celulares. Neste ensaio, as células mortas apresentam-se de cor azul (cor do corante), o que indica a perda da ação seletiva da membrana, enquanto que as células vivas permanecem incolores. Neste teste, o número de células vivas indica a porcentagem de células viáveis, do total de células contadas (KIM et al., 2011).

Considerando a necessidade constante de se avaliar o potencial ecotoxicológico e o comprometimento que os agrotóxicos disponíveis para uso agrícola possam causar à saúde humana, foi realizada uma ampla revisão dos dados descrito na literatura científica sobre o organofosforado clorpirifós. Essa busca de informações sobre o agrotóxico deu suporte a elaboração de um artigo de revisão sobre o assunto e a melhor fundamentação teórica para a discussão dos resultados obtidos nos ensaios de toxicidade, fitotoxicidade, citogenotoxicidade e

mutagenicidade, realizados com os bioindicadores *L. sativa* e *A. cepa* e com a linhagem celular HepG2/C3A (derivada de hepatocarcinoma humano).

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo investigar o potencial fitotóxico, citogenotóxico e mutagênico do inseticida clorpirifós. Os ensaios foram desenvolvidos com diferentes sistemas testes, *in vitro* e *in vivo*, e realizados com diferentes concentrações do agrotóxico.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial fitotóxico do inseticida clorpirifós, por meio de teste de germinação e de inibição do desenvolvimento do hipocótilo e da radícula de plântulas de *Lactuca sativa*;
- Avaliar o potencial citotóxico do inseticida clorpirifós, por meio do teste de índice mitótico de células meristemáticas de *A. cepa*;
- Avaliar o potencial genotóxico do inseticida clorpirifós, por meio do teste de aberrações cromossômicas realizados com células meristemáticas de *A. cepa*;
- Avaliar o potencial mutagênico do inseticida clorpirifós, por meio do teste do micronúcleo realizados com células meristemáticas de *A. cepa*;
- Avaliar o potencial citotóxico do inseticida clorpirifós, por meio dos testes do MTT, Resazurina e Azul de Tripán, realizados com linhagem de hepatoma humano (células HepG2/C3A).

3. REVISÃO DE LITERATURA

O ramo da ciência que estuda a composição química e os efeitos das substâncias sobre os organismos vivos, bem como o diagnóstico e o tratamento das intoxicações e envenenamentos, é denominado de toxicologia (National Institute of Environmental Health Science – NIH, 2018). Quando esse estudo é aplicado para identificar e monitorar os impactos de agentes químicos sobre o ambiente, é então chamado de ecotoxicologia, termo sugerido pelo toxicologista René Truhaut (TRUHAUT, 1977).

A ecotoxicologia é a área da toxicologia que estuda os efeitos de substância naturais ou sintéticas sobre diversos níveis de organização biológica (celular, individual populacional, da comunidade e ecossistema). Nos estudos ecotoxicológicos se incluem as avaliações de sensibilidade dos diferentes organismos vivos (CHAPMAN, 2002) e os possíveis impactos de agentes tóxicos sobre a saúde e ao bem-estar humano (YU, 2005; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006; MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

Ao longo dos anos, pôde-se observar que o contato do homem com substâncias químicas pode gerar efeitos adversos à sua saúde, que vão desde alergias até envenenamentos e morte. Entre as muitas substâncias tóxicas que atingem o ambiente e conseqüentemente o meio biológico, destacam-se os compostos usados na agricultura para eliminar ou impedir a ação de patógenos, que possam diminuir a produção agrícola. Esses compostos, recebem diferentes denominações, entre elas agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas, remédios ou venenos para planta. (FUNDACENTRO, 1998).

A legislação brasileira tratava, até 1989, esse grupo de produtos químicos como defensivos agrícolas, termo este atribuído pela conotação de uma ação protetiva às culturas e, conseqüentemente, à produção agrícola, conferida por esses compostos. A partir da promulgação da Lei Federal no 7.802, de 11 de julho de 1989 (atualmente regulamentada pelo Decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002), esses compostos químicos passaram a ser nominados de agrotóxicos. Essa substituição do termo foi fundamentada na própria descrição conceitual do termo, que já evidenciava que esses compostos tinham ação tóxica sobre plantas e animais, não

sendo então conveniente o uso do termo “defensivos agrícolas”, pois este mascarava essa ação tóxica ampla do produto (Informativo CRQ III, 1997).

Os agrotóxicos tiveram seu uso implementado por novas políticas agrícolas, que foram adotadas a partir da década de 70. O uso intensivo desses químicos impulsionou a sua produção e utilização crescentes, sempre justificada pela necessidade do aumento da produção agrícola. Contudo, esse uso abusivo também levou a sérios danos à saúde humana e ao meio ambiente (PELAEZ ET AL., 2010).

A exposição humana a agrotóxicos está associada a grandes riscos de intoxicação, pelo fato desses compostos serem potencialmente tóxicos. Esses químicos podem ainda desencadear efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, além de terem ação imunodepressora ou serem cancerígenos. A contaminação humana é ainda maior no caso dos trabalhadores agrícolas, devido ao contato intenso e contínuo a esses químicos (RAMOS et al., 2020).

Agrotóxicos são substâncias químicas, ou mistura de substâncias, usadas para prevenir ou controlar danos em plantas ou animais causados por espécies pragas, tanto da agricultura como da pecuária (FAO, 2003). A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) classifica esses químicos de acordo com o organismo alvo de sua ação (inseticida, herbicida, fungicida, dentre outros), do grupo químico que estão inseridos (organoclorados, organofosforados, carbonatos, neonicotinóides, etc.) e do seu poder tóxicos (altamente, muito, medianamente ou pouco tóxicos). Pela característica tóxica que esses compostos apresentam, eles podem causar sérios danos ao ambiente onde são depositados e, conseqüentemente, à saúde do trabalhador. Contudo, para Perez e Moreira (2007), os efeitos adversos registrados para os agrotóxicos estão mais relacionados ao seu uso indiscriminado do que propriamente à sua classe química, bem como ao uso inadequado dessas substâncias, a falta de utilização de equipamentos de proteção e a precariedade dos mecanismos de vigilância.

A Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) cita que o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, com um consumo anual de aproximadamente 850 milhões de litros de agrotóxicos. Porém, de acordo com Eerd et al (2013), apenas uma fração dessas substâncias alcança, efetivamente, a

espécie-alvo. Esse alto consumo está diretamente relacionado à vocação agrícola brasileira, cuja economia está fortemente atrelada ao agronegócio. É importante ainda considerar que há um crescente desenvolvimento de tecnologias voltadas para o aumento da produção agropecuária, cujos produtos desenvolvidos nessa prática normalmente são novos agrotóxicos (BRAIBANTE e ZAPPE, 2012), que podem gerar ainda mais impacto ambiental e também maior comprometimento à saúde humana (SOARES e PORTO, 2007).

De acordo com dados do Ministério da Saúde (2018), no Brasil são notificados aproximadamente 7 a 9 mil casos de intoxicações anuais por agrotóxicos. Dados de 2015 (Sistema de Informações de Agravos de Notificações -Sinan) demonstram que 28% dos mais de 10 mil casos de contaminação por agrotóxico estão relacionados às contaminações ocupacionais. Porém, de acordo com o Ministério da Saúde (2018), esse valor pode ser ainda maior, devido à subnotificações dos casos de intoxicações induzidas por agrotóxicos, uma vez que a assistência médica da zona rural é, no geral, precária e muitos dos sintomas de intoxicação por agrotóxicos se confundem com sintomas de outras enfermidades.

Somado ao fato dos agrotóxicos causarem danos à saúde humana, o uso inadequado dessas substâncias podem se caracterizar também como um fator de risco para a fauna e flora, e causar impactos adversos ao ar, solo e recursos hídricos. O destino deles químicos no ambiente depende do seu potencial de persistência; da sua capacidade de lixiviação, sorção/dessorção, volatilização, dispersão atmosférica, absorção pelas plantas e escoamento superficial (DE SOUZA et al., 2021). Estudos realizados por Oliveira et al. (2018), comprovam que a contaminação de solos agrícolas está fortemente relacionada à infiltração de agrotóxicos nesses solos. Desta forma, os agrotóxicos podem interferir na qualidade do solo e, conseqüentemente, alterar a sua estrutura, podendo, muitas vezes, acarretar em eliminação da microbiota, que leva a um sério comprometimento do desenvolvimento da cultura (EMBRAPA, 2013). As variações na característica do solo, influenciam também o destino do químico no ambiente, podendo carrear esses contaminantes para a outras matrizes ambientais, como as águas superficiais e subterrâneas, além de contaminar também a biota local (CLASEN et al., 2017).

Os ambientes aquáticos, por serem o destino final de todos os poluentes, são os que mais recebem substâncias tóxicas, como os agrotóxicos. Esses compostos chegam até os recursos hídricos por diferentes vias: carreamento pelas águas da chuva, escoamento de água da irrigação; percolação no solo, durante a aplicação dos químicos; e pela poeira oriunda dos solos contaminados, onde estão adsorvidos. Sua presença de agrotóxicos nas águas superficiais aumenta as possibilidades desses compostos impactarem a biosfera endêmica da região e, conseqüentemente, interferirem na biodiversidade local. Os agrotóxicos também podem atingir os lençóis freáticos, principalmente por percolação no solo (VASCONCELOS, 2014). Rúbio e Gonçalves (2018) avaliaram a presença de agrotóxicos em amostras de água e de sedimentos coletados no rio Pirapó (Paraná), antes e depois à aplicação de inseticida nas culturas locais. Os autores identificaram nas amostras a alta presença de 6 agrotóxicos usados na região. Por esses resultados, eles alertaram para a necessidade de realização de monitoramento constante da qualidade de água dos mananciais usados para captação de água para abastecimento público.

A propagação dos agrotóxicos para a atmosfera, que acontece principalmente pelo potencial de volatilização dos compostos presentes no solo e na água, aumenta as possibilidades desses agentes em comprometer o ambiente e a saúde humana (MAHMOOD et al., 2014). Woffod et al. (2014) monitoraram o ar da cidade de Parlier (Califórnia), para avaliar a possível exposição da população aos agrotóxicos aplicados na região. O estudo mostrou que a população estava exposta a 19 diferentes agrotóxicos, por mais de 1 ano, sendo que alguns deles apresentavam concentrações superiores às determinadas pelo *Cancer Potency Value*.

Os agrotóxicos mais utilizados e que, conseqüentemente, causam mais intoxicações ocupacionais são os das classes dos organofosforados e carbamatos. Os organofosforados, que são substâncias passíveis de serem absorvidas pelas vias dérmica, inalatória e oral (ONYEISI et., al. 2017), são utilizados mundialmente na agricultura (EDWARDS E TCHOUNWOU, 2008).

Historicamente, os organofosforados são os inseticidas mais utilizados na agricultura, representando mais de 55% da comercialização desta classe de

agrotóxico (RIBEIRO & PEREIRA, 2016) O modo de ação tóxica dos compostos organofosforados é dado pela da inibição da enzima acetilcolinesterase, o que resulta em acúmulo de acetilcolina. A acetilcolina é um neurotransmissor responsável pela transmissão de impulsos nervosos e seu acúmulo causa a interrupção dos mesmos (DOW AGROSCIENCE, 2002; RIBEIRO & PEREIRA, 2016). Essa substância pode ser encontrada nos gânglios do sistema nervoso simpático e parassimpático, nas junções neuromusculares esqueléticas, nas terminações pós ganglionares dos nervos parassimpáticos e em terminações colinérgicas do sistema nervoso central. Assim, a ação anticolinesterásica provoca excesso de ativação dos receptores, o que ocasiona os efeitos no sistema nervoso central e efeitos periféricos muscarínicos e nicotínicos (CLARK, 2006). Essa ação pode provocar toxicidade aguda, quando a exposição é única e os efeitos são imediatos, ou crônica, como por exemplo a conferida por exposição ocupacional/ou ambiental, cujos efeitos podem se manifestar a longo prazo, desencadeando problemas sérios à saúde humana, como os relacionados à distúrbios da fertilidade, teratogenicidade, indução de doenças degenerativas e câncer (ALAVANJA et al. 2004).

Na França e nos Estados Unidos, as substâncias químicas pertencentes ao grupo dos organofosforados têm sido associadas a casos de aplasia medular, porém essa relação ainda é controversa. Um estudo caso realizado no Paraná mostrou uma relação direta entre o uso de organofosforados e anemia aplástica adquirida (POMEROY-BLACK et al., 2007). Estudos realizados por Bastos et al. (2020) apontaram associação entre os organofosforados e casos de cânceres de tireóide, de mama e de ovário em mulheres na menopausa.

O Clorpirifós (figura 1), é um inseticidas/acaricidas pertencente ao grupo químico dos organofosforados mais comercializados no mundo (HERNANDEZ RUIS et al., 2009). É um inseticida considerado extremamente tóxico (classificação toxicológica I), muito usado contra insetos pragas (mosquitos, baratas, larvas, besouros-saltadores e formigas de fogo e outros) de várias culturas agrícolas (algodão, batata, café, citros, feijão, milho, pastagem, soja, trigo, dentre outras) (ANVISA).



Figura 1. Fórmula estrutural do agrotóxico Clorpirifós (C₉H₁₁Cl₃NO₃PS). (Fonte: ANVISA. Acesso em novembro de 2018).

Devido aos efeitos adversos promovidos pelo Clorpirifós, há uma necessidade de se avaliar melhor este composto, tanto quando a sua presença no ambiente, como para os seus efeitos sobre a saúde humana (CARVALHO, 2003).

Muitos bioensaios realizados com agrotóxicos têm sido desenvolvidos para avaliar o potencial de indução de danos desses compostos sobre o material genético de diferentes espécies. Alguns vegetais, como a espécie *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola), são considerados excelentes bioindicadores de contaminação ambiental (GRANT, 1994; MA, 1995; GRANT, 1999), caracterizando-se como excelentes biomarcadores utilizados em testes *in vitro*, para este fim.

A espécie *L. sativa* é uma planta modelo para estudos de fitotoxicidade, sendo recomendada, por várias organizações internacionais, para avaliações ecotoxicológicas (ISO, 1995; USEPA, 1996; ARAGÃO et al., 2015). São realizados com esses bioindicadores testes que avaliam alterações nas taxas de germinação de sementes e a potencialidade de inibição de desenvolvimento radicular e do hipocótilo, testes estes considerados simples, de rápida realização e de baixo custo (PARK et al., 2016).

O sistema teste *A. cepa* é um excelente bioindicador para avaliação de efeitos citogenotóxicos de agentes químicos, como, por exemplo, dos agrotóxicos (FERNANDES et al., 2007, 2008; BIANCHI et al., 2015). Essa sua excelência é dada pela sua alta cinética de proliferação, pelo rápido crescimento de suas raízes, grande número de células em divisão, alta tolerância a diferentes condições de

cultivo, disponibilidade de uso durante o ano todo, facilidade no manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n = 16$) e de grande tamanho (QUINZANI-JORDÃO, 1978; RANK; NIELSEN, 1997; FISKESJO, 1985; FERNANDES et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além disso, este sistema também possui baixo custo e confiabilidade/equivalência com outros importantes testes de citogenotoxicidade, o que o caracteriza como instrumento de extrema eficiência para o monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias químicas (FACHINETTO et al, 2007). Sendo assim, a espécie *A. cepa* se tornou a mais indicada como material-teste padrão pela Royal Swedish Academy of Science (FISKESJÖ, 1985) e pelo Gene-Tox Program (GRANT, 1982).

Os ensaios de índice mitótico (razão entre as células em divisão celular/número total de células observadas), de índices de aberrações cromossômicas em células meristemáticas e de presença de micronúcleos em células meristemáticas e F1, de realizados com *A. cepa*, são muito utilizados para avaliar o potencial citogenotóxico e mutagênico de substâncias químicas (FERNANDES et al., 2007).

Os ensaios *in vitro*, realizados com cultura de celulares, constituem uma importante ferramenta de investigação aplicada à toxicologia (LEWINSKA et al., 2007). As vantagens de se utilizar essa técnica estão relacionadas com a praticidade do delineamento experimental, no qual é possível limitar o número de variáveis, padronizar, manipular e controlar facilmente as condições do teste; obter resultados significativos em curto período de tempo, utilizando pequenas quantidades de células (CARVALHO, 1996; ROGERO et al., 2003); e, conseqüentemente, reduzir a quantidade de animais experimentais e os custos operacionais de infraestrutura de bioensaios (CARVALHO, 1996; ZUCCO et al, 2004; LEWINSKA et al., 2007). Além disso, os ensaios *in vitro* permitem também avaliar o mecanismo de ação de contaminantes ambientais, possibilitando estimar a sua ação direta ou indireta sobre a célula avaliada (MANZANO, 2010).

Dentre as culturas celulares, destacam-se as células de hepatoma humano (HepG2/C3A), muito utilizadas em pesquisas ecotoxicológicas, por serem consideradas excelentes ferramentas de avaliação de diversas classes de

contaminantes ambientais, que podem atuar de forma direta e/ou indireta sobre os organismos (KNASMULLER et. al., 1998).

A linhagem celular C3A é um clone da HepG2 e, por ter uma expectativa de vida estendida, apresenta vantagens sobre às células HepG2 (GASKELL, SHARMA, COLLEY, et al., 2016). Esse tipo celular tem sido amplamente usado em pesquisas que avaliam a toxicidade humana, de diferentes substâncias, já que preservam a maioria das características morfológicas do fígado humano, os sistemas enzimáticos da metabolização celular e as enzimas que participam da ativação e detoxificação de compostos. Essas características dessa linhagem celular permitem avaliar, com mais fidedignidade, os efeitos que uma substância pode causar aos seres humanos (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

Diversos testes são utilizados para a avaliação de efeitos tóxicos de substâncias químicas. Dentre os ensaios usados para avaliar citotoxicidade de compostos, destacam os colorimétricos do MTT, da Resazurina e do Azul de Tripán. Esses ensaios consistem em expor, direta ou indiretamente, uma cultura celular ao agente alvo do estudo, para avaliar as potencialidades desse agente induzir alterações na viabilidade celular. Esta análise é feita com o auxílio dos corantes descritos acima, que permitem identificar alterações celulares por diferentes mecanismos de ação (ROGERO ET AL., 2003).

O ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) baseia-se na avaliação da citotoxicidade induzida por um composto ou toxina no metabolismo celular de glicídeos, através da avaliação da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais (enzima mitocondrial redutase). A viabilidade é quantificada pela redução do MTT (um sal solúvel em água de composto de coloração amarelada), pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP, a formazan, um sal de coloração roxa e insolúvel em água (DENIZOT & LANG, 1986).

O ensaio de resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazina-10-ium-3-ona) é semelhante ao do MTT, e avalia as mesmas enzimas. Nesse ensaio, quando a resazurina é reduzido a resorufina, fica de cor rosa. A resazurina atua como um

acceptor de elétrons, podendo ser reduzido por NADPH⁺ ou NADH⁺, agindo como indicador da vitalidade de organismos (MORAES & BONATTO, 2018) .

O teste do azul de tripan avalia a viabilidade celular pela integridade da membrana citoplasmática. As células mortas, quando em contato com o composto testado, absorvem o corante azul de tripan para seu citoplasma, por perda de seletividade da membrana. Assim, a avaliação da viabilidade celular é feita pelo número de células que estão coradas (mortas) e as incolores (vivas) (AVELAR-FREITAS et al., 2014).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Químico testado

O produto avaliado neste estudo foi o inseticida clorpirifós, comercializado sob o nome de Klorpan 480 EC (480 g do ingrediente ativo/L), pertencente ao grupo químico dos organofosforados e de classificação toxicológica I (extremamente tóxico). Seu ingrediente ativo é o clorpirifós, que tem como composição química O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato (C₉H₁₁Cl₃NO₃PS).

Para essa avaliação, foram preparadas seis soluções aquosas do inseticida clorpirifós: 10 mg mL⁻¹ (concentração recomendada para uso pelo fabricante); 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg mL⁻¹

4.2 Sistemas-testes e tratamentos

4.2.1 Bioensaios com bioindicadores vegetal

4.2.2 Teste de germinação com *Lactuca sativa* e com *Allium cepa*

Os testes de germinação com os bioindicadores *Lactuca sativa* (variedade crespa) e *Allium cepa* (variedade Baia Periforme) foram realizados com 20 e 100 sementes, respectivamente. Nos ensaios, as sementes foram dispostas em placa de Petri, previamente forradas com papel filtro, onde foi adicionado 5 mL das diferentes concentrações do inseticida e das substâncias dos testes controles. O tratamento controle negativo (CN) foi realizado em água de osmose reversa e os controles positivos (CP), para *A. cepa*: metill metansulfonato (MMS), concentração de 10 mg/L (para efeito clastonênico) e herbicida comercial trifluralina, na concentração de 0.84 g/L (para efeito aneugênico) (ANACLETO et al., 2017); para *L. sativa*: sulfato de zinco heptahidratado (0,005M- ZnSO₄7H₂O), conforme descrito por Lopes (2014). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após a germinação, foram contabilizadas as sementes germinadas, para a obtenção da porcentagem de germinação. Os resultados de inibição do desenvolvimento da radícula e do hipocótilo de *L. sativa* foram obtidos pela mensuração dos comprimentos dessas estruturas, que foram realizadas com o auxílio de um paquímetro.

A análise estatística dos dados com distribuição normal, para os ensaios de germinação com *L. sativa* e *A. cepa*, foi realizada pelo teste ANOVA com post-hoc em Dunnet, e para os dados de distribuição não normal, o teste de Kruskal Wallis, com post-hoc em Dunn, de acordo com Marôco (2014). Os dados foram analisados usando o software RStudio®.

4.2.3 *Ensaio de citogenotoxicidade e mutagenicidade com células meristemáticas de Allium cepa*

Após germinação das sementes de *A. cepa*, foram coletadas radículas com cerca de 1,5 cm de comprimento, que foram fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol:1 de ácido acético, v:v) por 6 a 12 horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, foi realizada a troca do fixador por um recém-preparado, para posterior armazenamento das raízes a 4 °C, até a sua utilização na confecção das lâminas.

As análises citológicas com células meristemáticas de *A. cepa*, foram desenvolvidas de acordo com o protocolo descrito por Grant (1982), com algumas modificações. As raízes foram submetidas a uma hidrólise ácida em HCl 1N a 60 °C, por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas com água destilada e transferidas para vidro âmbar contendo reativo de Schiff, onde ficaram protegidas da luz, por um período de 2 horas. Após esse período, foi feita uma série de lavagens em água de osmose reversa, até a total retirada do excesso do corante.

Para o preparo das lâminas, os meristemas foram dispostos em lâminas contendo uma gota de carmim acético (2%), recobertos com lamínulas e suavemente esmagados. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética, para serem, posteriormente, analisadas em microscopia de Luz.

Foram confeccionadas quatro lâminas por tratamento/triplicata e examinadas 500 células/lâmina, totalizando 12 lâminas e 6.000 células contadas/tratamento. A citotoxicidade foi avaliada pelo cálculo do índice mitótico (IM), obtido a partir da relação entre o número de células em divisão/número total de células observadas.

Para a avaliação da genotoxicidade foram considerados os diferentes tipos de aberrações cromossômicas (perdas, aderências, pontes e atrasos cromossômicos e brotos nucleares), nas diferentes fases do ciclo celular (intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase).

4.2.4 Ensaio do Micronúcleo com células F₁ de Allium cepa

O procedimento para confecção das lâminas foi o mesmo descrito acima, porém o material utilizado foi a região F₁, localizada a 1 milímetro acima da região meristemática.

Para a análise estatística dos resultados dos testes realizados com *A. cepa*, foram comparados os valores obtidos no grupo do CN com os demais tratamentos realizados. As análises estatísticas, para os dados normais, foram realizadas pelo teste ANOVA com post hoc em Dunnett, e para dados de distribuição não normal, pelo teste de Kruskal-Wallis, com post hoc em Dunn.

4.2.5 Bioensaios com Cultura de Células (linhagem HepG2/C3A)

As células de hepatoma humano – HepG2/C3A foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro – RJ, Brasil. As células foram cultivadas em monocamada, em meio MEM (Meio Mínimo Essencial Eagle), com solução antibiótica/antimitótica, suplementado com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em frascos de cultura descartáveis de 25 cm³, em estufa com temperatura controlada (37 °C), CO₂ (5%) e umidade de 60%.

4.2.6 Teste do MTT

O teste de viabilidade celular do MTT foi realizado em placas de ELISA de 96 poços. Foram semeadas $2,34 \times 10^4$ células por poço, em um volume total de 100 µL de meio com soro, exceto nos poços referentes ao branco, onde foi colocado apenas o meio de cultura. A placa foi incubada por um período de 24 horas. Após esse período, o meio foi retirado e adicionados os tratamentos, previamente preparados com meio de cultura sem soro, totalizando um volume final de 200 µL por poço. Para o controle positivo, foi utilizado Triton X-100, diluído em meio de cultura sem soro e

para o controle negativo, meio de cultura sem soro. Nos demais poços, foram testadas inicialmente cinco diferentes concentrações de clorpirifós (10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg mL⁻¹), porém os resultados mostraram que nenhuma das concentrações testadas mostrou viabilidade de, pelo menos, 80%. Por esta razão, as amostras foram diluídas em quatro concentrações menores, obtidas a partir da concentração de 0,625 mg mL⁻¹ (0,15625; 0,078; 0,039; e 0,019 mg mL⁻¹). Os tratamentos permaneceram nos poços por um período de 24 horas e, posteriormente, retirados e substituídos por 150 µL de MTT, diluído em PBS, na concentração de 1 x 10⁻⁶ mg/mL. Após a adição do MTT, a placa foi incubada por 4 horas, em estufa a 37° C. Em seguida, a solução de MTT foi descartada e adicionado, em cada poço, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). As placas foram lidas em espectrofotômetro de fluorescência (Infinite M2000 Pro™ Plate Reader -TECAN), utilizando o comprimento de onda de excitação de 560 nm e de emissão 590 nm.

4.2.7 Teste da Resazurina

O ensaio foi realizado em placas de Elisa de 96 poços. As placas foram preparadas com 2,34 x 10⁻⁶ células por placa, em um volume total de 100 µL de meio da cultura correspondente de cada suspensão celular, suplementado com soro e incubadas por um período de 24 horas, tempo necessário para ocorrer a adesão das células na superfície dos poços. Após a incubação, o meio foi substituído pelos tratamentos, previamente preparados com meio de cultura sem soro, totalizando um volume final de 200 µL por poço. Nos poços destinados ao CN, foi adicionado meio de cultura sem soro. Os destinados ao CP receberam a adição de uma solução de Triton X-100 (1%), preparada com meio de cultura sem soro. Nos demais poços foram adicionadas as diferentes concentrações do inseticida clorpirifós (0,15625; 0,078; 0,039; e 0,019 mg mL⁻¹), preparadas com meio de cultura sem soro. Os tratamentos ficaram nos poços por um período de 24 horas. Em seguida, o meio foi retirado e substituído por 200 µL de solução de resazurina (44 µM), diluída em meio de cultura sem soro, permanecendo incubadas por mais 4 horas, à 37 °C. A leitura foi feita em fluorímetro (Infinite® 2000 Pro™ Plate Reader -

TECAN, Mannedorf, Suíça), configurado com $\lambda=560$ nm de excitação e $\lambda=590$ nm de emissão. A viabilidade foi avaliada com base na comparação das células tratadas com as células não tratadas (CN), onde as concentrações abaixo de 80% de viabilidade foram consideradas citotóxicas.

4.2.8 Ensaio do Azul de Tripán

O teste de viabilidade com o corante Azul de Tripán (0,4%, GIBCO, Cat. Nº 15250-061) foi realizado em placas de ELISA de 6 poços. Foram semeadas, aproximadamente, 5×10^5 células por poço, em um volume total de 2 mL de meio com soro. As placas foram incubadas por 24 horas, para estabilização. Passado esse tempo, o meio foi retirado e um novo meio de cultura (sem soro) foi adicionado, juntamente com os tratamentos. Para o controle positivo, foi utilizado Triton X-100, diluído em meio de cultura sem soro (solução a 1%) e para o controle negativo meio de cultura sem soro. Nos demais poços, foram adicionadas as diferentes concentrações do inseticida clorpirifós (0,15625; 0,078; 0,039; e 0,019 mg mL⁻¹). Os tratamentos permaneceram nos poços por 24 horas. Decorrido este tempo, os poços foram lavados duas vezes com 2 mL de PBS, para a retirada do excesso de corante e, posteriormente, as células foram removidas da parede dos poços pela incubação com 200 μ L de tripsina 0,5%, por 5 minutos, a 37 °C (em estufa de CO₂). Em seguida, a reação foi inativada com 600 μ L de meio com soro. As soluções com células foram transferidas para eppendorfs devidamente identificados. Para a confecção das lâminas, foi gotejada sobre elas uma gota de mistura de 20 μ L de azul de tripán e 20 μ L da solução celular homogeneizada. A contagem celular foi realizada em microscopia de luz (aumento de 400x). Os dados obtidos foram posteriormente transformados em porcentagem e usados na avaliação da viabilidade das concentrações testadas, considerando não citotóxicas as concentrações que apresentaram uma viabilidade celular maior ou igual a 80%. Este ensaio foi realizado em triplicata.

5. RESULTADOS

Os resultados dessa dissertação estão apresentados em forma de artigo. Três artigos compõem o trabalho, e podem ser visualizados a seguir.

ARTIGO 1

Agrotóxicos organofosforados, com destaque ao Clorpirifós : Caracterização e avaliação ecotoxicológicas pelo bioindicador *Allium cepa*

Mariana Santos Costa, Jaqueline Bianchi, Maria Aparecida Marin-Morales

RESUMO

Os agrotóxicos são substâncias químicas utilizadas no mundo todo para controle de pragas. No Brasil, sua utilização crescente decorre da economia do país, que tem base essencialmente agrícola. Embora o uso de agrotóxico leve a um aumento da produção agrícola, os seus resíduos causam efeitos indesejáveis ao meio ambiente e a saúde dos organismos expostos, dentre eles os seres humanos. Como a maioria dos agrotóxicos tem como destino final o meio ambiente, esses químicos são considerados potenciais contaminantes de todos os compartimentos ambientais. Os seres humanos podem se expor aos agrotóxicos por diferentes vias (oral, inalatória e dérmica) e de forma direta (contaminação ocupacional) e indireta (pela ingestão de água contaminada e por via trófica). Os organofosforados (OF) representam uma das classes de agrotóxicos mais utilizada no Brasil. Seu uso foi impulsionado pela proibição dos agrotóxicos organoclorados (OC), devido a persistência dos mesmos, tornando então os OF os grandes substituídos dos OC. Dentre os efeitos tóxicos dos OF, destacam-se os, distúrbios neurológicos, má formação congênita, infertilidade e doenças genéticas incluindo o câncer. O inseticida Clorpirifós é um dos OF considerados de alta toxicidade para os seres vivos, que se destaca como um dos inseticidas mais utilizados no Brasil para controle de pragas. Este artigo de revisão teve como proposta reunir importantes informações sobre a citogenotoxicidade de agrotóxico, destacando neste enfoque os OF e, mais especificamente, o inseticida Clorpirifós. Para a elaboração dessa revisão, foram realizadas buscas na literatura científica, utilizando as bases de dados Portal CAPES, como PubMed, Scielo, Science Direct, Web of Science, Taylor & Francis Online; Medline, além de sites de agências ambientais de saúde internacionais, como OECD Online e USEPA. Foram também discutidos neste artigo de revisão artigos científicos que utilizaram o bioindicador *Allium cepa*, como modelo para avaliar a citogenotoxicidade de agrotóxicos, por ser este organismo teste indicado para este fim pelo IPCS, WHO, USEPA e UNEP. Nesta revisão foram apresentados dados de uso de agrotóxico no Brasil; contaminação ambiental e

efeitos sobre a saúde humana promovidos por OF, citogenotoxicidade de OF, bioindicadores e métodos mais utilizados nas avaliações tóxicas desses agentes.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, Fitotoxicidade, Aberrações Cromossômicas, Micronúcleo, Inseticidas.

ABSTRACT

Pesticides are substances used around the world to control pests. In Brazil, its growing use stems from the country's economy, which is essentially agricultural. Although the use of pesticides leads to an increase in agricultural production, their residues cause undesirable effects on the environment and the health of exposed organisms, including humans. As most pesticides have the environment as their final destination, these chemicals are considered potential contaminants of all environmental compartments. Human beings can be exposed to pesticides through different routes (oral, inhalation and dermal) and directly (occupational contamination) and indirectly (through the ingestion of contaminated water and through the trophic route). Organophosphates (OP) represent one of the most explored classes of pesticides in Brazil. Its use was driven by the ban on organochlorine (OC) agrochemicals, due to their persistence, making them the major substitutes for OC. Among the toxic effects of OP, neurological disorders, congenital malformations, infertility and genetic diseases including cancer stand out. The insecticide Chlorpyrifós is one of those considered highly toxic to living beings, which stands out as one of the most used insecticides in Brazil for pest control. This review article aimed to gather important information about a pesticide's cytogenotoxicity, highlighting in this focus the OP and, more specifically, the insecticide Chlorpyrifos. To review this review, a search was carried out in the scientific literature, using Portal CAPES, PubMed, Scielo, Science Direct, Web of Science, Taylo & Francis Online; Medline, and websites of international environmental health agencies, such as OECD Online e USEPA . Scientific articles that used the *Allium cepa* bioindicator as a model to assess pesticide cytogenotoxicity were also discussed in this review article, as this test organism is indicated for this purpose by the IPCS, WHO, USEPA and UNEP. This review included data on pesticide use in Brazil; environmental contamination and effects on human health promoted by OP, cytogenotoxicity of FO, bioindicators and methods most used in toxic evaluations of these agents.

Keywords: Ecotoxicology, Phytotoxicity, Chromosomal Aberrations, Micronucleus, Insecticides.

1. Introdução

Nas últimas décadas o consumo de agrotóxicos cresceu significativamente, transformando o Brasil em um dos líderes mundiais desse mercado (RIGOTTO et al., 2014). De acordo com os dados da Comissão de Direitos Humanos e Minorias da Câmara dos Deputados (2019), em 2017, o país foi considerado o maior consumidor de agrotóxicos em volume de produto do planeta, com cerca de 550 mil toneladas de ingredientes ativos aplicados em nossas culturas. Esse alto consumo está relacionado à importância econômica do agronegócio no Brasil.

A ANVISA (2003) cita que a exposição de pessoas a agrotóxicos pode se dar de forma indireta, pelo consumo de alimentos contaminados com esses produtos, ou por contato direto, como é o caso dos trabalhadores agrícolas e seus familiares que residem próximo às áreas de cultivo. Além dos registros de contaminação humana por agrotóxicos, também deve ser considerada a alta contaminação que esses agentes promovem no ambiente, cujos resíduos são encontrados na água, no solo e no ar (PENA E SPERLING, 2003. De acordo com Siqueira (2008), a contaminação por agrotóxicos que altera a qualidade ambiental e a saúde da população exposta está relacionada, principalmente, ao uso inadequado desses produtos.

Os agrotóxicos mais utilizados no país pertencem às classes dos organoclorados e organofosforados (JAGA E DHARMANI, 2003). Dentre os organofosforados mais utilizados, destaca-se o inseticida Clorpirifós (O,O-dietil-O-3,5,6-tricloropiridin-2-piridinilfosforotioato), por ser muito utilizado em culturas de grande importância econômica do Brasil, como as de algodão, milho, trigo e soja (BARNHOORN et al., 2005; ANVISA, 2020),.

A avaliação dos possíveis efeitos adversos dos agrotóxicos aos organismos e aos ecossistemas é geralmente feita por meio de testes realizados com algumas espécies vegetais ou animais sensíveis a diferentes agentes químicos, denominadas de bioindicadores de toxicidade. Por esses testes serem capazes de estimar os perigos e riscos biológicos de substâncias químicas, eles também servem de alerta

sobre os efeitos danosos de uma infinidade de contaminantes ambientais (ARIAS et al., 2007). Dentre os diversos indicadores usados para avaliação de toxicidade ambiental, destacam-se os bioindicadores vegetais *Allium cepa* (cebola) e *Lactuca sativa* (alface), por estes apresentarem características interessantes como facilidade de manuseio para os bioensaios e a obtenção de resultados rápidos (SOBRERO E RONCO, 2004; LEME E MARIN-MORALES, 2009).

Ensaio realizados com linhagens celulares mantidas em cultura também são considerados eficientes para avaliar a ação de diversos agentes presentes no ambiente (LEWINSKA et al., 2007). Ensaio com culturas celulares permitem controlar as condições físicas, químicas e fisiológicas dos experimentos, tornando possível avaliar o metabolismo celular frente a diferentes condições ambientais e diferentes contaminantes (Freshney, 2015).

O presente estudo teve por objetivo compilar informações científicas sobre os possíveis comprometimentos promovidos à saúde e ao ambiente pelo dos orgafosforado Clorpirifós, inseticida este que se destaca como o mais usados na agricultura brasileira. A busca das informações foram feitas em bases de dados do Portal CAPES, como PubMed, Scielo, Science Direct, Web of Science, Taylo & Francis Online; Medline, bem como em sites de agências ambientais de saúde internacionais, como OECD Online e USEPA.

2. Uso de agrotóxicos no Brasil

A agricultura teve, ao longo da história, um papel muito importante para o desenvolvimento da sociedade humana. Isso porque, as culturas sempre estiveram atreladas ao fornecimento de alimentos para a população, se ajustando à demanda imposta pelo crescimento populacional. Esse suprimento adequado de alimento fez com que o homem buscasse, constantemente, técnicas e substância que pudesse melhorar a produção agrícola, como, por exemplo, fertilizantes e os agrotóxicos (SADOWSKI E BAER-NAWROCKA, 2018).

Os agrotóxicos se tornaram mais populares durante a segunda guerra mundial, com a descoberta de que o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) era eficiente para combater insetos e auxiliar na erradicação de doenças transmitidas por eles, como a malária e a febre amarela. O uso desses compostos acabou sendo

incorporado pelos agricultores, para controlar pragas agrícolas e, conseqüentemente, diminuir as perdas na agricultura (D'MATO et al., 2002). O aumento da produção agrícola, associado ao uso dessas substâncias, fez com que fossem produzidos mais compostos organossintéticos e aumentasse o espectro de ação dos agrotóxicos (inseticidas, herbicidas...). Também foram implementadas mudanças das técnicas de produção agropecuária, como a utilização de diferentes fertilizantes químicos. Toda essa mudança na agricultura caracterizou a chamada de Revolução Verde (ALBERGONI E PELAEZ, 2007).

No Brasil, o uso de agrotóxicos começou na década de 40, sendo ainda mais acelerado na década de 60, quando foi promulgada a isenção de impostos como de circulação de mercadoria (ICM), de produtos industrializados (IPI e das taxas de importação de produtos estrangeiros, bem como foi permitido o uso de pulverizações agrícolas (MOREIRA, 2000). O Brasil é considerado como um dos países que mais consomem e comercializam agrotóxicos no mundo. O setor agropecuário é um dos mais lucrativos do país, com movimento na economia da ordem de U\$ 10 bilhões/ano. Também está incluído nesse setor o desenvolvimento de novos agrotóxicos voltados para o aumento do potencial agrícola (RIGOTTO et al., 2014).

De acordo com Vasconcelo (2018), o país apresenta um consumo médio de agrotóxico da ordem de 540 mil toneladas/ano. Em 2013 foram vendidos 495,7 mil toneladas desses químicos, aumento em 2016 para 541,8 mil toneladas vendidas, valor esse que ainda aumentou em 2017. A figura 1 traz informações sobre o consumo de agrotóxicos e substâncias afins, entre os anos de 2000 a 2017. O Ministério da agricultura publicou, em 2020, que, até o início daquele ano, já tinham sido registrados, pelo menos, 150 novos agrotóxicos para uso no Brasil, onde 118 seriam destinados a agricultura. A figura 2 mostra o registro anual de agrotóxicos no Brasil, entre 2000 e 2020, (dados do Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento), e divulga os resultados obtidos até outubro de 2020, data esta em que o país já havia registrado 315 novos agrotóxicos.

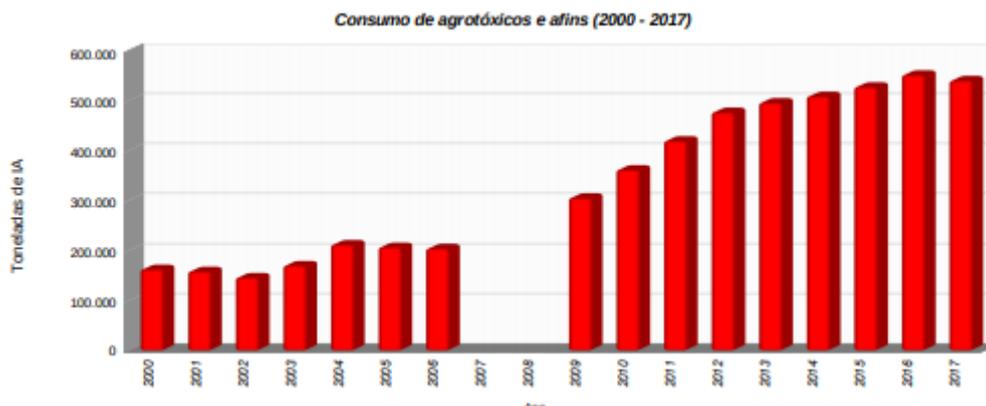


Fig. 1. Consumo de agrotóxico e substâncias afins registrados entre os anos 2000-2017. Fonte: IBAMA. (art. 41 do Decreto 4.074/2002). Dado atualizados: 25/06/2018

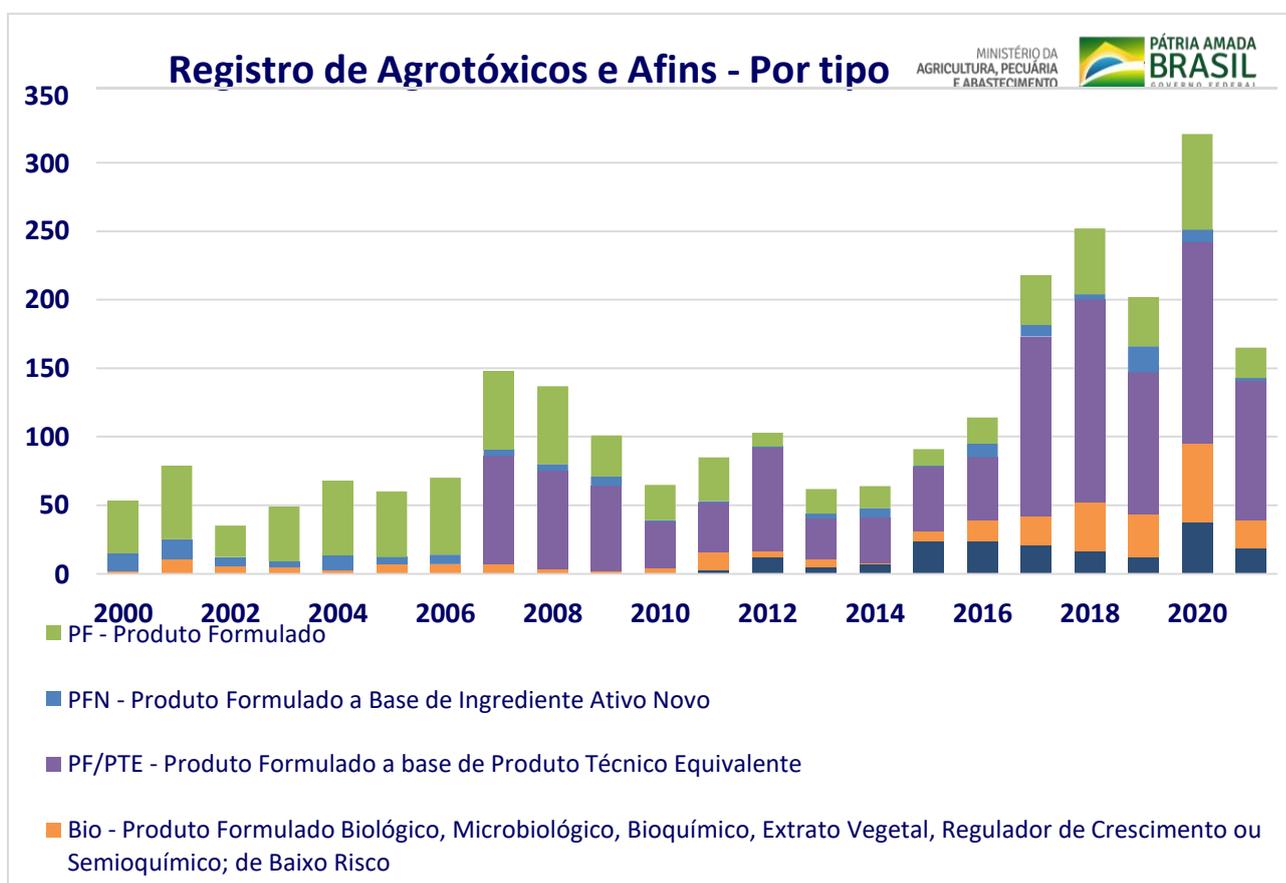


Fig. 2. Histórico de registro anual de agrotóxicos no Brasil entre os anos 2000- 2020. Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Dados atualizados em 13/07/2021 as 18h22.

Os agrotóxicos são substâncias ou misturas de substâncias usadas na agricultura com o objetivo de proteger a produtividade e a qualidade do produto final

(REYNOSO et al., 2019). Eles geralmente são aplicados diretamente nas culturas, por meio de aviões, implementos agrícolas terrestres automatizados ou por equipamentos manuais (SANCHEZ-BAYO, 2011). São classificados de acordo com a toxicidade (figura 3), grupo químico e, principalmente pelo organismo alvo, por exemplo, herbicidas, inseticidas e fungicidas. A figura 3 mostra a classificação dos agrotóxicos, de acordo com a ANVISA, baseada no grau de toxicidade das substâncias.

| | EXTREMAMENTE TÓXICO | ALTAMENTE TÓXICO | MODERADAMENTE TÓXICO | POUCO TÓXICO | IMPROVÁVEL CAUSAR DANO AGUDO | NÃO CLASSIFICADO |
|------------------------|---|---|---|--|---|------------------|
| PICTOGRAMA |  |  |  |  | Sem símbolo | Sem símbolo |
| PALAVRA DE ADVERTÊNCIA | PERIGO | PERIGO | PERIGO | CUIDADO | CUIDADO | Sem advertência |
| CLASSE DE PERIGO | | | | | | |
| ORAL | Fatal se ingerido | Fatal se ingerido | Tóxico se ingerido | Nocivo se ingerido | Pode ser perigoso se ingerido | - |
| DÉRMICA | Fatal em contato com a pele | Fatal em contato com a pele | Tóxico em contato com a pele | Nocivo em contato com a pele | Pode ser perigoso em contato com a pele | - |
| INALATÓRIA | Fatal se inalado | Fatal se inalado | Tóxico se inalado | Nocivo se inalado | Pode ser perigoso se inalado | - |
| COD DA FAIXA | VERMELHO | VERMELHO | AMARELO | AZUL | AZUL | VERDE |

Fig. 3. Classificação dos agrotóxicos de acordo com a Anvisa, utilizada para fins de registro e reavaliação, baseada no grau de toxicidade destas substâncias. Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019

Apesar do uso dessas substâncias auxiliarem os setores econômico e agrícola do país, são inúmeros os estudos que as associam a efeitos adversos à saúde humana (BRONDANI et al., 2018). Esses efeitos podem ser tanto agudos, quando os sintomas aparecem durante a exposição ou logo após o contato do indivíduo com a substância, quanto crônicos, quando os sintomas aparecem em longo prazo, desenvolvendo efeitos como infertilidade e câncer (GONONI et al., 2019). A contaminação por agrotóxicos acontece de forma oral, dérmica ou inalação, e acomete, principalmente, os profissionais que estão em contato direto

com eles (QUEIROZ, 2019). O relatório da Organização das Nações Unidas – ONU (2017) publicou que o uso crescente e indevido de agrotóxicos é responsável pela morte por intoxicação de, aproximadamente, 200 mil pessoas, e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde -OMS (2019), são registradas no Brasil, aproximadamente, 20 mil mortes por ano associadas ao consumo de agrotóxicos.

Sarwar (2015) afirma que, sem o uso de agrotóxicos, haveria uma redução de cerca de 35 a 40% da produção agrícola, o que poderia comprometer a disponibilidade de alimento para a população. O autor ainda destaca que a aplicação de forma correta como a utilização de doses adequadas, método correto de aplicação e utilização de EPI's, reduziria, significativamente, a exposição humana à essas substâncias e, conseqüentemente, os impactos que esses químicos causam à saúde humana.

3. Agrotóxicos como contaminantes ambientais

Historicamente, o uso de agrotóxicos já trouxe benefícios mundiais à saúde humana, principalmente nas décadas de 50 e 60, pelos auxílios prestados ao combate de doenças causadas por vetores biológicos. Porém, o desenvolvimento de novos químicos, somado ao uso indiscriminado e em larga escala e o reconhecimento de efeitos nocivos causados por esses produtos gerou, e ainda gera, muita preocupação, quanto aos impactos que eles podem causar tanto aos organismos como ao ambiente (AVALOS, 2009). Os impactos associados aos agrotóxicos estão relacionados aos seus potenciais de bioacumulação, persistência, perigos no transporte, toxicidade do produto para diversos organismos e mutagenicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade para humanos (GOMES et al., 2002). Algumas classes de agrotóxicos apresentam maior capacidade de bioacumulação e persistência ambiental, devido a estabilidade estrutural de suas moléculas e degradação lenta do composto (GOMES et al., 2002). Muitos agrotóxicos foram substituídos e ou banidos como agentes controladores de pragas, devido aos seus potenciais de bioacumulativos e de persistência. Um exemplo conhecido é a proibição de uso dos agrotóxicos organoclorados com a substituição deles pelos organofosforados, (SANTOS et al., 2007).

A contaminação ambiental provocada por essas substâncias pode prejudicar diferentes compartimentos e matrizes ambientais, como o solo, a água, o ar e os organismos vivos (SPADOTTO E GOMES, 2006). A contaminação do solo por agrotóxico pode se dar pela aplicação direta do produto na superfície do solo, mas também por resíduos de pulverizações aplicadas nas partes aéreas dos vegetais, bem como pela queda de folhas, flores, frutos e galhos dos vegetais onde o produto foi aplicado (PRIMAVESI, 2002). Os agrotóxicos podem ser transportados para o solo por águas de chuva, igualmente ao que acontece nas contaminações das águas superficiais e subterrâneas (GOMES E BARIZON, 2014).

Melo de Castro et al. (2020) avaliaram a vulnerabilidade de solo de área agrícola à contaminação de agrotóxicos, por meio dos parâmetros de textura, matéria orgânica, pH e concentração de metais pesados. Os resultados da avaliação indicaram que as porcentagens de metais encontrados no solo indicavam as possíveis áreas de contaminação. Pedlowski et al. (2020) avaliaram os efeitos do uso de agrotóxicos em um assentamento de reforma agrária do norte região norte fluminense. Os resultados do estudo mostraram uma predominância de substâncias moderadamente tóxicas para a saúde humana e altamente perigosas no ambiente, no local, o que levou os autores a concluir que havia uma necessidade de se implementar uma ação sócio ambiental educativa junto aos produtores, para instruí-los e esclarecê-los sobre o uso responsável de agrotóxicos, bem como alertá-los sobre os riscos do uso incorreto dessas substâncias, tanto para a saúde como para o meio ambiente.

O consumo de água de mananciais contaminados por agrotóxicos pode levar, em longo prazo, ao acúmulo dessas substâncias nos organismos, e consequentemente, induzir eventos como o câncer, distúrbios nervosos, entre outros. Quando os agrotóxicos são lixiviados/percolados no solo, eles podem chegar até as águas superficiais. Se esse manancial for usado na captação de água para abastecimento público, torna-se necessária uma rigorosa análise e tratamento desta água, antes que ela seja distribuída para a população (DELLAMATRICE E MONTEIRO, 2014). Esses químicos podem ainda se acumular nos tecidos de

peixes, gerando intoxicação via cadeia alimentar (BATISTA E CESTARYZYCHAR, 2019).

No estudo desenvolvido por Gilson et al. (2020), os autores fizeram um panorama teórico da contaminação por agrotóxico nos recursos hídricos do município de Realeza (Estado do Paraná). Foram levantados 27 agrotóxicos aplicados nas culturas de soja, milho, trigo e feijão da região, dos quais 13 deles foram classificados como contaminantes em potencial da água subterrânea; 10 com alto potencial de ser transporte pela água e 3 deles apresentaram um alto potencial de transporte associado ao sedimento. Alguns agrotóxicos demonstram ter alta mobilidade e alta persistência tanto no solo como na água.

Menezes et al. (2021) estudaram a relação entre o uso indiscriminado dos agrotóxicos da região de Campos de Goytacazes (RJ), com o aumento da contaminação da água e dos comprometimentos à saúde humana. Os resultados mostraram que o aumento da contaminação da água de abastecimento estava relacionado ao uso indiscriminado de agrotóxicos.

Quanto a contaminação do ar, Belo et al. (2012) citam que os agrotóxicos atingem a atmosfera, especialmente, pela volatilização. Os autores atentam para a capacidade desses compostos se acumularem em formações plúmbeas, podendo ser carregados pelo vento e precipitarem longe do local de sua aplicação. Assim, o vento e as chuvas são importantes fatores de transporte de agrotóxicos no meio atmosférico e, conseqüentemente responsáveis por problemas de contaminação de áreas urbanas e áreas não agricultáveis. Mendonça (2021) coloca ainda a preocupação com às aplicações de agrotóxicos realizadas por pulverizações, pois estas podem acarretar em sérios danos ao ambiente e aos organismos eventualmente expostos. Um exemplo de contaminação pelo ar, que chamou atenção e abriu discussões sobre a pulverização aérea de agrotóxicos, aconteceu no interior do Maranhão, em 2021, quando um avião aplicou agrotóxico em uma cultura, mas essa aplicação atingiu também uma comunidade rural, provocando sérios eventos de intoxicação (BRASIL DE FATO, 2021).

4. Inseticidas organofosforados

Os inseticidas organofosforados (OP) pertencem a uma classe de agrotóxicos amplamente utilizada na agricultura brasileira (AQUINO, 2011). Os agrotóxicos organofosforados são ésteres, amidas ou derivados tiol dos ácidos de fósforo, contendo várias combinações de carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e nitrogênio. São compostos orgânicos altamente lipossolúveis e biodegradáveis. Esses agrotóxicos são rapidamente hidrolisados, tanto nos meios biológicos quanto no ambiente, se distribuindo de forma rápida pelos tecidos orgânicos, inclusive ultrapassando as barreiras placentárias e hematoencefálicas (Santos et al., 2007). Devido a sua alta maior lipofilicidade, eles podem interagir com a membrana celular e se acumular nos tecidos (CIRCUNVIS, 2010).

Esses compostos começaram a ser mais utilizados, quando os organoclorados foram proibidos, devido a sua alta persistência ambiental (BORSOI et al., 2014). O desenvolvimento dos organofosforados (OP) teve início do ano de 1940, quando o químico alemão Gerhard Schrader descobriu a estrutura química geral destes compostos e sintetizou o primeiro inseticida desta classe, que continha tetraetil pirofosfato como ingrediente ativo (TERRY, 2012).

Como pode ser vista na figura 4, a estrutura química geral dos organofosforados apresenta os radicais R1 e R2, normalmente do grupo alquil ou aril, que podem estar ligados diretamente ao fósforo, sendo chamados de fosfinatos, ou ligados ao fósforo via O- ou S-, recebendo então a denominação de fosfatos. Caso um radical se ligue diretamente ao fósforo, e o outro ao O- ou S-, são chamados de fosfonatos. Já nos OP fosforoamidatos, o carbono é ligado ao fósforo, ao invés de um grupo amino (VALE, 1998). Em relação a ligação com o fósforo, os organofosforados são divididos em grupo fosfato, cuja ligação do fósforo é com o oxigênio, e os fosfotioatos, onde a ligação é dada entre o fósforo e o enxofre (LOTTI E JOHNSON, 1980). Os fosfatos são os mais tóxicos, devido a eletronegatividade do oxigênio ser maior, em relação ao enxofre, durante a atuação no organismo alvo. O outro grupo tem compostos menos reativos, porém apresentam maior tempo de permanência no ambiente, provocando maior poder residual ao composto (WHO, 1986).

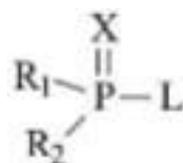


Fig. 4. Estrutura fundamental de inseticidas organofosforados. X= O, S e Se; R1, R2 = alquil, SR', OR' ou NHR; L = halogênios; alquil, aril ou heterocíclicos (SANTOS et al., 2007).

Para que os OP se tornem toxicologicamente ativos, é necessário que haja uma bioativação metabólica, que acontece por dessulfuração, dada principalmente por enzimas do complexo citocromo p450, além de outros fatores físicos como luz, pH e temperatura. Essa ativação ocorre não apenas no fígado, mas também em outros órgãos como o cérebro, rins e pulmões. Contudo, os compostos resultantes dessa ativação podem ser hidrolisados nos tecidos dos mamíferos (PAUL et al., 2018). Os insetos são mais sensíveis a estes compostos, por geralmente não possuírem esse sistema enzimático de metabolização (PAUL et al., 2018).

A absorção dos compostos organofosforados dá por via oral, respiratória e cutânea, sendo essa última a causa mais frequente das intoxicações ocupacionais (RIBEIRO E MELLA, 2007). Dentre os sintomas desencadeados pelos OP, estão distúrbios do sono, agitação, depressão respiratória e morte (SANTOS et al., 2015). Seu uso também já foi relacionado a casos de malformações congênitas, infertilidade e produção de efeitos genéticos e câncer (PERIPOLLI e RODRIGUES, 2002; VERGARA, 2015; LINHARES, 2013).

Estudos realizados por Perry et al., (2020) comprovaram que exposições crônicas aos OP podem induzir déficits neurocomportamentais, aumentando a incidência de doenças neurodegenerativa, efeitos nos nervos periféricos e comprometimento no neurodesenvolvimento. Hu et al., (2018) avaliaram os efeitos da exposição pré-concepção a agrotóxicos no tempo de gravidez e na infertilidade de casais chineses. Os resultados desse estudo mostraram que as exposições pré-concepção a OP e a piretróides estão associadas com diminuição da fertilidade feminina. Estudos realizados por Yang et al., (2020) avaliaram os efeitos da

exposição a inseticidas organofosforados e o risco de desenvolvimento de câncer de mama. Os resultados do estudo indicaram que esses OP aumentam a probabilidade de desenvolver essa patologia.

O *International Programme on Chemical Safety – World Health Organization* (IPCS-WHO) classifica os inseticidas organofosforados como químicos inibidores de enzimas colinesterases. Por essa ação do composto, esses agrotóxicos apresentam baixa toxicidade para o ambiente, mas alta toxicidade para os organismos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2012) classifica os compostos de acordo com o seu parâmetro de DL50 (Dose letal para 50% dos organismos expostos), em Classe I (Extremamente Tóxicos – Faixa vermelha), Classe II (Altamente tóxicos – Faixa Amarela), Classe III (Medianamente Tóxicos – Faixa Azul) e Classe IV (Pouco Tóxicos – Faixa Verde).

5. Inseticida Clorpirifós

O Clorpirifós, cuja estrutura química pode ser observada na figura 5, é nominado, pela IUPAC, de 0,0-dietil-0-(3,5,6-tricloro-piridil)-fósforo-tionato. Esse inseticida pertencente ao grupo dos organofosforados e apresenta uma formulação líquida e emulsionável (ANVISA, 2021). O Clorpirifós é o ingrediente ativo de muitas formulações de agrotóxicos comerciais (inclusive o Klorpan®). Ele foi inicialmente fabricado e comercializado pela empresa Dow Chemical Company em 1965, nos Estados Unidos (SOLOMON et al, 2014).



Fig. 5. Fórmula estrutural do agrotóxico Clorpirifos ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$). (Fonte: ANVISA. Acesso em novembro de 2018).

Esse inseticida, que é considerado pela ANVISA (2021) como extremamente tóxico (Classe II), é registrado para controle de diversas pragas (moscas, lagartas, ácaros, pulgões e outros), que atacam culturas, como por exemplo, de milho, soja, feijão, café, algodão, citros, maçã, banana, batata, cenoura, repolho, tomate, couve e fumo. São agrotóxicos amplamente utilizados no país, sendo o quinto inseticida mais vendido no Brasil (VINHA et al., 2013).

Sua ação tóxica ocorre pela inibição da enzima colinesterase, causando síndrome colinérgica, portanto de ação neurotóxica (ES, 1999). Ele age sobre os insetos e ácaros por contato e ingestão, ocasionando a morte desses artrópodos. A colinesterase está relacionada ao bom funcionamento da memória e aprendizagem, e sua principal função é a modulação de impulsos nervosos responsáveis pela comunicação entre os neurônios, através da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ASSIS E CARVALHO, 2011). A interferência na fenda sináptica ocasionada por esses compostos está diretamente relacionada ao seu risco para a saúde humana, uma vez que essas substâncias podem ser absorvidas pelo homem pela pele, trato gastrointestinal, via respiratória e membranas das células de mucosas. Desta forma, existe grande preocupação com relação à contaminação de corpos hídricos por essas substâncias (PENA E SPERLING, 2003).

Os processos de biodegradação do clorpirifós podem se dar por bioativação, onde são gerados metabólitos tóxicos, como o tclorpirifós oxon, mas pode ser também por detoxificação, formando metabólitos não tóxicos, como o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (SANTANA E CAVALVANTE, 2016). Pela ação da citocromo p450, o clorpirifós gera um intermediário instável, que hidrolisa os compostos não tóxicos, os quais podem ser eliminados pela urina (WESSELING et al., 2006).

Em solos, a meia vida do clorpirifós é em torno de 60 a 120 dias, dependendo de fatores como pH e teor de carbono orgânico do solo, temperatura, clima, umidade e a flora presente. Entretanto, no ambiente, o composto pode sofrer modificações em sua estrutura, por mecanismo de hidrólise, fotólise e volatilização (ALEXANDRE, 2015).

6. Mutagênese ambiental

Muitos dos compostos químicos utilizados pelos seres humanos, como os agrotóxicos, fármacos, cosméticos, corantes, dentre outros, acabam tendo o meio ambiente como seu destino final. Assim, esses compostos podem impactar diferentes compartimentos ambientais, como a água, o ar, o solo e também os alimentos. Os resíduos de substâncias tóxicas presentes em ambientes contaminados podem atingir a biota local e causar sérios danos tanto aos organismos expostos como também aos seus descendentes. Os ensaios de mutagênese ambiental são projetados para detectar e avaliar efeitos genotóxicos e mutagênicos induzidos por contaminantes ambientais. Estas avaliações podem ser realizadas por diferentes sistemas testes, tanto por sistemas testes vegetais como por sistemas testes animais e por diferentes biomarcadores por meio de endpoints genéticos.

Dentre os vegetais comumente utilizados para avaliação da genotoxicidade dos compostos químicos, podemos destacar o sistema teste de *Allium cepa*. Estudos realizados desde 1938 já descreviam a sensibilidade deste vegetal para avaliar distúrbios no fuso mitótico e de aberrações cromossômicas (AC) nas células meristemáticas de suas raízes, após exposição a químicos como a colchicina e diferentes soluções de sais orgânicos (LEVAN, 1938, 1945). As vantagens de seu uso estão associadas à sua estrutura citogenética, cromossomos grandes e em pequeno número ($2n = 16$), a sua dinâmica de proliferação, sua fácil visualização em microscopia de luz, seu baixo custo experimental; sua facilidade de aplicação, além de produzir excelentes resultados comparáveis com os sistemas testes animais. Por essas características, a espécie é bastante indicada para avaliação de danos genéticos e de distúrbios no ciclo mitótico, induzidos por diversas classes de contaminantes ambientais, produzindo (FISKESJO, 1985; RANK e NIELSEN, 1994, CHAUHAN et al., 1999; FERNANDES *et al.*, 2007, 2009; LEME e MARIN MORALES, 2009; TEDESCO e LAUGHINGHOUSE, 2012).

Os ensaios com *A. cepa* são considerados eficientes e altamente preditivos para avaliar o potencial de indução de danos cromossômicos em organismos

expostos a compostos tóxicos. Assim, os resultados obtidos com esse sistema teste podem ser estendidos para outros seres vivos, como por exemplo os mamíferos, já que o alvo das lesões é o DNA, molécula esta comum a todos os seres vivos. Diferentes *endpoints* podem ser avaliados por meio dos ensaios com *A. cepa*, como, por exemplo, os de: toxicidade, realizados pela análise do índice de germinação de sementes e do comprimento da raiz e hipocótilo; citotoxicidade, por meio da análise do índice mitótico; genotoxicidade, como os de aberrações cromossômicas (AC) e normalidades nucleares (NA); e ainda os de mutagenicidade, pelo teste do micronúcleos (MN). Assim, pela grande eficiência da espécie detectar danos promovidos por diferentes compostos tóxicos, ela também é indicada para avaliar diferentes classes de contaminantes ambientais, ela vem sendo muito usada em estudos de biomonitoramento ambiental (LEME e MARIN-MORALES, 2009, LEME et al, 2008; BIANCHI et al., 2011; MAZZEO e MARIN-MORALES, 2015; GONÇALVES et al., 2020; Pamplona-et al. , 2020)

Na literatura, podem ser encontrados diversos trabalhos que utilizaram do teste de *A. cepa* para avaliar uma infinidade de compostos químicos, isolados ou em misturas complexas. Alguns exemplos incluem efluentes domésticos e industriais, efluentes agrícolas, agrotóxicos, corantes têxteis, corantes alimentícios, efluentes tratados, metais, nanopartículas, hidrocarbonetos aromáticos e químicos de maneira geral (incluindo nestes os voláteis e fotodegradáveis). (BIANCHI et al., 2011; DEBNATH et al., 2020; WIJEYARATNE e WICKRAMASINGHE, 2020; JAYAWARDENA et al., 2021)

A elevada e crescente utilização de agrotóxicos no mundo todo também tem gerado uma grande preocupação quanto ao destino de seus resíduos e os seus efeitos genotóxicos e mutagênicos para os seres vivos. O sistema teste de *A. cepa* tem sido utilizado com frequência em diferentes estudos que buscam avaliar os danos genéticos induzidos por diferentes agrotóxicos, em suas mais variadas classes químicas, incluindo nesses os organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretrina/piretróides, dentre outros.

Fatma et al. (2018) avaliaram, por meio do sistema teste *A. cepa*, os efeitos morfotóxicos, citotóxicos e genotóxicos de diferentes concentrações (10, 30, 50, 70,

90, 110, 130 e 150 ppm) e tempos de exposição (24 2 48h) do fungicida Mancozeb (ditiocarbamato). Os autores verificaram inibição no número e tamanho das raízes, bem como do índice mitótico, além de elevadas frequências de AC, para todas as concentrações testadas. Os tipos de AC mais encontradas foram aderências, fragmentação, desorientação dos cromossomos, c-metáfases, pontes, perdas e movimentação precoce dos cromossomos.

Uma outra forma de avaliar os efeitos de agrotóxicos pelo sistema teste *A. cepa* é por meio de simulação de aplicação do pesticida diretamente no solo. Esses experimentos são realizados em potes apropriados, para que o crescimento dos bulbos da planta não seja comprometido. Esta metodologia foi utilizada por Verma e Srivastava (2018), para avaliar os efeitos de diferentes concentrações (2.5, 5, 7.5, e 10 mg/kg de solo) e tempos de tratamento (1, 7, 15, 30 e 45 dias) do fungicida carbendazim (benzimidazol). Os autores verificaram que houve uma diminuição do índice mitótico dose e tempo dependente e indução significativa de AC (pontes, aderências, perdas e movimentação precoce dos cromossomos, bem como C-metáfases, multipolaridades, desorientação, distúrbios no fuso e células binucleadas) para todas as concentrações e tempos testados. Porém, foi verificado um aumento das lesões dependente da concentração até o dia 7. A partir deste tempo, as lesões não mais apresentaram correlação com as concentrações testadas. O sistema teste de *A. cepa* também foi utilizado por Macar (2020) para avaliar a citogenotoxicidade do fungicida Tetraconazol (triazol) em diferentes concentrações (1.00 mg/L, 5.00 mg/L e 10.00 mg/L). O autor verificou diminuição do índice mitótico e indução dose-dependente de AC (fragmentos, aderências, perdas e pontes cromossômicas, distribuição desigual da cromatina, vacuolização nuclear, polarização reversa e MN).

Tütüncü et al. (2019) avaliaram os efeitos citogenotóxicos de diferentes concentrações (2.5, 5.0, e 7.5 mg/L) do inseticida metiocarbe (carbamato), por meio do sistema de *A. cepa*. Foi verificado um decréscimo dos parâmetros fito e citotóxicos de porcentagem de raiz, comprimento da raiz, ganho de peso e índice mitótico. Os autores também observaram efeitos genotóxicos para o inseticida,

comprovado pelo alto índice de AC do tipo fragmentos, aderências, pontes e perdas cromossômicas, bem como distribuição desigual da cromatina e MN encontradas.

Diferentes concentrações do inseticida imidaclopride (3,6, 0,36 e 0,036 g/L) e do herbicida sulfentrazone (1,2, 0,6 e 0,06 g/L) foram avaliados por Bianchi et al. (2016), em diferentes tempos de tratamento (24 h exposição e 48 e 72 h de recuperação). O inseticida Imidaclopride induziu AC, principalmente dos tipos pontes e aderências cromossômicas no tratamento contínuo de 24h. Porém, após os períodos de recuperação com água de 48 e 72h, houve decréscimos nas porcentagens das AC. O tratamento com o herbicida sulfentrazone induziu diferentes tipos de AC como quebras, perdas e pontes cromossômicas e MN. Os autores também analisaram os efeitos conjunto da mistura destes agrotóxicos, cujos resultados mostraram efeitos genotóxicos significativos para a mistura, sendo estes diminuídos, após os tratamentos de recuperação com água, resultados esses semelhantes aos observados para o inseticida testado. Pelos resultados, os autores sugeriram que houve um efeito antagônico atuante na mistura, pela minimização dos efeitos do herbicida, conferidos pelo inseticida.

Sheikh et al. (2020) utilizaram o sistema de *A. cepa* para avaliar os efeitos citogenotóxicos da cipermetrina (cypermethrin) e do malathion (organofosforado), em diferentes concentrações (0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,5%; 1%; 1,5% e 2%) por 12 e 24 horas. Os autores verificaram uma diminuição do crescimento da raiz e do índice mitótico com o aumento das concentrações dos agrotóxicos e do tempo de exposição. Diferentes tipos de AC também foram induzidas pelos dois agrotóxicos, como aderências, pontes e perdas cromossômicas, c-metáfases e células binucleadas, indicando genotoxicidade associada ao uso dos mesmos.

Os organofosforados representam, como já citado, uma das classes de inseticidas mais utilizadas no Brasil (WHO, 2016). Assim, muitos são os trabalhos que buscam avaliar os efeitos destes compostos sobre a saúde humana e, para isso, muitos tem utilizado o sistema teste de *A. cepa* como modelo experimental. O potencial genotóxico de diferentes tempos de exposição (24h de tratamento e 48h de recuperação em água) e concentrações de inseticida Malathion (1,5, 0,75, 0,37, e 0,18 mg/mL) foram avaliados por Bianchi et al. (2015). Os autores verificaram

induções significativas de AC e MN para algumas das concentrações e tempos testados. Foi observado que as maiores concentrações apresentaram um efeito acumulativo sobre as células, visto que seus efeitos continuaram 48 h após o fim da exposição. Mercado e Caleño (2019) avaliaram a toxicidade e a citogenotoxicidade do herbicida glifosato (organofosforado) em diferentes concentrações (5, 10, 15, 25 e 30 mg/L), por 72 horas. Os autores verificaram uma diminuição nos comprimentos das raízes, bem como do índice mitótico, com o aumento das concentrações. O teste de genotoxicidade indicou indução de diferentes tipos de AC (MN, pontes, aderências e quebras cromossômicas, ausência de núcleo, núcleos alongados e anáfases irregulares. Pandir (2018) avaliou os efeitos do diazinon (organofosforado) (10, 40, 80 e 160 ppm) em células meristemáticas de *A. cepa*, por 24, 48 e 72 horas de exposição. Foi verificado inibição do crescimento da raiz e do índice mitótico e aumento de AC do tipo hiper cromasia, segregação tardia, MN, c-mitoses, perdas e aderências cromossômicas, cromatina em glóbulos e núcleos pulverizados, com o aumento das concentrações testadas.

Os efeitos citogenotóxicos dos organofosforados Clorpirifós e Monocrotofós foram avaliados, para diferentes concentrações (0,12, 0,25, 0,50, 0,75 e 1%), de um período de exposição de 4 h, por Sinha e Kumar (2014). Os autores verificaram diferentes tipos de AC, como perdas, aderências, pontes e fragmentos cromossômicos, células binucleadas e MN, que aumentaram, proporcionalmente, com o aumento das concentrações, para os dois agrotóxicos. Já o IM diminuiu com o aumento das concentrações.

Asita e Makhalemele (2008) avaliaram os efeitos citogenotóxicos de diferentes concentrações de quatro agrotóxicos de diferentes classes químicas [Clorpirifós (organofosforado), Alpha-thrin (piretróide), Efekto virikop (oxicloreto de cobre) e Springbok (glifosato)], por meio do ensaio com *A. cepa*, por 20 h. Clorpirifós, Alpha-thrin e Springbok foram citotóxicos, enquanto o Efekto virikop não. O ensaio de genotoxicidade apresentou resultados significativos para o Clorpirifós, Springbok e Efekto virikop, sendo que o clorpirifós induziu AC como aderências, atrasos, fragmentos e pontes cromossômicas, cromossomos descondensados, anáfases e telófases multipolares e cromossomos pulverizados, enquanto que o

Springbok e Efeko virikop induziram apenas perdas cromossômicas. O Alpha-thrin não apresentou genotoxicidade.

Com o controle cada vez mais rigoroso do uso de animais de laboratório em experimentos biológicos, tornou-se necessário o desenvolvimento e padronização de testes *in vitro*, para detecção os efeitos danosos de diversas substâncias químicas à saúde dos seres vivos. De acordo com Lewinska et al. (2007), ensaios com cultura de células constituem uma importante ferramenta de investigação básica, usada em diferentes áreas do conhecimento, como a imunologia, a virologia, a genética e a toxicologia ambiental. Para Carvalho (1996), uma das principais aplicações da cultura celular é a investigação da ação tóxica de vários compostos, como drogas, detergentes, cosméticos e agrotóxicos.

Estudos realizados por Chandrakar et al. (2020), avaliaram o potencial genotóxico do Malathion (organofosforado) e do Carbofuran (carbamato) em fibroblastos de gatos cultivadas *in vitro*, por meio dos ensaios de AC, MN e do cometa. Os autores expuseram as células à crescentes concentrações do malathion (5mM a 45mM) e do carbofuran (0,045mM a 1,08mM), por 24 e 48 horas. A avaliação das AC e MN, induzidos pelos agrotóxicos, foi feita por meio de ensaios realizados com bloqueadores metafásicos e para o ensaio do cometa foi considerado o parâmetro comprimento da cauda (tail length), classificando-os em diferentes classes, de acordo com o grau do dano observado. O teste de AC indicou uma indução de aberrações cromossômicas dependente da dose, com indução de quebras cromatídicas, fragmentos, deleções, gaps, associação de satélites, formação de fragmentos e Mn. O ensaio do cometa indicou genotoxicidade para as maiores concentrações testadas dos dois agrotóxicos, comprovada pela visualização das caudas formadas por quebras na dupla fita de DNA. Com estes resultados, os autores puderam demonstrar a eficiência dos testes de AC, MN e do cometa realizados em cultura de células de mamífero na avaliação da genotoxicidade do Carbofuran e Malathion.

Esse artigo de revisão de baseou em publicações disponíveis nas mais importantes e reconhecidas bases de dados científicos internacionalmente, como: PubMed, Scielo, Science Direct, Web of Science, Taylo & Francis Online;

Medline, bem como em sites de agências ambientais de saúde internacionais, como OECD Online e USEPA. Nesta revisão foram abordados temas como uso de agrotóxico nas culturas brasileira; contaminação ambiental e efeitos sobre a saúde humana promovidos por orgânicos, incluindo nesses o inseticida clorpirifós; citogenotoxicidade e mutagenicidade desses compostos, bioindicadores e métodos mais utilizados nas avaliações tóxicas desses agentes.

REFERENCIAS

ALBERGONI, L; PELAEZ, V. **Da revolução verde à agrobiotecnologia: ruptura ou continuidade de paradigmas?**. Revista de Economia, v. 33, n. 1, 2007.

ALEXANDRE, D., CARNIEL, L. S. C., MALLMANN, G. C., SAVI, A., & KLAUBERG FILHO, O. **Efeitos de clorpirifós sobre organismos da fauna edáfica em solos naturais**. Organizadora, p. 98, 2015

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilancia Sanitária. Reclassificação toxicológica de agrotóxicos. **Acesso em jun de 2021**. Disponível em <http://antigo.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=5578706&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos-&inheritRedirect=true>

AQUINO, A. **Intoxicação por organofosforados no Brasil**. Tese de Doutorado. Faculdade de educação e meio ambiente. Ariquemes, Rondônia, 2011

ARORA, O.P.; SHAH, V.C.; RAO, S.R.V. **Studies on micronuclei induced by mytomicin-C in the root cells of *Vicia faba***. Experimental Cell Research, v. 56, p. 443-448, 1969

ASITA AO, MAKHALEMELE R. **Genotoxicity of Chlorpyrifos, Alpha-thrin, Efeito virikop and Springbok to onion root tip cells**. African Journal of Biotechnology, 7 (23), 4244-4250, 2008

ASSIS, C. R. D., BEZERRA, R. S., & CARVALHO, L. B. **Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides**. Pesticides in the modern world-pests control and pesticides exposure and toxicity assessment, 13, 253-278, 2011

AVALOS, C. **El polémico uso de agroquímicos**. Revista Generación, v.134, p. 10-15, 2009

- BATISTA GONÇALVES, J., & CESTARIZYCHAR, B. **Utilização de agrotóxicos, consumo de alimentos com os agroquímicos e seus efeitos sobre o sistema endócrino.** InterfacEHS, v. 14, n. 2, 2019
- BELO, M. S. D. S. P., PIGNATI, W., DORES, E. F. G. D. C., MOREIRA, J. C., & PERES, F. **Uso de agrotóxicos na produção de soja do Estado do Mato Grosso: um estudo preliminar de riscos ocupacionais e ambientais.** Revista Brasileira de Saúde Ocupacional, v. 37, p. 78-88, 2012
- BIANCHI J, MANTOVANI MS, MARIN-MORALES MA. **Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture.** Journal of Environmental Sciences v. 36, p. 102-111, 2015
- BORSOI, A., DOS SANTOS, P. R. R., TAFFAREL, L. E., & JÚNIOR, A. C. G. **Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente.** Acta Iguazu, v.3, p.86-100, 2014
- BRASIL DE FATO. **Fazendeiros são multados por pulverização de agrotóxicos que atingiu criança no MA.** Acesso em maio de 2021. Disponível em <<https://www.brasildefato.com.br/2021/05/05/fazendeiros-sao-multados-por-pulverizacao-de-agrotoxicos-que-atingiu-crianca-no-ma#:~:text=Sem%20licenciamento%20ambiental%2C%20atividade%20de,valor%20de%20273%20mil%20reais&text=Andr%C3%A9%20Lucas%2C%20de%207%20anos,Buriti%2C%20no%20estado%20do%20Maranh%C3%A3o>>
- BRONDANI, V. D. F., PIZOLOTTO, A. L. Z., ILHA, S., & ZAMBERLAN, C. **Exposição a agroquímicos e a relação com doenças crônicas: revisão narrativa.** Disciplinarum Scientia| Saúde, 19(2), 201-206, 2018
- CHANDRAKAR TR, SINGH AP, SARKHEL BC, BAGCHI SN. **In vitro cytotoxicity and genotoxicity assessments of carbofuran and malathion pesticides on cat (*Felis catus*) fibroblast cells.** Biomed. & Pharmacol. J, 13(3), 1157-1168, 2020
- CHAUHAN, L.K., SAXENA, P.M., GUPTA, S.K. **Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*.** Environmental and Experimental Botany, v.42, p. 181-189. 1999
- CIRCUNVIS, B. C. **Organoclorados E Organofosforados: Principais Características E Seus Efeitos Potencias À Saúde Humana.** Revista uningá review, v. 3, p. 4-4, 2010
- CLORPIRIFÓS. **Monografias atualizadas.** Acesso em jun de 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/c/4226json-file-1>>

D'AMATO, C., TORRES, J. P., & MALM, O. **DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental-uma revisão**. Química Nova, 25(6a), 995-1002, 2002

DELLAMATRICE, P. M., & MONTEIRO, R. T. **Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 18, 1296-1301, 2014

ES, E. D. **Comparative study of inhibition of brain and plasma cholinesterase and hepatic and plasma aliesterases in young and adult rats following exposures to three organophosphorothionate insecticides**. Egyptian Journal of Physiological Sciences. 1999; 23 (1-2): 149-177, 1999

FATMA F, VERMA S, KAMAL A, SRIVASTAVA A. **Monitoring of morphotoxic, cytotoxic and genotoxic potential of mancozeb using *Allium* assay**. Chemosphere 195, 864-870, 2018

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

FISKESJÖ, G. **Benzo[a]pyrene and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in the *Allium* test**. Hereditas, v.95, p. 155-162, 1981.

GILSON, I. K., VIEIRA, M. G., STEINKI, G., & DA COSTA CABRERA, L. **Predição teórica da contaminação por agrotóxicos nos recursos hídricos de realça, paraná**. Biodiversidade, v. 19, n. 2, 2020.

GOMES, M. A. F., SPADOTTO, C. A., & PESSOA, M. C. P. **Avaliação da vulnerabilidade natural do solo em áreas agrícolas: subsídio à avaliação do risco de contaminação do lençol freático por agroquímicos**. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 12, 2002

GONÇALVES, V. D., COELHO, M. D. F. B., & CAMILI, E. C. **Bioensaios em sementes de *Lactuca sativa* L. com extrato de folhas de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.** Revista Internacional de Ciências, v. 6, p. 160-170, 2016

GOVONI, B., CONTE, A. M., GODOY, B. R. B., & BOEIRA, J. M. **Análise da exposição direta e indireta à compostos agroquímicos: biomonitoramento da saúde humana**. Brazilian Journal of Development, v. 5, p. 15668-15674, 2019

HU Y, JI L, ZHANG Y, SHI R, HAN W, TSE LA, PAN R, WANG Y, DING G, XU J, ZHANG Q, GAO Y, TIAN Y. **Organophosphate and Pyrethroid Pesticide Exposures Measured before Conception and Associations with Time to Pregnancy in Chinese Couples Enrolled in the Shanghai Birth Cohort**. Environ Health Perspect. v. 9; p. 126, 2018

INCA- INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **Exposição no trabalho e no ambiente**. Acesso em Agosto de 2021. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos>>

Bianchi, J., Espindola, E. L. G., & Marin-Morales, M. A. **Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents**. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 74, p. 826-833, 2011

LEME, D. M., DE ANGELIS, D. D. F., & MARIN-MORALES, M. A. **Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells**. *Aquatic Toxicology*, 88(4), 214-219, 2008

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. ***Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application**. *Mutation Research*, v. 682, p. 71-81, 2009

LEVAN A. **Cytological reactions induced by inorganic salt solutions**, *Nature*. v. 156, p. 751-752, 1945

LEVAN, A. **The effect of colchicines in root mitosis in *Allium***. *Hereditas*, v. 24, p. 471-486, 1938

LEWINSKA, A.; WNUK, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G. **Total anti-oxidant capacity of cell culture media**. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 34, p. 781-786, 2007

LINHARES, A. G. **Efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos sobre a acetilcolinesterase eritrocitária humana e seu potencial uso como biomarcador da exposição ocupacional**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2013

LOTTI, M., & JOHNSON, M. K. **Repeated small doses of a neurotoxic organophosphate**. *Archives of toxicology*, v. 45, p. 263-271, 1980

M.J. PALMIERI, J. LUBER, L.F. ANDRADE-VIEIRA, L.C. DAVIDE. **Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: a comparative approach**. *Mutat. Res.*, v. 763, p. 30-35, 2014

MACAR O. **Multiple toxic effects of tetraconazole in *Allium cepa* L. meristematic cells**. *Environmental Science and Pollution Research*. v. 28, n. 8, p. 10092-10099, 2020

MAZZEO, D. E. C., & MARIN-MORALES, M. A. **Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nucleolar alterations**. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22. p. 9796-9806, 2015

MELO DE CASTRO, T., ARAÚJO FIRMO, W. D. C., ARAÚJO MENDONÇA SILVA, F. D. M., FERREIRA DA SILVA, D., & CHAGAS SILVA, M. R. **Vulnerabilidade do Solo em Área Agrícola à Contaminação por Agrotóxicos.** Revista FSA, v. 17, 2020

MENDONÇA, A. C. R. **Análise jurídica sobre a nocividade dos agrotóxicos no estado de Goiás.** Dissertação de mestrado. PUC Goiás, 2020

MENEZES, J. D. F. F., DOS SANTOS, J. V. P., DUTRA, J. A. D. S. S., TAVARES, M. G., & GUIMARÃES, H. A. **Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos: análise dos impactos causados na saúde humana e ambiental.** Biológicas & Saúde, v. 11, p. 19-35, 2021

MENEZES, J. D. F. F., DOS SANTOS, J. V. P., DUTRA, J. A. D. S. S., TAVARES, M. G., & GUIMARÃES, H. A. **Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos: análise dos impactos causados na saúde humana e ambiental.** Biológicas & Saúde, v. 11, p. 19-35, 2021

MERCADO SAS, CALEÑO JDQ. **Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator,** Science of the Total Environment. v. 700, p. 134452, 2020.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Insumos agropecuários.** Acesso em jul de 2021. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/ATOSADJUVANTES>>

MOREIRA, R. J. **Críticas ambientalistas à revolução verde.** Estudos sociedade e agricultura. Estudos Sociedade e Agricultura, v. 8, n. 2, 2000

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

PAMPLONA-SILVA, M. T., GONÇALVES, L. C., DO CARMO BITTENCOURT-OLIVEIRA, M., & MARIN-MORALES, M. A. **DNA damages induced by both endotoxin and exotoxin produced by cyanobacteria.** Chemosphere, 254, 126716, 2020

PANDIR D. **Assesment of the genotoxic effect of the diazinon on rootcells of *Allium cepa* (L.)** Braz. Arch. Biol. Technol. v.61: e18160390, 2018

PAUL, K. C., CHUANG, Y. H., COCKBURN, M., BRONSTEIN, J. M., HORVATH, S., & RITZ, B. **Organophosphate pesticide exposure and differential genome-wide DNA methylation.** Science of the Total Environment, v. 645, p.1135-1143, 2018

PENA, M., Cruz, I., & SPERLING, E. V. **Contaminação ambiental por resíduos de agrotóxicos aplicados via irrigação por aspersão.** In Embrapa, 2003

MILHO E SORGO, A. **Saneamento ambiental: ética e responsabilidade social**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22. Rio de Janeiro, RJ: ABES/AIDIS, 2003

PERIPOLLI, M. Q., & RODRIGUES, S. **Levantamento da ocorrência de casos de má formação congênitas no município de Cachoeira do Sul durante os anos de 2000 a 2002: busca de uma correlação entre a incidência com o uso de agrotóxicos no município**. Salão de iniciação Científica (14.: 2002: Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2002

PERRY, J., COTTON, J., RAHMAN, M. A., & BRUMBY, S. A. **Organophosphate exposure and the chronic effects on farmers: a narrative review**. Rural and remote health, v. 20, p.4508-4508, 2020

QUEIROZ, P. R. **Intoxicações por agroquímicos no Brasil: análise temporal das características epidemiológicas**. Dissertação de mestrado. Mestrado Profissional em Sistemas Agroindustriais (Pombal), 2016

RANK, J.; NIELSEN, M.H. **Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater**. Mutation Research, v.312, p.17-24, 1994

RENJANA PK, ANJANA S, THOPPIL JE. **Evaluation of genotoxic effects of baking powder and monosodium glutamate (MSG) using *Allium cepa* assay**. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 5, 132e139, 2013

REYNOSO, E. C., TORRES, E., BETTAZZI, F., & PALCHETTI, I. **Trends and perspectives in immunosensors for determination of currently-used pesticides: the case of glyphosate, organophosphates, and neonicotinoids**. Biosensors, v. 9, p. 20, 2019

RIBEIRO, A. C. C., & MELLA, E. A. C. **Intoxicação ocupacional por organofosforados—a importância da dosagem de colinesterase**. Iniciação Científica Cesumar, v. 9, p. 125-134, 2007

RIGOTTO, R. M., VASCONCELOS, D. P., & ROCHA, M. M. **Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública**. Cadernos de Saúde Pública, v. 30, p. 1360-1362, 2014

SADOWSKI, A., & BAER-NAWROCKA, A. **Food and environmental function in world agriculture—Interdependence or competition?**. Land Use Policy, v. 71, p. 578-583, 2018

SÁNCHEZ-BAYO, F. **Impacts of agricultural pesticides on terrestrial ecosystems**. Ecological impacts of toxic chemicals, p. 63-87, 2011

- SANTANA, L. M. B. M., & CAVALCANTE, R. M. **Transformações metabólicas de agrotóxicos em peixes: uma revisão.** Orbital: The Electronic Journal of Chemistry, v. 8, p. 257-268, 2016
- SANTOS, H. T. D., CARVALHO, D. F. D., SOUZA, C. F., & MEDICI, L. O. **Cultivo de alface em solos com hidrogel utilizando irrigação automatizada.** Engenharia Agrícola, v. 35, p. 852-862, 2015
- SANTOS, J. A. T., SELEGHIM, M. R., NERILO, S. B., FERNANDEZ, L. S., & DE OLIVEIRA, M. L. F. **Inseticidas organofosforados e intoxicação humana: uma revisão da produção científica sobre o tema.** SaBios-Revista de Saúde e Biologia, v. 10, p. 54-65, 2015
- SANTOS, V. M. R. D., DONNICI, C. L., DACOSTA, J. B. N., & CAIXEIRO, J. M. R.. **Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais.** Química Nova, v. 30, p. 159-170, 2007
- SARWAR, M. **The dangers of pesticides associated with public health and preventing of the risks.** International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering, v. 1, p. 130-136, 2015
- SHEIKH N, PATOWARY H, LASKAR RA. **Screening of cytotoxic and genotoxic potency of two pesticides (malathion and cypermethrin) on *Allium cepa* L.** Molecular & Cellular Toxicology, v. 16, n. 3, p. 291-299, 2020.
- SINHA VS, KUMAR NJ. **Assessment of mito-inhibitory and genotoxic effects of two organophosphate pesticides in the root tip cells of *Allium cepa* L.** Annals of Plant Sciences, v. 3, p. 699-703, 2014
- SOLOMON, K. R., WILLIAMS, W. M., MACKAY, D., PURDY, J., GIDDINGS, J. M., & GIESY, J. P. **Properties and uses of chlorpyrifos in the United States. Ecological risk assessment for chlorpyrifos in terrestrial and aquatic systems in the United States,** p. 13-34, 2014
- SPADOTTO, C., & GOMES, M. **Resíduos de agroquímicos no ambiente.** Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico, 2006.
- TEDESCO SB, LAUGHINGHOUSE IVHD. **Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test.** In: Srivastava J, editor. Environmental contamination. Croatia: InTech; p. 137-156, 2012
- TERRY, A. V. JR. **Functional consequences of repeated organophosphorate exposure: potential non cholinergic mechanisms.** Pharmacol Ther, v. 134, n. 3, p. 355-65, 2012
- THE GUARDIAN. **UN experts denounce 'myth' pesticides are necessary to feed the world.** Acesso em Agosto de 2021. Disponível em

<https://www.theguardian.com/environment/2017/mar/07/un-experts-denounce-myth-pesticides-are-necessary-to-feed-the-world?CMP=share_btn_fb&fbclid=IwAR3G-9bYiv8kRUE7wH6XCmECx32N366jMMJaNnxWxiWWMCvxGZ6sngRg7XI>

TÜTÜNCÜ E, YALÇIN E, ACAR A, YAPAR K, ÇAVUŞOĞLU K. **Investigation of the Toxic Effects of a Carbamate Insecticide Methiocarb in *Allium cepa* L.** Cytologia 84(2): 113-117, 2019

VALE, J. A. **Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning.** Toxicology Letters, v. 102, p. 649-652, 1998

VERGARA, F. **Clorpirifós na gestação: riscos para a fertilidade dos descendentes?.** Dissertação de Mestrado. Acervo digital UFPR, 2015

VERMA S, SRIVASTAVA A. **Cyto-genotoxic consequences of carbendazim treatment monitored by cytogenetical analysis using *Allium* root tip bioassay.** Environ Monit Assess, v. 190, n. 4, p. 1-10, 2018.

VINHA, M. B., DE OLIVEIRA PINTO, C. L., PINTO, C. M. F., DE SOUZA, C. F., DE MIRANDA SOUZA, M. R., & DE OLIVEIRA, L. L. **Impactos do uso indiscriminado de agrotóxicos em frutas e hortaliças.** Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável, 2013

WESSELING, C., ARAGÓN, A., ROJAS, M., BLANCO, L., LÓPEZ, L., SOTO, A., ... & LÓPEZ, I. **Efectos del clorpirifos en la salud de trabajadores bananeros de La Lima, Honduras,** 2006

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Safer access to pesticides: experiences from community interventions.** Geneva. p. 55, 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Ottawa Charter for Health Promotion. Geneva, Switzerland: WHO.** Acesso em Agosto de 2021
Disponível em
<<http://www.who.int/healthpromotion/conferences/previous/ottawa/en/index.html>>

YANG, KJ, LEE, J., & PARK, HL. **Exposição a pesticidas organofosforados e risco de câncer de mama: uma revisão rápida de estudos em humanos, animais e baseados em células.** Jornal internacional de pesquisa ambiental e saúde pública , v. 17, p. 5030, 2020

ARTIGO 2

Investigação de efeitos fitotóxicos, citogenotóxicos e mutagênicos de diferentes concentrações do inseticida Clorpirifós sobre bioindicadores vegetais.

Mariana Santos Costa, Maria Aparecida Marin-Morales

RESUMO

O aumento da produção agrícola leva também ao aumento do uso de agrotóxicos, que acaba causando sérios impactos ambientais e prejuízos à saúde humana. Os agrotóxicos são substâncias químicas que podem persistir por longos períodos no ambiente, o que acaba agravando ainda mais essa situação. A economia brasileira tem uma forte dependência da agricultura e, por isso, o agronegócio faz com que o Brasil seja um dos maiores consumidores mundiais dessa substância. Os inseticidas são os agrotóxicos mais utilizados na agricultura e, dentro dessa classe, o clorpirifós é um dos químicos mais usados em áreas agrícolas brasileira. Esse inseticida do grupo dos orgânicos tem sido relacionado a infertilidade, disfunções motoras e neurológicas e também com indução de câncer, fatos esses que levam a uma grande preocupação, quanto ao seu potencial poluidor. Este estudo avaliou o potencial fitotóxico, de seis concentrações (10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg mL⁻¹), e os efeitos citogenotóxico e mutagênico de quatro concentrações (2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg mL⁻¹) do produto comercial Klorpan (Clorpirifós), por meio de ensaios com os bioindicadores *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. Pelos resultados obtidos no estudo, todas as concentrações testadas do inseticida não alteraram os resultados de índice mitótico, quando comparados com os resultados do controle negativo, mas induziram um aumento significativo de brotos em células meristemáticas, alterações indicativas de genotoxicidade da substância. A presença de micronúcleo em células F1 de *Allium cepa*, para três concentrações testadas do inseticida (2,5; 1,25; 0,625 mg mL⁻¹), indicaram que o efeito genotóxico, observado em células meristemáticas de *Allium cepa*, foi fixado nas células F1, indicando que a genotoxicidade do inseticida derivou em um efeito mutagênico para o bioindicador utilizado no ensaio.

Palavras chave: Toxicidade, Organofosforado, Micronúcleo, Fitotoxicidade, *Allium cepa*, *Lactuca sativa*

ABSTRACT

The increase in agricultural production also leads to an increase in the use of pesticides which ends up causing serious environmental impacts and damage to human health. Pesticides are chemical substances that can persist for long periods in the environment, which ends up aggravating this situation even further. The Brazilian economy is heavily dependent on agriculture and, therefore, agricultural business makes Brazil one of the world's largest consumers of this substance. Insecticides are the most used pesticides in agriculture and, within this class, chlorpyrifos is one of the most used chemicals in agricultural areas in Brazil. This insecticide from the group of organophosphates has been related to infertility, motor and neurological disorders and also to cancer induction, facts that lead to great concern regarding its polluting potential. This study evaluated the phytotoxic potential of six concentrations (10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg mL⁻¹) and the cytogenotoxic and mutagenic effects of four concentrations (2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg mL⁻¹) of the commercial product Klorpan (Chlorpirifós), through tests with the bioindicators *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. According to the results obtained in the study, all tested concentrations of the insecticide did not alter the mitotic index results, when compared to the negative control results, but induced a significant increase in sprouts in meristematic cells, alterations indicative of the substance's genotoxicity. The presence of micronucleus in *Allium cepa* F1 cells, for three tested concentrations of the insecticide (2,5; 1,25; 0,625 mg mL⁻¹), indicated that the genotoxic effect, observed in *Allium cepa* meristematic cells, was fixed in the cells F1, indicating that the insecticide's genotoxicity resulted in a mutagenic effect for the bioindicator used in the assay.

Keywords: Toxicity, Organophosphate, Micronucleus, Phytotoxicity, *Allium cepa*, *Lactuca sativa*

1. Introdução

O Brasil possui extensas área agricultáveis, sendo então considerado um dos maiores produtores agropecuários do mundo. Contudo, embora o agronegócio seja, há muito tempo, um dos principais setores da economia brasileira, ele também coloca o Brasil como um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (SUCEN, 1994). Levando em consideração os cultivos mais predominantes do país, como o milho (21%), a soja (42%) e cana-de-açúcar (13%), foi estimado que, só em 2015, o houve uma aplicação estimada de 899 milhões de litros de agrotóxicos nessas culturas (PIGNATI et al., 2017).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2021), desde 2017 o Brasil bate recorde no registro e liberação de novos agrotóxicos, passando de 404 para 493 novos químicos em 2020. Conseqüentemente houve aumento nos casos de intoxicação por agrotóxicos no Brasil. O Ministério da Saúde (2020) estima aproximadamente 14.664 casos de intoxicação em 2019, porém ainda citam que esse valor pode ser 50 vezes maior, uma vez que existe uma precariedade em relação as notificações de casos de intoxicação por agrotóxicos principalmente devido a maioria dos casos acontecer na zona rural.

Os agrotóxicos são compostos químicos que têm como função controlar, repelir ou prevenir pragas como insetos, roedores ou plantas invasoras de cultura (AMADEU CERQUEIRA DE MIRANDA; FERNANDES MELO; EDUARDO DE ARAUJO, 2018). Dessa forma, entende-se que, como essas substâncias apresentam toxicidade para espécies vegetais e animais, conseqüentemente, elas também têm efeitos sobre os organismos presentes no meio ambiente, (BRAGANÇA et al., 2018). Quando esses produtos são aplicados nas lavouras, eles não só afetam os organismos alvo de interesse, mas, como contaminam os mais variados compartimentos ambientais (solo, água, ar) e os alimentos, eles também oferecem sérios riscos aos trabalhadores agrícolas, aos consumidores de alimentos contaminados e à população do entorno das culturas, caracterizando assim um problema de saúde pública (PIGNATI; MACHADO, 2011) .

O Clorpirifós é um inseticida da classe dos organofosforados, amplamente usado em cultivos de soja, feijão, batata e milho (MAPA, 2018). De acordo com o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2018), o uso desse inseticida no Brasil aumentou, nos últimos anos, em cerca de 50%. Esse agrotóxico atua por bloqueio da enzima colinesterase, impedindo a ação da acetilcolina nas sinapses nervosas, provocando paralisia muscular do inseto. Ele pode atingir a água e ser fonte de contaminação para peixes e invertebrados aquáticos, e ainda se acumular nos tecidos desses animais (GVOZDENAC; INDJIC; VUKOVIC, 2013).

Sua toxicidade foi relacionada a distúrbios neurológicos, endócrinos, hematológicos e reprodutivos em animais e humanos (PERTALI et al., 2021). Anjum e Malik (2013) apontam que os organofosforados podem apresentar ainda propriedades como mutagenicidade e genotoxicidade, mesmo em concentrações mais baixas que as consideradas seguras, em relação a inibição de acetilcolinesterase. Nesse estudo, os autores avaliaram a mutagenicidade de águas residuais de indústria de inseticidas e concluíram que o efeito mutagênico desse composto pode representar um risco de indução de neoplasias para seres humanos.

A presença dessas substâncias no ambiente pode, pela sua capacidade de interação com o DNA, promover alterações cromossômicas numéricas e estruturais, como foi observado nos estudos realizados por Bianchi et al. (2012). Os autores encontraram efeitos genotóxicos e mutagênicos para baixas concentrações de um outro inseticida organofosforado (Malathion), tanto para células do bioindicador *Allium cepa* como para células da linhagem HTC (derivadas de hepatoma de *Rattus norvegicus*).

A realização de ensaios com bioindicadores vegetais apresenta algumas vantagens, como a facilidade de aplicação e a rapidez na obtenção de resultados, quando comparados com os ensaios realizados com animais (GRANT, 1994). Esses organismos, por serem muito sensíveis a ação de agentes químicos, são caracterizados como excelentes modelos genéticos para estudos de efeitos citogenéticos e mutagênicos (GRANT, 1994; CABUGA JR. et al., 2017). Os ensaios

realizados com a espécie *Allium cepa* (cebola) têm se mostrado eficientes para avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade de poluentes ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2009), pois permitem analisar distúrbios no ciclo mitótico e avaliar diferentes *endpoints* genéticos que provocam danos ao DNA (NEFIC et al., 2013). De acordo com Fiskejo (1985), os resultados obtidos pelos ensaios de *A. cepa* podem também indicar se a substância testada tem algum potencial para causar danos em outros organismos.

A região meristemática de *A. cepa* é utilizada em avaliações de *endpoints* de genotoxicidade (aberrações cromossômicas), como, por exemplo, anáfases multipolares, poliploidia e C-metáfases, que são indicativas de alterações no ciclo celular, decorrentes de problemas no fuso mitótico (ALBAS et al., 2014) ou pontes e quebras cromossômicas, indicativas de ação do agente sobre o material genético (FERNANDES et al., 2009). Já o ensaio com células F1, detecta a presença de micronúcleos, sendo considerado um excelente indicador de mutagenicidade (ÇAVAŞ; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). Além do modelo *A. cepa*, outras plantas também têm sido utilizadas como modelos para investigação de efeitos fitotóxicos de contaminantes ambientais, como, por exemplo, a espécie *Lactuca sativa* (alface). O uso desse vegetal permite investigar se o agente interfere tanto na germinação das sementes como no desenvolvimento da planta. É um bioensaio simples, de baixo custo e de rápida execução (PRIAC; BADOT; CRINI, 2017) .

No presente trabalho, foi avaliado o potencial que diferentes concentrações do pesticida clorpirifós tem de induzir aberrações cromossômicas, micronúcleos e alterações no ciclo mitótico de células meristemáticas e F1 de *Allium cepa*. A fitotóxicidade desse químico também foi avaliada pelos testes de germinação e de desenvolvimento da raiz e do hipocótilo, realizados com o modelo *Lactuca sativa*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Substancia testada

O agrotóxico avaliado neste estudo foi o inseticida clorpirifós, que tem como nome molecular O, O- dietil- O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato, fórmula

química $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ (WATTS, 2012) e está disponível para comercialização sob o nome Klorpan 480 EC (concentrado emulsionável).

O valor de 480 indica que o Klorpan apresenta 480g de clorpirifós em sua composição.

2.2. Preparo das soluções

Foram preparadas com o inseticida Clorpirifós seis diferentes concentrações, que foram utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade, citogenotoxicidade e mutagenicidade. A maior concentração foi preparada a partir da diluição do produto comercial (Klorpan 480 EC) em água de osmose, conforme recomendação do fabricante, para uso agrícola (proporção 1:100 - v:v). As cinco demais concentrações foram processadas por diluições de 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg mL⁻¹ da primeira concentração, em água de osmose reversa.

2.3. Ensaios de citogenotoxicidade com *Allium cepa*

Os bioensaios com *A. cepa* foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Grant (1928), com modificações. Foram usadas sementes de variedade baia periforme, as quais foram dispostas em placas de Petri. O experimento foi realizado em placas de Petri forradas com papel filtro. Foram acondicionadas 100 sementes/ placas e adicionado 5 mL dos tratamentos em cada placa. O controle negativo (CN) foi realizado com água de osmose reversa e os controles positivos (CP) com o herbicida Trifluralina (2,6-dinitro-N, N-dipropyl-4-trifluoro-methylaniline) a 0,84 mg/mL e com Metil metafulfonato (MMS), na concentração de 4×10^{-4} M. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

As placas de Petri foram dispostas e mantidas em BOD por 5 dias a 22 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram contabilizadas as sementes germinadas/placa e fixadas as raízes em solução de Carnoy (3:1, de etanol absoluto: ácido acético glacial - v:v). Para a confecção das lâminas, as raízes foram hidrolisadas em HCL 1N a 60°, por 8 minutos, e depois submetidas ao reativo de Schiff (reação de Feulgen), para coloração dos meristemas radiculares. As raízes

foram seccionadas para a separação da região meristema e da região F1, a serem utilizadas na confecção das lâminas.

2.3.1. *Teste de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de Allium cepa*

Para os ensaios do Índice Mitótico (IM) e de Aberrações Cromossômicas (AC), foram confeccionadas lâminas com meristemas radiculares de *A. cepa*, submetidos aos diversos tratamentos descritos anteriormente. As regiões meristemáticas das radículas previamente submetidas à reação de Feulgen foram dispostas em lâminas, para receberem uma gota de carmim acético (1%), usado como contra-corante, para facilitar a análise microscópica do material. Foram confeccionadas 4 lâminas de cada réplica, totalizando 12 lâminas/tratamento e analisadas 500 células por lâmina, totalizando 6.000 células/tratamento. A análise foi feita em microscopia de luz, em aumento de 1000 vezes.

A avaliação dos efeitos citotóxicos foi realizada pelos dados do IM, obtidos pelo número total de células em divisão/número total de células contadas, para cada lâmina analisada. Para a análise dos efeitos genotóxicos, foram considerados todos os tipos de ACs (brotos nucleares, C-metáfases, pontes, perdas e quebras cromossômicas, células micronucleadas, dentre outras), presentes em todas as fases do ciclo celular (Intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase).

A análise estatística dos ensaios descritos foi feita pelo software RStudio®. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, foi usado o teste de Kruskal-Wallis com post-hoc em Duun, e para dados com distribuição normal, o teste ANOVA. Todos os resultados dos tratamentos realizados foram comparados com os dados do CN.

2.3.2. *Teste do Micronúcleo em células F1 de Allium cepa*

Os ensaios com células da região F1 de *A. cepa* foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Ma et al. (1995). Esses ensaios foram utilizados para quantificar os efeitos mutagênicos do inseticida clorpirifós.

A região F1 das radículas fica localizada cerca de 1mm acima da região meristemática. Para o ensaio do MN com células F1, foram confeccionadas lâminas com as mesmas etapas descritas para a região meristemática. Foram confeccionadas 4 lâminas/réplica, totalizando 12 lâminas/tratamento e analisadas 500 células/lâmina, totalizando 6.000 células/tratamento. A análise da lâmina foi feita em microscopia de luz, em aumento de 400 vezes, as análises estatísticas foram feitas com o software RStudio®.

2.4. Ensaio de fitotoxicidade com *Lactuca sativa*

O ensaio de fitotoxicidade com *Lactuca sativa* foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Sobrero e Ronco (2004). Vinte sementes de *L. sativa* (variedade crespa - Grand Rapids) foram dispostas em placas de Petri recobertas com papel filtro umedecido com 5 mL de cada tratamento descrito anteriormente (6 concentrações). O CN foi realizado com água de osmose reversa e o CP com sulfato de zinco heptahidratado (0,05 M) (LOPES, 2014). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

As placas de Petri foram mantidas em BOD, no escuro, por 5 dias a 22 °C. Após esse período, foram contabilizadas as sementes germinadas por placa e foram realizadas as mensurações das radículas e dos hipocótilos, utilizando um paquímetro digital.

A análise estatística foi feita com o software RStudio®. Para dados de distribuição normal, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis com post-hoc em Dunn, e para dados com distribuição normal, o teste ANOVA com post-hoc em Dunnet. Todos os resultados dos tratamentos realizados foram comparados com os dados do CN.

3. Resultados

3.1 Bioensaio com *Allium cepa*

Pelo ensaio de germinação com *A. cepa*, foi possível observar que houve redução significativa na germinação das sementes expostas às três maiores concentrações testadas do inseticida clorpirifós (10; 5 e 2,5 mg mL⁻¹), conforme pode

ser visto na Figura 1. Pelo baixo índice de germinação registrado para as concentrações de 10 e 5 mg mL⁻¹, não foi possível coletar material suficiente para dar seguimento aos testes com essas amostras. Desta forma, os resultados apresentados para índice mitótico, aberrações cromossômicas e frequência de micronúcleos referem-se apenas às demais concentrações testadas (2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg mL⁻¹).

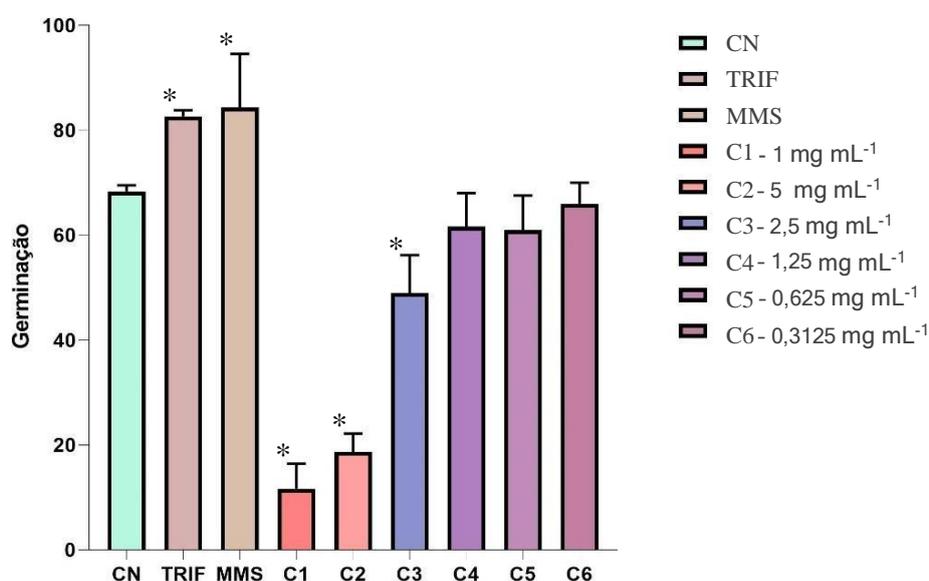


Figura 1. Resultado do ensaio de germinação em *Allium cepa*. As barras de erro representam o desvio padrão (DP), CN: controle negativo, TRIF: Controle positivo trifluralina, MMS: Controle positivo metil metanosulfonato, C1 a C6: concentrações do produto comercial. * Diferença estatística em relação ao CN (ANOVA, $p < 0,05$; post-hoc em Dunnet).

Quanto ao índice mitótico, nenhuma das concentrações avaliadas mostrou diferença estatística significativa em relação ao controle negativo, e nenhum outro efeito citotóxico foi observado (Tabela 1, Figura 2). Pelas análises realizadas com as regiões meristemática do bioindicador, foi observada a presença de células portadoras de MN e brotos nucleares, estatisticamente diferentes do CN, para as concentrações de 2,5; 1,25 e 0,625 mg mL⁻¹ (Tabela 2, Figura 3). Esses resultados indicam potencial genotóxico para o inseticida clorpirifós.

Tabela 1. Índice mitótico de células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas a diferentes concentrações do inseticida Clorpirifós.

| Concentrações | IM (M±DP) |
|---------------|---------------|
| CN | 31.452±5.78 |
| C3 | 27.811±4.18 |
| C4 | 26.90279±4.59 |
| C5 | 25.082±5.26 |
| C6 | 26.722±4.39 |
| MMS | 28.433±3.65 |
| TRIF | 26.474±4.17 |

IM: Índice Mitótico; M: média; DP: desvio padrão, CN: controle negativo; MMS: metil metassulfonato (controle positivo); TRIF: trifluralina (controle positivo); C3: concentração de 2,5 mg mL⁻¹; C4: concentração de 1,25 mg mL⁻¹; C5: concentração de 0,625 mg mL⁻¹; C6: concentração de 0,3125 mg mL⁻¹; * Diferença estatística em relação ao CN (ANOVA, p ≤ 0,05; post-hoc em Dunnet).

Tabela 2: Frequência de aberrações cromossômicas obtidas em células de meristema radiculares de *Allium cepa*, expostas a diferentes concentrações do inseticida clorpirifós.

| Tratamento | Micronúcleo | Brotos nucleares | Anáfases Multipolar | Células Binucleada | Pontes Cromossômicas | Núcleos Lobulados | C-metáfase |
|------------|-------------|------------------|---------------------|--------------------|----------------------|-------------------|------------|
| CN | 0.5±0.52 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 |
| TRIF | 5.1±3.40* | 4.1±2.19* | 0.2±0.40 | 0.2±0.60 | 0.8±0.78* | 1.3±1.32* | 0.1±0.30 |
| MMS | 8.1±2,18* | 1.6±0.84 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 |
| C3 | 4.3±1.33* | 6.3±1.15* | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 |
| C4 | 2.5±1.35* | 6.2±1.61* | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 |
| C5 | 3.8±1.47* | 4.8±1.39* | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 |
| C6 | 1.8±0.42 | 3.0±1.33 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 |

CN: controle negativo; TRIF: trifluralina (controle positivo); MMS: metil metanosulfonato (controle positivo); C3: concentração de 2,5 mg mL⁻¹; C4: concentração de 1,25 mg mL⁻¹; C5: concentração de 0,625 mg mL⁻¹; C6: concentração de 0,3125 mg mL⁻¹ * Diferença estatística em relação ao CN (Kruskal Wallis, p < 0,05; post-hoc em Dunn).

Nas análises realizadas com células meristemáticas de *A. cepa*, foram encontradas células com micronúcleos em diferentes estágios do ciclo celular, porém com predominância nas fases de interfase e prófase (Figura 2A). Algumas células apresentaram mais de um MN e MNs de tamanhos variados, mostrando conteúdos diferentes de material genético, o que se pode inferir mecanismos de ação diferente para o inseticida estudado (Figura 2B), como por exemplo indução de

quebras ou de perdas cromossômicas. Também foram observadas células portadoras de mais de uma alteração, como MNs e brotos (Figura 2C). Neste estudo foram encontrados outras ACs, porém não foram significativas em relação ao CN (Tabela 2).

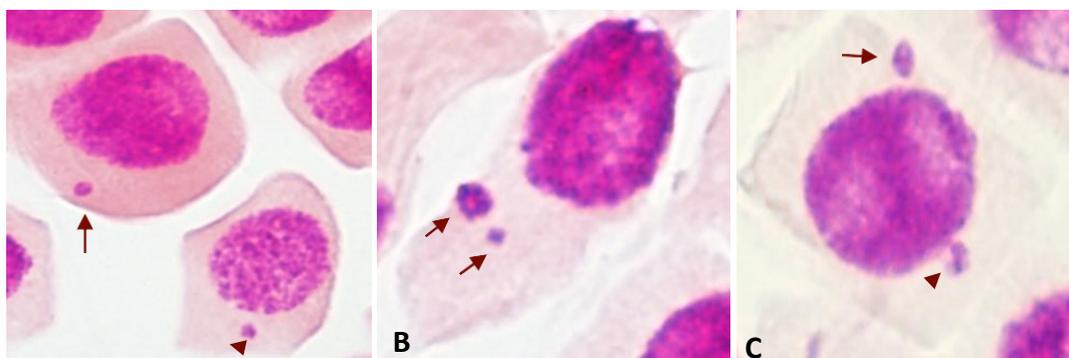


Figura 2. **A:** Células meristemáticas de *Allium cepa* em interfase (seta) e prófase (cabeça de seta), com presença de micronúcleos, após germinação em diferentes concentrações de clorpirifós. **B:** Célula meristemática de *A. cepa* com a presença de dois micronúcleos de tamanhos diferentes (setas). **C:** Célula apresentando um micronúcleo (seta) e um broto (cabeça de seta). Aumento: 1000X

3.2. Teste do micronúcleo em células F1 de *Allium cepa*

A presença de micronúcleo em células F1 exposta às concentrações C3, C4 e C5 (2,5; 1,25 e 0,625 mg mL⁻¹ respectivamente) do inseticida clorpirifós indica que esse agrotóxico apresenta potencial mutagênicos para essas concentrações. Já aC6, por ser uma concentração mais diluída que as demais citadas, não se mostrou potencialmente mutagênica, pois, nesta concentração o agrotóxico não induziu alterações que levassem a formação de MNs (Tabela 3, Figura 3).

Tabela 3: Frequência de micronúcleos em células da região F1 de de raízes de *Allium cepa*, expostas em diferentes concentrações do inseticida e clorpirifós.

| Tratamento | Frequência de MNs (%) |
|------------|-----------------------|
| CN | 0.19±0.21 |
| MMS | 0.32±0.19* |
| TRIF | 0.74±0.32* |
| C3 | 0.59±0.18* |
| C4 | 0.49±0.25* |
| C5 | 0.55±0.24* |
| C6 | 0.49±0.29 |

CN: controle negativo; TRIF: trifluralina (controle positivo); MMS: metil metanosulfonato (controle positivo); C3: concentração de 2,5 mg mL⁻¹; C4: concentração de 1,25 mg mL⁻¹; C5: concentração de 0,625 mg mL⁻¹; C6: concentração de 0,3125 mg mL⁻¹ * Diferença estatística em relação ao CN (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; post-hoc em Dunn).

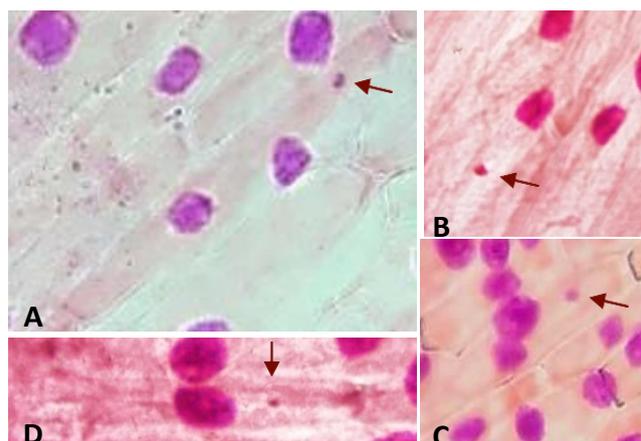


Figura 3. A- D: Células F1 de *Allium cepa* apresentando micronúcleos induzidos pelo efeito mutagênico de diferentes concentrações de clorpirifós. Aumento: 400X

Pela avaliação comparativa dos resultados obtidos nos ensaios realizados com células da região meristemáticas e células da região F1 do bioindicador *A. cepa*, expostas a diferentes concentrações de clorpirifós, foi possível observar que ambos os tipos celulares apresentaram MNs, em níveis significativamente diferentes aos do CN. Esses resultados comprovam o potencial mutagênico das concentrações C3, C4

e C5, uma vez que houve transferências de danos genéticos das células meristemática para as células descendentes (F1).

Tabela 4: Frequência de micronúcleos nas regiões meristemáticas e F1 de células após exposição às concentrações de clorpirifós.

| Tratamento | Região Meristemática | Região F1 |
|------------|----------------------|------------|
| CN | 0.5±0.52 | 0.19±0.21 |
| TRIF | 5.1±3.40* | 0,74±0.28* |
| MMS | 8.1±2.18* | 0.32±0.19* |
| C3 | 4.3±1.33* | 0.59±0.18* |
| C4 | 2.5±1.35* | 0.49±0.25* |
| C5 | 3.8±1.47* | 0.55±0.24* |
| C6 | 1.8±0.42 | 0.39±0.29 |

CN: controle negativo; TRIF: trifluralina (controle positivo); MMS: metil metanosulfonato (controle positivo); C3: concentração de 2,5 mg mL⁻¹; C4: concentração de 1,25 mg mL⁻¹; C5: concentração de 0,625 mg mL⁻¹; C6: concentração de 0,3125 mg mL⁻¹* Diferença estatística em relação ao CN (Kruskal Wallis, p< 0,05; post-hoc em Dunn).

3.3. Ensaio com *Lactuca sativa*

Os resultados de índice de germinação de *L. sativa* não mostraram efeito fitotóxico para todas as concentrações testadas do inseticida clorpirifós, quando comparados com os dados do CN (Figura 4).

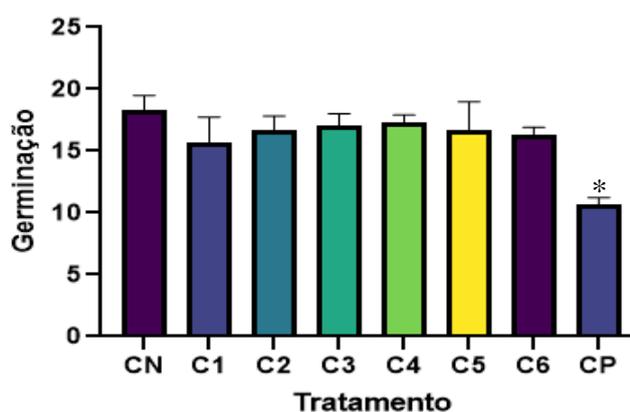


Figura 4. Resultado do ensaio de germinação em *Lactuca sativa*. As barras de erro representam o desvio padrão (DP); CN: controle negativo; CP: Controle positivo com Sulfato de zincoheptahidratado; C1: concentração de 1 mg mL⁻¹; C2: concentração de 5 mg mL⁻¹; C3: concentração de 2,5 mg mL⁻¹; C4: concentração de 1,25 mg mL⁻¹; C5: concentração de 0,625 mg mL⁻¹; C6: concentração de 0,3125 mg mL⁻¹; *Diferença estatística em relação ao CN (ANOVA, p< 0,05; post-hoc em Dunnet).

Na figura 5 estão apresentados os resultados dos ensaios de fitotoxicidade (alongamento da radícula e do hipocótilo) realizados com o bioindicador *L. sativa*. Foi observado que as sementes expostas às três maiores concentradas do inseticida Clorpirifós (10; 2,5 e 1,25 mg mL⁻¹) apresentaram diferenças estatísticas significativas, em relação ao controle negativo, tanto para o comprimento da radícula como do hipocótilo, resultados esses que comprovam a fitotoxicidade observada no teste de germinação realizada com o bioindicador *A. cepa*.

Crescimento do hipocótilo e radícula

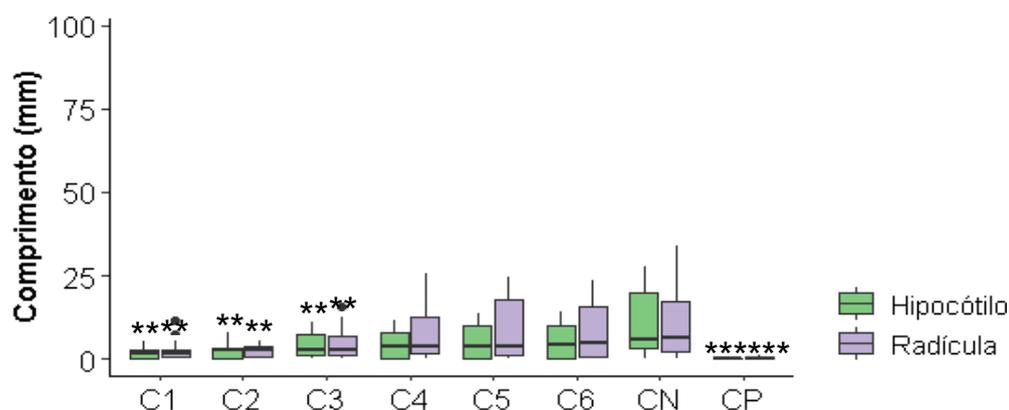


Figura 5. Resultados dos testes de alongamento radicular e do hipocótilo, realizados com o bioindicador *Lactuca sativa*, para avaliar a fitotoxicidade do inseticida Clorpirifós, CN: controle negativo; TRIF: trifluralina (controle positivo); Sulfato de zinco heptahidratado (controle positivo); ; C1: concentração de 1 mg mL⁻¹; C2: concentração de 5 mg mL⁻¹; C3: concentração de 2,5 mg mL⁻¹; C4: concentração de 1,25 mg mL⁻¹; C5: concentração de 0,625 mg mL⁻¹; C6: concentração de 0,3125 mg mL⁻¹* Diferença estatística em relação ao CN (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; post-hoc em Dunn)

4. Discussão

Os testes de germinação realizado com *A. cepa* se mostraram indicados para avaliar a fitotoxicidade do inseticida clorpirifós. Nesta análise foi possível inferir que o inseticida apresenta potencial fitotóxico para esse bioindicador, efeitos esses observados para as maiores concentrações testadas do inseticida. Estudo realizados com o herbicida glifosato, por KÜLTİĞİN et al (2011), também mostrou que o herbicida alterou os índices de germinação de sementes de *A. cepa*, dados esses que corroboram a eficiência do teste de germinação com esse bioindicador, para avaliar toxicidade de agrotóxicos.

Estudos citogenéticos realizados com o bioindicador *A. cepa*, como os ensaios de ACs, em células meristemáticas, e os ensaios do MN, utilizando a região F1, são amplamente utilizados para identificar químicos com potencial genotóxico e mutagênico (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007) e para avaliação da toxicidade de poluentes ambientais (ATEEQ et al., 2002).

A análise do ciclo celular pode ser uma interessante e importante ferramenta para avaliar a atividade citogenotóxica de compostos químicos e alterações na frequência de divisões celulares podem indicar se um determinado agente apresenta potencial para induzir tumorização ou se este agente pode alterar as taxas de crescimento de um organismo (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009). Os ensaios de ACs, MN e de IM, realizados com espécies vegetais, como *A. cepa*, são eficientes marcadores de genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade, respectivamente. Os testes com esse bioindicador são amplamente utilizados, por serem altamente responsivos, apresentarem alta sensibilidade a ação de compostos químicos com potencialidade tóxica, por serem eficientes para diagnóstico de toxicidade de xenobiontes e de contaminantes ambientais, de fácil realização e de baixo custo. Também são considerados um bom modelo para avaliação do modo de ação de um compostos, quanto a indução de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos (BAGATINI; FERREIRA DA SILVA; TEDESCO, 2007, FERNANDES, Et al., 2007;2009).

Estudos que avaliaram os efeitos genotóxicos e mutagênicos de agrotóxicos, dentre eles os da classe dos organofosforados, têm indicado potencial tóxico para esses compostos, tanto para plantas como para animais (Fernandes et al., 2007, 2009; Ventura et al., 2008; BIANCHI et al., 2012). Moore et al., (2010) e Bianchi et al. (2012) investigaram os danos causados ao DNA de linhagens celulares humanas pelo organofosforado malathion. Os resultados obtidos por Moore et al., (2010) em linhagem de hepatocarcinoma humano (células HepG2) mostraram que, quanto mais alto o nível de exposição ao químico, maior a percentagem média de danos ao DNA, resultados esses que confirmaram o potencial genotóxico deste inseticida para essa linhagem celular humana. Complementarmente, pelos resultados de Bianchi et al (2012), obtidos com linhagem de células de hepatoma de rato (células HTC), os autores concluíram que o malathion, em baixas concentrações, apresenta potencial

genotóxico para mamífero (HTC), decorrente de ação indireta do produto sobre as células. Esses autores ainda destacaram a importância de se realizar estudos com baixas concentrações de agrotóxicos, pois, com esse tipo de avaliação, é possível estimar os efeitos de concentrações residuais sobre os organismos eventualmente expostos a esses produtos. Ma et al., (1989) realizaram estudos com esse mesmo agrotóxico em plantas *Tradescantia*. Os autores testaram dois tipos de apresentação do produto (forma líquida e forma gasosa), encontrando resultados diferentes, quanto a genotoxicidade do inseticida. A forma líquida não demonstrou efeito genotóxico, porém os vapores do inseticida malathion promoveram alta frequência de micronúcleos.

Lactuca sativa (alface) é uma planta da família *Asteraceae* considerada ótimo modelo para a avaliação de riscos de contaminação ambiental, devido a sua alta sensibilidade, além de permitir testes macrocópicos, principalmente na avaliação do potencial fitotóxico. Os ensaios de alongamento de raiz são considerados muito eficiente para avaliar a fitotoxicidade de um composto ou uma amostra, além de apresentarem vantagem como rapidez na obtenção das respostas, facilidade de execução, alta sensibilidade e por serem de baixo custo. A germinação é considerada uma etapa de alta sensibilidade aos efeitos adversos de xenobiontes, pois, neste período, ocorrem vários processos fisiológicos, que podem sofrer interferência de compostos tóxicos (SOBRERO; RONCO, 2004) .

Os estudos de fitotoxicidade de inseticidas organofosforados, utilizando o bioindicador *L. sativa*, ainda são escassos, embora esse organismo seja altamente adequado para esse tipo de avaliação. Penckowski et al. (2004) investigou os efeitos de interações de seis agrotóxicos, inclusive o clorpirifós, sobre cultura de milho. O inseticida clorpirifós foi avaliado na concentração usada em campo de 1.125 mL ha⁻¹. Os resultados deste estudo não indicaram potencial fitotóxico para essa cultura, porém foram observados sintomas visuais de intoxicação, gerados por alguns dos inseticidas testado, dentre eles o clorpirifós, que provocou maior intoxicação. A mistura de glifosato e clorpirifós apresentou grau 2 de incompatibilidade física.

Petter et al. (2007) avaliaram em cultura de soja, a toxicidade da interação de 10 inseticidas de diferentes grupos químicos com o herbicida glifosato. Os resultados

mostraram que a associação entre o glifosato com o clorpirifós provocou efeito fitotóxico significativamente maior do que os outros inseticidas. Um outro estudo realizado por Silva et al., (2005) mostrou que a fitotoxicidade de alguns herbicidas está relacionada à sua interação com inseticida, principalmente os dos grupos dos organofosforados e metilcarbamatos.

4.1 Ensaio utilizando o bioindicador *Allium cepa*

Nos ensaios realizados com o modelo *A. cepa*, foi observada a presença significativa de brotos e MNs em células meristemáticas expostas às concentrações de 2,5; 1,25 e 0,625 mg mL⁻¹ do inseticida clorpirifós (comercializado sob o nome de Klorpan 480 EC), o que comprova o potencial genotóxico deste inseticida. Também foram observadas respostas semelhantes, para presença de MN, em células da região F1 das raízes de *A. cepa*, expostas às mesmas concentrações do inseticida. Pelos resultados coincidentes, observados para os dois tecidos da planta, é possível concluir um potencial mutagênico para o agrotóxico testado. Essa interpretação pode ser explicada pelo fato de que as células da região F1 são originadas, por divisão celular mitótica, das células meristemáticas. Assim, os MNs presentes nas células F1 são estruturas derivadas de danos no DNA que ocorreram nas células meristemáticas, e repassadas às células descendentes, o que configura um clássico evento mutagênico (MA et al., 1995). Os micronúcleos são pequenos núcleos formados de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros, que foram perdidos durante o processo de divisão celular, e não incorporados em nenhum núcleo das células filhas, mas que permanecem no citoplasma de uma delas (NETO et al., 2005).

No estudo realizado por Bianchi et al. (2008), foi investigado o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do organofosforado malathion, por meio de ensaios com o bioindicador *Allium cepa*. Os autores encontraram efeitos semelhantes aos do presente estudo, quanto aos efeitos citotóxicos, pois nenhuma concentração testada alterou, significativamente, os valores deste *endpoint*, em relação ao controle. Esses resultados sugerem que os inseticidas organofosforados podem não apresentar efeitos citotóxicos para *A. cepa*, indicando que esse

organismo teste não se caracteriza como bom modelo para ser usado em avaliação de toxicidade desse grupo de compostos. Contudo, os resultados do estudo citado mostrou efeito genotóxico para o organofosforado, devido a presença de aberrações como broto nucleares e pontes cromossômicas, em três das quatro concentrações avaliadas. Bianchi et al. (2012) também realizaram testes de recuperação com *A. cepa*, que mostraram que, mesmo após o retorno das condições ideais de germinação (transferência das sementes para água ultra pura), o malathion continuou exibindo potencial genotóxico e mutagênico, que os autores sugeriram ser devido a um potencial efeito acumulativo do agrotóxico. O estudo também realizou ensaio com células F1, comprovando um potencial mutagênico dos organofosforados.

Brotos nucleares são alterações que podem ser resultantes da eliminação de material genético excedente, que foram originados por processos de amplificação causados por agentes tóxicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). A presença de brotos e MNs podem indicar que a substância testada apresenta efeito genotóxico do tipo aneugênico.

O inseticida clorpirifós foi avaliado, quanto a seu potencial mutagênico, pelo teste de ames (*Salmonella/microsome*), linhagens TA97a, TA98, TA100, TA102 e TA104 e por mutantes de *E. coli*, linhagem K-12, para avaliar defeitos no reparo do DNA. O estudo comprovou o efeito mutagênico do inseticida e alertou para o risco de indução de transformações neoplásicas em humanos (ANJUM; MALIK, 2013). Essas respostas obtidas nos testes realizados com microrganismos mostram-se bem semelhantes aos resultados de *Allium cepa* do presente estudo, quanto aos efeitos genotóxicos e mutagênicos do inseticida clorpirifós alvo.

4.2 Ensaio utilizando o organismo *Lactuca sativa*

Os testes de germinação, realizados com o bioindicador *L. sativa*, não indicaram fitotoxicidade para o inseticida clorpirifós, para nenhuma das concentrações testadas, o que permite inferir que essa espécie não parece ser um bom modelo para ser usado em avaliação de fitotoxicidade do referido inseticida. Resultados semelhantes aos observados no presente estudo foram também reportados por

Salamandane (2015), para o inseticida organofosforado dimetoato e o fungicida mancozeb.

Vários inseticidas e fungicidas também foram testados, quanto a fitotoxicidade por Vieira et al. (2001). Os autores testaram as concentrações de campo dos químicos isolados e em associação, sobre o bioindicador *Carica papaya* L. (mamoeiro). Um dos químicos testados foi o organofosforado Hostathion 400 BR. Os resultados mostraram que essa substância causou injúrias nas folhas da planta e, quando associado a outros agrotóxicos, prejudicou o crescimento dos mamoeiros, dados esses que reforçam o potencial fitotóxico dos organofosforados.

Os resultados dos testes de alongamento da raiz e do hipocótilo do presente estudo mostraram que as amostras mais concentradas de clorpirifós (1; 5 e 2,5 mg mL⁻¹) induziram diminuição significativa no comprimento das duas estruturas avaliadas (raiz e hipocótilo), quando comparados com o CN. A figura 5 traz os dados referentes ao comprimento da raiz e do hipocótilo. Foi observado que o aumento do comprimento das estruturas se deu em uma relação direta com a diminuição da concentração do agrotóxico, sendo a solução 0,3125 mg mL⁻¹ a que mais se assemelhou aos resultados do CN. Já as três soluções mais concentradas foram as que apresentaram maiores efeito fitotóxico para *L. sativa*. Petter et al. (2007) estudou o efeito fitotóxico do inseticida clorpirifós, associado ao herbicida glifosado, em culturas de soja. Os autores relataram que o clorpirifós pode causar intoxicação às plantas, principalmente em situações de alta temperatura ou déficit hídrico. Utzig (2016) também avaliou a fitotoxicidade do clorpirifós pelo mesmo bioindicador. Os resultados dos ensaios não indicaram fitotoxicidade para essas concentrações, provavelmente por representarem baixas concentrações do composto analisado. Foram realizados estudos de fitotoxicidade do clorpirifós com *Zea mays* L. (milho) e *Sinapia alba* L. (mostarda branca). Os resultados desses ensaios mostraram que, em baixas concentrações, o inseticida não induziu diminuição na germinação do milho, porém afetou a germinação da mostarda branca (GVOZDENAC; INDJIC; VUKOVIC, 2013).

5. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, as maiores concentrações testadas do inseticida clorpirifós inibiram a germinação de sementes de *A. cepa*, mas não inibiram a germinação das sementes de *L. sativa*. Esses dados indicam que, para o parâmetro germinação de sementes, o bioindicador *A. cepa* foi mais sensível, portanto, mais indicado para ser usado como *endpoint* de fitotoxicidade do clorpirifós.

No estudo realizado com o inseticida, não foi observado, pelo teste do de IM, efeito citotóxico para o organismo *Allium cepa*. Já os ensaios de ACs em células meristemáticas mostraram potencial genotóxico para o inseticida, devido a significativa presença de brotos nucleares, alterações essas que também comprovaram um efeito aneugênico para o agrotóxico. Outras aberrações genotóxicas muito encontradas nas células meristemáticas foram os MNs. Pelos testes do MN, realizados em células F1, foi possível inferir que o efeito genotóxico observado nas células meristemáticas foi fixado nas células F1. Desta forma, se os MNs da região meristemática persistiram nas células da primeira geração (F1), é um indicativo de que o organofosforado clorpirifós apresenta também um comprovado potencial mutagênico.

O teste de alongamento radicular em alface induziu um baixo desenvolvimento das suas estruturas radiculares, nas concentrações mais altas (C1, C2 e C3), comprovando o potencial fitotóxico observado pelo teste de germinação com *A. cepa*. A concentração indicada para uso do produto foi a que mais afetou o desenvolvimento da planta. Os resultados de alongamento radicular foram aumentando com a diminuição da concentração do produto.

O estudo também demonstrou que as ACs e os efeitos tóxicos observados para o clorpirifós foram diminuindo com a diminuição das concentrações do agrotóxicos. A menor concentração de clorpirifós ($0,3125 \text{ mg mL}^{-1}$) não foi fitotóxica, citogenotóxica e mutagênica para o organismo teste *A. cepa* e tampouco fitotóxica para *L. sativa*, mostrando que essa concentração pode ser considerada não preocupante em eventuais contaminações ambientais.

Frente aos resultados obtidos neste estudo sobre a fitotoxicidade, citogenotoxicidade e mutagenicidade do inseticida clorpirifós, exceto para a menor concentração testada, reforça-se a necessidade de realização de estudos mais abrangentes e com uma maior diversidade de organismos, para que se possa estimar os seus reais perigos, tanto para o meio ambiente como para a saúde humana.

Referências

- ALBAS, C. S.; J.P. SOUZA.; G.A. NAI.; J.L.S PARIZI. Avaliação da genotoxicidade da *Ilex paraguariensis* (erva mate) pelo teste do micronúcleo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2 SUPPL. 1, p. 345-349, 2014.
- DE MIRANDA, A. C.; MELO, L. F.; DE ARAUJO, A. E. Impactos Dos Agrotóxicos Na Saúde Do Solo E Humana: Uma Revisão. **Saúde debate | rio de janeiro**, v. 42, n. 117, p. 518-534, 2018
- ANJUM, R.; MALIK, A. Evaluation of mutagenicity of wastewater in the vicinity of pesticide industry. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 2, p. 284-291, 2013.
- ATEEQ, B.; FARAH, M. A; ALI, M. N; AHMAD, W. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 518, n. 2, p. 135-144, 2002.
- BAGATINI, M. D.; FERREIRA DA SILVA, A. C.; TEDESCO, S. B. The use of *Allium cepa* test as a bioindicator of genotoxicity of medicinal plants infusions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- BRAGANÇA, I.; GROSSO, L.; REDE, D.; SOUSA, D. R.; LEMOS, P. C.; DOMINGUES, V. F.; DELURE-MATOS, C. Ecotoxicological effects of insecticides in plants assessed by germination and other phytotoxicity tools. **Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants**, p. 47-76, 2018.
- BIANCHI, J.; MANTOVANI, M.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 3 6: 102-111, 2012.
- CABUGA JR., C. C. *Allium cepa* test: An evaluation of genotoxicity. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 7, n. 1, p. 12-19, 2017.
- ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and

chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, n. 3, p. 264-271, 2005.

ÇAVUŞOĞLU, K.; YALÇINA, E.; TÜRK MENA, Z.; YAPAR, K.; ÇAVUŞOĞLU, K.; ÇİÇEK, F. Investigation of Toxic Effects of the Glyphosate on *Allium cepa*. **Tarım Bilimleri Dergisi – Journal of Agricultural Sciences**, 17: 131-142, 2011.

DE ENDEMIAS, Superintendência de Controle. Coletânea de legislação sobre a Superintendência de Controle de Endemias-Sucen. **São Paulo**, 1994.

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, n. 3, p. 252-259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicity and Environmental safety**, 72: 1680-1686, 2009.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research Regular Papers**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

GVOZDENAC, S.; INDJIC, D.; VUKOVIC, S. Phytotoxicity of chlorpyrifos to white mustard (*Sinapis alba* L.) and maize (*Zea mays* L.): Potential indicators of insecticide presence in water. **Pesticidi i fitomedicina**, v. 28, n. 4, p. 265-271, 2013.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 8, p. 2090-2095, 2009.

IBAMA. **Relatório de Comercialização de Agrotóxicos**. 2018.

<https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos>.

Acesso em 12/04/2021.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

MA TH, A. V.; HARRIS, M. M.; BARE, J. L. Tradescantia-Micronucleus (Trad-MCN) test on the genotoxicity of malathion. **Environ Mutagen**. 1983.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA.

Notícias. Brasília: **MAPA, 2018**. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/noticias/ranking-da-fao-mostra-que-uso-de-defensivos-no-brasil-e-menor-que-em-diversos-paises-da-europa>. Acesso em: 15 maio. 2021.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA.

Notícias. Brasília: **MAPA, 2021**. Disponível em:

<https://www.epsjv.fiocruz.br/noticias/reportagem/governo-federal-prepara-decreto-para-mudar-a-regulacao-sobre-o-registro-de>. Acesso em: 15 de julho de 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - **RELATÓRIO NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DE POPULAÇÕES EXPOSTAS A AGROTÓXICOS**. Notícias. Brasília 2020.

Disponível em:

https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos.pdf. Acesso em 15 de julho de 2021.

MOORE, P. D.; YEDJOU, C. G.; TCHOUNWOU, P. B. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. **Environ Toxicol**. 2010

NEFIC, H.; MUSANOVIC, J.; METOVIC, A.; KURTESHI, K. Chromosomal and nuclear alterations in root tip cells of allium cepa L. Induced by alprazolam. **Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)**, v. 67, n. 6, p. 388-392, 2013.

DE ALMEIDA, J. X.; DE MELO, F. P.; DE MELO, A. J. M.; DA SILVA, J. C.; DANTAS, J. P. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) IN VIVO. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 2, p. 0, 2005.

PENCKOWSKI, L. H.; PODOLAN, M. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Maize tolerance to imidazolinone herbicides when treated with insecticides. **Planta Daninha**, v. 22, n. 2, p. 307-313, 2004.

PETTER, F. A.; PROCÓPIO, S. O.; CARGNELUTTI FILHO, A.; BARROSO, A. L. L.; PACHECO, L. P.; BUENO, A. F. Associations among glyphosate and insecticides in Roundup Ready® soybean. **Planta Daninha**, v. 25, n. 2, p. 389-398, 2007.

PETARLI, G. B; SALAROLI, L. B.; CATTAFESTA, M. Saúde, Trabalho e Ambiente: Um Olhar Interprofissional para a Saúde de Populações Rurais. **Editora Appris**, 2021.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. D. S.; LARA, S. S. D.; CORREA, M. L. M.;

- BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. D. C.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: Uma ferramenta para a vigilância em saúde. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017.
- PIGNATI, W. A.; MACHADO, J. M. H. **Do Litoral Norte Do E Stado De S ão P Aulo** ,. [s.l: s.n.].
- PRIAC, A.; BADOT, P. M.; CRINI, G. Évaluation de la phytotoxicité d'eaux de rejets via *Lactuca sativa* : paramètres des tests de germination et d'élongation. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 340, n. 3, p. 188-194, 2017.
- SALAMANDANE (2015). Toxicity of dimethoate and mancozeb to *Brassica rapa* L.. **Ambiência**. **Ambiência**.
- SANTOS, M.J.G.; SOARES, A.M.V.M.; LOUREIRO, S. (2010). Joint effects of three plant protection products to the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus* and the collembolan *Folsomia candida*. **Chemosphere**. V. 80, p. 1021 - 1030.
- SILVA, J. F.; SILVA, J. F.; FERREIRA, L. R.; FERREIRA, F. A. Herbicidas: absorção, translocação, metabolismo, formulação e misturas. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**, p. 118-154, 2007.
- SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. **Imta**, p. 55-67, 2004.
- USEPA. Human Health Risk Assesment Chlorpyrifos. **Springer Tracts in Civil Engineering**, p. 131, 2000.
- UTZIG, L. M.; LIMA, R. M.; GOMES, M. F.; RAMSDORF, W. A.; MARTINS, L. R.; LIZ, M. V.; FREITAS, A. M. Ecotoxicity response of chlorpyrifos in *Aedes aegypti* larvae and *Lactuca sativa* seeds after UV/H₂O₂ and UVC oxidation. **Ecotoxicology and environmental safety**, 169, 449-456. (2019).
- VENTURA, 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: 42-51, 2008.
- VIEIRA, A.; RUGGIERO, C.; MARIN, S. L. D. Toxic effects of fungicides, acaricides and insecticides, on papaya plant (*Carica papaya* L.) cv. Sunrise solo improved line 72/12, under field conditions. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 315-319, 2001.
- WATTS, M. Chlorpyrifos as a possible global POP. **Pesticide Action Network North America**, n. August, p. 1-34, 2012.

ARTIGO 3

Avaliação da citotoxicidade do inseticida Clorpirifós, por meio de ensaios colorimétricos realizados com cultura de células humanas

Mariana Santos Costa, Leticia Rocha Gonçalves, Maria Aparecida Marin-Morales

Resumo:

A produção e o uso de agrotóxicos têm aumentado ao longo dos anos e, com isso, os sérios impactos que esses químicos promovem no ambiente e na saúde pública. O Clorpirifós é um dos inseticidas organofosforados que tem um amplo uso na agricultura brasileira. Esse inseticida, considerado extremamente tóxico (classe toxicológica 1), tem sido relacionado a problemas de saúde humana, como infertilidade, disfunções motoras, neurológicas e também ao câncer, patologias essas que aumentam a preocupação, quanto a seu uso exacerbado e ao seu potencial de contaminação ambiental. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico de diferentes concentrações do inseticida Clorpirifós, divididas em duas etapas experimentais: 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg mL⁻¹ (1ª etapa experimental) e C7: 0,15625 mg mL⁻¹; C8: 0,078 mg mL⁻¹; C9: 0,039 mg mL⁻¹ e C10: 0,019 mg mL⁻¹ (2ª etapa experimental), por meio de ensaios com a linhagem celular HepG2/C3A. Foram realizados três diferentes ensaios de citotoxicidade (MTT, Resazurina e Azul de tripan). Os resultados do ensaio do MTT mostraram potencial citotóxico para todas as concentrações da primeira etapa experimental (C1 a C6) e para as concentrações C7 e C8 da 2ª etapa. Portanto, somente as concentrações mais baixas testadas (C9 e C10) apresentaram viabilidade celular superior a 80%. As concentrações C7, C8, C9 e C10 também foram aplicadas aos testes da resazurina e do azul de tripan. Todas as concentrações usadas no teste da resazurina mostraram-se citotóxicas para as células HepG2/C3A, enquanto que para o ensaio do azul de tripan, somente a C7 causou citotoxicidade para essas células. Pelos resultados dos três ensaios, é possível inferir que o inseticida clorpirifós apresenta alta toxicidade, pois somente a partir da C8 os seus efeitos mostraram diminuição do potencial tóxico. Porém, mesmo as mais baixas concentrações ainda foram capazes de causar danos às células estudadas.

Palavras-chave: Azul de tripan; HepG2/C3A; Fígado; MTT; Resazurina; Agrotóxico

Abstract:

The production and use of pesticides has increased over the years and, with it, the serious impacts that these chemicals have on the environment and public health. Chlorpyrifós is one of the organophosphate insecticides that has a wide use in Brazilian agriculture. This insecticide, considered extremely toxic (toxicological class 1), has been related to human health problems, such as infertility, motor and neurological disorders and also cancer, pathologies that increase the concern about its exacerbated use and its potential for environmental contamination. This study aimed to evaluate the cytotoxic potential of different concentrations of the insecticide Chlorpyrifos, divided into two experimental steps: 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg mL⁻¹ (1st experimental stage) and C7: 0,15625 mg mL⁻¹; C8: 0,078 mg mL⁻¹; C9: 0,039 mg mL⁻¹ e C10: 0,019 mg mL⁻¹ (2nd experimental), through tests with the cell line HepG2/C3A. Three different cytotoxicity assays (MTT, Resazurin and Trypan blue) were performed. The results of the MTT assay showed cytotoxic potential for all concentrations of the first experimental stage (C1 to C6) and for the C7 and C8 concentrations of the 2nd step. Therefore, only the lowest concentrations tested (C9 and C10) had cell viability greater than 80%. The concentrations C7, C8, C9 and C10 were also applied to the resazurin and blue trypan. All concentrations used in the resazurin test proved to be cytotoxic for HepG2/C3A cells, while for the d assay trypan blue, only C7 caused cytotoxicity to these cells. From the results of the three tests, it is possible to infer that the insecticide chlorpyrifos has high toxicity, as only from C8 its effects showed a reduction in the toxic potential. However, even the lowest concentrations were still able to cause damage to the studied cells.

Keywords: Trypan blue; HepG2/C3A; Liver; MTT; Resazurin; Pesticides

Introdução:

O consumo de agrotóxicos no Brasil tem aumentado ao longo dos anos devido à sua característica essencialmente agrícola, fato este que tem colocado o país como um dos líderes mundiais no uso dessas substâncias (ALF et al., 2020). Esses produtos, usados para combater ou prevenir as culturas das pragas, tem como finalidade a obtenção de uma maior produtividade agrícola.

Contudo, embora esse objetivo primário seja na maioria das vezes alcançado, essas substâncias trazem efeitos adversos, com sérias consequências negativas para

o meio ambiente e para a saúde humana (NOGUEIRA et al., 2020).

O Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológicas-SINITOX (2019) estima que o consumo brasileiro de agrotóxico tenha superado 300 mil toneladas/ano. Outro índice que vem também aumentando no país é o registro de casos de intoxicação por esses químicos. De acordo com a DATASUS, 2020, só em 2017, foram registrados 179 mil novos casos de intoxicação por agrotóxico no Brasil (DATASUS, 2020). Contudo, o Ministério da Saúde alerta que esse número pode ser ainda muito maior, uma vez que existe muita dificuldade de se notificar essas intoxicações, devido aos sintomas serem muito semelhantes aos de outras doenças. Neto e Dimenstein (2017) acrescentam que essa notificação pode também estar subestimada, pelo fato de que a maioria dos casos ocorre na zona rural, onde há carência em assistência médica e portanto subnotificação dos casos.

Dentre os agrotóxicos mais usados no Brasil, destacam-se os da classe dos organofosforados (OF), químicos estes que chamam a atenção pela sua toxicidade e pelo seu potencial de contaminação ambiental e de danos à saúde da população (FENIK, TANKIEWICZ & BIZIUK 2011). Os OF foram introduzidos na agricultura em substituição aos organoclorados, agrotóxicos esses que deixaram de ser usados, devido à sua alta persistência ambiental (BAIRD; CANN, 2011). Os OF são ésteres, amidas ou derivados tióis dos ácidos fosfóricos, fosfônicos, fosforotiótico, que apresentam menor persistência no ambiente, quando comparados aos organoclorados (BOWLS, 2003).

Embora os OF apresentem baixa persistência no ambiente, seu uso também é preocupante, pois esses agrotóxicos podem se mobilizar no ambiente e contaminar áreas distantes do local de sua aplicação. Esses compostos podem atingir os recursos hídricos, e causar sérios problemas à biota aquática, como alterações morfológicas, comportamentais, oxidativas, bioquímicas, hematológicas, reprodutoras, de desenvolvimento, e até efeitos deletérios em todo o ecossistema (SUNANDA et al., 2016).

Os OF também são mundialmente muito utilizados (SANTOS et al., 2007), porém, devido aos efeitos adversos provocados por essa substância, principalmente os genotóxicos e neurológicos, a União Européia proibiu o seu uso e comércio em

(EPA, 2020) proibiu o uso de clorpirifós em lavouras.

O Clorpirifós é um dos inseticidas OF mais comercializado no Brasil. Seu consumo ocupa, de acordo com o Ministério da Saúde (2018), o sexto lugar no ranking dos mais consumidos no país, sendo muito usado em plantações de café, batata, feijão, milho, soja e trigo (AGROLINK,2020). Sua ação nos insetos se dá por bloqueio da enzima colinesterase. Esse agrotóxico tem caráter lipofílico, que favorece a sua entrada através das membranas celulares. Contudo ele também causa perturbações nessas estruturas, levando ao funcionamento não correto das mesmas (ADRESI, 2003).

Pesquisas voltadas ao estudo de clorpirifós têm mostrado efeitos tóxicos desses químicos para abelhas (DORNELES, 2015), vegetais (FOONG et al., 2020), células de neurônios hipocâmpais de camundongos e em seres humanos (NAIME, 2017). O inseticida pode ser absorvidos em humanos por via oral, respiratória e cutânea, sendo esta última a causa mais comum de intoxicações ocupacionais. O uso dessas substâncias também foi associado a casos de efeitos deletérios sobre o sistema nervoso, respiratório, cardiovascular, genito-urinário, pele, olhos, reações alérgicas, casos de infertilidade masculina e abortos espontâneos em mulheres, além de diminuição de QI e casos de autismo em crianças (HERTZ-PICCIOTTO et al., 2018).

Os OF sofrem biotransformações por enzimas hepáticas oxidases, hidrolases e transferases e podem produzir metabólitos ainda mais tóxicos do que o produto de origem(JOKANOVI, 2001).

Ensaio com culturas de células de mamíferos têm sido amplamente aplicados em avaliações dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico de poluentes ambientais (MAZZEO et al., 2010). As linhagens celulares de hepatócitos são frequentemente utilizadas na avaliação da toxicidade de produtos químicos, por estarem envolvidas, principalmente, com a metabolização de xenobiontes (GOMEZ-LECHON et al., 2005).

Os ensaios colorimétricos realizados com culturas de células são comumente usados em avaliações do potencial citotóxico, por possibilitarem avaliar diferentes aspectos de citotoxicidade, como os decorrentes de alterações da atividade mitocondrial e/ou mensuração a partir da integridade da membrana celular (ROGERO et al., 2003).

Este estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações do inseticida clorpirifós em células de hepatoma humano (linhagem

HepG2/C3A) mantidas em cultura.

Materiais e Métodos

Condições da cultura de linhagem celular HepG2/C3A

As células de hepatoma humano (linhagem celular HepG2/C3A) utilizadas nesse estudo, foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro – RJ, Brasil. As células foram cultivadas em frascos de cultura descartáveis de 25 cm², em meio MEM (Meio Mínimo Essencial Eagle), com solução a 0,1% de antibiótica/antimitótica (10,000 U.I./mL penicillina and 10 mg/mL streptomina - Cutilab), suplementado com 10% de soro bovino fetal e mantidas em incubadora de CO₂ (5%) a 37° C.

Substância testada

Foi avaliado neste estudo o inseticida Clorpirifós (comercializado sob o nome de Klorpan 480 EC - 480 g/L de clorpirifós), pertencente ao grupo químico dos organofosforados (OP) e de classificação toxicológica I (extremamente tóxico). Seu ingrediente ativo clorpirifós, tem como composição química O,O-dietil O-3,5,6- tricloro-2-piridil fosforotioato (C₉H₁₁Cl₃NO₃PS).

Para o teste do MTT foram preparadas seis concentração (soluções aquosas) do inseticida Clorpirifós (C1: 10 ; C2: 5; C3: 2,5; C4:1,25; C5: 0,625 e C6: 0,3125 mg mL⁻¹), onde a solução C1 correspondeu a solução indicada para uso em campo e as demais concentrações foram diluições preparadas a partir da C1, de maneira gradual. Devido à alta toxicidade observadas para as concentrações C1 a C5, a C6, que apresentou menor citotoxicidade, foi usada como base para uma nova série de diluição (C7: 0,15625 mg mL⁻¹; C8: 0,078 mg mL⁻¹; C9: 0,039 mg mL⁻¹ e C10: 0,019 mg mL⁻¹) que foi usadas novamente no ensaio do MTT. Pelos resultados obtidos neste teste, essas diluições também foram aplicadas nos ensaios de Resazurina e Azul de Trypan.

Teste do MTT

O teste de MTT (Brometo de azul de tiazoliltetrazólio - CAS 298-93-1, Sigma) foi realizado para determinar, para a linhagem celular HepG2/C3A, quais das concentrações testadas do inseticida Clorpirifós não apresentavam citotoxicidade

(primeiros ensaios com as concentrações C1 a C6 e segundo ensaios as concentrações C7 a C10). O ensaio foi desenvolvido de acordo com o protocolo de Mosmann (1983), com algumas modificações. Foram semeadas $2,34 \times 10^4$ células por poço de uma placa de microtitulação e incubada, por um período de estabilização de 24 horas, em incubadora de CO₂ (5%) a 37 ° C. As células foram expostas às diferentes concentrações do inseticida Clorpirifós, por 24 horas. O controle negativo (CN) foi realizado com meio de cultura e o controle positivo (CP) com Triton X-100 a 1%. Na sequência, o meio contendo as diferentes concentrações do inseticida foi retirado dos poços. Para ser adicionado 150 µL de MTT (5 mg / mL). A placa foi incubada por 4 horas em incubadora de CO₂(5%) a 37 ° C e, em seguida, descartada a solução de MTT. Após esse procedimento, foi adicionado em cada poço 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). As placas foram lidas em espectrofotômetro modelo Infinite M2000 Pro™ (TECAN), com fluorímetro leitor de placa, a 540 nm. O ensaio foi realizado em duplicata e em experimentos independentes.

Teste de Resazurina

Para o teste de resazurina, realizadas células HepG2/C3A, foram testadas diferentes concentrações do inseticida Clorpirifós (C6 a C7), previamente definidas pelo ensaio do MTT. Foram semeadas $2,34 \times 10^6$ células por poço em placa de microtitulação, de acordo com o protocolo descrito por RISS et al. (2016), com algumas modificações. As células foram incubadas por um período de 24 horas em incubadora de CO₂(5%) a 37 ° C. Em seguida, as células foram expostas às diferentes concentrações do inseticida Clorpirifós, por mais 24 horas. O teste CN foi realizado com meio de cultura sem soro, e o CP com solução de Triton X-100 (1%). Após esse período, foi retirado o meio de todos os poços para ser adicionado 200 µL de solução de resazurina (44 µM), por 4 horas. Em seguida, as placas foram lidas no leitor de microplaca modelo Infinite M2000 Pro™ (TECAN), em comprimento de onda de excitação de 560 nm e de emissão de 590 nm. O ensaio foi realizado em duplicata.

Teste do Azul de tripan

O teste do Azul de Tripán (0,4%, GIBCO, Cat. Nº 15250-061) foi realizado de acordo com Strober (2001). Foram semeadas 5×10^5 células por poço de uma placa de microtitulação. As células foram incubadas, por 24 horas em incubadora de CO_2 (5%) a 37°C . Em seguida, as células foram expostas às diferentes concentrações do inseticida Clorpirifós, por 24 horas, nas mesmas condições anteriores. Para o CN, foi utilizado apenas meio de cultura e para o CP Triton X-100 (1%). Após essa etapa, as células foram lavadas duas vezes com PBS e separadas do frasco com tripsina (0,5%). Foram misturados em lâmina $20 \mu\text{L}$ de azul de tripan com $20 \mu\text{L}$ da solução celular. Na sequência, foram analisadas, em microscópio de luz, 100 células, para quantificar o percentual de células viáveis (brancas) e não viáveis (azuis). O ensaio foi realizado em triplicata.

Resultados

Ensaio do MTT

Os resultados do teste do MTT, realizado com células HepG2/C3A, estão apresentados na figura 1.

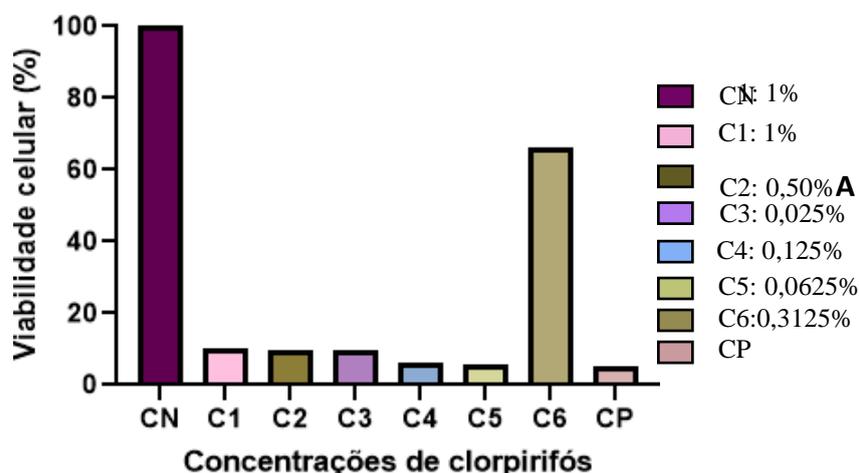


Figura 1. Resultado do teste de MTT. CN: controle negativo, CP: Controle positivo Triton X-100. C1: 10 ; C2: 5; C3: 2,5; C4:1,25; C5: 0,625 e C6: 0,3125 mg mL^{-1} do produto comercial.

Os resultados dos ensaios do MTT, realizados com as concentrações C1 (10 mg mL⁻¹), C2 (5 mg mL⁻¹), C3 (2,5 mg mL⁻¹), C4 (1,25 mg mL⁻¹), C5 (0,625 mg mL⁻¹) e C6 (0,3125 mg mL⁻¹) do inseticida clorpirifós, mostraram que, além do controle positivo (CP), as concentrações C1, C2, C3, C4 e C5 foram citotóxicas para as células HepG2/C3A, induzindo uma viabilidade celular menor que 20%. A C6 foi a concentração menos citotóxica, com viabilidade celular maior que 60%. Devido a alta citotoxicidade das maiores concentrações (C1 a C5), a C6 foi usada como base para uma série de diluições, que resultaram em quatro outras concentrações (C7: 0,15625 mg mL⁻¹; C8: 0,078 mg mL⁻¹; C9: 0,039 mg mL⁻¹ e C10: 0,019 mg mL⁻¹), que foram novamente testadas pelo ensaio do MTT.

O teste do MTT realizado com as C7 a C10 estão apresentados na figura 2.

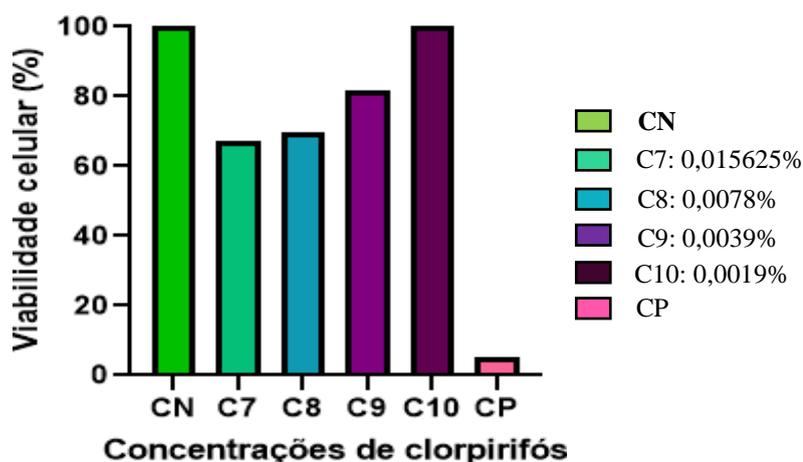


Figura 2. Resultado do ensaio de MTT. CN: controle negativo, CP: controle positivo Triton X-100. Concentrações C7: 0,15625 mg mL⁻¹; C8: 0,078 mg mL⁻¹; C9: 0,039 mg mL⁻¹ e C10: 0,019 mg mL⁻¹ do inseticida comercial.

Os resultados desse segundo ensaio, realizado com as concentrações C7 a C10, mostraram que as C7 e C8 foram mais citotóxicas que as C9 e C10.

A partir desses últimos resultados do MTT, foi possível estabelecer as concentrações a serem usadas nos ensaios de citotoxicidade da Resazurina e do Azul de Tripan, sendo elas as C7, C8, C9 e C10.

Teste de Resazurina

Os ensaios da Resazurina, realizados com as concentrações C7 a C10, estão apresentados na figura 3.

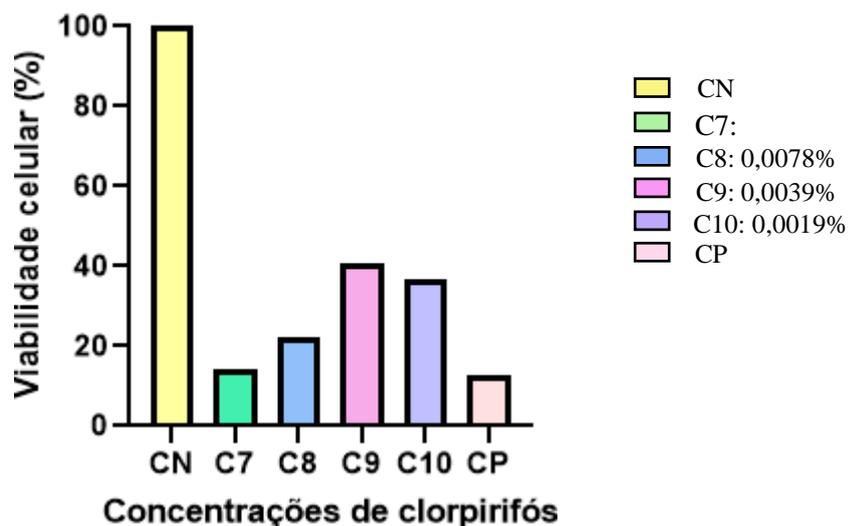


Figura 3. Resultado do ensaio de Resazurina. CN: controle negativo, CP: Controle positivo Triton X-100. Concentrações C7:0,015625%, C8:0,0078%, C9: 0,0039% e C10: 0,0019% do inseticida comercial.

Os resultados dos ensaios realizados com Resazurina mostraram que todas as concentrações testadas do inseticida clorpirifós apresentaram efeito citotóxico, com valores de viabilidade celular inferiores a 40%.

Teste do Azul de Tripán

Os resultados dos ensaios do Azul de Tripán, realizados com as concentrações C7 a C10, estão apresentados na figura 4.

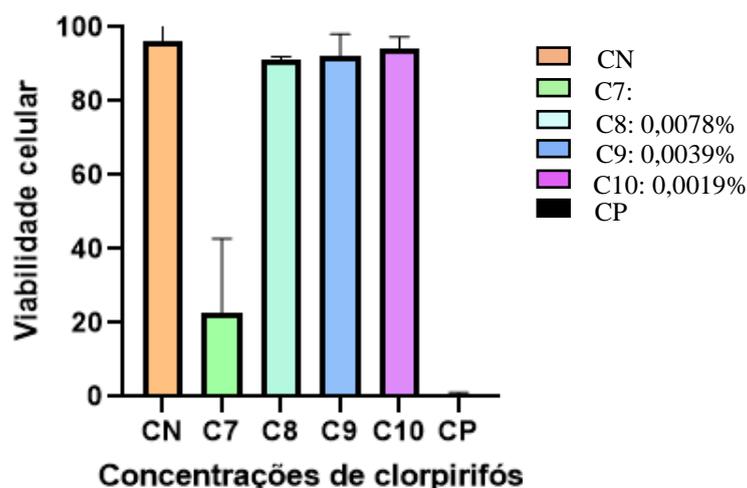


Figura 4. Resultado do ensaio do Azul de Tripán. CN: controle negativo, CP: Controle positivo Triton X-100. Concentrações C7: 0,15625 mg mL⁻¹; C8: 0,078 mg mL⁻¹; C9: 0,039 mg mL⁻¹ e C10: 0,019 mg mL⁻¹ do inseticida comercial. As barras de erro representam o desvio padrão (DP).

Os resultados observados no ensaio do azul de tripan mostraram que a concentração C7 apresentou potencial citotóxico para as células HepG2/ C3A, induzindo uma viabilidade celular menor que 60%. O efeito citotóxico não foi observado para as demais concentrações (C8, C9 e C10).

Pela análise comparativa dos resultados obtidos nos três ensaios colorimétricos de toxicidade (MTT, ensaio de Resazurina e Azul Tripán), pode-se inferir que o inseticida clorpirifós é tóxico para as células humanas. Nesse estudo também foi possível observar, pelos ensaios do MTT e do Azul de Tripán, que o inseticida clorpirifós apresenta uma toxicidade dose dependente, pois quanto maior foi a dose testado, maior foi o efeito citotóxico observado. Dentre os ensaios realizados, o de Resazurina se mostrou o mais sensível, uma vez que todas as concentrações avaliadas por esse teste exibiram efeito citotóxico (viabilidade celular inferior a 40%).

Discussão

O uso crescente do inseticida clorpirifós tem aumentado o potencial de exposição acidental ou ocupacional ao produto, o que vem desencadeando

consequentes casos de intoxicações, tanto de efeito agudo como crônico. Este quadro tem evidenciado a necessidade de estudos que avaliem mais detalhadamente o potencial tóxico do inseticida (DIAS et al., 2018). Diante deste contexto, o presente estudo avaliou a citotoxicidade de baixas concentrações do inseticida clorpirifós para células da linhagem de fígado humano HepG2/C3A.

A avaliação do potencial hepatotóxico de um produtos químicos constitui uma estratégia interessante para a certificação do seu uso seguro (ANTOINE et al. (2009). Os ensaios *in vitro*, realizados com linhagens celulares humanas, têm mostrado resultados interessantes sobre a toxicidade de diferentes compostos, se tornando, assim, uma opção ética e viável para reduzir o uso de animais em experimentação (HORII & YAMADA, 2008). Dentre os ensaios *in vitro*, destacam os realizados com a linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2/C3A. Essas células vem sendo muito utilizadas em estudos toxicológicos, por apresentarem características biológicas semelhantes as células de fígado adulto, portanto com atividade metabólica preservada, inclusive as de biotransformação e desintoxicação de substancias tóxicas (PROT et al., 2011; KELLY, 1994).

Os efeitos neurotóxicos do inseticida clorpirifós já são bem conhecidos, principalmente porque sua forma de ação é dada pela inibição da enzima colinesterase (MARQUES, 2020). Seus efeitos tóxicos e potenciais genotóxico e mutagênico também já foram comprovados em estudos realizados com diversos organismos, como, por exemplo, vegetais (CONRADI, 2020), insetos (MENDONÇA, 2021), peixes (MARQUES & AMÉRICO-PINHEIRO, 2020) e humanos (NOVAIS et al., 2021). Porém, os mecanismos de toxicidade hepática provocados por esse químico ainda são pouco explorada, principalmente aqueles relacionados aos efeitos de baixas doses de organofosforados.

No presente estudo, foi observado pelo teste do MTT, que as contrações C1 a C5 (, respectivamente) foram altamente citotóxicas para as células HepG2/C3A, cuja viabilidade das mesmas se mostrou abaixo de 20%, valor este semelhante ao exibido pelo teste CP. Como a C6 (0,3125 mg mL⁻¹) induziu uma menor citotoxicidade, em comparação com as anteriores (viabilidade celular de 60%), ela foi usada no preparo de outras quatro diluições,

para a obtenção de novas concentrações (C7: 0,15625 mg mL⁻¹; C8: 0,078 mg mL⁻¹; C9: 0,039 mg mL⁻¹ e C10: 0,019 mg mL⁻¹), a serem novamente testadas no ensaio do MTT e também nos outros dois ensaios colorimétricos (ensaio de resazurina e do azul de tripan). Com as novas diluições testadas foi possível verificar que as concentrações mais baixas (C9 e C10) não foram citotóxicas para as células HepG2/ C3A, quando submetidas ao teste do MTT. Já no ensaio de resazurina, foi observado que todas as concentrações testadas (C7 a C10) apresentaram potencial citotóxico para as células, enquanto que, pelo ensaio do azul de tripan, foi observado atividade citotóxica somente para a concentração C7. Neste ensaio, as demais concentrações testadas (C8, C9 e C10) apresentaram viabilidade celular superior a 80%, portanto não citotóxicas.

O teste do MTT é baseado na conversão de um corante amarelo hidrossolúvel (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) em um sal roxo insolúvel em água, chamado formazan. Essa conversão acontece por ação da redutase mitocondrial (KUMAR et al., 2018). Os sais usados nesse ensaio medem a atividade mitocondrial, e a quantidade de formazan produzida na redução do MTT está diretamente relacionada ao número de células viáveis, que pode ser medido em espectrofotometria (PENG et al., 2005).

Como todas as células são dependentes de ATP para a realização de suas atividades metabólicas/fisiológicas, danos mitocôndriais podem causar sérios comprometimentos funcionais às células ou até mesmo a sua morte (HUANG, 2020). O ensaio realizado com o MTT é amplamente aplicado para avaliar efeitos citotóxicos, usando como parâmetro de avaliação a viabilidade celular, uma vez que, somente as células vivas, apresentam atividade mitocondrial e membranas intactas e podem catalisar a reação do sal (SHOEMAKER et al., 2004). Esse ensaio também apresenta vantagens por ser de baixo custo e de fácil execução (COSTA, 2013). Pelo ensaio do MTT, foi possível confirmar que as concentrações C1, C2, C3, C4, C5 e C6 do inseticida clorpirifós apresentam um alto potencial citotóxico para as células de hepatoma humano. Essa resposta observada é indicativa de que o agrotóxico interferiu drasticamente na viabilidade dessas células, provavelmente por indução de danos nas mitocôndrias e /ou por peroxidação lipídica.

Diferentes linhagens celulares foram aplicadas em estudos de citotoxicidade de agrotóxicos da classe dos organofosforados. NA et al., (2016), avaliaram a toxicidade de concentrações usadas em campo dos compostos fosfato de trifenil (TPP), tributilfosfato (TBP), tris (2-butoxietil) fosfato (TBEP) e tris (2-cloroisopropil) fosfato (TCPP), em células de hepatoma humano (HepG2), de câncer de pulmão (A549) e de câncer de cólon (Caco-2). O ensaio de viabilidade celular (MTT), aplicado em células CCK-8 (*CellCounting Kit – 8*), mostrou que todos os compostos interferiram na viabilidade das células. Os autores ainda citaram a capacidade desses compostos induzirem lesões no DNA nuclear. Boussabbeh et al., (2015) estudaram os efeitos citotóxicos do agrotóxico Diazinon, (de mesma classe química do clorpirifós) sobre células HTC116 (câncer de cólon humano), por meio de ensaio do MTT. O inseticida foi testado na sua concentração de uso em campo. Os resultados do estudo mostraram que o composto é citotóxico para o tipo celular testado, e que pode causar danos oxidativos e peroxidação lipídica às células, decorrentes de produção de radicais livres, e fragmentação de DNA.

Hernández-Toledano et al., (2020), avaliaram os efeitos tóxicos do inseticida Malation, agrotóxico da classe dos orgafosforados, em linhagens de células hepáticas humanas HepG2 e WRL-68, bem como em células mononucleares do sangue periférico. O teste do MTT indicou citotoxicidade para os dois tipos celulares, indicando que houve redução da atividade mitocondrial induzida pelas concentrações testadas (0,1; 1; 10; 25; 50; 100 μ M).

Os resultados dos trabalhos citados acima são semelhantes aos encontrados na presente pesquisa, em relação a inibição de atividade mitocondrial por concentrações de agrotóxicos menor ou igual as indicadas para uso em campo.

A Resazurina é um corante muito utilizado para a avaliação de contaminação bacteriana ou fúngica, em ensaios de qualidade seminal e em ensaios de monitoramento de proliferação celular e/ou citotoxicidade (ZHANG et al., 2004). Para este último, tem sido empregado diferentes tipos celulares, como por exemplos linfócitos (MOCELIN et al., 2021), células de cérebro de rato (DERRY et al., 2021) e células hepáticas (SRISSET et al., 2021).

A reação da resazurina se baseia na redução de resazurina em resofurina, que promove a mudança da cor azul (resazurina) para a cor rosa (resofurina), por ação das enzimas mitocondriais e também citoplasmáticas. Desta forma, se avalia com esse teste, tanto as atividades mitocondriais como as de enzimas citoplasmáticas, do tipo redutase ou diaforase (O'BRIEN et al., 2000). Os resultados do ensaio de resazurina do presente estudo, realizados com baixas concentrações (C7, C8, C9 e C10) do inseticida clorpirifós, mostraram que todas as concentrações interferiram na viabilidade celular (valores inferiores a 40%), comprovando assim a ação citotóxica do inseticida para a linhagem celular testada.

Scotta et al., (2017) avaliaram a citotoxicidade de duas concentrações do inseticida clorpirifós (8,75 µg/mL e 35 µg/mL) em células de baço de rato. Os resultados do ensaio de resazurina indicaram potencial citotóxico para as duas concentrações. No estudo desenvolvido por Fai e Grant (2007), os autores avaliaram a citotoxicidade de oito fungicidas pertencentes a diferentes grupos químicos, dentre eles, os organofosforados. Os resultados dos ensaios de resazurina, usando os valores de IC50 e IC90 desses químicos, indicaram efeito citotóxico para os compostos da classe dos organofosforados.

Existe uma escassez muito grande de informações sobre o potencial citotóxico de concentrações mais baixas que as indicadas para uso em campo, relacionados aos compostos da classe dos organofosforados. Considerando que o inseticida clorpirifós é o sexto inseticida mais utilizado no Brasil e que os resultados do presente estudo mostraram que mesmo as doses residuais deste agrotóxico (C7, C8, C9 e C10) desencadearam efeitos citotóxicos em células hepáticas humanas, fica um alerta de que o uso dessa substância deve ser reavaliado, tanto pelo fato de serem extremamente usadas nas lavouras brasileiras, como por serem de alta toxicidade para humanos. O estudo também ressalta a necessidade de se realizar mais estudos sobre a temática da toxicidade de baixas concentrações de agrotóxicos, para se ampliar os conhecimentos a respeito dos possíveis efeitos desses compostos sobre organismos não alvos e, assim, definir estratégias que possam assegurar a qualidade ambiental. Os resultados dos ensaios de resazurina, além de corroborar os dados registrados pelo ensaio do MTT, sobre a ação do

inseticida sobre as mitocôndrias, mostram que o clorpirifós interfere também nas atividades de enzimas citoplasmáticas, mesmo quando em baixas concentrações (C9 e C10). Com isso podemos inferir que o ensaio de resazurina foi mais sensível para a avaliação do potencial citotóxico do clorpirifós que o teste do MTT.

O ensaio realizado com o corante azul de tripan é muito usado para avaliar a citotoxicidade de compostos químicos (ZANATTA et al., 2012). A metodologia desse teste se baseia na absorção do azul de tripan por células mortas, devido à perda de seletividade da membrana, enquanto que as células vivas permanecem sem coloração (KIM et al., 2011). O ensaio do azul de tripan é um dos primeiros ensaios descritos na literatura para avaliar a viabilidade celular, sendo considerado o método padrão para esse tipo de avaliação (CHAN et al., 2015).

Pelos resultados do ensaio do azul de tripan, realizados para avaliar a citotoxicidade das baixas concentrações de clorpirifós, pode-se observar que apenas a C7 não interferiu na viabilidade das células HepG2/C3A (registro de valor acima de 80% de viabilidade). Foi observado que houve diminuição da toxicidade, proporcional à diminuição da concentração de clorpirifós.

De et al., (2015) avaliaram a toxicidade de um agrotóxico organofosforado pelo ensaio do azul de tripan. Os resultados do estudo também mostraram que houve aumento de células viáveis com a diminuição da concentração do produto. Estudos de Ahmadian et al., (2018) investigaram o potencial citotóxico de concentrações de clorpirifós em células de hepatócitos primários de ratos machos Sprague Dawley (200-250g). Os resultados também mostraram redução da toxicidade com a diminuição da concentração. Além disso, o teste de azul de tripan foi utilizado para determinar concentrações que seriam utilizadas nos demais testes, como o MTT e a medição do vazamento de LDH, que é usado para a determinação da integridade da membrana (HAÏDARA et al., 1999). O teste do LDH mostrou potencial perda de integridade da membrana, induzida por clorpirifós.

A toxicidade de clorpirifós foi também investigada por Li et al., (2015) pelo ensaio do azul de tripan, realizado com células de carcinoma cervical humano (HeLa) e células de rim de embrião humano (HEK293). Os resultados mostraram

que o clorpirifós causou uma redução de viabilidade das células HeLa, HEK293 e de *Drosophila* (S2), dependente do aumento da concentração. Esse trabalho avaliou concentrações mais altas que a indicada para uso em campo.

Slotkin et al., (2017) estudaram a neurotoxicidade de três compostos organofosforados, os quais apresentaram viabilidade celular maior de 80% nas concentrações mais baixas avaliadas. O ensaio de azul de tripan foi realizado para estudo de viabilidade celular. Resultados semelhantes foram encontrados nessa pesquisa, onde as menores concentrações não apresentaram potencial citotóxico.

Conclusão

No presente estudo, foi possível avaliar o potencial citotóxico de diferentes concentrações do inseticida clorpirifós, por meio de três diferentes ensaios de viabilidade celular (MTT, Resazurina e Azul de Tripan). Inicialmente foram avaliadas seis concentrações do inseticida pelo ensaio do MTT, sendo que a maior concentração testada foi a de uso na agricultura (1 mg mL^{-1}). Todas as concentrações testadas apresentaram potencial citotóxico para as células HepG2/C3A. Foram preparadas concentrações mais baixas do inseticida (consideradas residuais), que foram novamente aplicadas no testes do MTT e também nos testes de resazurina e azul de tripan.

Em relação a avaliação da atividade mitocondrial pelo ensaio do MTT, as concentrações iniciais (C1 a C6) apresentaram potencial citotóxico para as células HepG2/C3A. Dentre as concentrações residuais avaliadas, somente C7 e C8 apresentaram potencial citotóxico, indicando que o composto, mesmo em concentrações baixas, promove alteração na atividade mitocondrial das células.

O teste de resazurina foi mais sensível, visto que todas as concentrações estudadas apresentaram potencial citotóxico, uma vez que a viabilidade celular observada foi inferior a 40%. Esse ensaio permitiu a confirmação da citotoxicidade do inseticida clorpirifós, por alterações na atividade das enzimas mitocondriais e das enzimas citoplasmáticas.

Os resultados do ensaio do azul de tripan indicaram que somente a C7 apresentou potencial citotóxico para as células avaliadas. Desta forma, foi

observado que nas demais concentrações, o composto conseguiu entrar na célula, porém sem perturbar a homeostase da membrana.

Foi observado nos três ensaios de citotoxicidade realizados que houve diminuição do potencial tóxico, a medida que a concentração de clorpirifós foi diminuindo. Porém, mesmo as mais baixas concentrações ainda foram capazes de causar danos severos às células, levando-as a morte, possivelmente devido às alterações nas atividades das enzimas citoplasmáticas, como também observado no ensaio de resazurina.

Os resultados do presente estudo mostram que este inseticida é altamente tóxico para células humana, o que pode representar sérios riscos à saúde da população expostas a esses químicos. O estudo ainda alerta para a necessidade de se realizar mais avaliações sobre a toxicidade de baixas concentrações de agrotóxicos e os impactos que o clorpirifós pode causar em organismos não alvos.

Referências

- ADRESI, Y.. **Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance**. Turkish Journal of Biochemistry -Turk J Biochem], 28(2), 54-61, 2003
- AHMADIAN, E., KHOSROUSHAHI, A. Y., EGHBAL, M. A., & EFTEKHARI, A. **Betanin reduces organophosphate induced cytotoxicity in primary hepatocyte via an anti-oxidative and mitochondrial dependent pathway**. Pesticide biochemistry and physiology, 144, 71-78, 2018
- ALF, A. M., FERNANDES, S. B. V., & MUELLER, A. A. **Uso dos agroquímicos e os impactos na saúde do trabalhador rural**. Salão do Conhecimento, 6(6), 2020
- AN, J., HU, J., SHANG, Y., ZHONG, Y., ZHANG, X., & YU, Z. **The cytotoxicity of organophosphate flame retardants on HepG2, A549 and Caco-2 cells**. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 51, 980-988, 2016
- BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.
- BERETTA, E. M. **Efeitos do inseticida Diazinon em células de Hepatocarcinoma humano (HepG2)**, Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal - FCAT, UNESP, 2020

BOCHNIE, K. A., GREGÓRIO, P. C., & MACIEL, R. A. P. **Análise da viabilidade celular por mtt em células tratadas com toxinas urêmicas–revisão.** *Cadernos da Escola de Saúde*, 1, 2016

BOUSSABBEH, M., SALEM, I. B., HAMDY, M., FRADJ, S. B., ABID-ESSEFI, S., & BACHA, H. **Diazinon, an organophosphate pesticide, induces oxidativestress and genotoxicity in cells deriving from large intestine.** *Environmental Science and Pollution Research*, 23(3), 2882-2889, 2016

BOWLS, B. J., FREEMAN JR, J. M., LUNA, J. A., & MEGGS, W. J. **Oral treatment of organophosphate poisoning in mice.** *Academic Emergency Medicine*, v.10, p.286-287, 2003

CADWELL, K. D., LOCKWOOD, N. A., NELLIS, B. A., ALF, M. E., WILLIS, C. R., & ABBOTT, N. L. **Detection of organophosphorous nerve agents using liquid crystals supported on chemically functionalized surfaces.** *Sensors and Actuators B: Chemical*, 128(1), 91-98, 2007

CHAN LLY, KUKSIN D, LAVERTY DJ, SALDI S, QIU J. **Observação morfológica e análise usando citometria de imagem automatizada para a comparação do azul de tripano e método de detecção de viabilidade baseado em fluorescência.** *Citotecnologia*; 67 (3): 461-73, 2015

CONRADI JUNIOR, E. **Dinâmica de atrazina e clorpirifós em lisímetro cultivado com milho (Zea mays L.).** Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, UNIOESTE, 2020

COSTA, Â. D. A. DA. **Avaliação da citotoxicidade de diferentes nanotransportadores sem substância ativa em função da sua densidade populacional.** 1-101. Disponível em <
[https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/9273/1/Ângela Daniela Alves da Costa.pdf](https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/9273/1/Ângela%20Daniela%20Alves%20da%20Costa.pdf)> Acesso em Jun de 2021.

DATASUS. Dados da Bahia de Intoxicação Exógena. Brasília. Disponível em:
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/Intoxba.def>. Acesso em Maio 2021.

DERRY, P. J., MCHUGH, E. A., LIOPO, A. V., VO, A. T., GNANASEKARAN, A., TOUR, J. M., & KENT, T. A. **Abstract P792: Therapeutic Catalytic Nanoantioxidants Derived From Activated Charcoal.** *Stroke*, 52(Suppl_1), AP792-AP792, 2021

DIAS, A. P., GURGEL, A. DO M., ROSA, A. C. S., BÚRIGO, A. C., DE OLIVEIRA, A. C., NIEMEYER, C. B., SANTOS, E. H. DE A., ALMEIDA, F. S., CARNEIRO, F. F., NETTO, G. F., GURGEL, I. G. D., VILLARDI, J. W. R., ROSA, J. C. S., FRIEDRICH, K., AUGUSTO, L. G. DA S., BASTOS, L. H. P., MEIRELLES, L. C., CARDOSO, MARIA H. W. M., COSTA, R. N., ... DE ALMEIDA, V. E. **Agrotóxicos de Saúde.** Disponível em:

<<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/32385/2/02agrotoxicos.pdf>> Acesso em Jun de 2021.

DORNELES, A. L.. **Toxicidade de Inseticidas Organofosforados para as Abelhas sem Ferrão *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca fiebrigi***. Tese de Doutorado apresentada na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Brasil). 51, 60, 2015

EFSA. **The European Union One Health 2019 Report**. Acesso em maio 2021. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/6406>>

FAI, P. B., GRANT, A., & REID, B. **Chlorophyll a fluorescence as abiomarker for rapid toxicity assessment**. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 26(7), 1520-1531, 2017

FENIK, J., TANKIEWICZ, M., & BIZIUK, M. **Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 30(6), 814-826, 2011

FOONG, S. Y., MA, N. L., LAM, S. S., PENG, W., LOW, F., LEE, B. H., & SONNE, C. **A recent global review of hazardous chlorpyrifos pesticide in fruit and vegetables: prevalence, remediation and actions needed**. Journal of hazardous materials, 400, 123006, 2020

GOMEZ-LECHON, M., DONATO, M., CASTELL, J., & JOVER, R. **Human Hepatocytes as a Tool for Studying Toxicity and Drug Metabolism**. Current Drug Metabolism, 4(4), 292-312, 2005

HERNÁNDEZ-TOLEDANO, D. S., ESTRADA-MUÑIZ, E., & VEGA, L. **Genotoxicity of the organophosphate pesticide malathion and its metabolite dimethylthiophosphate in human cells in vitro**. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 856, 503233, 2020

HERTZ-PICCIOTTO, I., SASS, J. B., ENGEL, S., BENNETT, D. H., BRADMAN, A., ESKENAZI, B., LANPHEAR, B., & WHYATT, R. **Organophosphate exposures during pregnancy and child neurodevelopment: Recommendations for essential policy reforms**. PLoS Medicine, 15(10), 1-15, 2018

HORII, I., & YAMADA, H. **In vitro hepatotoxicity testing in the early phase of drug discovery**. Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments AATEX, 14, 437-441, 2008

HUANG, T., HUANG, Y., HUANG, Y., YANG, Y., ZHAO, Y., & MARTYNIUK, C. J. **Toxicity assessment of the herbicide acetochlor in the human liver carcinoma (HepG2) cell line**. Chemosphere, 243, 125345, 2020

JOKANOVI, M. **Biotransformation of organophosphorus compounds**. Toxicology, 166(3), 139-160, 2001

KUMAR, P., NAGARAJAN, A., & UCHIL, P. D. **Analysis of cell viability by the MTT assay**. Cold Spring Harbor Protocols, 2018(6), 469-471, 2018

KELLY, J. H. **U.S. Patent No. 5,290,684**. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, 1994

KIM, J. S., NAM, M. H., AN, S. S. A., LIM, C. S., HUR, D. S., CHUNG, C., & CHANG, J. K. **Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods**. *Journal of clinical laboratory analysis*, 25(2), 90-94, 2011

LI, D., HUANG, Q., LU, M., ZHANG, L., YANG, Z., ZONG, M., & TAO, L. **The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis**. *Chemosphere*, 135, 387-393, 2015

MARQUES, M. B. L., & AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P. **Ocorrência de clorpirifós em ambientes aquáticos e seus efeitos ecotoxicológicos em bioindicadores**. *Revista Nacional de Gerenciamento de Cidades*, 8(65), 1184, 2020

MAZZEO, D. E. C., LEVY, C. E., DE ANGELIS, D. D. F., & MARIN-MORALES, M. A. **BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery**. *Science of the total environment*, 408(20), 4334-4340, 2010

MENDONÇA, A. J. T. **Toxicidade oral de inseticidas derivados do Nimsobre a abelha africanizada *Apis mellifera* (Hymenoptera: apidae)**. 2021

MENDES, B., RODRIGUES, V., SOUZA, A., BARACY, G., BASTOS, I., & ORZECOWSKI, M. **Avaliação do uso da resazurina em teste de suscetibilidade in vitro frente a *Sporothrix brasiliensis*** *Histórico do Artigo*. A avaliação da resistência. 2, 32-37, 2019

MOCELIN, L. C., RODRIGUES, K. S., BRITO, M. G., GRAMS, K. C., ZAMBRA, A. L., PARISI, M. M., & ALTA, U. D. C. **Efeito citotóxico diferencial do extrato hidroetanólico de erva-mate differential cytotoxic effect of hydroethanolic yerba mate extract (*ilex paraguariensis*) on erythrocytes and peripheral blood**. 1-16, 2021

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63, 1983

NAIME, A. A. **Estudo da neurotoxicidade induzida pelo clorpirifós e seu metabólito oxon em células HT22**. 2017

NETO, M. C., & DIMENSTEIN, M. **Mental Health in Rural Settings: Analyzing the Psychosocial Work**. *Psicologia: Ciencia e Profissao*, 37(2), 461, 2017

NOGUEIRA, F. DE A. M., SZWARCOWALD, C. L., & DAMACENA, G. N. **Exposição a agrotóxicos e agravos à saúde em trabalhadores agrícolas: o que revela a literatura?** *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 45, 1-23, 2020

NOVAIS, C. M., QUEIROZ, T. M. DE, & SEABRA JÚNIOR, S. **Panorama da**

contaminação ambiental por agrotóxicos no estado do mato grosso: risco para o abastecimento urbano.*Research, Society and Development*, 10(1), 2021

PABUENA, D. E., ORTIZ, I. C., LÓPEZ, J., OROZCO, L. J., QUIJANO PARRA, A., PARDO, E., & MELÉNDEZ, I. **Actividad genotóxica inducida por extracto de fresa fumigada con pesticidas en Pamplona, Norte de Santander, Colombia.** *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 19(76), 111-117, 2015

PENG, L., WANG, B. & REN, P. **Redução de MTT por flavonóides na ausência de células.** *Colloids Surf B Biointerfaces*. 10 , 108-11, 2005

PROT, J. M., ANINAT, C., GRISCOM, L., RAZAN, F., BROCHOT, C., GUILLOUZO, C. G., ... & LECLERC, E. **Improvement of HepG2/C3a cell functions in microfluidic biochip.** *Biotechnology and bioengineering*, 108(7), 1704-1715, 2011

ROGERO, S. O., LUGÃO, A. B., IKEDA, T. I., & CRUZ, Á. S. **Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias.** *Materials Research*, 6(3), 317-320, 2003

SANTOS, V. M. R. D., DONNICI, C. L., DACOSTA, J. B. N., & CAIXEIRO, J. M. R. **Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais.** *Química Nova*, 30, 159-170, 2007

SCOTTA, A. V., BONGIOVANNI, G. A., & SORIA, E. A. **In vitro Modulating Activity of aqueous extracts from American Plants on Chlorpyrifos-induced toxicity on Murine Splenocytes.** *Revista de la Facultad de Ciencias Medicas (Cordoba, Argentina)*, 74(4), 325-330, 2017

SINITOX. **O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox).** Informações tóxico-farmacológica. Rio de Janeiro. Disponível em <<https://sinitox.iciet.fiocruz.br/>> Acesso em Jun de 2021.

SHOEMAKER, M., COHEN, I., & CAMPBELL, M. **Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells.** *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2-3), 381-384, 2019

SLOTKIN, T. A., SKAVICUS, S., STAPLETON, H. M., & SEIDLER, F. J. **Brominated and organophosphate flame retardants target different neurodevelopmental stages, characterized with embryonic neural stem cells and neuronotypic PC12 cells.** *Toxicology*, 390, 32-42, 2017

SUNANDA, M., CHANDRA SEKHARA RAO, J., NEELIMA, P., GOVINDA RAO, K., & SIMHACHALAM, G. **Effects of chlorpyrifos (An organophosphate pesticide) in fish.** *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 39(1), 299-305, 2016

USEPA (2020). **Environmental crimes case bulletin** . Acesso em maio 2021.

Disponível em <

[YOLLADA SRISSET, WARANYA CHATUPHONPRASERT & KANOKWAN JARUKAMJORN. **Bergenin Attenuates Sodium Selenite-Induced Hepatotoxicity via Improvement of Hepatic Oxidant-Antioxidant Balance in HepG2 Cells and ICR Mice**. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 11:2, 97-115, 2021](https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P100ZEKS.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=2016+Thru+2020&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C16thru20%5CTxt%5C00000019%5CP100ZEKS.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL></p></div><div data-bbox=)

ZANATTA, G., STEFFENS, D., BRAGHIROLI, D. I., FERNANDES, R. A., NETTO, C. A., & PRANKE, P. **Viability of mesenchymal stem cells during electrospinning**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(2), 125-130, 2012

ZHANG, H. X., DU, G. H., & ZHANG, J. T. **Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro**. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(3), 385-389, 2004

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os dados obtidos no presente estudo forneceram importantes resultados quanto aos efeitos fitotóxicos, citogenotóxicos e mutagênicos de diferentes concentrações estudadas do inseticida clorpirifós, pertencente à a classe dos organofosforados. Desse modo, podemos concluir que:

- A espécie *A. cepa* mostrou ser indicada mais indicada para ser usada como *bioindicador* de fitotoxicidade do clorpirifós do que a espécie *L. sativa*, visto que as concentrações mais altas desse inseticida inibiram a germinação de *A. cepa* e não de *L. sativa*;

- A fitotoxicidade do composto estudado foi comprovada pelo ensaio de enlramento de radícula e hipocótilo de *L. sativa*. Nestes testes foi observado que quanto maior a concentração do herbicida, maior foi o efeito tóxico para o bioindicador;

- Os potenciais citogenotóxico e mutagênico do inseticida Clorpirifós foram avaliados pelo índice de germinação (IG), índice mitótico, índice de frequência de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos MN) em célula meristemática e F1;

- Foi observada uma redução significativa de IG para as concentrações C1, C2 e C3, indicando que essas concentrações foram fitotóxicas para o bioindicadores testados. Pelos baixos IG de C1 e C2, não foi possível, se quer, obter material suficiente para prosseguir os testes com essas concentrações;

- As concentrações C4, C5 e C6 não apresentaram potencial fitotóxico, nem para *A. cepa* e nem para *L. sativa*;

- As análises de índice mitótico mostraram que as concentrações de C4 a C6 não apresentavam potencial mutagênico para o bioindicador *A. cepa*;

- O ensaio de AC, realizados com células meristemáticas de *A. cepa*, indicaram potencial genotóxico do clorpirifós para as concentrações C3, C4 e C5, comprovado pela presença significativa de brotos nucleares e MN. A presença de brotos está associada ao potencial aneugênico do agrotóxico;

- O potencial mutagênico observado nos ensaios do MN de células F1 mostrou que danos que foram induzidos nas células meristemáticas persistiram nas F1;
- Os estudos realizados com sementes de *A. cepa* e *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do clorpirifós indicaram que a menor concentração testada (C6) não foi fitotóxica, citogenotóxica e nem mutagênica, para nenhum dos bioindicadores;
 - Os resultados das concentrações inicialmente analisadas pelo ensaio do MTT (C1 a C6), mostraram que todas as concentrações foram citotóxicas para as células HepG2/C3A. Foi então preparadas 4 novas diluições (C7: 0,15625 mg mL⁻¹; C8: 0,078 mg mL⁻¹; C9: 0,039 mg mL⁻¹ e C10: 0,019 mg mL⁻¹), usando a C6 como base de preparo. Essas concentrações foram novamente testadas pelo ensaio do MTT e também pelos outros ensaios colorimétricos de citotoxicidade (resazurina e azul de tripan);
 - O ensaio do MTT, realizado com as concentrações mais baixas do inseticida (C7 a C10) indicou que somente as C9 e C10 não foram citotóxicas para as células HepG2/C3A. Os testes com as demais concentrações levaram a uma viabilidade celular inferior a 80%, indicando que a substância promove alterações nas enzimas mitocondriais;
 - O teste de resazurina indicou potencial citotóxico para todas as concentrações do inseticida estudado, indicando que as concentrações residuais podem provocar alterações nas enzimas citoplasmáticas das células expostas, como pode ser visto para a C10, que foi a concentração mais baixa testada neste estudo. Esses resultados também confirmam alterações causadas nas enzimas mitocondriais pela C7 e C8;
 - O ensaio do azul de tripan, que avalia a integridade da membrana citoplasmática, confirmou o potencial citotóxico somente para C8, pois as demais concentrações não apresentaram potencial citotóxico. Isso indica que o composto, nas concentrações mais baixas, consegue entrar na célula sem causar danos às suas membranas;
 - A busca de literatura científica, realizada para a elaboração de um artigo de revisão sobre os possíveis impactos dos agrotóxicos da classe dos OF, com ênfase não inseticida clorpirifós, mostrou que já existem pesquisas toxicológicas associadas

ao seu uso, principalmente às relacionadas com efeitos neurotóxicos. Porém, são escassos os estudos que abordam a toxicidade de concentrações residuais desses químicos. Desta forma, é muito importante a avaliação de efeitos biológicos de diferentes concentrações, especialmente as mais baixas, visto que os OF podem percorrer longas distâncias e atingir áreas onde eles nunca foram aplicados. A sua presença nesses novos ambientes pode incorrer a risco severos à biota exposta e danos consideráveis à saúde humana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITARIA. **Índice Monográfico C20**

– **Clorpirifos**. portal.anvisa.gov.br: Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/C20%2B%2BClorpirif%25C3%25B3s.pdf/f8ddca3d-4e17-4cea-a3d2-d8c5babe36ae>. Acesso em: 01 de dezembro de 2018>.

ANACLETO, L. R., ROBERTO, M. M., & MARIN-MORALES, M. A.

Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. Chemosphere v.173. p.31-42, 2017

ARAGÃO, F. B., PALMIERI, M. J., FERREIRA, A., COSTA, A. V., QUEIROZ, V. T., PINHEIRO, P. F., & ANDRADE-VIEIRA, L. F. **Phytotoxic and cytotoxic effects of *Eucalyptus* essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.)**. Allelopathy J, v.35, p. 259-272, 2015

ANWAR, S., LIAQUAT, F., KHAN, Q. M., KHALID, Z. M., & IQBAL, S. **Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3, 5, 6-trichloro-2- pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1**. Journal of Hazardous Materials, v. 168. p.400-405, 2009

AVELAR-FREITAS, B. A., ALMEIDA, V. G., PINTO, M. C. X., MOURÃO, F. A. G., ASSENSINI, A. R., MARTINS-FILHO, O. A., ROCHA-VIEIRA, E., & BRITO-MELO, G. E. A. **Trypan blue exclusion assay by flow cytometry**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 47. P. 307-315, 2014

BIANCHI, J., FERNANDES, T. C. C., & MARIN-MORALES, M. A. **Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them**. Chemosphere, v. 144, p. 475-83, 2016.

BIANCHI, J., MANTOVANI, M. S., & MARIN-MORALES, M. A. **Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture**. Journal of Environmental Sciences, v.36, p. 102-111, 2015

BRAIBANTE, M. E. F., & ZAPPE, J. A. **A Química dos Agrotóxicos**. Química Nova Na Escola, v. 34, p. 10-15, 2012

CARVALHO, T. U. **Cultura de Células Animais**. In: BENCHIMOL, M. (Org.). Métodos de Estudo da Célula. Rio de Janeiro: FENORTE/UENF., v. 2, p. 45-58, 1996

CHAPMAN, P. M. **Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology**. Marine Pollution Bulletin, v.44, p.7-15, 2002

CLARK, R. F. **Inseticides: Organic phosphorus compounds and carbamate.**In: **Goldfrank's Toxicologic Emergencies.** Edited by: Flomenbaum, N. E.; Goldfrank, L. R.; Hoffman, R. S.; Howland, M. A.; Lewin, N. A.; Nelson, L. S. McGraw-Hill, p. 1497-1512, 2006

CLASEN, B.; MURUSSI, C. R.; FORGIARINI, F. R. BAGGIOTTO, C. **Atividades agropecuárias e a contaminação da água e peixes com agrotóxicos. Manejo e conservação do solo e da água em pequenas propriedades rurais no sul do Brasil: impacto das atividades agropecuárias na contaminação do solo e da água.** Organizador Tales Tiecher. – Frederico Westphalen: RS. p.181, 2017

DE SOUZA, R. S., BARBIERI, I. B., & ADRIANO, M. Z. **A contaminação agroquímica no Brasil vista como crime de ecocídio. Por uma abordagem ecocêntrica na regulação de agrotóxicos.** Desenvolvimento e Meio Ambiente, v. 57, 2021

DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002. **Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto 4074-2002 - Decreto dos Agrotóxicos.** Link: <file:///Users/mariaaprecidamarinmorales/Downloads/decreto-4074-2002-decreto-dos-agrotoxicos.pdf>. Acesso em 24/09/2021.

DENIZOT, F., & LANG, R. **Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.** Journal of Immunological Methods, v.89,p. 271-277, 1986

DOW AGROSCIENCE. **Toxicological Properties od Chlorpyrifos.** Disponível em <<http://www.dowagro.com/webapps/lit/litorder.asp?filepath=chlorp/pdfs/noreg/010-90067.pdf&pdf=true>>. Acesso em Maio 2021. **Environmental mutagens,**

EDWARDS, F. L., & TCHOUNWOU, P. B. **Environmental toxicology and health effects associated with methyl parathion exposure—a scientific review.** International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 2, p. 430-441, 2005

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos / Humberto Gonçalves dos Santos et al. 3ª ed. Rev. Ampl. 353p. il. Color. - Brasília, DF.**

FACHINETTO, J. M.; BAGATINI, M. D.; DURIGON, J.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. **Efeito antiproliferativo das infusões de Achyrocline satureioides DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de Allium cepa.** Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 49-54, jan./mar, 2013

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. **Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent –Trifluralin herbicide.** Ecotoxicology & Environmental Safety, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Faostat**. Rome: FAO. Acesso em maio de 2021. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP>>

FREDERICO. P.; JOSINO, C. M.; GAETAN, S. D. **Agrotóxico, Saúde e Ambiente: uma introdução ao tema. É VENENO OU É REMÉDIO?** .21-41. Link: <https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/cap_01_veneno_ou_remedio.pdf>. Acesso em 24/09/2021, 2003

FUNDACENTRO. **Prevenção de acidentes no trabalho com agrotóxicos: segurança e saúde no trabalho**. São Paulo: Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, Ministério do Trabalho. n. 3, 1998

FUNKE, V, AM. **Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase mu1 and theta1 in patients with acquired aplastic anemia: a Brazilian experience**. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, n. 4, p. 340-341, 2007

GASKELL H, SHARMA P, COLLEY HE, MURDOCH C, WILLIAMS DP, WEBB SD. **Characterization of a functional C3A liver spheroid model**. *Toxicol Res(Camb)*. v. 5. p. 1053-1065, 2016

GRANT, W. F. **Chromossome aberration assays in Allium. A report of the U.S. environmental protection agency**. Gene-Tox program. *Mutation Research*, v. 99, p. 273-291, 1982

GRANT, W.F. **The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens..** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

GRANT, W.F. **Chromosome aberration assays in Allium cepa**. . *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.

GOMES, M. A. F. **Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de origem Agrícola no Brasil: cenário 1992/2011**. Jaguariúna, SP / Embrapa Meio Ambiente. Documento 98, 35p, 2014

INFORMATIVO CRQ II. **O dilema do uso de defensivos agrícolas**. Rio de Janeiro: Con-selho Regional de Química, III Região, 1997

ISO- International Organization for Standardization. **Soil Quality-determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora. Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence of Higher Plants.**, Geneva, Switzerland (ISSO 11269-2), 1995

KNASMÜLLER, S., PARZEFALL, W., SANYAL, R., ECKER, S., SCHWAB, C., UHL, M., MERSCH-SUNDERMANN, V., WILLIAMSON, G., HIETSCH, G., LANGER, T., DARROUDI, F., NATARAJAN, AT. **Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens.** *Mutat Res.* v.18. p. 185-202, 1998

LEÃO, R. S., MARQUES, R. C., BURALLI, R. J., SILVA, D. S., & GUIMARÃES, J. R. D. **Avaliação de saúde pública por exposição a agroquímicos: uma experiência com a agricultura familiar no noroeste do Rio de Janeiro.** *SustentabilDebate.* v. 9. P. 81-94, 2018

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. **Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application.** *Mutat Res.*, v. 682, p.71-81, 2009.

LEWINSKA, A., WNUK, M., SLOTA, E., & BARTOSZ, G. (2007). **Total anti-oxidant capacity of cell culture media.** *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 34, p. 781-786, 2007.

LIU, B., MCCONNELL, L. L., & TORRENTS, A. L. B. A. **Hydrolysis of chlorpyrifos in natural waters of the Chesapeake Bay.** *Chemosphere*,v. 44, p. 1315-1323, 2001

MA, T. H., XU, Z., XU, C., MCCONNELL, H., RABAGO, E. V., ARREOLA, G. A., & ZHANG, H. **The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants.** *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, v. 334. p.185-195, 1995

MAGALHÃES, D. D. P., & FERRÃO FILHO, A. D. S. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.** *Oecol. Bras.*, v.12, n.3, p.355-381, 2008.

MAHMOOD A, MALIK RN, LI J, ZHANG G. **Human health risk assessment and dietary intake of organochlorine pesticides through air, soil and food crops (wheat and rice) along two tributaries of river Chenab, Pakistan.** *Food Chem Toxicol.* V. 71. p.17-25, 2014

MANZANO, B. C. **Avaliação dos potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das águas do ribeirão Tatu, região de Limeira-SP, após o recebimento de efluentes urbanos.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Relatório Nacional de vigilância a populações expostas a agrotóxicos.** Vol. 1, Tomo 2. Brasília. Acesso em jun 2021. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos.pdf>

MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T. **Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes - Revisão**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, n. 18, p.1-58, Semestral. Ano IX, 2012

MORAES, J., & BONATTO, D. **Development of resazurin assay for evaluation of yeast viability and vitality in microbreweries** (in Portuguese). December, p. 12-44, 2018

MORI, M. N. **Descontaminação de embalagens descartadas de clorpirifós utilizando o processo de oxidação avançada por radiação ionizante** Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 2006

NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES. HEALTH & EDUCATION. **Toxicologia**. Disponível em <<https://www.niehs.nih.gov/health/topics/science/toxicology/index.cfm>. Acesso em maio de 2021>.

ONYEISI, J. O. S., DE CARVALHO COSTA, T. P., DE SOUZA SANTOS, L. F., COSTA, R., DO AMARAL, F. P. D. M., & CHAVES, T. V. S. **Apoptose em Trabalhadores Expostos ao Agrotóxico Organofosforado**. Revista Interdisciplinar, v. 10, n. 2, p. 83-88, 2017.

PARK, J., YOON, J. H., DEPUYDT, S., OH, J. W., JO, Y. M., KIM, K. & HAN, T. **The sensitivity of an hydroponic lettuce root elongation bioassay to metals, phenol and wastewaters**. Ecotoxicol. Environ. Saf, Coreia do Sul, v.126, p.147-153, 2016

PELAEZ, V., TERRA, F. H. B., & SILVA, L. R. **A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meioambiente (Agrochemical regulation in Brazil: market power vs. health and environment defense)**. Revista de Economia, v. 36(1),p. 27-48, 2010

POMEROY-BLACK, M. J., JORTNER, B. S., & EHRICH, M. F. **Early effects of neuropathy-inducing organophosphates on in vivo concentrations of three neurotrophins**. Neurotoxicity Research, v. 11, p. 85-91, 2007

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas**. La formación de intercambios entre cromátidas hermanas. Tese de Doutorado em Genética. Universidade de Complutense, Madrid, 1987

RAMOS, M. L. H., LIMA, V. DA S., SILVA, R. E. DA, NUNES, J. V. DO N., & SILVA, G. C. DA. **Perfil epidemiológico dos casos de intoxicação por agrotóxicos de 2013 a 2017 no Brasil**. Brazilian Journal of Development, v. 6(7), p. 119, 2020

RANK, J.; NIELSEN, M. H. **Allium cepa anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate**. Mutat. Res., v. 390, p. 121-127, 1997

RIBEIRO, D. S., & PEREIRA, T. D. S. **O agrotóxico nosso de cada dia.** *Vittalle - Revista de Ciências da Saúde* 28 (2016) 14-26, 2016

ROGERO, S. O., LUGÃO, A. B., IKEDA, T. I., & CRUZ, Á. S. **Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias.** *Materials Research*, v. 6, p. 317-320, 2003

RUBIO, A. J., & GONÇALVES, J. E. **Análise química de agroquímicos (pesticidas) em amostras de água e sedimento por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas coletadas da bacia do rio pirapó.** X EPCC -Encontro Internacional de Produção Científica. 24 à 26 de Outubro de 2017.

SOARES, W. L., & PORTO, M. F. **Atividade agrícola e externalidade ambiental: Uma análise a partir do uso de agrotóxicos no cerrado brasileiro.** *Ciencia e Saude Coletiva*, v. 12(1). p. 131-143, 2007

TRUHAUT, R. **Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1: 151-173, 1977

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). **Ecological Effects Test Guidelines: Seed Germination/root Elongation Toxicity Test.** (OPPTS850.4200), 1996

VALENTIN-SEVERIN, I., LE HEGARAT, L., LHUGUENOT, J. C., LE BON, A. M., & CHAGNON, M. C. **Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays.** *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 536(1-2), p. 79-90, 2003

VASCONCELO, YURI. **Agrotóxicos na berlinda.** *Pesquisa FAPESP*, n. 271:18-27, 2018

VASCONCELOS, A. M. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae).** Tesede Doutorado em Engenharia Ambiental. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014

WOFFORD P, SEGAWA R, SCHREIDER J, FEDERIGHI V, NEAL R, BRATTESANI M. **Community air monitoring for pesticides. Part 3: Using health-based screening levels to evaluate results collected for a year.** *Environ Monit Assess.* v.186(3). P.1355-1370, 2014

YU, M.-H. **Environmental Toxicology: Biological and Health Effects of Pollutants.** 2nd ed., CRC Press: Boca Raton, 2005

ZUCCO, F.; DE ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. **Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after.** *Toxicology in vitro*, v. 18, p. 153-163, 2004

ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática –Princípios e Aplicações**. São Carlos. Editora RiMa. V. 478, 2006