

---

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

---

**ANÁLISE DOS EFEITOS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E  
MUTAGÊNICOS DO INSETICIDA MALATION, UTILIZANDO OS  
SISTEMAS TESTE DE *ALLIUM CEPA* E CÉLULAS DE MAMÍFEROS.**

**JAQUELINE BIANCHI**

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

**Março - 2008**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



ANÁLISE DOS EFEITOS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E  
MUTAGÊNICOS DO INSETICIDA MALATION, UTILIZANDO OS  
SISTEMAS TESTE DE *ALLIUM CEPA* E CÉLULAS DE  
MAMÍFEROS.

**JAQUELINE BIANCHI**

**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 a obtenção do  
título de Mestre em Ciências  
Biológicas (Biologia Celular e  
Molecular).

Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Março de 2008

*“Dá seu primeiro passo com fé, não é necessário que veja todo o caminho completo, só dê o primeiro passo.”*

*(Martin Luther King Jr.)*

*Aos meus queridos pais, Jorge e Marisa, pelo amor, apoio e incentivo, e ao meu noivo Gustavo, pela confiança e companheirismo, dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à professora Marin pela sua dedicação, amizade, paciência e por me orientar em mais este trabalho. Também sou grata pelo seu companheirismo, por me ensinar a encarar os problemas sempre com otimismo e enxergar o lado bom das coisas e por estar sempre disposta a me escutar e compartilhar momentos bons e também de desânimo ao longo destes quase cinco anos de amizade.

Agradeço à Fapesp, pela bolsa concedida e ao Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro, que nos deu condições de realizar esta pesquisa.

Quero também expressar minha grande gratidão ao professor Mário Sérgio Mantovani, da Universidade Estadual de Londrina, que me recebeu de braços abertos e me ensinou tudo, com muita paciência e bom humor, sobre os ensaios com cultura de células. Agradeço também aos seus alunos e agora, meus novos amigos, que muito me ajudaram nos experimentos: Marcela, Juliana, Josiane, Rodrigo, Ariane e José Pedro.

De importância fundamental na realização deste trabalho tiveram meus pais Jorge e Marisa, e meus irmãos Alexandre e Fernanda. Agradeço pelo amor, incentivo, pela confiança, por ouvir meus desabafos quando tudo dava errado, por acreditarem no meu potencial de pesquisadora e por tentarem, pacientemente, compreender meu trabalho e mostrar interesse quando eu explicava à eles sobre aberrações cromossômicas!!

Outra pessoa de papel tão fundamental quanto o da minha família, na realização deste trabalho é meu noivo Gustavo. Não tenho palavras para expressar o quanto sou grata pelo seu amor, pela sua confiança, por seu incentivo, suas palavras animadoras nas inúmeras vezes em que reclamei por estar longe de casa, cansada, estressada, ou quando meus experimentos não davam certo e por entender que a distância, embora ruim, era

necessária para o cumprimento de mais esta etapa. Agradeço imensamente pela sua ajuda, seu companheirismo e interesse em compreender meus experimentos, principalmente ao longo destes dois anos de mestrado.

Obrigada também às professoras Sanae e Patrícia, pelos conselhos e jantares divertidos, à Carmem pelo incentivo e momentos de distração e à Dora pela confiança e companhia nas noites de trabalho.

Lógico que não posso deixar de agradecer aos meus amigos “mutagênicos”: Dani, Dânia, Thaís, Jana, Rê, Bruna, Lívia, Matheus, Davi, Márcia, Silvia, Cintya, Tati, Zé e Iza pela companhia de todos os dias, pelas risadas de perder o fôlego, principalmente quando a Rê está presente, pelos papos interessantes e muitas vezes doidos. Com certeza o laboratório de Mutagênese é o mais divertido do departamento!!! Também agradeço às mais novas integrantes da mutagênese, Cris, Nádia e Sandra, que apesar de estarem a pouco tempo no laboratório, já compartilharam comigo momentos sérios de trabalho e de muita diversão também.

Agradeço em especial à Dani, por ter se tornado uma grande amiga, pela sua imensa amizade e por me ajudar nos momentos em que mais precisei, tanto nos problemas da faculdade quanto pessoais.

Também agradeço aos meus amigos “não mutagênicos” Reinaldo e Gal, por serem velhos companheiros de todo dia, companheiros de muitas e muitas risadas, de conversas jogadas fora e pelo admirável alto astral que eles têm e que contagia todos. E também aos meus amigos Thiago, Rogi e Milena Xuxu, que são também muito divertidos e sempre estão envolvidos nos acontecimentos engraçados do laboratório.

As todos os amigos do departamento: Marielle, Fred, Cris e Gerson, obrigada pela amizade.

À todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho e que compartilharam comigo momentos bons e não tão bons ao longo destes anos no departamento.

## ÍNDICE

<b>1. Introdução Geral</b> .....	1
<b>2. Objetivos</b> .....	5
<b>3. Revisão da Literatura</b> .....	6
3.1. Mutagênese Ambiental .....	6
3.2. Os agroquímicos como contaminantes ambientais .....	9
3.2.1. Nomenclatura de químicos de uso agrícola e domissanitário .....	9
3.2.2. Efeitos dos agrotóxicos no meio ambiente e nos organismos expostos ...	11
3.3. Os Organofosforados .....	15
3.4. Inseticida Malation .....	19
3.5. Sistema teste de <i>Allium cepa</i> para detecção de danos cromossômicos causados por químicos ambientais .....	24
3.6. Cultura de células para avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade de químicos ambientais .....	29
3.7. Teste de aberrações cromossômicas .....	33
3.8. Teste do micronúcleo .....	38
3.9. Ensaio do cometa .....	40
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	44
4.1. Materiais .....	44
4.1.1. Material Biológico .....	44
4.1.2. Químicos testados .....	44
4.1.2.1. Malation .....	44
4.1.2.2. Metil metanosulfonato .....	45
4.1.2.3. Benzo[a]pireno .....	46
4.2. Métodos .....	46
4.2.1. Bioensaios com sementes de <i>Allium cepa</i> .....	46
4.2.1.1. Teste de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em células meristemáticas .....	47
4.2.1.2. Teste do micronúcleo em células F <sub>1</sub> .....	48
4.2.2. Bioensaios com células HTC .....	48
4.2.2.1. Teste do micronúcleo em células binucleadas .....	49

4.2.2.2. Ensaio do cometa .....	50
<b>5. Artigo 1</b> .....	53
<b>6. Artigo 2</b> .....	93
<b>7. Discussão e Conclusões Gerais</b> .....	120
<b>8. Referências Bibliográficas</b> .....	128

## **RESUMO**

---

Os agrotóxicos, substâncias químicas muito utilizadas para combater pragas na agricultura e nas residências, além de contribuírem para o aumento da produtividade e, conseqüentemente, o crescimento economia, também são responsáveis pela contaminação ambiental, quando utilizados indiscriminadamente, e por muitos casos de intoxicações e doenças genéticas nos seres humanos. Dependendo de sua composição química, degradabilidade e persistência no ambiente, os agrotóxicos podem comprometer a cadeia alimentar e afetar o ecossistema como um todo. Dentre os agrotóxicos bastante utilizados em todo o mundo, está o organofosforado malation. Pelo seu amplo uso, torna-se preocupante os possíveis danos que este inseticida possa promover no meio ambiente e nos organismos a ele expostos, pois alguns trabalhos já mostram esta sua ação detrimental. Desta forma, este trabalho investigou o potencial de indução de danos no DNA, para diferentes concentrações de malation, por meio das técnicas de aberrações cromossômicas e teste do micronúcleo em *A. cepa* e micronúcleo e ensaio do cometa em células HTC (*hepatoma tissue culture*). Nos testes com células meristemáticas e F<sub>1</sub> de *A. cepa*, expostas por 24 e 48 horas ao malation, foram verificadas freqüências significativamente elevadas de AC e MN. Após 24 horas de

exposição, não houve aumento na quantidade de AC, mas sim de MN. A análise das células F<sub>1</sub> de *A. cepa*, juntamente com o teste de AC, forneceu dados importantes sobre a fixação dos danos genéticos induzidos pelo malation. Nenhum resultado relevante de citotoxicidade foi verificado em *A. cepa*. Após passarem pelo teste de recuperação, somente as células expostas às menores concentrações testadas apresentaram diminuição nos índices de AC e MN. Já nos ensaios com células HTC, foi verificado, por meio do ensaio do cometa, efeito genotóxico para todas as concentrações testadas, após exposição por 24 horas ao inseticida, mas pelo teste do MN, nenhum resultado significativo foi encontrado. Estes dados sugerem que as lesões no DNA foram reparadas e não decorreram em mutação cromossômica. Com a realização combinada de diferentes testes, pode ser verificada uma ação clastogênica para o malation. O ensaio do cometa em células HTC indicou a potencialidade do inseticida induzir quebras no DNA, levando a sua fragmentação. O teste do MN, em células de *A. cepa* indica a ação clastogênica deste inseticida, devido ao tamanho relativamente pequeno dos micronúcleos observados. A análise das AC em células meristemáticas de *A. cepa* indicou uma predominância de aberrações como quebras e pontes cromossômicas em anáfase. A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que, mesmo em baixas concentrações, o malation é capaz de induzir danos no DNA de organismos expostos. Estes dados reforçam a importância da realização de estudos com pequenas concentrações de químicos que contaminam o ambiente, para alertar a população sobre os reais perigos que estes podem promover sobre os organismos expostos.

**Palavras-chave:** malation, agrotóxicos, ensaio do cometa, micronúcleos, aberrações cromossômicas, *A. cepa*, células HTC.

## **ABSTRACT**

---

Pesticides, chemicals widely used to combat pest in agriculture and in homes, besides contribute to the increase productivity and the economy, are also responsible for environmental pollution and for many intoxications cases and genetic diseases in human beings. Depending on their chemical composition, degradability and degree of persistence in the environment, the pesticides can endanger the food chain and affect the entire ecosystem. Among the pesticides most used in the world is the organophosphate malathion. Due to its widespread use it has been worrying the possible damages that can promote this insecticide in the environment and in organisms exposed to it. This study investigated the induction potential of DNA damage with several malathion concentrations using chromosomic aberration (CA) techniques, micronucleus test (MN) in *A. cepa* and micronucleus and comet assay in hepatoma tissue culture (HTC). In *A. cepa* tests, meristematic and F<sub>1</sub> cells exposed for 24 and 48 hours to malathion showed significative frequencies of CA and MN. After 24 hours of exposure, there was no increase in the CA amounts, but was observed an increase to frequency of MN. The F<sub>1</sub> cells analysis, together with the CA tests, provided important data on the genetic damages fixation induced by malathion. No relevant results of citotoxicity were verified in *A. cepa*. After the recovery test, the cells exposed to the smaller tested concentrations

of malathion showed reduction of AC and MN indices. In the HTC cells test, was verified by the comet assay, genotoxic effects for all the tested concentrations, after exposure for 24 hours to the insecticide, but by the micronucleus tests, no significant results were found. These data suggest that the DNA lesions were repaired and not elapsed in mutation. With the concomitant realization of different tests, the clastogenic action of malathion could be verified. The comet assay in HTC cells indicated the potentiality of the insecticide to promote DNA fragmentation. The micronucleus test in *A. cepa* and HTC cells suggested a possible clastogenic action for this insecticide due to the relatively small size of the induced micronucleus. The analysis of CA in *A. cepa* meristematic cells indicated predominance of aberrations such as bridges and chromosome breaks in anaphase. From these results, we can conclude that even in low concentrations the malathion is able to induce DNA damage in exposed organisms. These data reinforce the importance of performing studies with low concentrations of chemicals that contaminate the environment to alert the population about the real hazards that this substances can cause on the exposed organisms.

**Key-words:** malathion, pesticides, comet assay, micronuclei, chromosomic aberrations, *A. cepa*, HTC cells.

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

---

O uso de agrotóxicos, de modo geral, tem como principal objetivo a eliminação de animais e vegetais que prejudicam as plantações. Além disso, seu uso está diretamente relacionado às questões econômicas, uma vez que, livre das infestações, as plantações crescem mais vigorosamente e apresentam melhor qualidade, contribuindo para um aumento da produtividade agrícola.

Por outro lado, o uso indiscriminado destes produtos, tanto na agricultura como nas residências, é um dos principais fatores responsáveis pela contaminação ambiental e por problemas na saúde do homem.

O descarte incorreto das embalagens, assim como a aplicação de modo incorreto do produto, contribuem para a entrada e distribuição destes químicos no ambiente. A água da chuva pode contribuir para contaminação das águas subterrâneas, das águas superficiais, das camadas mais superficiais do solo e, conseqüentemente, de todas as formas de vida existentes nestes ambientes. A contaminação ambiental pode por em risco todo o ecossistema, dependendo do grau de persistência e do potencial acumulativo do químico no ambiente e nos organismos.

Somando-se à exposição ocasional ou indireta, que ocorre por meio da ingestão de água e alimentos, o homem pode entrar em contato com os agrotóxicos pela

exposição ocupacional ou direta. O manuseio e a aplicação do produto sem o uso de equipamentos de segurança adequados, como luvas, botas, máscara, etc., pode contribuir para a ocorrência de intoxicações e para o desenvolvimento de várias doenças (respiratórias, cardíacas, alérgicas, dentre outras).

Alguns agrotóxicos podem também induzir o aparecimento de câncer, de doenças reprodutivas e degenerativas. Estas adversidades decorrem do fato de alguns componentes químicos, presentes nos agrotóxicos, apresentarem características genotóxicas e/ou mutagênicas, que os tornam capazes de interagir com o DNA, o que pode promover, por exemplo, alterações numéricas ou estruturais nos cromossomos, ativação ou inativação de genes.

Químicos da classe dos organoclorados possuem uma toxicidade muito elevada e um alto grau de persistência no ambiente. Por esta razão, seu uso está cada vez mais restrito, sendo substituído pelos organofosforados, por terem estes últimos uma maior facilidade de degradação no ambiente.

Dentre os organofosforados mais utilizados no Brasil e também no mundo, está o malation. Este inseticida, que tem ação não sistêmica, é utilizado para eliminar insetos que prejudicam as culturas de arroz, feijão, café, trigo, cacau, citros, tomate, alface, repolho, morango, maçã, dentre outras, bem como nas residências, principalmente para controlar pragas de plantas ornamentais. Apesar de ser um inseticida antigo, disponível no mercado há mais de 50 anos, ele ainda é muito utilizado nas residências e facilmente encontrado para venda na maioria das agropecuárias brasileiras.

A toxicidade do malation ocorre pela inibição da enzima acetilcolinesterase, que leva a um acúmulo de acetilcolina nas terminações nervosas, com conseqüente hiperexcitação deste sistema. Os insetos são os mais afetados pelo malation, pois eles

não possuem (ou possuem em pequenas quantidades) as carboxiesterases, que são enzimas capazes de degradar este inseticida e levar à formação de metabólitos não tóxicos que são, facilmente, eliminados do organismo. Os mamíferos possuem estas enzimas em grandes quantidades e, por isso, são pouco afetados por este inseticida.

No meio ambiente, o malation não contamina o solo, por ser facilmente degradado pelas bactérias, e também não se acumula na cadeia alimentar. No entanto, alguns estudos verificaram a ocorrência de danos genéticos, como quebras e pontes cromossômicas, formação de micronúcleos e outras aberrações cromossômicas, bem como o desenvolvimento de cânceres, em células de organismos expostos ao malation.

A constante preocupação com a qualidade de vida dos seres humanos e com a questão ambiental, tem levado muitos pesquisadores a desenvolverem técnicas que permitem estudar os efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos causados por diferentes químicos lançados no meio ambiente. Estas informações servem de alerta para a população sobre os riscos potenciais a que possam estar expostas, em decorrência do mau uso destes produtos.

Para a análise de possíveis efeitos mutagênicos causados por diversas substâncias químicas introduzidas no meio ambiente, três testes básicos são utilizados. Desses, dois são de mutação gênica (teste de Ames e teste de mutação gênica em células de mamíferos - *mouse lymphoma assay*) e o outro de mutação cromossômica (micronúcleos, aberrações cromossômicas, trocas entre cromátides irmãs). O teste de Ames utiliza várias linhagens da bactéria *Salmonella* e detecta mutações induzidas por diferentes mecanismos de ação, como erros na matriz de leitura e trocas de pares de bases do DNA. O teste com linfomas de camundongos detecta mutações de ponto, abrangendo uma quantidade maior de nucleotídeos. Os testes do micronúcleo,

aberrações cromossômicas e trocas entre cromátides irmãs identificam mutações cromossômicas visíveis, que são expressas pelos cromossomos durante o ciclo de divisão mitótica ou meiótica.

Para uma melhor compreensão dos efeitos de químicos sobre os seres vivos, muitos organismos têm sido utilizados como indicadores, tais como: bactérias, insetos, poliquetas, microcústáceos, hidras, moluscos, peixes, anfíbios, roedores, macacos, homens e várias espécies vegetais. Dentre as espécies vegetais, *Allium cepa* é um dos mais antigos e sensíveis sistemas-teste utilizado para detecção de danos genéticos causados por poluentes ambientais e por substâncias químicas puras. Este teste foi introduzido em 1938 por Levan e, até hoje, é muito utilizado em diversos trabalhos. Por meio deste teste é possível verificar a ocorrência de indução de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais e de micronúcleos, nas diferentes fases do ciclo celular.

Dentre os mamíferos, as células em cultura constituem um excelente sistema-teste, freqüentemente, utilizado para investigar a ação de diversos agentes presentes no ambiente. As células metabolizadoras de ratos, como as HTC (*hepatoma tissue culture*), possuem a maioria das enzimas necessárias para a transformação de pró mutágenos em mutágenos e, por isso, são indicadas para estudos dos efeitos de uma grande variedade de compostos sobre as células. Os testes mais utilizados para verificação do potencial genotóxico e mutagênico de diversos agentes, por meio de cultura de células, são o teste do micronúcleo e do ensaio do cometa.

Este trabalho teve por objetivos investigar, por meio dos sistemas testes de *A. cepa* e de células HTC, a potencialidade citotóxica, genotóxica e mutagênica do inseticida malation.

## 2. OBJETIVOS

---

Frente às potencialidades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas do inseticida malation, descritas anteriormente, e ao seu grande uso agrícola e doméstico, o presente trabalho teve por objetivo:

- Investigar as potencialidades citotóxicas (morte celular e índice mitótico), genotóxicas (presença de aberrações cromossômicas) e mutagênicas (presença de micronúcleos) de quatro concentrações do inseticida Malation<sup>®</sup> (malation comercial 500 CE - 50% de pureza): 1,5; 0,75; 0,37 e 0,18 mg/mL, em células meristemáticas e F<sub>1</sub> de *Allium cepa*;
- Investigar as potencialidades genotóxicas (teste do cometa) e mutagênicas (teste do micronúcleo) das quatro concentrações referidas acima e de mais três outras concentrações do inseticida malation comercial (54; 5,4 e 0,54 µg/mL) em cultura de hepatomas de ratos, linhagem HTC;
- Analisar e comparar a eficiência dos dois sistemas-testes na detecção de danos causados por baixas concentrações do inseticida no ambiente.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

---

#### **3.1. Mutagênese Ambiental**

A poluição ambiental, que gera conseqüências danosas não só para o meio ambiente, mas também para a saúde humana, vem sendo assunto de discussão mundial desde os anos 70 do século passado. Em 1972, este tema foi um dos destaques na Conferência Mundial das Nações Unidas Sobre o Meio Ambiente Humano (CNUMH), realizado na Suécia e depois, em 1992, no Brasil, na Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente e Desenvolvimento (CNUMAD, ECO-92). Devido ao grande número de trabalhos relacionados ao tema, a poluição ambiental continua sendo uma das preocupações mundiais, pois vem sendo exaustivamente, discutido até os dias de hoje.

Para a CGG (Comission on Global Governance, 1995), o crescimento elevado da produção de produtos químicos vem alterando a composição química das águas, do solo, do ar e de todo o sistema biológico, colocando em perigo, não só o seu bem estar, mas também a sua sobrevivência.

Com o aumento de estudos que registram a existência de agentes perigosos dispersos em diversos ambientes em todo o mundo (DEAN et al., 1996; De ROSA et

al., 1996), decorrente das atividades humanas, as agências governamentais e as comunidades civil e científica estão se tornando cada vez mais preocupadas com o impacto que estes contaminantes vem causando ao ambiente e, conseqüentemente, com os efeitos que podem causar sobre as populações humanas (AU e RIBEIRO, 2003).

A utilização crescente de produtos como fármacos, agroquímicos, cosméticos, corantes e muitos outros tem causado um aumento, substancial, nas taxas de mutagênese ambiental (AZEVEDO, 2003). Muitos destes compostos estão envolvidos com mudanças prejudiciais herdáveis no material genético, que não são percebidas de imediato, mas que podem causar danos sérios, depois de algum tempo (VOGEL, 1982).

A poluição do ambiente em que vivemos afeta não só a população humana, mas também outros organismos tais como as plantas, os animais e os microrganismos. Um ambiente saudável garante que, tanto as populações atuais como as suas gerações subseqüentes, se mantenha sem prejuízos, garantindo a sua preservação. Desta forma, existe uma necessidade, urgente, de se estabelecer e se aplicar técnicas que possam indicar o modo de ação de agentes estranhos sobre os organismos expostos, além de estabelecer estratégias que possam prevenir a indução de mutações, principalmente, as causadas pelas atividades humanas (AZEVEDO, 2003).

Uma mutação é definida como uma mudança na seqüência de DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica. Os agentes que têm a potencialidade de mudar a seqüência do DNA são considerados tóxicos para os genes e são, então, chamados de genotóxicos (RIBEIRO, 2003).

Contudo, é importante salientar que os agentes capazes de interagir com a molécula de DNA não se restringem, apenas, aos de efeitos mutagênicos, pois existem agentes genotóxicos que, além da capacidade de interagirem com o material genético,

também podem interagir com outros componentes celulares, como fibras do fuso e enzimas celulares, como as topoisomerases. Desta maneira, o termo ‘genotoxicidade’ abrange muitas ações diferentes dos agentes, sobre o material genético, como a formação de adutos de DNA, lesões na fita de DNA, síntese de DNA não programada e trocas entre cromátides irmãs, enquanto que a mutagenicidade é determinada pela indução de mutação gênica ou cromossômica. É sabido que os efeitos genotóxicos podem ser transitórios, ou seja, passíveis de reparo, e os efeitos mutagênicos são persistentes, pois levam a uma alteração definitiva no conteúdo ou na estrutura do material genético de um organismo (DEARFIELD et al., 2002).

A proliferação de agentes químicos introduzidos no ambiente, que podem promover possíveis alterações genéticas nos organismos, foi um dos principais motivos que levou ao desenvolvimento de metodologias de avaliação de genotoxicidade de substâncias químicas (BRUSICK, 1987). Dentre estas metodologias, vários testes biológicos são capazes de detectar e identificar agentes genotóxicos no ar, na água e no solo (DE FLORA et al., 1993; AL-SABTI e METCALFE, 1995; MINISSI et al., 1996).

A maioria dos testes para detectar substâncias mutagênicas baseia-se na demonstração de danos cromossômicos, tais como alterações cromossômicas estruturais, formação de micronúcleos, trocas entre cromátides irmãs, avaliação de genes mutantes ou de danos no DNA, utilizando diferentes organismos como bactérias, insetos, plantas e animais, tanto em ensaios realizados *in vitro*, como *in vivo* (PEÑA, 1996).

Para Smaka-Kincl et al. (1997), testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para avaliar as reações dos organismos vivos aos poluentes ambientais e para indicar o potencial dos efeitos sinérgicos de vários poluentes,

enquanto análises químicas e físicas determinam a presença e concentração de diferentes poluentes. Testes citogenéticos são apropriados para identificação de efeitos de substâncias em suas várias concentrações e em diferentes tempos de exposição, além de também avaliar a sua influência sobre os organismos (AL-SABTI e KURELEC, 1985; AL-SABTI, 1989; ABDU et al., 1989; PANDA et al., 1990).

Uma nova área de pesquisa, a genética toxicológica, tem por finalidade não apenas estimar os danos nas células pela detecção dos efeitos genotóxicos ou mutagênicos (RABELO-GAY et al., 1991), mas também identificar e analisar o modo de ação de agentes tóxicos que são capazes de interagir com o material genético dos seres vivos. A detecção da ação e o entendimento das propriedades físico-químicas dos compostos genotóxicos permitem estimar os efeitos hereditários, deletérios ou mesmo letais para os organismos (ARNAIZ, 1995). Segundo Al-Sabti e Kurelec (1985), Fiskesjö (1988), e Al-Sabti (1989), testes de genética toxicológica, realizados com organismos testes adequados, são úteis para avaliar os efeitos prejudiciais de substâncias tóxicas e mutagênicas, além de estimar os efeitos combinados de vários contaminantes ambientais.

## **3.2. Os agroquímicos como contaminantes ambientais**

### **3.2.1. Nomenclatura de químicos de uso agrícola e domissanitário**

Quando falamos em produtos químicos utilizados para combater, repelir, mitigar ou inibir pragas, é comum nos depararmos com diferentes nomenclaturas tais como: praguicidas, pesticidas, agrotóxicos e defensivos agrícolas. Estas denominações possuem significados diferentes e, para casos específicos, alguns termos são mais apropriados do que outros.

Segundo Larini (1999), o termo praguicida inclui apenas os compostos químicos capazes de matar as pragas, excluindo aqueles que atraem e repelem ou que regulam o crescimento e a reprodução dos organismos vivos. A denominação pesticida tem o sentido mais aplicado para se referir a doença do que propriamente à praga, significando algo com poder de destruir a peste, ou seja, qualquer doença epidêmica grave, muitas vezes endêmica, de grande mobilidade e mortalidade. O termo defensivo agrícola tem o significado de algo que serve para defender ou resistir ao ataque de um inimigo qualquer, não explicitando o que ou quem está envolvido no processo. O termo agrotóxico está relacionado a todos os compostos químicos utilizados na agricultura, excluindo os de uso domissanitário, da pecuária e de plantas aquáticas.

No entanto, de acordo com a Lei Federal nº 7.802 de 11/07/89, os agrotóxicos são “os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento”. O termo agrotóxico, segundo a lei acima citada, engloba mais do que aqueles químicos utilizados na agricultura e parece ser uma tentativa de reunir, de maneira não específica, as diferentes nomenclaturas em um único termo.

Os agrotóxicos são ainda divididos, basicamente, em quatro classes distintas: inseticidas, fungicidas, herbicidas e outros (onde se incluem os grupos dos raticidas, acaricidas, nematocidas, molusquicidas, fumigantes, etc).

Como nesta revisão não se tem por objetivos analisar os efeitos de substâncias que apenas matam ou repelem ou inibem o crescimento de pragas, será utilizado o termo geral ‘agrotóxicos’ para referir às substâncias químicas utilizadas na agricultura e/ou em residências, independentemente de sua ação específica sobre determinadas pragas.

### **3.2.2. Efeitos dos agrotóxicos no meio ambiente e nos organismos expostos**

Os agrotóxicos são compostos que possuem uma grande variedade de substâncias químicas ou produtos biológicos e que foram desenvolvidos para combater as pragas agrícolas. Deste modo, representam um risco, em potencial, para todos os organismos vivos. Os organismos podem entrar em contato com estes produtos por várias vias, tais como dérmica, inalatória ou por ingestão de produtos contaminados. Os efeitos adversos dos agrotóxicos à saúde dependem de suas características químicas, da quantidade absorvida ou ingerida, do tempo de exposição e das condições gerais de saúde do indivíduo contaminado (GARCIA, 2001).

Dentre as medidas utilizadas no campo para o aumento da produção agrícola, os agrotóxicos se destacam como a alternativa mais acessível. O uso crescente de agrotóxicos na agricultura, aliado à economia de mercado, tem gerado uma situação paradoxal, na qual um arsenal tecnológico que promove o aumento e diversificação da produção, também está associado ao surgimento de injúrias à saúde e à segurança de indivíduos expostos. No Brasil, estima-se que dois terços da população estão expostos, em diferentes níveis, aos efeitos nocivos desses agentes químicos (PERES et al., 2005), incluindo seus produtos de degradação por processos físicos e biológicos, por meio da exposição à contaminação ambiental ou ocupacional (BOLOGNESI, 2003).

Alguns estudos demonstraram que, além do efeito esperado pelos produtores em aumentar a produtividade rural, existe uma relação proporcional entre o uso de agrotóxicos, a degradação ambiental e os danos à saúde humana (WASWA et al., 2002).

Os agrotóxicos representam uma perturbação relevante para muitas espécies aquáticas e terrestres (LIESS et al., 2005). Tem sido verificado que estes químicos afetam, potencialmente, todos os grupos de organismos em ecossistemas aquáticos tais como os microrganismos (DELORENZO et al., 2001), os invertebrados (CASTILLO et al., 2006), as plantas (FRANKART et al., 2003, FERNANDES et al., 2007; LEME e MARIN-MORALES, 2008) e os peixes (GRANDE et al., 1994; VENTURA et al., 2008).

Os agrotóxicos podem alcançar os recursos hídricos por várias vias. A primeira forma de poluição da água vem dos resíduos dos agrotóxicos aplicados na agricultura (TURGUT, 2003). A maior concentração de resíduos ocorre, imediatamente, após a aplicação dos agrotóxicos no campo e, posteriormente, pela sua persistência no ambiente, em baixas concentrações, por um longo período de tempo. A poluição das águas superficiais, por agrotóxicos, tem origem nas aplicações por equipamentos agrícolas terrestres e por pulverização aérea (SCHWEIZER et al., 2000 *apud* TURGUT, 2007).

Baseado nas características físico-químicas dos agrotóxicos (solubilidade, peso molecular, etc.) e na concentração utilizada, quando estes agentes entram em contato com os recursos hídricos, eles são ainda diluídos, o que diminui, progressivamente, a sua concentração (TRAPP, 2000; 2002). No entanto, mesmo em concentrações baixas eles podem afetar, negativamente, os organismos. Além disso, uma vez que os agrotóxicos entram na cadeia alimentar e se bioacumulam, eles podem ser transferidos

por esta via para os seres humanos, se concentrar e, assim, causar riscos à sua saúde (TURGUT, 2007).

Os agrotóxicos podem promover danos à saúde do homem, tanto pela sua exposição a ambientes contaminados, como também pela atividade laboral. De acordo com Bolognesi (2003), a exposição ocupacional, que envolve os estágios de formulação, manufatura e aplicação dos agrotóxicos, constitui um alto risco ao homem, por promover uma exposição a misturas complexas, constituídas de diferentes tipos de químicos, bem como de impurezas, solventes e outros compostos. Além dessas substâncias, alguns ingredientes inertes, que não possuem atividade agrotóxica, podem ser biologicamente ativos e, em alguns casos, comprometer sistemas biológicos, por serem mais tóxicos do que o próprio componente ativo do agrotóxico.

Além da exposição ocupacional, os indivíduos também podem se expor aos agrotóxicos por meio da água e alimento que ingerem e pelo ar que circundam e adentram as residências. Este tipo de exposição, denominada paraocupacional, tem mostrado ser mais substancial e ocorrer mais frequentemente do que a exposição ocupacional (FENSKE, 1997).

Outros fatores como falta de informação, baixa escolaridade, condições inadequadas de trabalho e falta de proteção durante a aplicação dos agrotóxicos também exibem papéis importantes na exposição da população a estes químicos (HURTIG et al., 2003; KARLSSON, 2004).

A extensiva utilização de agrotóxicos representa um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, especialmente aqueles com economias baseadas no agronegócio, como o Brasil. A utilização de agrotóxicos em larga escala neste país deu-se a partir da década de 70, quando estes foram incluídos,

compulsoriamente, junto com adubos e fertilizantes químicos, nos financiamentos agrícolas (ARAÚJO et al., 2007). A venda de agrotóxicos no Brasil vem crescendo nos últimos anos, levando o país à posição de um dos maiores consumidores destes produtos no mundo. Com isso, só no setor agrícola, cerca de 12 milhões de trabalhadores rurais ficam expostos, diariamente, aos agrotóxicos (OLIVEIRA-SILVA e MEYER, 2003).

Dentre as 15.000 formulações existentes para 400 agrotóxicos diferentes, cerca de 8.000 delas estão licenciadas para uso no Brasil (Sistema de Informações para o Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo - SIGRH, 2005). Só em 2001 foram consumidos no país 328.413 toneladas de agrotóxicos (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2004). Como consequência do grande consumo, cerca de 150.000 toneladas destes químicos são lançados, anualmente, no território brasileiro (CRESTANA, 2000). Na região sudeste do país, o seu consumo está estimado, de acordo com a revisão de Meyer et al. (2002), em 52 Kg de agrotóxico/trabalhador/ano.

Segundo Bolognesi e Morasso (2000), resíduos de agrotóxicos presentes nos vegetais e na água de beber possuem um grande potencial em causar efeitos, em longo prazo, como o câncer. De maneira geral, os agrotóxicos são considerados químicos potencialmente mutagênicos, pela capacidade de seus ingredientes induzirem mutação gênica, alterações cromossômicas ou danos no DNA, evidenciados por diferentes *endpoints* (BOLOGNESI e MERLO, 1989). Apesar de muito utilizados pela sua eficiência tóxica e por ter ação específica sobre certos organismos, esta especificidade não é tão absoluta e muitos agrotóxicos acabam atingindo também os seres humanos (BOLOGNESI e MORASSO, 2000).

A Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) investigou, até o período de 2002, o potencial carcinogênico de uma grande variedade de inseticidas, fungicidas, herbicidas e outros compostos similares e verificou atividade carcinogênica para 56 agrotóxicos. Químicos como os herbicidas fenoxi ácidos, ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), lindane, metoxiclor, toxafene e muitos organofosforados foram associados ao aparecimento de câncer em estudos realizados com seres humanos.

Existem ainda estudos que relacionam a exposição aos agrotóxicos com o aparecimento de malformação congênita. Estes estudos, que correlacionam a incidência das malformações com a exposição dos pais aos agrotóxicos, têm fornecido informações conflitantes e/ou inconclusivas (RESTREPO et al., 1990; ROJAS et al., 2000).

### **3.3. Os Organofosforados**

Os agrotóxicos estão divididos em muitas classes, das quais, as de maior importância, são os organoclorados (OC) e os organofosforados (OF). Os OC são reconhecidamente resistentes à biodegradação e podem ser acumulados nas cadeias alimentares, produzindo um aumento significativo de sua concentração nos indivíduos do final da cadeia. Já os OF, dependendo de sua formulação, modo de aplicação e do clima onde são aplicados, são rapidamente degradados no ambiente (SANKARARAMAKRISHNAN et al., 2005).

Devido à suas propriedades tóxicas e alta persistência no ambiente, o que constitui uma ameaça à saúde humana, os OC tiveram seu uso proibido, na maioria dos países desenvolvidos. Assim, atualmente, os OF estão sendo amplamente utilizados como seus substitutos, principalmente, pela sua maior degradabilidade no ambiente.

Embora os OF não sejam considerados os poluentes ambientais mais tóxicos, eles podem ser encontrados, em grande escala, nas superfícies das águas e nos alimentos (DRISS et al., 1993; JOHN et al., 2001; GALLOWAY e HANDY, 2003).

Os OF são agrotóxicos que atuam como potentes inseticidas. São ésteres amido ou tiol-derivados dos ácidos fosfóricos, fosfônicos, fosforotióicos e fosfonotióicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003) de uso agrícola e doméstico para controle de insetos. Estes compostos, no entanto, podem ser altamente tóxicos para organismos não alvos, sejam eles vertebrados ou invertebrados (WARE, 1983).

Os compostos OF exercem toxicidade aguda sistêmica, pela inibição da enzima acetilcolinesterase. Esta enzima apresenta dois sítios distintos, conhecidos como esterático e aniônico, que servem como pontos de ligação para a acetilcolina. As moléculas dos inseticidas organofosforados apresentam uma conformação estrutural que permite um encaixe do seu grupamento fosfato no sítio esterático da acetilcolinesterase. Ao contrário da acetilcolina, que é prontamente hidrolisada com a acetilação, a hidrólise da enzima fosforilada ocorre de maneira lenta. Sendo assim, há acúmulo de moléculas de acetilcolina na sinapse, levando a hiperexcitação do sistema nervoso (OMOTO, 2000) e causando, no homem, problemas de saúde como náuseas, vômitos, vertigens, dores de cabeça, dores abdominais, problemas de pele e oculares (ECOBICHON, 1996).

A ação letal dos organofosforados pode ser comumente atribuída à insuficiência respiratória. O envenenamento grave, com prognóstico de morte provável, é identificado por inconsciência, ausência de reflexos pupilares, secreção bronquiolar excessiva e dificuldades respiratórias (LARINI, 1999).

Alguns estudos têm relacionado a exposição do homem à estes inseticidas com problemas de saúde crônicos ou sintomas respiratórios, problemas de memória, câncer,

depressão, deficiências neurológicas, abortos espontâneos e defeitos de nascimento (STALLONES e BESELER 2002; ARCURY et al. 2003; STRONG et al. 2004; FIRESTONE et al. 2005).

Além da inibição da acetilcolinesterase, há um segundo efeito tóxico causado pela exposição aos OF, conhecido como polineuropatia (ataxia e paralisia duas a três semanas após a exposição), seguido, algumas vezes, da transformação irreversível da enzima inibida (JOHNSON, 1982). Estes dois efeitos estão relacionados à estrutura química dos OF e pode ser influenciada pelo metabolismo destes compostos, podendo formar potentes inibidores de enzimas (JOKANOVIC, 2001).

A maioria dos casos de doenças relacionadas aos agrotóxicos envolve o uso de OC e OF que possuem atividade neurotóxica (ARAÚJO et al., 2000). Os OF, a partir da década de 70, passaram a ser os inseticidas mais utilizados no mundo. Desde então, tem aumentado, drasticamente, o relato de casos de intoxicação por organofosforados, por efeitos tóxicos decorrentes de exposição aguda ou crônica, mesmo que em baixas doses (ROSENSTOCK et al., 1990; SCHUMAN e WAGNER, 1991).

Algumas evidências sugerem que podem ocorrer efeitos adversos, aos seres humanos, devido a exposição a concentrações de OF abaixo daquelas que causam a inibição da acetilcolinesterase, ou seja, efeitos que não estão claramente relacionados à inibição desta enzima (SALVI et al., 2003; SINGH e SHARMA, 2000).

Os OF possuem outras propriedades, independentes dos seus efeitos anticolinesterásicos, como mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade em órgãos como coração, fígado e rins (CONCON, 1988).

Uma atenção considerável tem sido dada aos indicadores de danos genéticos, em populações humanas, ocupacionalmente, expostas aos OF, como aberrações

cromossômicas, troca entre cromátides irmãs e micronúcleos (SORSA et al., 1990; KOURAKIS et al., 1996). Os efeitos precisos destas aberrações cromossômicas não são totalmente conhecidos, mas um aumento no número de aberrações cromossômicas, seguidas de exposições aos OF, sugerem um aumento na probabilidade de desenvolvimento de câncer (FIGA-TALAMANCA et al., 1993; KOURAKIS et al., 1996).

Mais recentemente, tem sido postulado que os OF também produzem estresse oxidativo, em diferentes tecidos, pela formação de espécies reativas de oxigênio (AHMED et al., 2000; AKHGARI et al., 2003; ABDOLLAHI et al., 2004).

Os inseticidas OF possuem um caráter lipofílico que favorece a sua incorporação através das membranas celulares (VIDEIRA et al., 1996). Esta facilidade de penetração provoca perturbações físicas e químicas nas membranas, que leva, conseqüentemente, a disfunções que prejudicam o seu funcionamento correto (VIDEIRA et al., 2001). Segundo Sikkema et al. (1995) e Mouritsen e Jorgensen (1998), há uma correlação entre perturbações nos mecanismos básicos da membrana celular e a toxicidade destes inseticidas. Assim, os primeiros efeitos dos inseticidas podem estar relacionados com as mudanças físico-químicas que promovem na estrutura e organização das membranas celulares (VIDEIRA et al., 2001).

Após sua absorção pelo corpo, os OF sofrem reações denominadas de biotransformação. Uma vez que os OF são compostos lipofílicos e tem uma penetração facilitada no tecido dos insetos, as reações de biotransformação são, primeiramente, direcionadas a produzir compostos mais polares. Nas transformações biológicas dos OF, alguns metabólitos podem ser formados com toxicidade diferente daquela do produto de origem. A biotransformação dos OF pode produzir metabólitos muito tóxicos e, mesmo

que a quantidade de metabólitos formados nestas reações seja baixa, ela pode levar à efeitos significativos, do ponto de vista toxicológico (JOKANOVIC, 2001).

Ainda segundo o autor acima citado, as reações de biotransformação dos xenobióticos são divididas em reações de fase I e reações de fase II. Nas reações de fase I, grupos polares como hidroxil (-OH), carboxil (-COOH), tiol (-SH) e amino (-NH<sub>2</sub>) são introduzidos nas moléculas por reações de oxidação, redução e hidrólise. Os metabólitos formados podem ser mais tóxicos do que os compostos primários ou podem também não serem tóxicos. Nas reações de fase II, os metabólitos polares são conjugados com substratos endógenos, como glucoronides, sulfatos, acetatos e amino ácidos, que formam compostos hidrossolúveis, que podem ser fácil e rapidamente excretado pela urina.

### **3.4. Inseticida malation**

O inseticida malation, O,O-dimetil-S-(1,2-dicarboxietil)fosforoditioato, (C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>6</sub>PS<sub>2</sub>, FIGURA 1), introduzido em 1950 pela Companhia Americana Cyanamid, é um organofosforado não-sistêmico, de classificação toxicológica II (altamente tóxico) ou III (medianamente tóxico) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 1985), que atua no controle de insetos sugadores e mastigadores como os Coleoptera, Diptera, Hemiptera e Lepidoptera e vetores de doenças como os Culicidae, em diversas culturas como as de algodão, arroz, trigo, cacau, café, citros, feijão, pepino, berinjela, tomate, couve, alface, repolho, morango, noqueira, pêssego, maçã e plantas ornamentais (CHEMINOVA, 2002).





**Figura 3:** Transformação do malation em Isomalation, por isomerização térmica ou fotoquímica

Nos estudos de aberrações cromossômicas e de micronúcleos, realizados por Flessel et al. (1993), em animais *in vivo*, foi observado que cinco testes tiveram resultados significativos para danos cromossômicos, quando o malation comercial foi testado. Dois outros testes foram realizados com malation puro e, neste caso, não foram obtidos resultados significativos.

O grande uso do malation deve-se a sua baixa toxicidade para mamíferos e alta seletividade para insetos, quando comparado com outros organofosforados. Sua seletividade deve-se, primeiramente, ao fato de os mamíferos possuírem altos níveis de carboxiesterases, enzimas que hidrolizam o malation e seus metabólitos, formando intermediários não tóxicos que podem ser facilmente eliminados das células. Os insetos possuem pouca ou nenhuma destas esterases, sendo, portanto, severamente afetados pelo malation (THOMPSON et al., 1989).

Segundo o Ministério da Saúde (2003), a absorção do malation ocorre pela pele, pelo trato respiratório e pelo trato gastrointestinal e, muitas vezes, é favorecida pelos solventes presentes na sua formulação. Nas exposições que ocorrem durante os processos industriais de fabricação, na formulação, na aplicação agropecuária ou no controle de vetores em saúde pública, as principais vias de exposição são a respiratória e a cutânea. Depois de absorvidos, os organofosforados e seus produtos de

biotransformação são, rapidamente, distribuídos por todos os tecidos, não existindo evidências de bioacumulação.

No meio ambiente, o malation não adere às partículas do solo e é rapidamente degradado pelas bactérias, por isso não alcança as águas subterrâneas. Na água, o inseticida é degradado pelas bactérias e, no ar, pela luz solar. A meia vida do malation, no solo, é de 1 a 6 dias e, na água, de 6 a 18 dias. O malation traz grandes preocupações quando aplicado em regiões próximas a recursos hídricos, pois é altamente tóxico a organismos aquáticos, incluindo vertebrados, anfíbios e peixes (U.S. Department of Agriculture - USDA, 2000). Segundo a Agencia para Substancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR, 2003), este inseticida não se acumula na cadeia alimentar, devido à sua rápida degradação nos organismos. Esta característica diferencia este inseticida daqueles pertencentes à classe dos organoclorados (SANKARARAMAKRISHNAN et al., 2005).

Segundo a IARC, há poucas evidências de mutagenicidade e carcinogenicidade em testes realizados com mamíferos expostos aos cinco pesticidas mais comumente utilizados, dentre eles o malation, pois a interpretação de vários estudos tem sido controversa (MINTON e MURRAY, 1988; LIPKOWITZ et al., 1992, CABELLO et al., 2003).

Nos estudos realizados por Cabello et al. (2003), foi encontrado um aumento na incidência de câncer de mama em ratos expostos ao malation. Já no trabalho de Lipkowitz et al. (1992), em uma população de trabalhadores agrícolas, foi verificado que a exposição a diversos agrotóxicos, dentre eles, o malation, causou uma incidência 10 a 20 vezes maior de uma inversão no cromossomo 7. Embora esta aberração, por si só, não seja oncogênica, a elevação de sua frequência pode levar a um aumento da

instabilidade genômica e, conseqüentemente, a um aumento na indução de risco de câncer.

Estudos realizados por Brenner (1992) mostraram um aumento de quebras e aberrações cromossômicas em células sanguíneas de trabalhadores rurais, logo após a exposição ao malation. O produto, quando testado em animais de laboratório (ratos e esquilos), mostrou induzir mutações. Em alguns casos, o malation mostrou ter ação sobre a indução de danos genéticos em doses inferiores àquelas descritas como de níveis agudos de toxicidade.

Para a avaliação da genotoxicidade do malation, foram realizados estudos em trabalhadores expostos ao inseticida, durante o programa de erradicação de moscas de frutas na Califórnia. Os resultados apontaram para um alto nível de micronúcleos nos linfócitos desses trabalhadores, porém consistiam em dados não significativos, quando comparados com o teste controle (CECCHINE et al., 2000).

Efeitos adversos observados por Giri et al. (2002), em mamíferos expostos ao malation, mostraram que este inseticida é um agente potencialmente genotóxico e um potente composto mutagênico, por poder induzir aberrações cromossômicas, quebras cromossômicas e micronúcleos em organismos expostos.

Segundo Cox (2003), o malation foi classificado pela Agência de Proteção Ambiental (EPA), em 2000, como um composto com evidências carcinogênicas em animais, mas não suficiente para avaliar seu potencial carcinogênico em humanos, colocando-o, portanto, no grupo 3, quanto ao seu potencial carcinogênico. Esta classificação é baseada em um sistema que classifica as substâncias, de acordo com seu potencial carcinogênico para o homem, em 5 grupos: grupo 1 (carcinogênico), grupo 2

(possivelmente carcinogênico), grupo 3 (provavelmente carcinogênico), grupo 4 (sem classificação) e grupo 5 (não carcinogênico).

A classificação do malation, pela EPA, foi baseada em citações da Cheminova, indústria que produz o inseticida, que indicaram a indução de tumor de fígado em ratos de laboratório, expostos a doses consideradas excessivas pela EPA. Segundo a IARC, o malation não pode ser classificado quanto a sua carcinogenicidade para seres humanos (ATSDR, 2003).

### **3.5. Sistema teste de *Allium cepa* para detecção de danos cromossômicos causados por químicos ambientais**

A proliferação de agentes químicos introduzidos no ambiente, que podem promover possíveis alterações genéticas nos organismos, foi um dos principais motivos que levou ao desenvolvimento de metodologias de avaliação de genotoxicidade de substâncias químicas (BRUSICK, 1987). Dentre a bateria de testes disponíveis, os mais indicados para estudos de monitoramento ambiental devem ser aqueles com mais facilidade de execução e com capacidade de gerar resultados rápidos e reprodutíveis (FISKEJÖ, 1985).

Um dos principais problemas para se avaliar os efeitos de poluentes considerados genotóxicos, segundo Campana et al. (2003), é a escolha do organismo teste adequado. As diferenças de sensibilidade entre as espécies, que são dadas pelas diferentes taxas metabólicas e pelas condições fisiológicas específicas, podem, muitas vezes, produzir resultados enganosos.

Dentre as plantas, os vegetais superiores são reconhecidos como excelentes indicadores de efeitos mutagênicos por responderem, eficientemente, às substâncias

químicas ambientais. Comparações entre sistemas testes vegetais e não vegetais demonstraram, segundo Grant (1994), que os testes que usam vegetais superiores têm uma alta sensibilidade, pois produzem poucos resultados falsos.

Por serem receptores biológicos diretos de agrotóxicos, os vegetais constituem também um excelente material para testes genéticos e de monitoramento destes contaminantes (MA et al., 1995).

Para Ma (1979) e Guimarães et al. (2000), testes com plantas são apropriados para realização de estudos de mutagênese em curto período, tanto em laboratórios como no biomonitoramento *in situ*. Análises de mutagenicidade em plantas são importantes para a investigação das conseqüências prejudiciais da poluição à saúde humana, principalmente em países e regiões que passaram por um rápido desenvolvimento e que apresentam um aumento na carga poluidora ambiental, devido à urbanização e industrialização.

Segundo Houk (1992), resultados provenientes de bioensaios genéticos são relevantes à saúde humana porque o alvo toxicológico é o DNA, o qual existe em todas as formas celulares vivas. Dessa forma, pode ser extrapolado que compostos que reagem com o DNA de uma espécie têm o potencial para produzir efeitos semelhantes em outras espécies.

De acordo com Grant (1994), sistemas testes de plantas, por serem reconhecidos como excelentes indicadores de efeitos citotóxicos, citogenéticos e mutagênicos de químicos ambientais, deveriam ser indicados pelas autoridades reguladoras como uma alternativa para testes preliminares de detecção de possíveis danos genéticos resultantes da poluição ou do uso de químicos ambientais. Os resultados dos ensaios realizados com essas plantas poderiam contribuir, significativamente, para alertar a população

sobre os efeitos que agentes químicos podem causar, tais como mutações e câncer. As vantagens dos ensaios com plantas superiores, como o baixo custo e a facilidade de manuseio, as tornam ideais para uso por cientistas de países em desenvolvimento.

As células de meristemas radiculares de plantas são apropriadas para detecção de clastogenicidade de poluentes ambientais (MA et al., 1995). Muitos *endpoints* podem ser monitorados por meio das análises destas células, tais como indução de aberrações cromossômicas e cromatídicas, troca entre cromátides irmãs e formação de micronúcleos (MIGID et al., 2007).

Diferentes sistemas testes vegetais como *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Tradescantia sp* e *Vicia faba* podem ser utilizados para a análise das atividades mutagênicas de químicos ambientais. Por meio desses sistemas podem ser realizados ensaios de aberrações cromossômicas e de micronúcleos (RANK et al., 2002; MATSUMOTO e MARIN-MORALES, 2004; MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; LEME e MARIN-MORALES, 2008).

A espécie *A. cepa*, que constitui um dos mais antigos sistemas para análise de aberrações cromossômicas (NILAN, 1978), foi introduzida em 1938, por Levan, com a demonstração da ocorrência de distúrbios no fuso mitótico de células de ponta de raiz de cebola, pela ação da colchicina.

Por ser um sistema teste bom e sensível para o monitoramento de efeitos clastogênicos de químicos ambientais (RANK e NIELSEN, 1997), células somáticas de *A. cepa* têm sido utilizadas para estudar as alterações cromossômicas induzidas por agentes químicos e físicos. Dentre os *endpoints* considerados, incluem-se quebras, trocas e *gaps* que envolvem rearranjos e aberrações subcromatídicas, cromatídicas e cromossômicas (KIHLMAN, 1971; AUERBACH, 1976).

A espécie *A. cepa* tem sido freqüentemente utilizada como um organismo padrão para testes rápidos, por apresentar boa correlação com sistemas testes de mamíferos (GRANT, 1982; CHAUHAN et al., 1999). Além disso, esta espécie também apresenta boa cinética de proliferação, rápido crescimento das raízes, grande número de células em divisão, alta tolerância a diferentes condições de cultivo, disponibilidade durante o ano todo, baixo custo, fácil manuseio, cromossomos de número reduzido ( $2n = 16$ ) (QUINZANI-JORDÃO, 1987; MATSUMOTO et al., 2006) e de tamanhos grandes (cerca de 10  $\mu\text{m}$  de comprimento) (VED BRAT, 1965).

As diferenças bioquímicas e farmacocinéticas, existentes entre células de plantas e de mamíferos, são as principais responsáveis pela falta de reconhecimento dos testes de genotoxicidade realizados com plantas. As agências reguladoras consideram que dados obtidos por meio de ensaios de genotoxicidade realizados com plantas possuem um valor limitado, quando extrapolados para seres humanos, embora haja uma grande aceitação de outros sistemas testes não mamíferos como bactérias, drosófilas, neurósporas e fungos. No entanto, resultados comparáveis entre plantas e animais são freqüentemente registrados (GRANT et al., 1981).

Comparado aos testes de Ames e de *microscreen*, o sistema teste de *A. cepa* mostrou ser mais sensível, pela possibilidade de detectar substâncias carcinogênicas que apresentaram resultados negativos no teste de Ames (RANK e NIELSEN, 1994).

Em um levantamento sobre os efeitos citogenéticos causados por agrotóxicos, por exemplo, demonstrou-se a existência de uma excelente correlação entre a freqüência de anormalidades cromossômicas e C-mitoses entre plantas e animais (GRANT, 1978). Trabalhos realizados por Clive e Spector, (1978); Xing e Zhang, (1990); Pavlica et al. (1991) com plantas como *Allium cepa* e *Vicia faba* e células de mamíferos como

fibroblastos de hamster chinês e linfócitos humanos, também demonstraram a existência de uma correlação positiva nas análises de aberrações cromossômicas e trocas entre cromátides irmãs entre os sistemas testes de plantas e animais. Uma correlação de 82% foi observada por Rank e Nielsen (1994), para testes de carcinogenicidade realizados com roedores e *A. cepa*.

Estudos realizados por Grover et al. (1990) avaliaram os efeitos genotóxicos dos agrotóxicos, utilizando vegetais e mamíferos como organismos testes. Suas análises evidenciaram a existência de uma correlação significativa (91,5%) entre os dois sistemas. A existência de uma boa correlação entre os resultados obtidos entre os vegetais e os animais reforça a afirmação de que os resultados obtidos com plantas não devem ser negligenciados, quanto aos riscos que os poluentes podem causar aos seres humanos (FISKEJÖ, 1981).

Por meio de testes com *A. cepa*, são analisados, principalmente, efeitos tóxicos e clastogênicos de químicos de ação direta sobre os organismos. Entretanto, sugere-se que este sistema teste também pode ser utilizado, com eficiência, para se avaliar os efeitos de substâncias que agem indiretamente sobre os organismos, ou seja, aqueles que só exibem toxicidade, após passarem por processos de metabolização (FISKEJÖ, 1981a).

Segundo Vig (1978) e Plewa (1978), as plantas possuem capacidade de ativar promutágenos. Elas podem metabolizar muitos compostos tóxicos por oxidação, transformação e conjugação e compartimentalizar estes produtos nos seus tecidos (LAMOUREX e RUSNESS, 1986). Os principais sistemas enzimáticos que atuam na ativação de promutágenos em plantas parecem estar envolvidos, segundo Stiborova e Anzenbacher (1991), com a monooxigenação, peroxidação e conjugação. Mas outros

sistemas enzimáticos também podem desempenhar um papel importante no processo de ativação de substâncias tóxicas em plantas (PLEWA e WAGNER, 1993).

Similarmente aos animais, as plantas possuem múltiplas enzimas do citocromo P-450 (DONALDSON e LUSTER, 1991). No entanto, em contraste com o dos animais, o citocromo P-450 das plantas exibe uma variedade altamente restrita de especificidade a substratos (PLEWA e WAGNER, 1993).

Estudos realizados por Fiskejö (1981a) demonstraram que as células de raiz de cebola possuem enzimas importantes no processo de metabolização do benzo[a]pireno e outros hidrocarbonetos policíclicos. Este autor verificou que o benzo[a]pireno, que precisa ser ativado para exercer seus efeitos biológicos, induziu índices significativos de mutagenicidade em células de *A. cepa*.

Segundo Fiskejö (1985) e Rank e Nielsen (1997), resultados positivos obtidos pelo teste de *A. cepa* devem ser considerados como uma indicação de que o químico testado também pode causar danos biológicos em outros organismos.

### **3.6. Cultura de células para avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade de químicos ambientais**

Com o controle cada vez mais rigoroso do uso de animais de laboratório em experimentos biológicos, torna-se necessário o desenvolvimento e padronização de testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos e de substâncias para uso pelos seres humanos (ROGERO et al., 2003).

Durante as duas últimas décadas, muitos ensaios de toxicidade *in vitro*, utilizando células em cultura, têm sido desenvolvidos para se fazer uma triagem de químicos ambientais, com o objetivo de evitar possíveis resultados duvidosos e longos

períodos de tempo com experimentação animal (BARLIE, 1994). Ensaio com cultura de células constituem uma importante ferramenta de investigação básica, na atualidade, servindo a diversas áreas de investigação, como a imunologia, a virologia, a genética e a toxicologia *in vitro* (LEWINSKA et al., 2007).

Na biomedicina, por exemplo, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso biomédico. Somente depois de comprovada a sua não toxicidade é que o produto é levado para testes com animais de laboratório (Órgão Internacional de Padronização - *International Standard Organization- ISO 10993*).

Segundo Carvalho (1996), uma das maiores aplicações da cultura celular é a investigação da ação de vários produtos como drogas, detergentes, cosméticos, inseticidas, dentre outros. Na maioria das vezes, os resultados obtidos não são extrapolados, diretamente, para os animais, mas parte-se do princípio que, se um produto causa danos nas células *in vitro*, poderá também afetar os animais expostos.

Vários métodos *in vitro* para avaliação de toxicidade foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes consistem em colocar o material, direta ou indiretamente, em contato com uma cultura de células, para verificar se ele induz alterações celulares. Estes ensaios também oferecem importantes informações sobre os mecanismos pelos quais as alterações acontecem (CRUZ et al., 1987; ROGERO et al., 2000 a, b). O parâmetro mais utilizado para avaliar a citotoxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada pela técnica de corantes vitais como o vermelho neutro, que possibilita a distinção entre células vivas e danificadas ou mortas (CIAPETTI et al., 1996).

Distúrbios no crescimento celular ou redução na habilidade de formação de colônia têm sido relacionados com eventos de toxicidade (WITTE et al., 1995).

Métodos *in vitro* são adequados para a determinação de mecanismos de ação de agentes tóxicos e oferecem uma melhor padronização das etapas experimentais, o que possibilita manipular ou introduzir variáveis desejadas como tempo de tratamento, tipos de combinações das substâncias testadas (BRUSICK, 1987), efeitos de temperatura, pH, dentre outros (CARVALHO, 1996).

A cultura de células apresenta vantagens sobre os métodos *in vivo*, pela possibilidade de limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente e por ter períodos de experimentação mais curtos (ROGERO et al., 2003). Além disso, podem-se obter resultados significantes mesmo com pequenas amostras de células e sem a necessidade de sacrifício de grandes quantidades de animais (CARVALHO, 1996).

Culturas de células de mamíferos são utilizadas, com sucesso, nos estudos de avaliação da mutagenicidade dos agentes tóxicos. Estes testes apresentam vantagens pela facilidade de padronização das condições do ensaio, pela possibilidade de realizar tratamentos das células em várias fases do ciclo celular e pela organização do material genético assemelhar-se às células *in vivo* (RABELO-GAY et al., 1991).

Os ensaios citogenéticos *in vitro* (testes de aberrações cromossômicas estruturais e/ou numéricas e teste do micronúcleo), realizados com células de mamíferos, constituem um dos principais testes utilizados para detecção do potencial mutagênico de agentes químicos. A utilização de células de mamíferos pode permitir correlações com possíveis efeitos em humanos (BRUSICK, 1987), devido a sua maior similaridade com

este sistema e, conseqüentemente, com mutações importantes na etiologia de doenças degenerativas, do câncer e de outras doenças genéticas (RIBEIRO, 2003).

Dentre as células de roedores comumente utilizadas para estes testes (CHO, V79, HTC, etc.), as HTC (*Hepatoma Tissue Culture*) constituem sistemas simples e sensíveis para realização de ensaios *in vitro*. Por este teste, é possível detectar danos cromossômicos causados por carcinógenos, dependentes de ativação metabólica. Estas células mostraram ser sensíveis à indução de trocas entre cromátides irmãs, quando expostas a Mitomicina C (forte agente alquilante) e a aflatoxina B1 (potente carcinógeno). Quando comparadas com as V79, a sensibilidade à aflatoxina B1 foi cerca de 200 vezes maior para as HTC (DEAN et al., 1980). Ao testar o potencial mutagênico do extrato n-butanólico do cogumelo *Agaricus blazei*, em células HTC e CHO-K1, Bellini et al. (2006) verificaram uma maior freqüência de micronúcleos nas células HTC do que nas CHO.

As células HTC são células metabolizadoras provenientes de fígado de ratos (*Rattus norvegicus*), que expressam as enzimas de fase I e de fase II do processo de metabolização de substâncias químicas (OLIVEIRA et al., 2006). A biotransformação da maioria das substâncias químicas é realizada, principalmente, pelo fígado (NEBERT e MCKINNON, 1994). A indução ou a inibição de componentes do sistema de enzimas, que metabolizam químicos tóxicos, podem constituir uma ferramenta importante para a obtenção de informações sobre os mecanismos pelos quais os metabólitos destes produtos induzem efeitos tóxicos sobre as células (KNOWLES et al., 1980). As células HTC apresentam alta atividade metabólica e, por isso, são largamente utilizadas em pesquisas para verificar, *in vitro*, a influência da metabolização pelo fígado na toxicidade de substâncias (GAD, 2000).

As culturas de células de linfócitos humanos ou de linhagens provenientes de hamster Chinês, como por exemplo as CHO (ovário) e as V79 (pulmão), não são capazes de realizar a metabolização de drogas. Assim, para análise deste importante processo de metabolização de substâncias químicas pelos organismos, muitos laboratórios utilizam a fração S9 (fração microsomal de fígado de ratos tratados com Araclor), que promove um aumento na produção da enzima P-450 (GALLOWAY et al., 1994).

Estudos realizados com metodologias que utilizam testes *in vitro* demonstraram que os ensaios com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis (ROGERO et al., 2003).

### **3.7. Testes de Aberrações Cromossômicas (AC)**

Dentre as classes de poluentes, uma das mais preocupantes e que tem sido foco de muitos estudos é a que inclui os agentes genotóxicos e mutagênicos. Estes agentes induzem alterações na molécula de DNA, podendo levar a um comprometimento das gerações futuras, pela característica de herdabilidade que apresentam, além de poder promover efeitos imediatos como o comprometimento da saúde dos organismos expostos (RIBEIRO, 2003).

Uma das conseqüências biológicas da exposição humana aos agentes químicos genotóxicos é a indução de AC (NATARAJAN, 2002; OBE et al., 2002). Estas representam a parte visível de uma grande variedade de alterações induzidas no material genético, resultantes da atuação de diferentes mecanismos de reparo das quebras do DNA (OBE et al., 2002). As quebras nas cadeias duplas do DNA são as lesões primárias fundamentais para a formação de AC, pois, apesar de vários mecanismos de

reparo estarem envolvidos, muitos deles pode não ocorrer de maneira correta, induzindo a alterações no DNA e, conseqüentemente, as AC (PFEIFFER et al., 2000).

As AC são decorrentes de mudanças na estrutura normal dos cromossomos, resultantes de quebras ou trocas de material cromossômico (SWIERENGA et al., 1991) ou de alterações no número total de cromossomos, podendo ocorrer espontaneamente ou como resultado da exposição à agentes químicos ou físicos (RUSSEL, 2002). A maioria das aberrações observada nas células é letal, mas há muitas AC que são viáveis e podem causar danos genéticos em células somáticas ou germinativas (SWIERENGA et al., 1991).

Os testes de AC têm apresentado posição de destaque entre a bateria de testes recomendados por lei, para a avaliação de agentes genotóxicos. As vantagens destes testes incluem a possibilidade de identificação dos diferentes tipos de AC, de detecção de alterações no índice mitótico e do modo de ação dos químicos testados (MATEUCA et al., 2006).

As AC estão intimamente relacionadas a doenças como a neoplasia, na qual se verifica uma correlação diretamente proporcional entre a freqüência de AC nos linfócitos e o desenvolvimento do câncer e com cerca de 50% dos abortos espontâneos (NATARAJAN, 2002). O acúmulo de dados, obtidos pela aplicação do teste de AC nos últimos anos, tem sido satisfatório para a análise da correlação entre a mensuração de AC e o subsequente desenvolvimento de câncer (BONASSI e AU, 2002). Sabe-se hoje que pessoas com elevadas freqüências de AC apresentam risco significativo de desenvolvimento de câncer (OBE et al., 2002).

Dentre as AC, dois tipos são destacados: as numéricas e as estruturais. As AC numéricas incluem as aneuploidias e as poliploidias. A formação de células aneuplóides

pode ocorrer por meio de não disjunção cromossômica, produzida por uma segregação aberrante, na qual uma célula filha ganha um cromossomo, enquanto a outra perde, ou por perda cromossômica resultante de atrasos cromossômicos durante a segregação na anáfase. A poliploidia, que corresponde a uma multiplicação exata do número haplóide de cromossomos, pode ser induzida pela ausência de um fuso mitótico funcional e a conseqüente falha na migração das cromátides para os pólos (ELHAJOUJI et al., 1998, FERNANDES et al., 2007). Outros mecanismos de poliploidia incluem falhas na citocinese ou fusão nuclear de células binucleadas (KIRSCH-VOLDERS et al., 1998).

Alterações cromossômicas estruturais podem ser induzidas por diversos fatores como quebras no DNA, inibição da síntese de DNA e erros na replicação do DNA (ALBERTINI et al., 2000).

Em testes de AC, assume-se que altas doses de um determinado químico induzem AC estruturais como quebras e trocas cromossômicas ou cromatídicas, que podem ser classificadas, em sua maioria, como AC instáveis, podendo levar a célula à morte. Por outro lado, baixas doses de um determinado químico, que geralmente causam pouca ou nenhuma toxicidade celular, podem levar a formação de células viáveis, mas com a presença de variados tipos de AC (KIRKLAND, 1998).

Entre os mais variados tipos de AC que podem ser induzidas por químicos estão: supercondensação e picnose nos núcleos interfásicos ou nos cromossomos (MOHANDAS e GRANT, 1972), condensação de material genético na prófase e em estágios tardios da mitose, aderência cromossômica, micronúcleo (MA, 1979; MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; LEME e MARIN-MORALES, 2008), divisão citoplasmática incompleta com formação de células bi e polinucleadas, anáfase multipolar, atraso cromossômico, ponte cromossômica e C-metáfase (GRANT,

1978; MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; LEME e MARIN-MORALES, 2008).

Segundo Grant (1978), as aderências cromossômicas são originadas de um empacotamento impróprio das fibras cromatínicas dentro das cromátides e cromossomos, resultando em interassociações das fibras, fazendo com que os cromossomos fiquem ligados uns aos outros por meio de pontes subcromatídicas. Este tipo de AC indica alta toxicidade e normalmente não é reversível, levando a célula à morte. A formação de células binucleadas tem origem na inibição da citocinese de células mononucleadas, enquanto que as células polinucleadas são originadas pela inibição da citocinese em células binucleadas.

Ainda para este mesmo autor, a formação de anáfases multipolares está relacionada com a inativação parcial do fuso mitótico, levando a uma movimentação irregular dos cromossomos na anáfase. Os cromossomos atrasados, também originados por problemas no fuso mitótico, podem ser perdidos ou podem originar micronúcleos. Para Fernandes et al. (2007), as anáfases multipolares podem decorrer de poliploidizações promovidas pela inatividade do fuso mitótico, onde os centros organizadores dos microtúbulos (COM) são divididos e segregados, mas, como não há formação de fuso, os cromossomos não segregam. Em uma próxima divisão celular, quando as condições celulares são normalizadas e novos fusos são polimerizados, os cromossomos migram para os diversos COM presentes.

Pontes ou fragmentos cromossômicos são resultantes de quebras cromossômicas ou cromatídicas. Já os cromossomos perdidos indicam um efeito C-mitótico fraco com risco de aneuploidia. As C-mitoses também são indicações de efeito tóxico fraco, mas

elas podem ser reversíveis e ocorrem após a deformação da estrutura do fuso (FISKEJÖ, 1985).

As AC comumente induzidas por agentes clastogênicos (indutores de quebras no DNA), são identificadas como fragmentos acêntricos ou dicêntricos ou produtos de translocações não-recíprocas. Estes tipos de aberrações são denominados instáveis. Inversões, duplicações e translocações são consideradas AC estáveis (GRANT, 1982).

Quebras cromossômicas devem ser consideradas como um sinal de alerta para a ocorrência de danos herdáveis no material genético (NICHOLS, 1973), embora algumas quebras possam ser reparadas ou podem levar a célula à morte e não causar mutações herdáveis (GRANT, 1982).

Os compostos considerados aneugênicos, ou seja, aqueles que interferem no fuso mitótico, não afetam diretamente o DNA, mas podem causar erros durante a segregação cromossômica (GRANT, 1978). As substâncias aneugênicas caracterizam-se por associar-se às moléculas celulares envolvidas com a segregação das cromátides ou a moléculas que fazem parte das estruturas de DNA, como centrômeros e telômeros. Também são aneugênicas as moléculas que se associam às estruturas envolvidas no controle do ciclo celular e as moléculas que fazem parte do aparato do fuso mitótico (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002).

O tipo de AC induzida está relacionado ao tempo no qual o núcleo interfásico foi exposto ao agente indutor de dano. Exposições que ocorrem durante a fase G<sub>1</sub> do ciclo mitótico resultam em danos em cromossomos inteiros, enquanto que tratamentos durante as fases S e G<sub>2</sub> resultam em danos nas cromátides individuais. Após exposição durante a fase S, as AC mais encontradas são as quebras cromatídicas e as trocas entre

cromátides. Exposições durante a fase G<sub>2</sub> originam, principalmente, quebras cromatídicas e *gaps* cromatídicos (GRANT, 1978).

### 3.8. Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo é uma ferramenta importante que evoluiu rapidamente no campo da genética toxicológica. Constitui um método simples para avaliação de vários tipos de danos citogenéticos (GAUTHIER et al., 1999), com aplicação em diversas áreas biológicas e da saúde, assim como na identificação do potencial genotóxico de novos produtos farmacêuticos, agroquímicos ou agentes físicos em geral (KIRSCH-VOLDERS, 1997).

Este teste apresenta vantagens pela simplicidade de análise dos resultados e pela possibilidade de aplicação em qualquer população celular em proliferação (HAYASHI et al., 1998). Além disso, o teste do micronúcleo possibilita uma detecção rápida de danos causados no material genético de organismos expostos a químicos ambientais, como quebras e perdas de cromossomos inteiros, que são facilmente visualizados nas células filhas como uma estrutura similar ao núcleo principal, porém, de tamanho reduzido (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

Para que uma estrutura composta de material genético seja considerada micronúcleo, ela deve apresentar algumas características tais como, um diâmetro com cerca de 1/16 a 1/3 do diâmetro do núcleo principal da célula; não ser refringente; não estar conectado ao núcleo principal; apresentar envoltório visivelmente distinto da membrana nuclear; possuir a mesma intensidade de coloração do núcleo principal ou, eventualmente, apresentar uma coloração mais intensa (FENECH, 2000).

Os micronúcleos (MN) são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal da célula, durante a divisão celular. Desta forma, os MN representam perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou de dano cromossômico numérico, por falhas no aparelho mitótico. Estas estruturas são formadas durante a divisão celular mitótica ou meiótica, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor do conjunto cromossômico das células filhas (FENECH, 1997).

Ainda segundo o autor acima, a formação de MN é dependente da proporção de células que estão se dividindo. Conseqüentemente, a comparação da frequência de MN entre diferentes populações de células em divisão só seria segura, quando ambas exibirem uma cinética semelhante de divisão nuclear, após o dano no DNA.

No teste do MN *in vitro*, o uso de citocalasina B leva ao bloqueio da citocinese, mas não evita a divisão nuclear, resultando em um acúmulo de células binucleadas, formadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão, independentemente do grau de sincronia e da proporção de células em divisão (FENECH, 1997; FENECH, 2000; KIRSCH-VOLDERS et al., 2002).

Pela sua ampla aplicação, o teste do MN com bloqueio da citocinese tem sido bastante utilizado, tanto em estudos *in vivo* como em estudos *in vitro* (SALVADORI et al., 2003).

Em plantas, as células meristemáticas das raízes constituem materiais genéticos eficientes e apropriados para a detecção da clastogenicidade de poluentes ambientais. Dentre os muitos *endpoints* citológicos que podem ser verificados nestas células, a formação de MN é um reconhecido indicador de danos, de resposta mais efetiva e rápida (MA et al., 1995). Como os MN são revelados na geração de células seguinte à

divisão celular, denominada  $F_1$ , a maioria dos MN deveria ser encontrada na região de células  $F_1$ , já que o grau de sincronia destas células é bem maior do que o encontrado na região meristemática. Estudos realizados por Arora et al. (1969) revelaram que as células  $F_1$ , portadoras de MN, não se dividem mais e tendem a degenerar na geração seguinte ( $F_2$ ).

Vêm sendo introduzidas contínuas inovações nos protocolos do teste do MN, o que está proporcionando uma maior aplicabilidade a ele, como a possibilidade de usá-lo como parte da bateria de testes recomendados pelas agências governamentais, no registro de novos produtos que entram anualmente no mercado mundial (SALVADORI et al., 2003).

### **3.9. Ensaio do Cometa**

O ensaio do cometa tem se tornado uma ferramenta básica, que vem sendo cada vez mais utilizada pelos pesquisadores interessados em avaliar a genotoxicidade de novos químicos, realizar o monitoramento da contaminação ambiental e humana e pesquisar os danos e reparo de DNA (COLLINS, 2004), sem a necessidade de se ter células em divisão (OLIVE e BANÁTH, 1993).

Esta técnica permite detectar lesões no DNA, tais como quebras de fita simples, quebras de fitas duplas e sítios álcali-lábeis, causadas por agentes genotóxicos (RIBEIRO, 2003). Por meio deste teste não é possível a detecção de mutações, mas é possível detectar lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Uma vez que as lesões detectadas pela técnica do cometa são passíveis de correção, este teste também pode ser utilizado para estudos de reparo de DNA (GONTIJO e TICE, 2003).

Como o teste do cometa detecta danos no DNA em células viáveis, que não estão em divisão, ele pode ser aplicado em qualquer tipo de tecido, desde que possam ser obtidas células vivas (GONTIJO e TICE, 2003).

Segundo Tice (1995), a denominação ‘teste do cometa’ (*comet assay*), também conhecido como ‘*Single-Cell Gel (SCG) assay*’ foi sugerido por Olive (1989), devido a aparência que cada nucleóide apresenta quando submetido à eletroforese. Os nucleóides são constituídos de alças superenoveladas de DNA, de RNA, de matriz nuclear e suas proteínas, e são obtidos após exposição da célula a um tratamento com solução de lise, responsável pela remoção das membranas, do citoplasma, do nucleoplasma, dos nucleossomas e das proteínas nucleolares, incluindo quase todas as histonas (COLLINS, 2004).

Östling e Johanson (1984) foram os primeiros a desenvolver a técnica de eletroforese em microgel, para a detecção de danos no DNA em células únicas. Nesta técnica, células embebidas em agarose foram lisadas com detergente e alta concentração de sais e submetidas à eletroforese em pH neutro. Nestas condições, a utilidade do teste era muito limitada. Anos mais tarde, Singh et al. (1988) introduziram uma nova versão do ensaio, em condições alcalinas (pH >13). Nestas condições de pH foi possível detectar um aumento na migração do DNA em decorrência do aumento nos níveis de quebras de fita simples, quebras de fita simples associadas a excisão de sítios incompletos de reparo, *cross-links* DNA-DNA e DNA-proteínas e sítios álcali lábeis (sítios apurínicos), além das quebras de fita dupla (TICE et al., 2000).

Em pH 12,6 ou maior, os sítios álcali lábeis são, rapidamente, transformados em quebras (KOHN, 1991). Em pH > 13, ocorre uma maximização na expressão de sítios

álcali lábeis e quebras de fita simples (TICE et al., 2000), devido a desnaturação do DNA, em pH alcalino, e sua separação em fitas simples (GONTIJO e TICE, 2003).

Devido ao fato de que quase todos os agentes genotóxicos induzem mais quebras de fita simples e/ou sítios álcali lábeis do que quebras de fita dupla no DNA, a versão alcalina do ensaio do cometa ofereceu um aumento na sensibilidade do teste, para identificar agentes genotóxicos (TICE et al., 2000).

Ainda segundo os autores acima citados, a indução de altos níveis de quebras de fita simples e de sítios álcali lábeis resulta em uma grande habilidade de migração do DNA. Em contraste, a presença de DNA *cross-links* reduz a migração do DNA.

Comparado com outros testes de genotoxicidade, o ensaio do cometa é vantajoso pela sua alta sensibilidade na detecção de baixos níveis de danos no DNA; por requerer um pequeno número de células por amostra; por ser versátil; ter baixo custo; ser de fácil aplicação e ser necessário pouco tempo para realização do procedimento completo (TICE et al., 2000).

A sensibilidade e especificidade do teste do cometa podem ser aumentadas se os nucleóides forem incubados com endonucleases bacterianas de reparo que reconhecem tipos específicos de danos no DNA, como por exemplo, dímeros de pirimidina induzidos por radiação UV e danos causados por alquilação e oxidação de bases, e os convertem em quebras, aumentando a quantidade de DNA na cauda do cometa (COLLINS, 2004).

No ensaio do cometa, a interpretação da ação do agente estudado é feita pelo aspecto do nucleóide. Assim, células sem ou com pouco dano no DNA não apresentam cauda, permanecendo similares aos núcleos, enquanto que células com mais danos

exibem estruturas semelhantes a um cometa, por serem portadoras de caudas (TICE, 1995).

Segundo Collins (2004), existem diferentes métodos, no ensaio do cometa, para se avaliar os danos induzidos no DNA. Por meio de analisadores de imagens, os parâmetros mais comumente utilizados são: o comprimento da cauda do cometa; a intensidade relativa de fluorescência da cabeça e da cauda e o momento da cauda (o produto entre o comprimento e a intensidade da cauda). É também possível fazer uma análise visual, sem a necessidade de programas de análise de imagens. Por meio deste método, os danos são classificados de acordo com a aparência do cometa, em 4 ou 5 classes, sendo que o de classe zero indica ausência de danos e, a última classe, dano máximo, com grande parte do DNA presente na cauda. A análise visual é rápida, simples e é indicada para os laboratórios que não dispõem de equipamentos analíticos de altos custos.

O ensaio do cometa é um método simples para mensurar quebras no DNA de células eucarióticas (COLLINS, 2004) e, embora seja mais comumente aplicado em células animais, também têm sido desenvolvidos métodos para aplicação em células vegetais (KOPPEN e ANGELIS, 1998).

Muito ainda deve ser realizado para que o ensaio do cometa seja padronizado e validado para ser, rotineiramente, utilizado na identificação de danos no DNA em diferentes tecidos-alvos do ataque dos agentes genotóxicos (TICE et al., 2000).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 Material Biológico**

Dois organismos testes foram utilizados neste trabalho:

- sementes da espécie *Allium cepa* (cebola comum,  $2n = 16$ ), de mesma variedade (Baia Periforme, marca Top Seed<sup>®</sup>) e de mesmo lote;
- células HTC (*Hepatoma tissue culture*), que são células metabolizadoras obtidas de *Rattus norvegicus*, adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil.

#### **4.1.2 Químicos testados**

##### *4.1.2.1 Malation*

O malation é um inseticida pertencente ao grupo químico dos organofosforados e de classificação toxicológica II (altamente tóxico). Seu ingrediente ativo é o malationa (500g/L) e sua composição química é O,O-dimetil-S-(1,2-dicarboxietil) fosforoditioato ( $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ ). Neste trabalho foi utilizado o malation comercial 500 CE (concentrado emulsionável), Ind. Quím. Dipil, 50% de pureza (Malation<sup>®</sup>).

Para os testes com *Allium cepa*, foram preparadas quatro concentrações do inseticida malation. A primeira concentração foi de 1,5 mg/mL, que corresponde à menor concentração do produto ativo indicada para uso em culturas. As demais concentrações foram obtidas a partir de diluições da primeira, em água Milli-Q, na proporção de 1:1, o que resultou em concentrações, progressivamente menores: 0,75; 0,37 e 0,18 mg/mL.

Como os testes preliminares realizados com as células HTC indicaram uma alta toxicidade para todas as concentrações anteriormente descritas, foram preparadas novas concentrações, com base na concentração citotóxica mais fraca (0,18 mg/mL). Esta última concentração foi diluída, obtendo-se uma concentração menor (54 µg/mL). A partir dela, foram realizadas diluições que resultaram em concentrações finais de 10 a 100 vezes menores (5,4 µg/mL e 0,54 µg/mL).

#### 4.1.2.2 Metil Metanosulfonato (MMS)

O Metil Metanosulfonato é um agente alquilante monofuncional, amplamente utilizado como indutor de danos no DNA, os quais podem resultar em mutagenicidade e carcinogenicidade. Este agente modifica a guanina para 7-metilguanina e a adenina para 3-metiladenina, causando, respectivamente, mau pareamento de bases e bloqueio da replicação (Beranek, 1990).

Neste trabalho foi utilizado como controle positivo para os testes com *Allium cepa*, o MMS (Sigma-Aldrich, CAS No 66-27-3), a 10 mg/L, sendo esta diluição, realizada em água Milli-Q.

#### 4.1.2.3 Benzo[a]pireno

O benzo[a]pireno (Sigma, CAS No 50-32-8), um hidrocarboneto policíclico aromático, potencialmente carcinogênico, foi utilizado como controle positivo nos testes realizados com cultura de células, na concentração de 20 µg/mL, tanto para o teste do micronúcleo como para o ensaio do cometa.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Bioensaios com sementes de *Allium cepa*

Sementes de *Allium cepa*, dispostas em placas de Petri forradas com papel filtro, foram colocadas para germinar em água Milli-Q, até que as raízes atingissem de 1 a 1,5 cm de comprimento. Após este procedimento, as sementes germinadas foram transferidas para placas de Petri contendo, individualmente, as concentrações de malation propostas para o estudo (1,5; 0,75; 0,37 e 0,18 mg/mL), a solução de MMS 10mg/L (controle positivo) e água Milli-Q (controle negativo), onde permaneceram por 24 horas. Decorrido este tempo, as raízes foram separadas em três grupos: o primeiro foi coletado e fixado em Carnoy (3 partes de etanol absoluto para 1 parte de ácido acético glacial – v:v); o segundo permaneceu nos respectivos tratamentos por mais 24 horas, totalizando 48 horas de exposição, e o terceiro foi transferido para placas contendo água Milli-Q, para um período de recuperação de 48 horas.

Após as 48 horas de exposição às diferentes concentrações de malation e ao MMS, e após o período de recuperação, todas as raízes foram coletadas e fixadas. A fixação foi feita em Carnoy (conforme descrito acima), por 6 a 18 horas, em temperatura ambiente. Após a fixação, o material foi armazenado em geladeira, em novo Carnoy recém preparado, até a sua utilização.

#### 4.2.1.1 *Teste de Genotoxicidade, Mutagenicidade e Citotoxicidade em células meristemáticas*

Os testes de genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade em células meristemáticas de *Allium cepa* foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982), com adaptações.

As radículas, previamente fixadas, foram lavadas em dois banhos de 5 minutos em água destilada e submetidas ao reativo de Schiff por, aproximadamente, 2 horas, segundo metodologia descrita por Feulgen e Rossenbeck (1924), *appud* Mello e Vidal, (1978). Com os meristemas corados e lavados em água corrente, foram confeccionadas lâminas para a avaliação de aberrações cromossômicas (teste de genotoxicidade), de micronúcleos (teste de mutagenicidade), de morte celular e de índice mitótico (teste de citotoxicidade) para cada tratamento. Foram confeccionadas 20 lâminas por tratamento e analisadas 500 células de cada uma delas, totalizando 10.000 células por tratamento. A observação foi feita em microscopia de luz, em aumento de 400 vezes.

Para a análise dos efeitos citotóxicos, foram analisados os índices mitóticos (IM) e de morte celular para cada tratamento. Para a análise dos efeitos genotóxicos, todos os tipos de aberrações cromossômicas encontradas, tais como perdas de cromossomos, aderências cromossômicas, C-metáfases, pontes cromossômicas, dentre outras, foram consideradas. Para a análise dos efeitos mutagênicos foram registrados a ocorrência de micronúcleos e de quebras cromossômicas, presentes nas células de todos os ensaios realizados.

Para a realização destes testes, foram feitas duas repetições, a fim de se confirmar os dados obtidos. Todos os resultados foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney, seguindo o nível de significância de 0,05.

#### 4.2.1.2 Teste do Micronúcleo em células $F_1$

Neste estudo foi realizado o teste de micronúcleo em células da região  $F_1$  de *Allium cepa*, para se avaliar os efeitos do inseticida malation, sobre o material genético de células expostas, de acordo com metodologia descrita por Ma et al. (1995).

Os procedimentos de hidrólise e coloração das raízes com reativo de Schiff, realizados para a região  $F_1$ , foram os mesmos anteriormente descritos para a região meristemática. Para a confecção das lâminas, foi realizado esmagamento suave da região  $F_1$ , localizada a cerca de 1mm acima da região meristemática, seguido do mesmo procedimento anteriormente citado para células da região meristemática. Foram confeccionadas 20 lâminas permanentes para cada tratamento e analisadas 500 células de cada lâmina, totalizando 10.000 células contadas, por tratamento.

A observação foi feita em microscopia de luz, em aumento de 400 vezes. Assim como nos testes com a região meristemática, os ensaios foram realizados em duplicata.

As análises estatísticas foram feitas pelo teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

#### 4.2.2 Bioensaios com células HTC

Células HTC foram cultivadas em meio DMEM/F-12 (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco), sendo mantidas em frascos descartáveis de 25 cm<sup>2</sup> em estufa BOD a 37°C. Sob tais condições, o ciclo celular destas células é de, aproximadamente, 24 horas.

#### 4.2.2.1 Teste do Micronúcleo em células binucleadas

Para a realização do teste do micronúcleo, as células foram cultivadas por um ciclo celular completo, antes da adição dos tratamentos. Em seguida, tratamentos simultâneos por 24 horas foram realizados com as seguintes substâncias: a) Benzo[a]pireno (20 µg/mL) como controle positivo; b) malation (54 µg/mL; 5,4 µg/mL e 0,54 µg/mL); c) meio de cultura completo como controle negativo.

Após os tratamentos, as células foram lavadas por duas vezes com PBS e adicionados 5 mL de meio de cultura completo com 3 µg/mL de citocalasina B (Sigma), onde permaneceram por 26 horas.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método da coloração exclusiva com Azul de Trypan e os valores encontrados variaram entre 80 e 97%.

Para a colheita das células, o meio de cultura foi transferido para um tubo de centrífuga e, em seguida, as células foram lavadas, duas vezes, com 5 mL de PBS e tripsinizadas com 500 µL de Tripsina-EDTA (0,025%) por, no máximo, 2 minutos. A neutralização da tripsina foi feita com o meio de cultura reservado. A suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos a 1000 r.p.m. e o sobrenadante resultante descartado, reservando-se apenas 1,5 mL ao qual foi adicionado 1,5 mL de citrato de sódio (1%) e uma gota de formaldeído 40%. O pellet foi ressuspensionado e centrifugado, novamente, sob as mesmas condições anteriormente descritas. O sobrenadante foi descartado e 5 mL de metanol-ácido acético (3:1) foi adicionado para fixar as células. O pellet foi novamente ressuspensionado, centrifugado e o sobrenadante descartado. O novo pellet foi ressuspensionado com 0,5 mL de fixador recém preparado e guardado para confecção das lâminas.

Antes da confecção das lâminas para análise, estas foram lavadas e mantidas em água destilada a 4°C. Em seguida, a suspensão celular foi gotejada sobre lâminas limpas contendo um filme de água e, após serem secas em temperatura ambiente, foram coradas com Giemsa 5%, em tampão fosfato, por 10 minutos. Foram realizadas três repetições para cada tratamento.

Foram contadas 1000 células binucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração, para cada repetição, num total de 3000 células por tratamento.

A análise de significância dos resultados foi feita pelo teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

#### *4.2.2.2 Ensaio do Cometa*

Após serem cultivadas por 24 horas (um ciclo celular completo) em meio de cultura completo, as células das três repetições de todos os tratamentos foram tratadas por 24 horas com as mesmas substâncias utilizadas para o teste do micronúcleo, como descritas anteriormente. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e tripsinizadas com 0,5 mL de tripsina-EDTA 0,025% por, no máximo, 2 minutos. Decorrido este tempo, o processo foi interrompido pela adição de 5 mL de meio de cultura completo. As células foram então coletadas após centrifugação a 1000 r.p.m., por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, reservando-se apenas 0,5 mL da solução, onde o pellet foi ressuspendido.

Uma alíquota de 20 µL de suspensão celular foi misturada com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (37°C), em uma concentração de 0,5% e, rapidamente,

gotejada sobre lâminas secas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (60°C), diluição 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínula e levadas à geladeira (temperatura de 4°C), por 20 minutos. Após remoção cuidadosa das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise gelada, recém preparada, contendo 89 mL de solução de lise estoque (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris com pH ajustado para 10 com auxílio de 8 g de NaOH, 890 mL de água destilada e 1% de lauril sarcosinato de sódio), mais 1 mL de triton X-100 e 10 mL de DMSO, onde permaneceram por 1 hora, em geladeira, a 4°C.

As lâminas foram posteriormente transferidas para uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (pH > 13) recém preparada (300 mM de NaOH, 1 mM de EDTA, preparado de uma solução estoque contendo NaOH 10N e 200 mM de EDTA, pH 10), onde permaneceram por 20 minutos antes da eletroforese, para desnaturação do DNA. A corrida de eletroforese foi realizada a 4°C, por 20 minutos, a uma corrente de 25V e 300 mA. Seguindo-se a corrida, as lâminas foram submersas em solução de neutralização (0,4 M de tris-HCl, pH 7,5) em três séries de 5 minutos cada, secas a temperatura ambiente e fixadas com etanol por 10 minutos.

Após a fixação e secagem, as lâminas foram coradas com 30 µL de solução de brometo de etídio 1X, preparada de uma solução estoque 10X (200 µg/mL) e cobertas com lamínula. O material foi imediatamente analisado em microscópio de fluorescência, com filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm, em um aumento de 400X.

A dimensão dos danos indicados pelo teste do cometa foi avaliada, visualmente, pela análise de 100 nucleóides por tratamento, não sobrepostos e escolhidos aleatoriamente. De acordo com o tamanho das caudas, os nucleóides foram classificados

em quatro classes, segundo a classificação de Kobayashi et al. (1995), em: classe 0 - ausência de danos no DNA; classe 1 - dano pequeno; classe 2 - dano médio; classe 3 - dano grande.

O escore para os 100 nucleóides analisados foi obtido pela multiplicação do número de células encontradas em cada classe, pelo número da classe correspondente, com valores variando de 0 (ausência total de danos) a 300 (dano máximo causado). Os resultados obtidos para todos os tratamentos foram analisados, estatisticamente, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

**Detecção de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos induzidos  
por baixas concentrações do inseticida malation, utilizando células de  
*Allium cepa*.**

**Jaqueline Bianchi<sup>1</sup>, Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Av. 24-A, 1515, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

## RESUMO

O uso crescente e indiscriminado de agrotóxicos, tanto na agricultura como nas residências, têm contribuído, significativamente, para a liberação de grandes quantidades de resíduos tóxicos no meio ambiente. Além da contaminação que os agrotóxicos podem causar ao ambiente, estes químicos, por possuírem ingredientes ativos específicos, também são capazes de induzirem mutação gênica, alterações cromossômicas ou danos no DNA de organismos expostos. Este trabalho avaliou os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de baixas concentrações de malation em células de *A. cepa*, por meio dos testes de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN). Sementes de *A. cepa* germinadas em água ultra pura obtida em aparelho Milli-Q foram expostas, por 24 e 48 horas, a diferentes concentrações de malation. Os tratamentos de 24 horas de exposição ao inseticida passaram, em seguida, por um período de recuperação de 48 horas em água Milli-Q. As análises estatísticas indicaram indução de AC e MN tanto para as células expostas por 24 como por 48 horas. As exposições por 48 horas, além de induzir índices semelhantes às exposições de 24 horas, para AC, mostraram um aumento na quantidade de micronúcleos. A grande quantidade de pontes cromossômicas anafásicas e MN de tamanhos relativamente pequenos, encontrados nas células analisadas, apontam para um possível efeito clastogênico do malation sobre o material genético dos organismos expostos. Após passarem pelo período de recuperação, somente as células expostas às duas menores concentrações testadas apresentaram diminuição nos índices de AC e MN, indicando uma relação diretamente proporcional entre baixas concentrações de malation e baixo efeito acumulativo sobre as células. A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que o malation é capaz de induzir danos genéticos, mesmo em concentrações muito

baixas, reforçando a necessidade de mais estudos que avaliem os efeitos de baixas concentrações de químicos ambientais sobre organismos expostos.

**Palavras chave:** malation, aberração cromossômica, micronúcleo, genotoxicidade, mutagenicidade, *Allium cepa*.

## 1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são amplamente utilizados na agricultura para eliminar insetos e outros tipos de pragas que podem prejudicar a produção agrícola. Para obter uma produtividade economicamente sustentável e produtos em grande quantidade, com longo período de estocagem e baixo custo (WEISS et al., 2004), os produtores vêm fazendo uso, cada vez mais, destes agroquímicos.

No Brasil, foram consumidos, só em 2001, 328.413 toneladas de agrotóxicos (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2004). Como consequência deste grande consumo, cerca de 150.000 toneladas destes químicos são lançados no ambiente, anualmente (CRESTANA, 2000).

No meio ambiente, os agrotóxicos são encontrados, geralmente, em baixas concentrações. Dependendo de sua composição química e de seu grau de persistência no solo, os agrotóxicos permanecem no ambiente, em baixas concentrações, por um longo período de tempo. (SCHWEIZER et al., 2000 *apud* TURGUT, 2007). Além disso, a exposição do homem a estes agroquímicos, também ocorre por meio da ingestão de água e alimentos contaminados com baixas concentrações de agrotóxicos. Segundo Turgut (2007), os agrotóxicos, mesmo em concentrações baixas, podem ser transferidos por meio da cadeia alimentar e afetar, negativamente, os organismos.

Os agrotóxicos, considerados potencialmente mutagênicos pela capacidade que seus ingredientes apresentam em induzir danos no DNA, não possuem especificidade absoluta contra certos organismos e muitos acabam atingindo também os seres humanos (BOLOGNESI e MORASSO, 2000). Assim, além de contribuírem para o aumento da contaminação ambiental, estes químicos também causam problemas na saúde humana (SOARES et al., 2003).

Dentre os agrotóxicos mais utilizados na agricultura estão os organofosforados. Estes estão sendo amplamente utilizados como substitutos dos organoclorados que, devido à sua alta toxicidade e persistência no meio ambiente, foram proibidos na maioria dos países (DRISS et al., 1993).

Além da inibição da acetilcolinesterase, fator que determina a sua toxicidade (ETO, 1974), os organofosforados podem apresentar outras propriedades independentes dos efeitos anticolinesterásicos, como a mutagenicidade e a carcinogenicidade (CONCON, 1988), mesmo em concentrações mais baixas do que aquelas indicadas como seguras para a inibição da acetilcolinesterase (SINGH e SHARMA, 2000; SALVI et al., 2003).

O malation é um inseticida bastante utilizado na agricultura e nas residências, principalmente, por apresentar baixa toxicidade para mamíferos e alta seletividade para insetos, quando comparado com outros inseticidas do mesmo grupo. Esta ação específica do inseticida é devido ao fato dos mamíferos possuírem altos níveis de carboxiesterases, que são enzimas que hidrolizam o malation, produzindo intermediários não tóxicos e de fácil eliminação das células, enquanto que os insetos não apresentam esta reação ao inseticida, por possuírem pouca ou nenhuma destas esterases (THOMPSON et al., 1989).

No entanto, efeitos adversos observados por Giri et al. (2002) em mamíferos expostos ao malation, mostraram que este inseticida é mutagênico e pode causar aberrações cromossômicas, quebras cromossômicas e micronúcleos. Estudos realizados por Lipkowitz et al. (1992), em uma população de trabalhadores agrícolas expostos ao malation, indicaram um aumento no risco de desenvolvimento de câncer, pelo registro

de uma incidência 10 a 20 vezes maior de indução de inversão no cromossomo 7, o que pode promover uma instabilidade genômica no organismo afetado.

Os vegetais, por serem receptores biológicos direto de agrotóxicos, constituem um importante material para testes genéticos e de monitoramento desses contaminantes (MA et al., 1995). A espécie *Allium cepa* tem sido, freqüentemente, utilizada para se determinar efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de várias substâncias (FISKEJÖ, 1985; MATSUMOTO e MARIN-MORALES, 2004; FERNANDES et al., 2007; LEME e MARIN-MORALES, 2008), sendo utilizada como um organismo padrão para testes rápidos (SMAKA-KINCL et al., 1996) e por apresentar boa correlação com sistemas testes de mamíferos (GRANT, 1982; CHAUHAN et al., 1999).

Grover et al. (1990) avaliaram os efeitos genotóxicos dos agrotóxicos em células vegetais e de mamíferos e verificaram uma correlação significativa de 91,5% entre os dois sistemas. Segundo Fiskejö (1985) e Rank e Nielsen (1997), resultados positivos obtidos pelo teste de *A. cepa* devem ser considerados como uma indicação de que o químico testado também pode causar danos biológicos em outros organismos.

O presente trabalho teve como objetivo investigar as potencialidades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas de diferentes concentrações do malation sobre o sistema-teste de *A. cepa*, por meio dos testes de aberrações cromossômicas em células meristemáticas, de micronúcleos em células meristemáticas e F<sub>1</sub> e de índices mitótico e de morte celular.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

#### **2.1.1. *Allium cepa***

Para a avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do malation, foram utilizadas sementes da espécie *Allium cepa* (cebola comum,  $2n = 16$ ) da mesma variedade (Baia Periforme, marca Top Seed<sup>®</sup>) e de mesmo lote.

### 2.1.2. Malation

Neste trabalho foi utilizado o Malation<sup>®</sup> comercial 500 CE (concentrado emulsionável, da Ind. Quím. Dipil, com 50% de pureza), do qual foram preparadas quatro concentrações. A primeira concentração foi de 1,5 mg/mL, que corresponde à menor concentração do princípio ativo indicada pelo fabricante para uso na agricultura. As demais concentrações foram obtidas a partir de diluições da primeira em água Milli-Q, na proporção de 1:1, resultando nas concentrações progressivamente menores de 0,75; 0,37 e 0,18 mg/mL.

### 2.1.3. Metil Metanosulfonato (MMS)

O Metil Metanosulfonato (Sigma-Aldrich, CAS No 66-27-3), um agente alquilante monofuncional, amplamente usado como indutor de danos no DNA que possam resultar em mutagenicidade e carcinogenicidade (BERANEK, 1990), foi utilizado, neste trabalho, como controle positivo para os testes com *Allium cepa* na concentração de 10 mg/L, diluído em água Milli-Q.

## 2.2. Métodos

Sementes de *A. cepa*, dispostas em placas de Petri forradas com papel filtro, foram colocadas para germinar em água Milli-Q, até que as raízes atingissem de 1 a 1,5 cm de comprimento. Após este procedimento, as raízes foram transferidas, por 24 horas,

para outras placas de Petri contendo, cada uma delas, uma das concentrações de malation propostas para o estudo; a solução de MMS (controle positivo); e água Milli-Q (controle negativo). Decorrido este tempo, as raízes foram separadas em três grupos: no primeiro grupo, as raízes foram coletadas e, imediatamente, fixadas em Carnoy (3 partes de etanol absoluto para 1 parte de ácido acético glacial – v:v); no segundo grupo as raízes permaneceram nos respectivos tratamentos por mais 24 horas, totalizando 48 horas de exposição; no terceiro grupo as raízes foram transferidas para placas contendo água Milli-Q, para um período de recuperação de 48 horas.

Após as 48 horas de exposição nas concentrações de malation e no MMS e após o período de recuperação, todas as raízes foram coletadas e fixadas. A fixação foi feita em Carnoy, por 6 a 18 horas em temperatura ambiente, sendo, posteriormente, armazenado em geladeira, em um novo Carnoy recém preparado, até a sua utilização.

### *2.2.1. Teste de Genotoxicidade, Mutagenicidade e Citotoxicidade em células meristemáticas.*

Para estes testes, foi seguida a metodologia descrita por Grant (1982), com modificações. As radículas previamente fixadas foram lavadas em dois banhos de água destilada, por 5 minutos cada, e submetidas ao reativo de Schiff, segundo metodologia descrita por Feulgen e Rossenbeck (1924) *appud* Mello e Vidal, (1978). Com os meristemas corados e lavados em água corrente, foram preparadas, pelo método de esmagamento comum, 20 lâminas permanentes para cada tratamento, que foram usadas para a avaliação de aberrações cromossômicas (teste de genotoxicidade), de micronúcleos (teste de mutagenicidade), de morte celular e de índice mitótico (teste de

citotoxicidade). Foram analisadas 500 células por lâmina, totalizando 10.000 células por tratamento. A observação foi feita em microscopia de luz, em aumento de 400 vezes.

Todos os testes foram feitos em duplicata e os resultados foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

### *2.2.2. Teste do Micronúcleo em células F<sub>1</sub>*

A fim de verificar a fixação dos danos causados no material genético das células, pelo inseticida malation, também foram realizados testes de micronúcleo nas células da região F<sub>1</sub> das raízes de *A. cepa*.

Os procedimentos de hidrólise e coloração das raízes com reativo de Schiff, realizados para a região F<sub>1</sub>, foram os mesmos anteriormente descritos para a região meristemática. Para a confecção das lâminas, porções das raízes, localizadas cerca de 1 mm acima da região meristemática (região F<sub>1</sub>), foram pressionadas suavemente sobre as lâminas, seguido do mesmo procedimento anteriormente descrito. Foram confeccionadas 20 lâminas permanentes para cada tratamento e analisadas 500 células de cada lâmina, totalizando 10.000 células por tratamento. A observação foi feita em microscopia de luz, em aumento de 400 vezes.

Assim como nos testes com a região meristemática, os testes foram realizados em duplicata e as análises estatísticas foram feitas pelo teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Tratamento de 24 horas**

#### *3.1.1. Efeitos citotóxicos*

Todos os testes realizados com as concentrações do malation e com o MMS não levaram à indução de morte celular.

Pela análise do índice mitótico, foi verificada uma ação citotóxica apenas para a concentração de 0,75 mg/mL, pela diminuição significativa de seu índice. O controle positivo (teste com MMS) apresentou alterações significativas pelo aumento do índice mitótico, quando comparado com os resultados do controle negativo (TABELA 1).

**Tabela 1:** Freqüências (Freq), médias (M) e desvios padrões (DP) de células matemáticas de *A. cepo* nas diferentes fases da mitose, para as quatro concentrações de malatión, para o MMS (CP) e para o controle negativo (CN), após exposição por 24 horas.

	CN		MMS		1,5 mg/mL		0,75mg/mL		0,37 mg/mL		0,18 mg/mL	
	Freq	M±DP	Freq	M±DP	Freq	M±DP	Freq	M±DP	Freq	M±DP	Freq	M±DP
Prófase	12,16	60,8±30,5	17,08	85,4±30,4	11,69	58,45±27,6	7,56	37,8±18,9	11,73	58,65±21,0	11,29	56,45±29,3
Metáfase	1,23	6,15±2,9	1,0	5,0±2,0	1,01	5,05±3,1	0,79	3,95±2,3	1,08	5,4±2,2	1,18	5,85±4,2
Anáfase	0,66	3,3±2,1	0,57	2,85±1,7	0,48	2,4±1,5	0,48	2,4±2,1	0,75	3,75±2,1	0,80	3,9±3,3
Telófase	1,47	7,35±2,8	0,64	3,2±2,7	0,74	3,7±3,4	0,81	4,05±2,7	1,23	6,15±3,7	1,13	5,75±3,8
Total	15,51	77,55±32,8	19,29	96,45±32,5	13,92	69,6±30,6	9,64	48,2±22,3	14,87	74,35±22,8	14,39	71,95±35,7

\* estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo pelo teste de Mann-Whitney.

### 3.1.2. Efeitos genotóxicos

A análise dos efeitos genotóxicos apontou resultados significativos, após exposição das sementes de *A. cepa* ao MMS e para três das quatro concentrações testadas do malation (1,5; 0,75 e 0,18 mg/mL) (TABELA 2). Os tipos de aberrações cromossômicas encontradas estão apresentados na figura 1.

**Tabela 2:** Frequências, médias e desvios padrões (DP) de células portadoras de AC, após exposição de 24 horas às quatro diferentes concentrações do malation, ao MMS (CP) e à água Milli-Q (CN).

	Frequência de AC	Média±DP
CN	0,25	1,25±1,48
1,5 mg/mL	0,48	2,4*±1,8
0,75 mg/mL	0,53	2,65*±1,72
0,37 mg/mL	0,38	1,9±1,41
0,18 mg/mL	0,53	2,65*±1,59
MMS	0,57	2,85*±2,03

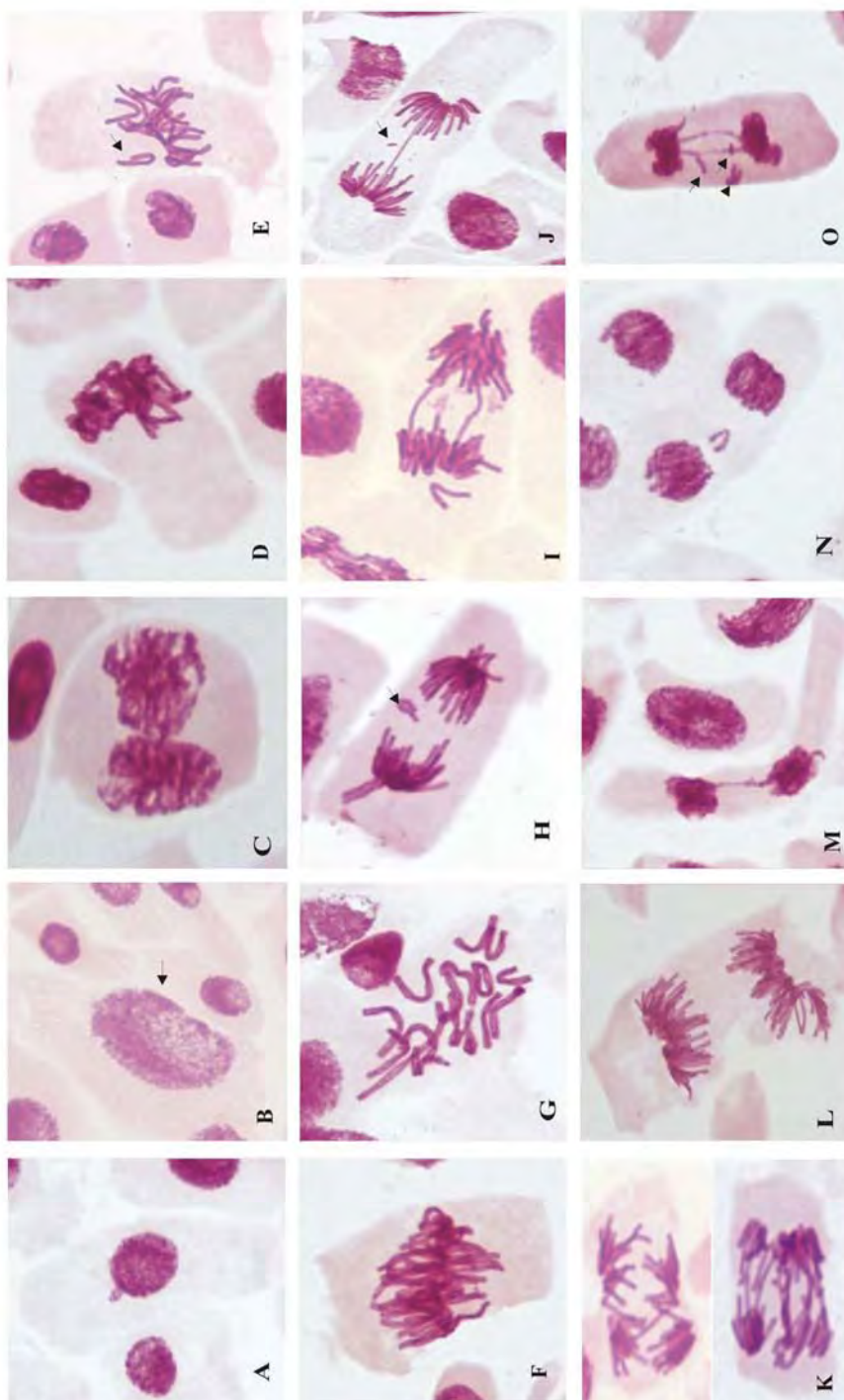
\* estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo pelo teste de Mann-Whitney.

Em números absolutos, as AC mais encontradas nos testes com malation foram os brotos nucleares, seguidos das pontes cromossômicas anafásicas. No entanto, proporcionalmente, a frequência de brotos nucleares foi muito baixa, quando comparada à de pontes cromossômicas anafásicas, uma vez que foram encontradas mais células em intérfase do que em anáfase (TABELA 3).

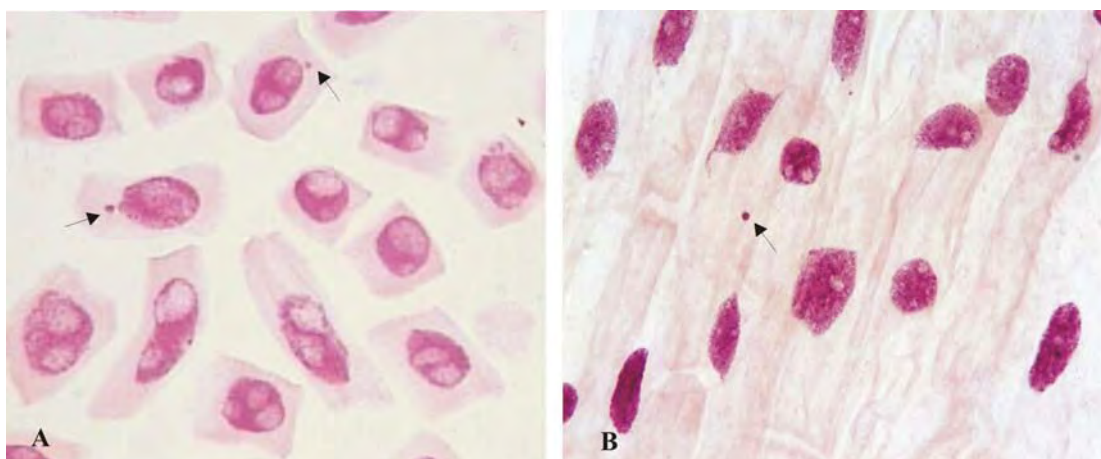
### 3.1.3. Efeitos Mutagênicos

A análise estatística das células meristemáticas de *A. cepa* portadoras de MN (FIGURA 2A) apontou efeito mutagênico para o controle positivo e para as duas concentrações mais altas do malation: 1,5 e 0,75 mg/mL. A análise das células da região F<sub>1</sub> (FIGURA 2B), apontou também mutagenicidade para a concentração de 0,18 mg/mL (TABELA 4).

FIGURA I



**Figura 1:** Aberrações cromossômicas nucleares e celulares encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição a diferentes tempos e concentrações do inseticida malathion. A) Broto interfásico; B) Prófase inicial poliploide (seta); C) Prófase binucleada; D) Metáfase com aderência cromossômica; E) Metáfase com perda de cromossomo (seta); F) Metáfase poliploide; G) C-metáfase; H) Anáfase com perda cromossômica (seta); I) Anáfase com pontes e perda cromossômica; J) Anáfase com ponte cromossômica e fragmento cromossômico decorrente de quebra (seta); K) Anáfases multipolares com pontes cromossômicas; L) Anáfase poliploide; M) Telófase com ponte cromossômica; N) Telófase com perda cromossômica; O) Telófase com ponte, quebras (setas) e perda cromossômica (cabeça da seta). Aumento: 400X.

**FIGURA 2**

**Figura 2:** Regiões meristemática e F<sub>1</sub> das raízes de *Allium cepa* com células portadoras de micronúcleos (setas). A) Região meristemática; B) Região F<sub>1</sub>. Aumento: 400X.

**Tabela 3:** Comparação das freqüências de broto nuclear (em células interfásicas – Int) e de ponte cromossômica (em células anafásicas – An) em células meristemáticas de *A. cepa*, expostas às diferentes concentrações de malation, ao MMS (CP) e à água Milli-Q (CN).

	CN		1,5 mg/mL		0,75 mg/mL		0,37 mg/mL		0,18 mg/mL		MMS	
	Int	An	Int	An	Int	An	Int	An	Int	An	Int	An
N. de células <sup>a</sup>	8412	66	8608	48	9036	48	8521	75	8560	80	8071	57
N. de AC <sup>b</sup>	11	8	25	14	25	15	16	14	15	25	26	12
Freq. de AC <sup>c*</sup>	0,13	12,12	0,29	29,16	0,27	31,25	0,18	18,66	0,17	31,25	0,32	21,05

b: brotos nucleares para células interfásicas e pontes cromossômicas para células anafásicas; c\* = (b/a) x 100.

**Tabela 4:** Freqüências, médias e desvios padrões (DP) de células portadoras de micronúcleos nas regiões meristemáticas (M) e F<sub>1</sub>, após exposição por 24 horas às concentrações de malation, ao MMS (CP) e à água Milli-Q (CN).

	Região M		Região F <sub>1</sub>	
	Freqüência	Média ± DP	Freqüência	Média ± DP
CN	0,15	0,75±0,7	0,11	0,55±0,8
1,5 mg/mL	1,43	7,15*±5,7	1,44	7,2*±7,6
0,75 mg/mL	0,7	3,5*±4,5	0,41	2,05*±2,9
0,37 mg/mL	0,34	1,7±1,8	0,11	0,55±0,8
0,18 mg/mL	0,18	0,9±1,1	0,51	2,55*±2,7
MMS	5,47	27,35*±12,8	2,76	13,8*±9,7

\* estatisticamente significativo (p<0,05) em relação ao controle negativo pelo teste de Mann-Whitney.

Foi observado que, a maioria dos MN encontrados nas células da região meristemática, após exposição às concentrações do malation, possuía tamanhos extremamente pequenos, quando comparados com o tamanho do núcleo principal das células (FIGURA 3).

### 3.2. Tratamento de 48 horas

#### 3.2.1. Efeitos citotóxicos

Após exposição por 48 horas nas diferentes concentrações de malation, ao MMS e à água Milli-Q não foram observadas células em processo de morte celular. Com

relação ao índice mitótico, foi observado um aumento significativo em células expostas ao MMS. Nenhum resultado significativo foi observado para as células expostas ao malation (TABELA 5).

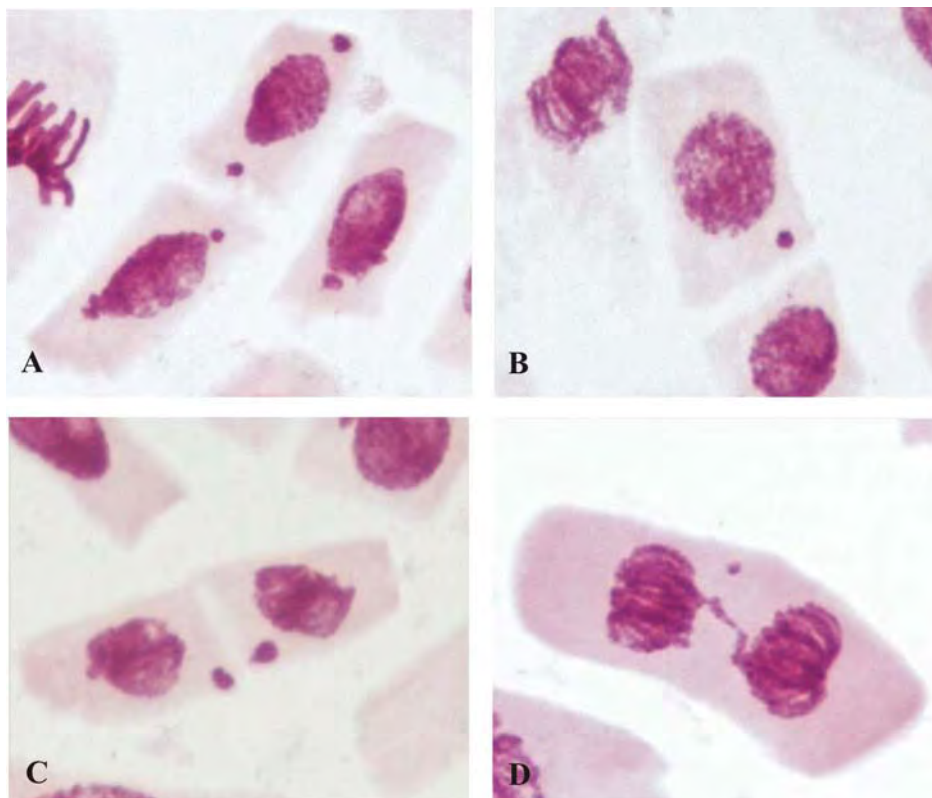
### 3.2.2. *Efeitos genotóxicos*

As células meristemáticas de *A. cepa* apresentaram frequências de AC significativas apenas para o controle positivo e para a maior concentração testada de malation (1,5 mg/mL), como apresentado na tabela 6.

Os tipos de AC encontradas para todas as concentrações, após exposição por 48 horas foram, praticamente, as mesmas encontradas após 24 horas de exposição, com exceção da prófase poliplóide e da telófase com ponte e perda cromossômica. As pontes cromossômicas em anáfase foram as aberrações cromossômicas encontradas em maior quantidade e frequência, assim como observado para o tratamento de 24 horas.

### 3.2.3. *Efeitos mutagênicos*

As análises estatísticas das células meristemáticas e das células F<sub>1</sub> (FIGURAS 2A e 2B), expostas por 48 horas ao malation, ao MMS e à água Milli-Q, apontaram um efeito mutagênico para o controle positivo e para as concentrações de 1,5; 0,75 e 0,37 mg/mL de malation (TABELA 7).

**FIGURA 3**

**Figura 3:** A-D: Células meristemáticas de *Allium cepa* com presença de MN, após exposição a diferentes tempos e concentrações de malation. Aumento: 400X.

**Tabela 5:** Frequências (Freq), médias (M) e desvios padrões (DP) de células meristemáticas de *A. cepa* nas diferentes fases da mitose, para as quatro concentrações de malikton, para o MMS (CP) e para o controle negativo (CN), após exposição por 48 horas.

CN		MMS			1,5 ng/mL			0,75ng/mL			0,37 ng/mL			0,18 ng/mL		
	Freq	M±DP	Freq	M±DP	Freq	M±DP	Freq	M±DP	Freq	M±DP	Freq	M±DP	Freq	M±DP	Freq	M±DP
Prófase	10,36	49,9±28,0	18,39	86,6±39,6	13,12	57,35±27,4	10,63	41,75±22,3	12,37	52,45±21,4	10,81	60,55±29,0				
Metáfase	1,12	5,05±2,7	1,35	4,75±2,8	1,21	5,05±2,8	1,34	5,2±3,1	0,92	3,7±2,2	0,88	4,8±4,9				
Anáfase	0,54	3,1±1,9	0,79	2,75±1,9	0,93	3,45±2,5	0,6	2,2±1,6	0,59	2,75±2,6	0,58	3,3±3,6				
Telófase	1,49	6,65±3,4	1,0	3,65±2,7	0,96	3,6±3,1	1,12	4,15±2,7	1,12	4,85±4,0	0,83	4,3±4,2				
Total	13,5	67,55±29,9	21,5	107,65±43,4	16,2	81,1±31,2	13,7	68,85±35,1	15	75±35	13,1	65,5±30,5				

\*estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo pelo teste de Mann-Whitney.

**Tabela 6:** Frequências, médias e desvios padrões (DP) de células portadoras de AC, após exposição de 48 horas nas quatro diferentes concentrações do malation, no MMS (CP) e na água Milli-Q (CN).

	Frequência de AC	Média±DP
CN	0,17	0,85±1,1
1,5 mg/mL	0,37	1,85*±1,7
0,75 mg/mL	0,36	1,80±1,6
0,37 mg/mL	0,30	1,5±1,5
0,18 mg/mL	0,31	1,55±1,4
MMS	0,54	2,7*±1,7

\* estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo (teste de Mann-Whitney).

**Tabela 7:** Frequências e desvios padrões de células das regiões meristemática (M) e F<sub>1</sub> portadoras de MN, após exposição de 48 horas nas concentrações de malation, no MMS (CP) e na água Milli-Q (CN).

	Região M		Região F <sub>1</sub>	
	Frequência	Média ± DP	Frequência	Média ± DP
CN	0,16	0,8±1,32	0,19	0,95±1,14
1,5 mg/mL	1,26	6,15*±4,6	1,35	6,75*±5,3
0,75 mg/mL	1,2	6*±6,5	0,83	4,15*±3,7
0,37 mg/mL	1,14	5,7*±9,4	1,53	7,65*±13,6
0,18 mg/mL	0,23	1,15±1,03	0,21	1,05±1,6
MMS	9,3	46,5*±31,3	8,09	40,45*±41,1

\* estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), em relação ao controle negativo (teste de Mann-Whitney).

### 3.3. Tratamento de Recuperação

Apenas as duas menores concentrações testadas de malation (0,37 e 0,18 mg/mL) não apresentaram resultados significativos para MN e AC, após o período de recuperação, quando comparados com o teste controle negativo. Também foi observado que os índices mitóticos das células, anteriormente expostas às quatro concentrações do malation, foram semelhantes ao encontrado para o controle negativo (TABELA 8).

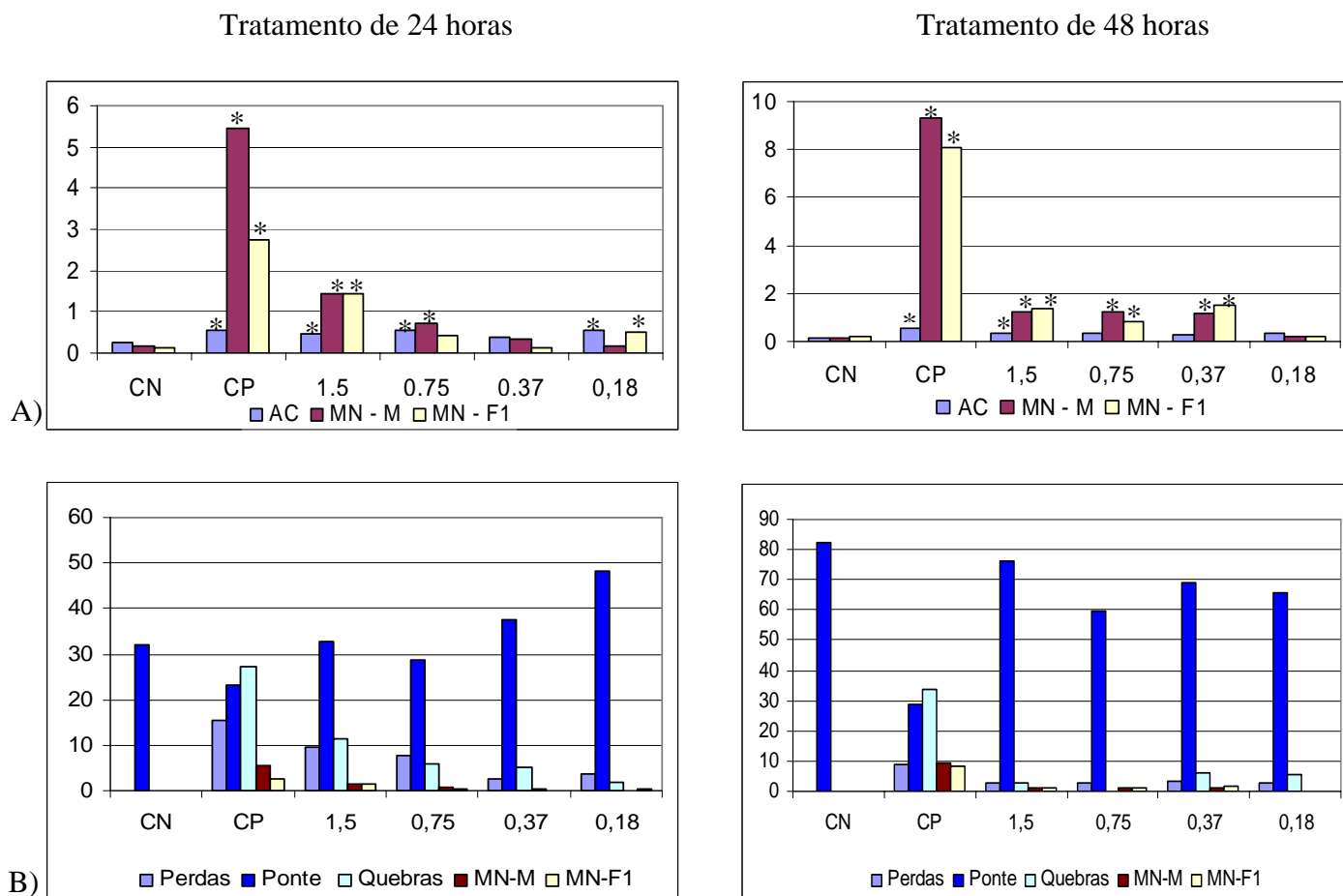
**Tabela 8:** Frequências, médias e desvios padrões (DP) de células das regiões meristemática (M) e F<sub>1</sub> portadoras de micronúcleos, aberrações cromossômicas (AC) e índice mitótico (IM), após exposição das raízes por 48 horas em água Milli-Q (período de recuperação).

	MN-M		MN-F <sub>1</sub>		AC		IM	
	Freq	Média ± DP	Freq	Média ± DP	Freq	Média ± DP	Freq	Média ± DP
CN	0,18	0,9±1,25	0,19	0,95±1,35	0,16	0,8±1,00	12,25	61,25±21,94
1,5 mg/mL	0,92	4,6*±4,12	1,31*	6,55*±7,6	0,32	1,6*±1,14	13,50	67,5±25,35
0,75 mg/mL	0,85	4,25*±5,10	0,9	4,65*±5,49	0,33	1,65*±0,93	12,22	61,1±23,58
0,37 mg/mL	0,19	0,95±1,19	0,32	1,6±1,87	0,31	1,55±1,70	10,52	52,6±27,67
0,18 mg/mL	0,32	1,6±4,64	0,34	1,7±4,49	0,30	1,5±1,35	11,22	56,1±27,20
MMS (CP)	2,80	14*±13,4	5,57	27,85*±24,2	0,42	2,1*±1,61	14,56	72,8*±18,95

\* estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo (teste de Mann-Whitney).

A figura 4 ilustra a provável origem dos MN encontrados nas células de *A. cepa*, após exposições ao malation, nos dois diferentes tempos de tratamento. Os gráficos da figura 4A ilustram as frequências de AC e de MN na região meristemática e na região F<sub>1</sub>. Com exceção da concentração de 0,37 mg/mL, as concentrações que induziram AC também induziram MN. Dentre as AC encontradas neste estudo, aquelas que poderiam estar relacionadas com a formação de MN são as quebras, as pontes e as perdas cromossômicas. A figura 4B mostra, separadamente, a frequência destas aberrações. O resultado nos sugere que, dentre os três tipos registrados de AC, as quebras e as perdas cromossômicas parecem estar mais relacionadas com o aparecimento do MN. Esta sugestão pode ser evidenciada pelos índices próximos registrados para quebras e perdas e células portadoras de MN. Além disso, quando comparado com o tratamento de 24 horas, não foi verificada a ocorrência de diminuição das pontes cromossômicas e aumento das frequências de MN, após exposição das raízes por 48 horas ao malation.

FIGURA 4



**Figura 4:** Frequências de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN) em células de *A. cepa*, após exposição às quatro concentrações do malation (mg/mL).

**A):** Frequência total de AC de células meristemáticas e de MN das regiões meristemática e F<sub>1</sub> para os tratamentos de 24 e 48 horas; **B):** Frequência de MN e dos tipos de AC encontradas, entre as células aberrantes.

MN-M: células meristemáticas portadoras de MN; MN-F<sub>1</sub>: células da região F<sub>1</sub> portadoras de MN; CN: controle negativo com água Milli-Q; CP: controle positivo com MMS.

\* significativo pelo teste estatístico de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Estudos dos efeitos genotóxicos e mutagênicos, realizados por meio de diferentes sistemas-testes com o inseticida malation, têm mostrado resultados conflitantes, pois em alguns casos são descritos resultados positivos, enquanto que em outros os resultados são negativos.

Segundo revisão realizada por Flessel et al. (1993), sobre a genotoxicidade do malation, estudos *in vivo* com células de medula óssea e espermatócitos de camundongo e hamster de várias linhagens, mostraram resultados significativos para AC e MN, após exposição dos animais ao malation comercial. Os autores também apresentam dados de estudos *in vitro* com células humanas (linfócitos, células B e fibroblastos) e de roedores (pulmão, CHO, fibroblastos), onde a maioria deles apresentou resultados significativos para AC e trocas entre cromátides irmãs.

Têm sido realizados poucos estudos utilizando vegetais como organismos teste para avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do malation. Ma et al. (1983) testaram a mutagenicidade deste inseticida, por meio da análise de MN em *Tradescantia*. Os autores não encontraram resultados significativos quando se avaliou os efeitos do malation após absorção pelo caule ou após exposição de partes da planta em câmara fechada ou mesmo após aplicação de malation em populações de *Tradescantia* em casa de vegetação. O teste do MN, utilizando *Tradescantia*, apenas foi eficiente para avaliar os efeitos do malation quando a planta foi exposta ao produto sob a forma gasosa.

Em nossos estudos, utilizando a espécie *A. cepa* como organismo teste para detecção dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do malation comercial,

encontramos resultados significativos para algumas das concentrações testadas, após exposições por 24 e 48 horas a este inseticida.

#### **4.1. Exposição das radículas de *A. cepa* em malation por 24 horas**

Pelos ensaios realizados, pode-se observar que as concentrações de malation que mais induziram AC foram as mesmas que também induziram quantidades significativas de MN, tanto nas células meristemáticas como nas  $F_1$  de *A. cepa*, com exceção da concentração de 0,18 mg/mL, que induziu formação de AC e MN na região  $F_1$ , mas não na meristemática. Com este resultado, podemos inferir que, para estas concentrações e tempo de exposição testados, as AC observadas mostraram uma correlação diretamente proporcional à presença de MN na região  $F_1$ , o que sugere uma fixação do dano na geração seguinte de células que sofreram esses danos.

A região  $F_1$  das raízes é constituída por células filhas, resultantes da divisão mitótica das células da região meristemática. Desta forma, os MN observados na região  $F_1$  são decorrentes de perdas e/ou quebras cromossômicas que ocorreram nas células meristemáticas e que foram excluídas do núcleo principal da célula, durante o ciclo celular (MA e XU, 1986).

Comparando as frequências de células micronucleadas, presentes na região meristemática e na região  $F_1$  das radículas de *A. cepa*, foi verificado que as concentrações que induziram índices significativos de MN na região meristemática (1,5 e 0,75 mg/mL em 24 horas), também induziram índices significativos de MN na região  $F_1$ . Somente para a concentração de 0,18 mg/mL (24 horas), foi encontrado resultado significativo de MN na região  $F_1$  e não significativo na região meristemática. A presença de uma quantidade maior de MN na região meristemática, em comparação

com a região F<sub>1</sub>, segundo Ma et al. (1995), é indicativo de ocorrência de atraso no ciclo mitótico. Assim, se existem poucas células em divisão na região meristemática, haverá, conseqüentemente, uma menor quantidade de células na região F<sub>1</sub> que poderiam ser portadoras de MN. Também entendemos que a diferença entre os percentuais de MN nas células das regiões meristemáticas e da região F<sub>1</sub>, pode ocorrer pela não fixação das células com danos, pela inviabilidade que o dano pode conferir a elas. Muitas das AC, como por exemplo, as pontes cromossômicas, podem não derivar em MN, por não sofrerem duplas quebras nos cromossomos interligados da ponte, mas podem levar as células a apresentarem conteúdos genéticos diferentes.

#### **4.2. Exposição das células de *A. cepa* ao malation por 48 horas**

Os resultados de genotoxicidade e mutagenicidade obtidos para este tempo de exposição (frequências de AC relativamente menores do que as registradas para os ensaios com 24 horas e frequências significativas de MN nas regiões meristemáticas e F<sub>1</sub> de *A. cepa*, para as três maiores concentrações testadas) indicam que, quando a exposição ao inseticida foi superior a 24 horas, não houve um aumento na indução de AC, mas, aquelas que já foram anteriormente induzidas nas primeiras 24 horas de exposição, contribuíram para um aumento de células portadoras de MN. As frequências de MN encontradas, após exposição ao malation por 48 horas, nas concentrações de 0,75 e 0,37 mg/mL, foram maiores do que as verificadas, tanto para a região meristemática quanto para a região F<sub>1</sub>, após 24 horas de exposição.

Para os dois tempos de tratamentos, de maneira geral, não foi verificado uma relação diretamente proporcional entre o aumento da concentração e a formação de AC e MN.

Embora tenham sido verificados efeitos genotóxicos e mutagênicos para os dois tempos de exposição ao malation, não foram encontrados resultados relevantes de citotoxicidade, para estas concentrações, no sistema teste estudado.

Estes resultados nos mostram que as concentrações estudadas, embora não inviabilizem as células expostas, causam sérios danos ao seu material genético.

#### **4.3. Tratamento de Recuperação de 48 horas, após exposição das células de *A. cepa* por 24 horas ao malation**

Os resultados do tratamento de recuperação indicaram que apenas as duas concentrações mais baixas testadas (0,37 e 0,18 mg/mL) não induziram AC e MN nas células das regiões meristemática e F<sub>1</sub>, o que pode ser um indicativo de que, quanto menor a concentração de malation, menor seu efeito acumulativo sobre o material genético dos organismos expostos.

Quanto ao parâmetro citotoxicidade, pela análise das células submetidas ao tratamento de recuperação, pode se observar uma normalização do índice mitótico, para a concentração de 0,75 mg/mL, que foi relativamente, baixo quando comparado com o controle negativo, após exposição de 24 horas. Os índices mitóticos obtidos para todas as concentrações estudadas, após o tempo de recuperação, confirmam as indicações de que, para as concentrações estudadas, o malation não causa efeitos citotóxicos.

#### **4.4. Potencial clastogênico do malation**

##### *4.4.1. Aberrações cromossômicas*

As AC são originadas de mudanças na estrutura dos cromossomos, resultantes de quebras, trocas ou rearranjos cromossômicos, que podem ser letais ou causar danos genéticos, tanto somáticos quanto herdáveis às células (SWIERENGA et al., 1991).

Neste estudo, todas as concentrações de malation testadas induziram variados tipos de AC, tanto as relacionadas a distúrbios no fuso mitótico, como as aderências cromossômicas, C-metáfases, cromossomos perdidos, atrasos cromossômicos, anáfases multipolares e poliploidias, quanto aquelas relacionadas a efeitos clastogênicos, como as pontes e quebras cromossômicas.

Dentre as aberrações registradas, as pontes cromossômicas anafásicas foram as que apareceram em maior frequência para todas as concentrações e tratamentos. Segundo Humphrey e Brinkley (1969), as pontes cromossômicas que aparecem na anáfase podem ser decorrentes de trocas estruturais ocorridas, anteriormente, entre as cromátides de um mesmo cromossomo ou entre as cromátides de dois cromossomos diferentes. Estes autores classificaram as pontes anafásicas em três tipos, de acordo com a sua formação: a) pontes falsas ou pegajosas – resultantes da aderência de materiais externos, como ribossomos ou nucléolos persistentes e, segundo Brinkley e Humphrey, (1969) e Cimini et al. (2003), proteínas do centrômero de cromátides irmãs; b) pontes resultantes de trocas entre cromátides irmãs, ou entre cromossomos distintos, devido a quebras e deleções terminais. Neste caso, após a quebra, as porções cromossômicas portadoras de cinetócoro ligam entre si, formando estruturas dicêntricas. Quando este conjunto se move para pólos opostos na anáfase, uma ponte cromossômica é formada. Os fragmentos terminais acêntricos são perdidos e não se reintegram ao núcleo principal

da célula, como observado na figura 1 J.; c) pontes “*side-arm*” – envolvem trocas de fibras em nível subcromatídico.

Os mecanismos da indução de pontes cromossômicas, em células com telômeros normais, por agentes que causam danos no DNA, não são ainda bem entendidos, mas sugere-se que estejam relacionados com defeitos no sistema de reparo de quebras de fita dupla do DNA (ZHU et al., 2002).

Uma vez que a formação de pontes cromossômicas anafásicas pode estar relacionada com a quebra de porções cromossômicas, e que este tipo de AC foi a mais encontrada em nossas análises, podemos sugerir que o malation atue como um agente com propriedades clastogênicas, promovendo quebras no DNA, principalmente nas fases que precedem a divisão celular.

#### 4.4.2. Células micronucleadas

De maneira geral, os MN encontrados nas células expostas ao malation foram, em sua maioria, de tamanhos relativamente pequenos, pela proporção observada entre eles e o núcleo principal (FIGURA 3). Segundo estudos de Yamamoto e Kikuchi (1980), MN pequenos podem ser originados por ação clastogênica. Assim, podemos reforçar a hipótese anteriormente apresentada de que o malation pode ser um agente de ação clastogênica. Nossas observações e sugestões corroboram os dados de Titenko-Holland et al. (1997), que verificaram que a formação da maioria dos MN em cultura de linfócitos humanos, após exposição em baixas concentrações ao malation, se deu por fragmentos desprovidos de cinetócoro, confirmando a ação clastogênica para este inseticida.

A capacidade do malation causar quebras no material genético é um efeito comumente observado entre os organofosforados (WEBSTER et al., 2002). Segundo Sbrana e Musio (1995), isto ocorre pela capacidade dos organofosforados induzir sítios frágeis no DNA. Os autores também acrescentaram que as quebras promovidas por agentes clastogênicos, em sítios frágeis específicos, parecem ser significantes no processo de carcinogênese de muitos tipos de câncer.

O mecanismo de interferência da maioria dos compostos genotóxicos e carcinógenos ocorre pelas suas características eletrofílicas ou pela ativação do composto a intermediários eletrofílicos, que se ligam, covalentemente, as macromoléculas (SEARLE, 1984). Segundo Woo et al. (1996), compostos organofosforados, como o malation e seus análogos, apresentam dois sítios eletrofílicos potenciais: grupos alquil e um grupo fosforil. Estudos *in vitro*, realizados por Imamura e Talcott (1985), mostraram que o malation (98% puro) e muitas de suas impurezas alquilaram um substrato sintético, a 4-(p-nitrobenzil)pirimidina, sugerindo que este inseticida atue como um forte agente alquilante. Em estudos posteriores, Wiaderkiewicz et al. (1986) demonstraram que o Malation produziu metilação em bases de DNA, *in vitro*, produzindo 7-metilguanina, uma nitrosamina de efeito promutagênico, por promover um emparelhamento incorreto entre as bases G e T, causando transição de bases G-C para A-T.

A maior reatividade de dois dos derivados do malation, o malaaxon e o isomalation, em comparação com o próprio malation, se deve às diferenças nos grupamentos alquil e fosforil destes três compostos.

#### 4.5 Bioativação do malation em células de *A. cepa*

Segundo Thompson et al (1989) e Sultatos (1994), a toxicidade do malation é dependente da sua bioativação em malaaxon. No animais, esta bioativação é feita pelas enzimas do citocromo P-450 (BURATTI et al., 2005).

Impurezas como o isomalation e vários ésteres de trimetilfosforotioatos, presentes no malation de formulação comercial, ou formados durante a estocagem do produto por isomerização térmica ou fotoquímica, podem potencializar a toxicidade do malation em até 10 vezes (PELLEGRINI e SANTI, 1972; ALDRIDGE et al. 1979). Isto acontece porque o isomalation inibe as carboxiesterases, que são enzimas que atuam nas vias de degradação do malation, levando a formação de compostos não tóxicos. Como resultado desta inativação, a degradação do malation passa a ser feita pela via do citocromo P-450, que gera uma elevada produção de malaaxon (BURATTI et al., 2005). De acordo com Lucier e Menzer (1970), a ligação P=O (encontradas no malaaxon e isomalation) é 1000 vezes mais potente em inibir as colinesterases do que a ligação P=S (encontrada no malation).

Estudos *in vitro*, realizados por Blasiak et al. (1999), com linfócitos de sangue periférico de homens expostos ao malation, ao malaaxon e ao isomalation puros, mostraram que, tanto o malaaxon quanto o isomalation induziram danos no DNA em concentrações baixas, que variaram de 8 a 66 µg/mL, enquanto que para os testes com malation puro, nenhum efeito genotóxico foi observado.

Os resultados positivos para mutagenicidade e genotoxicidade, encontrados neste estudo, para as concentrações testadas de malation (50% de pureza), podem nos indicar que as células de *A. cepa* apresentam sistemas enzimáticos com capacidade de ativação do malation em malaaxon.

Segundo Lamourex e Rusness (1986), as plantas podem metabolizar muitos compostos químicos por oxidação, transformação e conjugação e compartimentalizar estes produtos nos seus tecidos. Os principais sistemas enzimáticos que atuam na ativação de promutágenos em plantas parecem estar envolvidos, segundo Stiborova e Anzenbacher (1991), com a monooxigenação, peroxidação e conjugação. Porém, de acordo com Plewa e Wagner (1993), outros sistemas enzimáticos também podem desempenhar um papel importante no processo de ativação de substâncias químicas pelas plantas.

Similarmente aos animais, as plantas possuem múltiplas enzimas do citocromo P-450 (DONALDSON e LUSTER, 1991), com a diferença de que, nas plantas, estas enzimas são altamente restritas a determinados substratos e, além disso, a maioria das reações mediadas pelo citocromo P-450 envolve hidroxilações ou demetilações oxidativas (PLEWA e WAGNER, 1993). No caso do malation, sua bioativação em malaoxon envolve processos de desulfuração oxidativa.

Estudos realizados por Fiskejö (1981) demonstraram a eficiência das células de *A. cepa* em detectar efeitos mutagênicos induzidos pelo benzo[a]pireno, concluindo que estas células possuem enzimas importantes no processo de metabolização de substâncias químicas. Segundo Vig (1978), as células das raízes de *A. cepa* possuem um sistema oxidase de função mista, que é essencial para a ativação de promutágenos.

Apesar dos resultados positivos encontrados por alguns autores, com relação à bioativação de compostos químicos pelas plantas, a extrapolação de resultados encontrados em testes com vegetais para os animais e, mais especificamente para o homem, é um problema amplamente discutido no campo de testes biológicos (FISKEJÖ, 1988). Segundo Menn (1978) e Gentile et al. (1977), as biotransformações

são, geralmente, qualitativamente similares em plantas e animais, embora outros autores como Nilan e Vig (1976), mostraram que os efeitos de certos químicos são completamente diferentes entre estes dois sistemas.

Embora tenha sido verificado neste trabalho, que as células de *A. cepa* foram eficazes em detectar efeitos genotóxicos e mutagênicos do malation, cuja toxicidade é dada, principalmente, pela sua bioativação em malaoxon, sugerimos que testes mais direcionados, para avaliar a capacidade de bioativação do malation pelas células das raízes de *A. cepa*, devem ser realizados, a fim de melhor elucidar estas evidências.

## 5. CONCLUSÕES

Apesar do malation não apresentar efeitos citotóxicos sob as células de *A. cepa*, os testes de mutagenicidade e genotoxicidade realizados neste trabalho indicaram que este inseticida apresenta propriedades clastogênicas sobre os organismos expostos, e que esta ação ocorreu, principalmente, nas 24 primeiras horas de exposição. Após este período, pareceu não ocorrer novas induções de AC, mas as que já se formaram, anteriormente, continuam presentes sob a forma de MN, pela fixação da mutação na geração seguinte de células (região F<sub>1</sub>).

Levando-se em consideração que os MN formados na região meristemática podem: levar a célula à morte; reintegrarem-se ao núcleo principal da célula ou permanecerem isolados do núcleo principal, sem causar maiores prejuízos às células (LEACH e JACKSON-COOK, 2004), a realização de testes com células da região F<sub>1</sub> se mostrou bastante adequada, pois esta análise possibilitou a verificação da persistência dos danos causados pelo malation às células, uma vez que as concentrações que

induziram quantidades significativas de AC, também induziram quantidades significativas de MN na região F<sub>1</sub>, sem, contudo, inviabilizar as células.

Além de confirmar o potencial do malation em induzir quebras no material genético, os testes de mutagenicidade e genotoxicidade, realizados com *A. cepa*, também nos indicaram que este sistema-teste parece apresentar um sistema efetivo de bioativação do malation, por processos de oxidação enzimática. Esta observação nos permite ainda reforçar as indicações de que as raízes de *A. cepa* constituem um sistema-teste prático, sensível e eficiente para se avaliar os efeitos clastogênicos de uma grande variedade de químicos ambientais.

Por este estudo, pudemos ainda verificar que células expostas a baixas concentrações de malation (as menores concentrações testadas) tiveram seus efeitos mutagênicos e genotóxicos minimizados, quando a exposição foi interrompida por um período de recuperação em água livre de impurezas.

Pela análise geral dos resultados obtidos neste trabalho, podemos sugerir que o inseticida malation é capaz de induzir danos genéticos nas células de organismos expostos, mesmo em concentrações muito baixas. Esta observação reforça a necessidade de estudos mais detalhados, sobre os efeitos de baixas concentrações de químicos ambientais, para alertar a população sobre os riscos potenciais a que pode estar exposta.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento da pesquisa, ao Laboratório de Mutagênese Ambiental e ao Centro de

Estudos de Insetos Sociais (CEIS), ambos do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro, pelas condições de desenvolvimento do trabalho.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRIDGE, W.N.; MILES, J.W.; MOUNT, D.L.; VERSCHOYLE, R.D. The toxicological properties of impurities in malathion. **Archives of Toxicology**, v.42, p.95-106, 1979.

BERANEK, D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research**, v. 231, p. 11–30, 1990.

BLASIAK, J.; PAWEL, J.; TRZECIAK, A.; SZYFTER, K. *In vitro* studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. **Mutation Research**, v.445, p.275-283. 1999.

BOLOGNESI, C.; MORASSO, G. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. **Trends in Food Science and Technology**. v.11, p. 182-187. 2000.

BRINKLEY, B.R.; HUMPHREY, R.M. Evidence for subchromatid organization in marsupial chromosomes. I. Light and electron microscopy of X ray-induced sidearm bridges. **Journal of Cell Biology**, v. 43, p. 827-831, 1969.

BURATTI, F.M.; D'ANIELLO, A.; VOLPE, M.T.; MENEGUZ, A.; TESTAI, E. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome P450 isoforms. **Drug Metabolism and Disposition**, v.33. n. 3, p. 295-302, 2005.

CHAUHAN, L.K.; SAVENA, P.M.; GUPTA, S.K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. **Environment and Experiment Botany**, v. 42, p. 181-189, 1999.

CIMINI, D.; MATTIUZZO, M.; TOROSANTUCCI, L.; DEGRASSI, F. Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p. 3821-3833, 2003.

CONCON, J.M. in: CONCON, J.M. (Org). **Food Toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1988, 1133 p.

CRESTANA, S. Harmonia e Respeito entre Homens e Natureza: Uma Questão de Vida – A Contribuição da Agricultura. In: CASTELLANO, E.G.; CHAIDHRY, F.H. (Orgs.). **Desenvolvimento Sustentado: Problemas e Estratégias**. EESC-USP, São Carlos, São Paulo, 2000, p. 169-180.

DONALDSON, R.P.; LUSTER, D.G. Multiple forms of plant cytochromes P-450. **Plant Physiology**, v.96, p. 669-674, 1991.

DRISS, M.R.; HENNION, M.C.; BOUGUERRACA, M.L. Determination of carbaryl and some organophosphorus pesticides in drinking water using on-line liquid chromatographic preconcentration techniques. **Journal of Chromatography**, v. 639, n. 2, p.352-358, 1993.

ETO, M. **Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry**. Cleveland: CRC Press. 1974, 158 p.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>>. Acesso em 15 jul. 2004.

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

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

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

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

FLESSEL, P.; QUINTANA, P.J.E.; HOOPER, K. Genetic toxicity of malathion: a review. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 22, p. 7-17, 1993.

GENTILE, J.M.; WAGNER, E.D.; PLEWA, M.J. The detection of weak recombinogenic activities in the herbicides alachlor and propachlor using a plant activation assay. **Mutation Research**, v.48, p. 113-116, 1977.

GIRI S.; PRASAD S.B.; GIRI, A.; SHARMA, G.D. Genotoxic Effects of malation: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays *in vivo*. **Mutation Research**, v. 514, n.1-2, p. 223-231, 2002.

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

GROVER, I.S.; DHINGRA, A.K.; ADHIKARI, N.; LADHAR, S.S. Genotoxicity of pesticides. In: MENDELSON, M.L.; ALBERTINI, R.J. (Orgs.), **Mutation and the Environment**. Part E, New York: Wiley Liss, 1990, p. 91-106.

HUMPHREY, R.M.; BRINKLEY, B.R. Ultrastructural studies of radiation-induced chromosome damage. **The Journal of Cell Biology**, v. 42, p. 745-753, 1969.

IMAMURA, T.; TALCOTT, R. Mutagenic and alkylating properties of organophosphorus impurities of commercial malathion. **Mutation Research**, v.155, p. 1-6, 1985.

LAMOUREX, G.L.; RUSNESS, D.G. Xenobiotic conjugation in higher plants. In: PAULSON, G.D.; CALDWELL, J.; HUSTON, D.H.; MENN, J.J. (Orgs.). **Xenobiotic Conjugation Chemistry**, v. 299, 1986, p. 62-107.

LEACH, N.T.; JACSON-COOK, C. Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei? **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 554, p. 89-94, 2004.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study, **Mutation Research: Genetic and Toxicology Environmental Mutagenesis**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LIPKOWITZ, S.; GARRY, V.F.; KIRSCH, I.R. Interlocus V-J recombination measures genomic instability in agriculture workers at risk for lymphoid malignancies. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.89, p.5301-5305, 1992.

LUCIER, G.W.; MENZER, R.E. Nature of oxidative metabolites of dimethoate formed in rats, liver microsomes and bean plants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.18, p. 698-704, 1970.

MA, T.H.; ANDERSON, V.A.; HARRIS, M.M.; BARE, J.L. Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) test on the genotoxicity of malation. **Environmental Mutagenesis**, v. 5, p. 127-137, 1983.

MA, T.H.; XU, Z. Validation of a new protocol of the *Allium* micronucleus test for clastogens. **Environmental Mutagenesis**, v. 8, n. 6, p. 65-66, 1986.

MA, T.H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, H.; ZHANG, H. An improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v.334, p.185-195, 1995.

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

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

MENN, J.J. Comparative aspects of pesticide metabolism in plants and animals. **Environmental Health Perspectives**, v. 27, p. 113-124, 1978.

NILAN, R.A.; VIG, B.K. Plant test systems for detection of chemical mutagens. In: HOLLAENDER, A. (Org.), **Chemical Mutagens**. Principles and methods for their detection, v.4, 1976, p. 143-170.

PELLEGRINI, G; SANTI, R. Potentiation of toxicity of organophosphorus compound containing carboxylic ester functions toward warm-blooded animals by some organophosphorus impurities. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.20, p. 944-950, 1972.

PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D. Activation of promutágenos by green plants. **Annual Review of Genetics**, v.27, p. 93-113, 1993.

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. **Mutation Research**, v.390, p.121-127, 1997.

SALVI, R.M.; LARA, D.R.; GHISOLFI, E.S.; PORTELA, L.V.; DIAS, R.D.; SOUZA, D.O. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. **Toxicological Sciences**. v. 72, p. 267-271. 2003.

SBRANA, I.; MUSIO, A. Enhanced expression of common fragile sites with occupational exposure to pesticides. **Cancer Genetics and Cytogenetics**.v.82, p.123-127, 1995.

SEARLE, C.E. Chemical carcinogenesis. **American Chemical Society Monographs**, 1984, 182 p.

SINGH, S.; SHARMA, N. Neurological syndromes following organophosphate poisoning. **Neurology**, v. 48, p. 308-313. 2000.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, v. 368, p. 171-179, 1996.

SOARES, W.; ALMEIDA, R.M.V.R.; MORO, S. Rural work and risk factors associated with pesticide use in Minas Gerais, Brazil. **Caderno da Saúde Pública**, v.19, p. 1117-1127, 2003.

STIBOROVA, M; ANZENBACHER, P. What are the principal enzymes oxidizing the xenobióticos in plants: cytochromes P-450 or peroxidases? (a hypothesis). **General Physiology and Biophysics**, v.45, p.209-216, 1991.

SULTATOS, L.G. Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.43, p. 271-289, 1994.

SWIERENGA, S.H.H.; HEDDLE, J.A.; SIGAL, E.A.; GILMAN, J.P.W.; BRILLINGER, R.L.; DOUGLAS, G.R.; NESTMANN, E.R. Recommended protocols base on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories. IV.

Chromosome aberrations and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v.246, p.301-322, 1991.

THOMPSON, C.W.; FRICK, J.A.; NATKE, B.C.; HANSEN, L.K. Preparation, analysis and anticholinesterase properties of O,O-dimethyl phosphorothioate isomerides. **Chemical Research in Toxicology**, v.2, p.386-391, 1989.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A.M.; SMITH, M.T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: A study of malathion-exposed workers. **Mutation Research**, v. 388, p.85-95, 1997.

TURGUT, C. The impact of pesticides toward parrot feather when applied at the predicted environmental concentration. **Chemosphere**, v. 66, p. 469–473, 2007.

VIG, B.K. Somatic mosaicism in plants with special reference to somatic crossing over. *Environ. Health Perspectives*, v.27, p.45-50, 1978.

WEBSTER, L.; MCKENZIE, G.H.; MORIARTY, H.T. Organophosphate-based pesticides and genetic damage implicated in bladder cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**. v. 133, p. 112-117, 2002.

WEISS, B.; AMLER, S.; AMLER, R.W. Pesticides. **Pediatrics**, v.113, p. 1030-1036, 2004.

WIADERKIEWICZ, R.; WALTER, Z.; REIMSCHUSSEL, W. Sites of methylation of DNA bases by the action of organophosphorus insecticides *in vitro*. **Acta Biochimica Polonica**, p. 73-85, 1986.

WOO, Y-T; LAI, D.Y.; FERGUSON, M.F.; ARCOS, J.C. Carcinogenicity of organophosphorus compounds: an analysis of their structure-activity relationship.

**Environment Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, v.16, p.1-42, 1996.

YAMAMOTO, I.K.; KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mutation Research**, v. 71, p.127-131, 1980.

ZHU, C.; MILLS, K.D.; FERGUSON, D.O.; LEE, C.; MANIS, J.; FLEMING, J.; GAO, Y.; MORTON, C.C.; ALT, F.W. Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. **Cell**, v.109, p. 811-821, 2002.

**Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de baixas  
concentrações do inseticida malation em células HTC**

**Jaqueline Bianchi<sup>1</sup>, Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Av. 24-A, 1515, CP 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

## RESUMO

A análise dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de baixas concentrações de substâncias químicas lançadas no meio ambiente é de extrema importância, uma vez que, por se tratar concentrações muito pequenas, os cuidados quanto ao manuseio e descarte do produto são muitas vezes negligenciados. Neste trabalho foram realizados o teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese e o ensaio do cometa para avaliar os possíveis danos genéticos causados em células de mamíferos expostas a três diferentes concentrações do inseticida malation comercial: 54 µg/mL, 5,4 µg/mL e 0,54 µg/mL. Células de hepatoma de HTC de *R. norvegicus* (linhagem HTC) foram mantidas em meio de cultura DMEM/F-12 e tratadas com benz[a]opireno a 20 µg/mL (controle positivo) e com as três diferentes concentrações de malation, por 24 horas. Pelo ensaio do cometa foi observada uma sensibilidade das células ao químico testado, indicando efeito genotóxico para as três concentrações e para o controle positivo. Apesar de genotóxicas, as concentrações testadas não se mostraram mutagênicas pela aplicação do teste do micronúcleo. Somente o controle positivo mostrou-se diferente estatisticamente do controle negativo para este teste. O potencial genotóxico de um agente é o primeiro fator indicativo de que, pela sua ação, em longo prazo, este pode induzir carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva. Pelos resultados observados, nos quais as concentrações testadas de malation foram capazes de induzir dano no DNA nas células estudadas, podemos sugerir a necessidade de mais estudos sobre os efeitos que as baixas concentrações de agroquímicos podem induzir em organismos expostos à sua ação.

**Palavras-chave:** micronúcleo, ensaio do cometa, malation, agrotóxico, células HTC, genotoxicidade, mutagenicidade.

## 1.INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior consumidor individual de agrotóxicos no mundo. Somente em 2001, foram consumidos no país 328.413 toneladas de agrotóxicos (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2004). Como consequência do grande consumo, cerca de 150.000 toneladas de agrotóxicos são lançados no ambiente anualmente (CRESTANA, 2000). Na região sudeste do país (que compreende os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo), o consumo destes químicos está estimado, de acordo com a revisão de Meyer et al. (2002), em 52 Kg de agrotóxico/trabalhador/ano. Assim, calcula-se que dois terços da população do Brasil estão expostos, em diferentes níveis, aos efeitos nocivos destes agentes químicos, seja em função do consumo de alimentos contaminados, do uso de agrotóxicos para o combate de vetores de doenças infecto-contagiosas ou pela exposição ocupacional (PERES et al., 2005).

Os agrotóxicos, de maneira geral, são considerados químicos potencialmente mutagênicos pela capacidade de seus ingredientes em induzirem mutação gênica, alterações cromossômicas ou danos no DNA. Apesar de muito utilizados pela sua eficiência tóxica e por ter ação sobre certos organismos específicos, esta especificidade não é absoluta e muitos agrotóxicos acabam atingindo também os seres humanos (BOLOGNESI e MORASSO, 2000).

Os agrotóxicos da classe dos organoclorados apresentam propriedades tóxicas e altamente persistentes, o que constitui uma ameaça à saúde humana. Por esta razão, estes agrotóxicos tiveram seu uso proibido na maioria dos países e, hoje, os organofosforados estão sendo amplamente utilizados como substitutos dos

organoclorados, principalmente pela sua maior degradabilidade no ambiente (DRISS et al., 1993).

Os organofosforados exercem sua ação, principalmente, pela inibição da enzima acetilcolinesterase, o que determina a sua toxicidade. Dentre as enzimas, as esterases, mais especificamente a acetilcolinesterase, são o principal alvo da toxicidade. A inibição da acetilcolinesterase leva ao acúmulo de acetilcolina nas terminações nervosas, já que esta enzima realiza a hidrólise da acetilcolina, produzindo a colina e o ácido acético (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). Os organofosforados podem também ter outras propriedades independentes dos seus efeitos anticolinesterásicos, como mutagenicidade e carcinogenicidade, bem como toxicidade em órgãos específicos como coração, fígado, rins e outros (CONCON, 1988).

O homem pode entrar em contato com os agrotóxicos, geralmente em pequenas quantidades (FAN e JACKSON, 1989), tanto por meio da água e comida que ingere (FENSKE, 1997), como também pelo ar e poeira que adentram e circundam suas residências. Pesquisas mostram que esta exposição, chamada de “paraocupacional”, pode ser mais substancial e ocorrer mais frequentemente do que a exposição ocupacional (HOPPIN et al., 2006).

Segundo Singh e Sharma (2000) e Salvi et al. (2003), há evidências de que efeitos adversos dos organofosforados podem ser causados por concentrações que se encontram abaixo daquela seguramente indicada para a inibição da colinesterase. Algumas evidências têm sugerido que baixas doses de algumas substâncias químicas podem ser mais genotóxicas do que altas doses e, dessa forma, a extrapolação de altas para baixas doses pode ser enganosa (AU et al., 1990).

O organofosforado malation ( $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ ) é um inseticida não-sistêmico, altamente tóxico, de classificação toxicológica II ou III (ANVISA, 1985), que atua no controle de insetos sugadores, mastigadores e vetores de doenças.

O malation é amplamente utilizado na agricultura para controle de pragas e nas residências para eliminar insetos indesejáveis. Seu grande uso é devido a sua baixa toxicidade para mamíferos e alta seletividade para insetos, quando comparado com outros organofosforados. Sua seletividade deve-se, primeiramente, ao fato de os mamíferos possuírem altos níveis de carboxiesterases, enzimas que hidrolizam o malation e seus metabólitos a intermediários não tóxicos, que podem ser facilmente eliminados pelas células. Os insetos possuem pouca ou nenhuma destas esterases, sendo, portanto, severamente afetados pelo malation (THOMPSON et al., 1989).

No entanto, efeitos adversos observados por Giri et al. (2002), em mamíferos expostos ao malation, mostraram que este inseticida é mutagênico e pode causar aberrações cromossômicas, quebras cromossômicas e micronúcleos.

Segundo o Ministério da Saúde (2003), a absorção do malation ocorre pela pele, pelo trato respiratório e pelo trato gastrointestinal e, muitas vezes, é favorecida pelos solventes presentes na sua formulação. Nas exposições que ocorrem durante os processos industriais de fabricação, na formulação, na aplicação agropecuária ou no controle de vetores em saúde pública, as principais vias de exposição são a respiratória e a cutânea. Depois de absorvidos, os organofosforados e seus produtos de biotransformação são rapidamente distribuídos por todos os tecidos, não existindo evidências de bioacumulação.

A análise dos efeitos genotóxicos de baixas concentrações de substâncias químicas lançadas no meio ambiente é de extrema importância, uma vez que, por se

tratar de concentrações bastante pequenas, muitas vezes não são tomados os devidos cuidados, tanto no manuseio quanto no descarte do produto.

Este trabalho teve por objetivos analisar os efeitos genotóxicos e mutagênicos de baixas concentrações do inseticida malation, por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese em linhagem de células de hepatoma de rato (HTC), após 24 horas de tratamento.

## **2.MATERIAL E MÉTODO**

### *2.1 Linhagem celular*

Para a realização deste estudo, *Hepatoma tissue culture* (HTC), células metabolizadoras derivadas de *Rattus norvegicus*, foram adquiridas do Banco Celular do Rio de Janeiro-RJ, Brasil. Estas células cresceram em monocamadas em meio DMEM/F-12 (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco) e foram mantidas em frascos de cultura, descartáveis, de 25 cm<sup>2</sup>, em estufa BOD a 37°C. Sob tais condições, o ciclo celular destas células é de, aproximadamente, 24 horas.

### *2.2 Químicos*

Os químicos utilizados neste trabalho foram benzo[a]pireno (SIGMA, CAS No 50-32-8 - um hidrocarboneto policíclico aromático potencialmente carcinogênico), na concentração de 20 µg/mL, utilizado como agente indutor de danos no DNA, tanto no teste do micronúcleo como no ensaio do cometa e o inseticida malation comercial (grau de pureza 50%, CAS No. 121-75-5) nas concentrações de 54 µg/mL; 5,4 µg/mL e 0,54 µg/mL, preparadas no momento da utilização. As concentrações do inseticida, escolhidas para serem testadas neste trabalho, foram estabelecidas a partir de testes

anteriores. Nestes testes, foram utilizadas as concentrações de 1,5; 0,75; 0,37 e 0,18 mg/mL, sendo que a concentração de 1,5 mg/mL corresponde à menor concentração de campo do produto ativo recomendada para uso pelo fabricante. Todas estas concentrações testadas foram citotóxicas para as células HTC, constatado pelo teste de viabilidade celular com Azul de Trypan após 24 horas de tratamento. Neste teste, os valores de viabilidade abaixo de 80% são considerados inadequados para o desenvolvimento do teste.

Assim, a partir da menor concentração testada (0,18 mg/mL) foi realizada uma concentração 3,3 vezes menor (54 µg/mL) e, a partir desta, diluições que resultaram em concentrações finais de 10 a 100 vezes menores (5,4 e 0,54 µg/mL).

### *2.3 Teste do Micronúcleo com bloqueio de citocinese*

Para a realização do teste do micronúcleo, as células foram cultivadas por um ciclo celular completo, antes da adição dos tratamentos. Em seguida, tratamentos simultâneos por 24 horas foram realizados com as seguintes substâncias: a) Benzo[a]pireno (20 µg/mL) como controle positivo, b) malation (54 µg/mL; 5,4 µg/mL e 0,54 µg/mL), c) meio de cultura completo como controle negativo. Após os tratamentos, as células foram lavadas duas vezes com PBS e adicionados 5 mL de meio de cultura completo com 3 µg/mL de citocalasina B (Sigma), onde permaneceram por 26 horas.

Para a colheita das células, o meio de cultura foi transferido para um tubo de centrífuga e reservado. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e tripsinizadas com 500 µL de Tripsina-EDTA (0,025%) por, no máximo, 2 minutos. A neutralização da tripsina foi feita com o meio de cultura reservado. A

suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos a 1000 r.p.m. e o sobrenadante resultante foi descartado, reservando-se apenas 1,5 mL ao qual foi adicionado 1,5 mL de citrato de sódio (1%) e uma gota de formaldeído 40%. O *pellet* foi ressuspensionado e centrifugado novamente sob as mesmas condições anteriormente descritas. O sobrenadante foi descartado e 5 mL de metanol-ácido acético (3:1) foi adicionado para fixar as células. O *pellet* foi novamente ressuspensionado, centrifugado e o sobrenadante descartado. O novo *pellet* foi ressuspensionado com 0,5 mL de fixador recém preparado, e guardado para confecção das lâminas.

Antes da confecção das lâminas para análise, elas foram lavadas e mantidas em água destilada a 4°C. Em seguida, a suspensão celular foi gotejada sobre lâminas contendo um filme de água e, após serem secas em temperatura ambiente, foram coradas com Giemsa 5%, em tampão fosfato, por 10 minutos. Três repetições foram realizadas para cada tratamento.

Foram contadas as células binucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração. Os micronúcleos considerados nas análises foram os que apresentaram tamanhos menores do que 1/3 do tamanho dos núcleos principais e o mesmo padrão de coloração destes, além da ausência de refringência.

Foram analisadas 1000 células de cada repetição, num total de 3000 células por tratamento. A análise de significância dos resultados foi feita pelo teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

#### 2.4 Ensaio do Cometa

Após serem cultivadas por 24 horas (um ciclo celular completo) em meio de cultura completo, as células das três repetições de cada tratamento, foram tratadas por 24 horas com as mesmas substâncias utilizadas para o teste do micronúcleo, como descritas anteriormente. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e tripsinizadas com 0,5 mL de tripsina-EDTA 0,025%, por no máximo, 2 minutos. Decorrido este tempo, o processo foi interrompido pela adição de 5 mL de meio de cultura completo. As células foram então centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, reservando-se apenas 0,5 mL da solução, onde o *pellet* foi ressuspendido.

Para o prosseguimento do ensaio do cometa, foram realizados testes de viabilidade celular para todos os tratamentos. Para isto, 20  $\mu$ L de suspensão celular de cada tratamento foram misturados com 20  $\mu$ L de Azul de Trypan 0,4% (GIBCO) e transferidos para câmara de Neubauer. Foram contabilizadas as quantidades de células viáveis (brancas) e inviáveis (coradas em azul), presentes nos quatro quadrantes da câmara. Os índices de viabilidade celular foram obtidos, considerando-se as porcentagens de células viáveis do total de células analisadas.

Para a eletroforese, uma alíquota de 20  $\mu$ L de suspensão celular foi misturada com 120  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (37°C) em uma concentração de 0,5% e rapidamente pingada sobre lâminas secas, previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (60°C), diluição 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínula e levadas à geladeira a uma temperatura de 4°C, por 20 minutos. Após remoção cuidadosa das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise gelada recém preparada, contendo 89 mL de solução de lise estoque (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM

de Tris com pH ajustado para 10, com auxílio de 8 g de NaOH, 890 mL de água destilada e 1% de lauril sarcosinato de sódio), mais 1 mL de triton X-100 e 10 mL de DMSO, onde permaneceram por 1 hora em geladeira a 4°C.

As lâminas foram posteriormente transferidas para uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (pH>13) recém preparado (300 mM de NaOH/1 mM de EDTA, preparado de uma solução estoque contendo NaOH 10N e 200 mM de EDTA pH 10), onde permaneceram por 20 minutos antes da eletroforese, para desnaturação do DNA. A corrida de eletroforese foi realizada a 4°C, por 20 minutos a uma corrente de 25 V e 300 mA. Seguindo-se a corrida, as lâminas foram submersas em solução de neutralização (0,4 M tris-HCl, pH 7,5) em três séries de 5 minutos cada, secas a temperatura ambiente e fixadas com etanol, por 10 minutos.

Após fixação e secagem, as lâminas foram coradas com 30 µL de solução de brometo de etídio 1X, obtida de uma solução estoque 10X (200 µg/mL), e cobertas com lamínula. O material foi imediatamente analisado em microscópio de fluorescência, com filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm, em aumento de 400X.

A dimensão dos danos indicados pelo teste do cometa foi avaliada pela análise de 100 nucleóides por repetição, não sobrepostos e escolhidos aleatoriamente, totalizando 300 nucleóides por tratamento. De acordo com o tamanho das caudas, os nucleóides foram classificados em quatro classes, segundo a classificação de Kobayashi et al., (1995) em: classe 0 - ausência de danos visíveis no DNA; classe 1- dano pequeno; classe 2 - dano médio; classe 3 - dano grande.

Os escores para os nucleóides analisados foram obtidos por meio da multiplicação do número de células encontradas em cada classe pelo número da classe

correspondente, com valores variando de 0 (ausência total de danos) a 300 (dano máximo causado). Os resultados obtidos para todos os tratamentos foram analisados, estatisticamente, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Teste do Micronúcleo com bloqueio de citocinese

Pelas nossas análises, pudemos observar que apenas o controle positivo foi mutagênico para as células analisadas, confirmando a eficiência do teste do micronúcleo em células HTC. As três concentrações testadas apresentaram baixas frequências de micronúcleos e não foi possível o estabelecimento de uma relação dose-resposta entre elas, uma vez que a frequência de células micronucleadas foi, praticamente, a mesma para todas as concentrações testadas do inseticida (TABELA 1). Foi observado que a maioria dos MN encontrada em nossas análises, possuía tamanhos relativamente pequenos, em relação ao tamanho do núcleo principal das células (FIGURAS 1A e 1B).

**Tabela 1:** Frequência, valores máximos e mínimos, média e desvio padrão de micronúcleos (MN), nos ensaios com as três concentrações do inseticida malation em células HTC, após exposição por 24 horas.

Tratamentos	Concentrações	Frequência MN (MN/3000 células)	Média $\pm$ SD
Controle	-	0,4	4 $\pm$ 1
Benzo[a]pireno	20 $\mu\text{g/mL}$	1,43	14,3 $\pm$ 1,53*
malation	54 $\mu\text{g/mL}$	0,73	7,3 $\pm$ 2,87
	5,4 $\mu\text{g/mL}$	0,77	7,7 $\pm$ 3,21
	0,54 $\mu\text{g/mL}$	0,57	5,7 $\pm$ 2,31

\* Estatisticamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

### 3.2 Ensaio do Cometa

#### 3.2.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi calculada, após a análise das células presentes nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer, pelo método da coloração exclusiva com Azul de Trypan, que cora em azul as células inviáveis. Pelo teste, foram obtidos resultados que variaram de 80 a 97% de células vivas (TABELA 2), indicando que o malation, nas concentrações testadas, não foi citotóxico, permitindo a realização do ensaio sem interferência de falsos resultados, que poderiam induzir a interpretação equivocada da ação genotóxica do inseticida.

**Tabela 2:** Viabilidade das células HTC após exposição, por 24 horas, a baixas concentrações do inseticida malation.

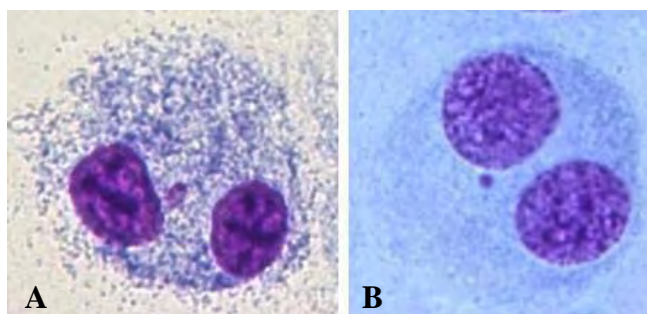
<b>Tratamentos</b>	<b>Células viáveis (brancas)</b>	<b>Células inviáveis (azuis)</b>	<b>Viabilidade celular (%)</b>
<b>Controle negativo</b>	891	50	94,70
	1450	74	95,14
	1176	39	96,80
<b>54 µg/mL</b>	1090	46	95,95
	1190	68	94,60
	1388	42	97,06
<b>5,4 µg/mL</b>	1523	42	97,31
	1510	72	95,45
	1136	71	94,12
<b>0,54 µg/mL</b>	1554	109	93,45
	1192	69	94,53
	1411	84	94,38
<b>Benzo[a]pireno</b>	603	132	82,04
	1368	332	80,47
	1496	359	80,64

#### 3.2.2 Genotoxicidade

De acordo com a dimensão dos danos sofridos pelo DNA, evidenciada pelos escores (tabela 3), verificou-se genotoxicidade para as três concentrações estudadas de

malation e para o controle positivo realizado com benzo[a]pireno. Foi observado também que os valores médios dos escores indicaram um efeito genotóxico inversamente proporcional às concentrações testadas: 54  $\mu\text{g/mL}$  (16,7), 5,4  $\mu\text{g/mL}$  (24) e 0,54  $\mu\text{g/mL}$  (38).

Embora o total de danos e escores verificados tenham sido maiores para as menores concentrações, foi observado que na genotoxicidade das duas maiores concentrações (54 e 5,4  $\mu\text{g/mL}$  de malation), ocorria presença significativa de danos de classe 2 e na concentração de 0,54  $\mu\text{g/mL}$ , a presença significativa de danos de classe 1,



**Figura 1: A e B)** Células HTC binucleadas com micronúcleo induzido pelo malation, após exposição por 24 horas.



**Figura 2:** Classes do cometa encontradas com maior frequência nas células HTC, após sua exposição ao inseticida malation, por 24 horas. **A)** classe 0 – ausência de dano visível; **B)** classe 1 – dano pequeno; **C)** classe 2 – dano médio.

sugerindo que o nível de agressão ao DNA das células parece aumentar com o aumento das concentrações de malation (FIGURAS 2B e 2C).

Algumas células em processo de morte celular, caracterizadas pela presença de mais de 90% de DNA nuclear dispostos na cauda (RIBEIRO et al., 2003), embora presentes, não se apresentaram em quantidades significativas.

**Tabela 3:** Escore das classes dos nucleóides observados para os testes com células HTC, submetidas a três concentrações do inseticida malation, após exposição por 24 horas, num total de 300 nucleóides analisados.

Tratamentos	Total <sup>a</sup>	Classes				Morte celular	Escore
		0	1	2	3		
<b>Controle</b>	2	98	2	0	0	0	2
	10	90	10	0	0	0	10
	1	97	1	0	0	2	1
Média±SD	4,3±4,9	95±4,3	4,3±4,9	0	0	0,7±1,1	4,3±4,9
<b>Benzo[a]pireno</b>	93	0	3	5	85	7	268
	98	0	10	37	51	2	237
	98	1	22	62	14	1	188
Média±SD	96*±2,8	0,3*±0,6	11,6±9,6	34,7*±28,5	50*±35,5	3,3±3,02	231*±40,3
<b>54 µg/mL</b>	10	90	8	2	0	0	12
	10	88	8	2	0	2	12
	21	78	16	5	0	1	26
Média±SD	13,7±6,3	85,3±6,4	10,7±4,6	3*±1,7	0	1±1	16,7*±8,1
<b>5,4 µg/mL</b>	22	77	18	4	0	1	26
	9	90	7	2	0	1	11
	26	71	20	3	3	3	35
Média±SD	19±8,8	79,3±9,7	15±7	3*±1	1±1,7	1,7±1,1	24*±12,1
<b>0,54 µg/mL</b>	20	80	18	1	1	0	23
	21	79	21	0	0	0	21
	43	56	23	13	7	1	70
Média±SD	28*±13	71,7*±13,6	20,7*±2,5	4,7±7,2	2,7±3,8	0,3±0,6	38*±27,7

<sup>a</sup> Número total de células com danos (classes 1+2+3)

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

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Com o aumento da introdução de produtos químicos lançados no ambiente, há uma preocupação cada vez maior com os impactos que estas substâncias possam causar

ao homem e ao meio ambiente (AU e RIBEIRO, 2003). Muitos destes compostos são genotóxicos e induzem instabilidades cromossômicas, contribuindo para o desenvolvimento de processos celulares malignos (ROWLEY, 1984).

Dentre os compostos químicos bastante utilizados pelos homens e encontrado com frequência no meio ambiente, estão os agrotóxicos. De modo geral, estes químicos apresentam potencialidade mutagênica pela capacidade de induzirem mutação gênica, alterações cromossômicas ou danos no DNA (BOLOGNESI e MERLO, 1989) e, portanto, representam um risco em potencial para todos os organismos expostos (GARCIA, 2001).

Para a detecção de compostos genotóxicos e mutagênicos, o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo são os mais frequentemente utilizados (HARTMANN et al., 2001).

Neste estudo, foram realizados testes *in vitro*, com hepatomas de rato, para avaliar os potenciais genotóxico e mutagênico de baixas concentrações do inseticida malation. Por meio do ensaio do cometa, verificamos genotoxicidade para as três concentrações testadas e para o controle positivo. No teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese, foram observados resultados significativos apenas para o controle positivo.

A partir dos resultados obtidos nestes, ensaios podemos concluir que os danos no material genético, observados nas células HTC após a exposição ao malation, provavelmente foram reparados pelas células e assim não resultaram em mutagenicidade. Segundo Ribeiro et al. (2003), o ensaio do cometa é uma técnica que permite detectar lesões no DNA causadas por agentes genotóxicos. Estas lesões (quebras de fita simples, quebras de fitas duplas e sítios álcali-lábeis) são passíveis de

correção e, desta forma, após serem processadas, podem ser reparadas ou resultarem em mutação.

Apesar de o teste do micronúcleo, realizado com células HTC expostas ao malation, não apresentar resultados significativos, quando comparados com o controle negativo, observamos que os micronúcleos presentes nas células submetidas às três concentrações foram, em sua maioria, de tamanhos relativamente pequenos, diferente do observado para as células do teste controle. Estes dados sugerem, segundo estudos de Yamamoto e Kikuchi (1980), que estes micronúcleos (FIGURA 1) podem ter se originado de uma possível ação clastogênica do malation. Nossos resultados corroboram os dados de Titenko-Holland et al. (1997) onde os autores verificaram que a formação da maioria dos micronúcleos em cultura de linfócitos humanos, após exposição ao malation em concentrações variando entre 20 e 100 µg/mL, se deu por fragmentos desprovidos de cinetócoro, confirmando a ação clastogênica deste inseticida.

Embora os estudos de Titenko-Holland et al. (1997) suportem nossa sugestão anterior de que o malation possa apresentar propriedades clastogênicas, os autores citados encontraram índices significativos de micronúcleo nas células expostas ao malation, diferentemente do encontrado em nossos trabalhos. Estas diferenças quanto à significância na indução de micronúcleo em células *in vitro*, podem estar relacionadas tanto ao tipo celular, quanto ao tempo de exposição e às concentrações testadas. Titenko-Holland et al. (1997) cultivaram linfócitos humanos, que foram isolados do sangue total de pessoas saudáveis, e expuseram tais células ao malation comercial, por um período de 72 horas, ou seja, dois dias a mais de exposição, comparado aos nossos experimentos. Além disso, duas das três concentrações testadas no presente trabalho foram menores do que a menor concentração testada pelo grupo de Titenko-Holland.

A importância dos resultados positivos para genotoxicidade, obtidos neste trabalho, por meio do ensaio do cometa, deve-se ao fato de que as lesões detectadas por este ensaio são lesões primárias, ou seja, lesões que são o ponto de partida para o desenvolvimento de danos genéticos maiores, muitas vezes herdáveis. As lesões no DNA, evidenciados pelo teste do cometa, que levam à efeitos prejudiciais ao organismo, não incluem somente as quebras na fita do DNA, que são relevantes para a formação de aberrações cromossômicas, mas também modificações no DNA como a formação de sítios abásicos, que são relevantes na indução de mutações gênicas (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005). Danos cromossômicos ou no DNA demonstram uma forte correlação com eventos de mutagênese e carcinogênese (FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

De maneira geral os tamanhos das caudas do cometa, apresentados pelas células após exposição ao malation, nos indicaram que os danos causados pelas concentrações estudadas, foram, em sua maioria, pequenos e médios, conforme apresentado nas figuras 2B e 2C. Esta indicação, no entanto, não exclui seu potencial genotóxico. Segundo Bolognesi e Morasso (2000), o potencial genotóxico é o primeiro fator que leva ao aparecimento de efeitos, em longo prazo, como a carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva, e, portanto, os cuidados na utilização, manuseio e descarte do inseticida malation devem ser levados em consideração.

Estudos *in vitro*, realizados por Blasiak et al. (1999), com linfócitos de sangue periférico humano expostos ao malation, ao malaaxon e ao isomalation puros, indicaram que o ensaio do cometa foi uma técnica altamente sensível para análise de danos no DNA induzidos por compostos organofosforados. Os autores verificaram que tanto o malaaxon quanto o isomalation induziram danos no DNA em concentrações

baixas, que variaram de 8 a 66 µg/mL, enquanto que nos testes com malation puro, não foram observados efeitos genotóxicos.

Impurezas como o isomalation e vários ésteres de trimetilfosforotioatos, estão presentes no malation de formulação comercial ou são formados durante a estocagem do produto (PELLEGRINI e SANTI, 1972), por isomerização térmica ou fotoquímica (BLASIAK et al. 1999).

A toxicidade do malation depende da sua bioativação em malaaxon (THOMPSON et al., 1989; SULTATOS, 1994). No organismo, o malaaxon é resultado da bioativação do malation pelas enzimas do citocromo P450 (BURATTI et al., 2005). Assim, o uso de células HTC, que possuem tanto as enzimas de fase I como as de fase II do processo de metabolização de drogas (OLIVEIRA et al., 2006), são importantes para a avaliação dos efeitos deste inseticida.

O isomalation, quando presente, pode potencializar a toxicidade induzida pelo malation em até 10 vezes (PELLEGRINI e SANTI, 1972; ALDRIDGE et al., 1979), incluindo lesões no DNA (FLESSEL et al. 1993; BLASIAK et al., 1999). Esta potencialização ocorre devido à inibição da atividade das carboxilesterases do fígado pelo isomalation (ALDRIDGE et al., 1979; TALCOT et al., 1979 a,b). As carboxiesterases de mamíferos são responsáveis pela rápida degradação do malation em compostos não tóxicos (KUTZ et al., 1992; USEPA, 2000). No entanto, esta reação compete por aquela catalisada pelo citocromo P450, que leva à formação do malaaxon. Sendo assim, na presença de isomalation, a via de metabolização do malation passa a ser a de bioativação pelo citocromo P450, resultando em um aumento na produção de malaaxon (BURATTI et al., 2005).

O mecanismo de interferência da maioria dos compostos genotóxicos e carcinógenos ocorre pelas suas características eletrofílicas ou pela ativação do composto a intermediários eletrofílicos que se ligam, covalentemente, as macromoléculas (SEARLE, 1984). Segundo Woo et al. (1996), compostos organofosforados, como o malation e seus análogos, apresentam dois sítios eletrofílicos potenciais: grupos alquil e um grupo fosforil. Estudos *in vitro* realizados por Imamura e Talcott (1985), mostraram que o malation (98% puro) e muitas de suas impurezas alquilaram um substrato sintético, a 4-(p-nitrobenzil)pirimidina, sugerindo que este inseticida atue como um forte agente alquilante. Em estudos posteriores, Wiaderkiewicz et al. (1986) demonstraram que o Malatiom produziu metilação em bases de DNA, *in vitro*, produzindo 7-metilguanina.

Os danos promovidos no material genético das células HTC, verificados pelos fragmentos de DNA presentes nos nucleóides analisados, após exposição ao malation, reforçam as citações de Webster et al. (2002) de que o produto estudado apresenta uma característica clastogênica comum dos agrotóxicos organofosforados. Estudos realizados por Sbrana e Musio (1995) revelaram que os organofosforados induzem sítios frágeis no DNA, onde as quebras subseqüentes parecem ser significativos nos processos de carcinogênese de muitos cânceres.

A partir deste estudo, foi possível verificar uma maior sensibilidade do ensaio do cometa em detectar baixos níveis de danos no DNA, causados por pequenas concentrações de malation, em cultura de células, do que o teste do micronúcleo. Além disso, podemos concluir que, mesmo baixas concentrações do inseticida testado foram capazes de induzir algum tipo de dano genético em organismos expostos, reforçando a

importância de estudos com químicos ambientais em pequenas concentrações, para alertar a população sobre os perigos potenciais dos químicos a que se expõem.

## 5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo financiamento da pesquisa, ao Laboratório de Genética Toxicológica e Mutagênese da Universidade Estadual de Londrina e ao Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRIDGE, W.N., MILES, J.W.; MOUNT, D.L.; VERSCHOYLE, R.D. The toxicological properties of impurities in malathion. **Archives of Toxicology**, v.42, p.95-106, 1979.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. Portaria nº 10/snvs de 08 de Março de 1985. DOU 14/03/85. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/10\\_85.htm#](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/10_85.htm#)>. Acesso em 29 jul.2005.

AU, W.W.; CANTELLI-FORTI, G.; HRELIA, P.; LEGATOR, M.S. Cytogenetic assays in genotoxic studies; somatic cell effects of benzene and germinal cell effects of dibromochloropropane. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v.10, p.125-134, 1990.

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

BLASIAK, J.; PAWEL, J.; TRZECIAK, A.; SZYFTER, K. *In vitro* studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. **Mutation Research**, v.445, p.275-283, 1999.

BOLOGNESI, C.; MERLO, F. Biomonitoring of human populations exposed to pesticides. In: CHEREMINISOFF, P.N. (Org.) **Encyclopedia of Environmental Control Technology**. Gulf Publishing Company, v. 8. cap. 28, 1989, p. 673-737.

BOLOGNESI, C.; MORASSO, G. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. **Trends in Food Science and Technology**. v.11, p. 182-187, 2000.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S; SPEIT, G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 245-254, 2005.

BURATTI, F.M.; D'ANIELLO, A.; VOLPE, M.T.; MENEGUZ, A.; TESTAI, E. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome P450 isoforms. **Drug Metabolism and Disposition**, v.33. n. 3, p. 295-302, 2005.

CONCON, J.M. In: CONCON, J.M. (Org.). **Food Toxicology**, New York, 1988, 1133p.

CRESTANA, S. Harmonia e Respeito entre Homens e Natureza: Uma Questão de Vida – A Contribuição da Agricultura. In: CASTELLANO, E.G.; CHAIDHRY, F.H. (Orgs.) **Desenvolvimento Sustentado: Problemas e Estratégias**. EESC-USP, São Carlos, São Paulo, 2000, p. 169-180.

DRISS, M.R.; HENNION, M.C.; BOUGUERRACA, M.L. Determination of carbaryl and some organophosphorus pesticides in drinking water using on-line liquid chromatographic preconcentration techniques. **Journal of Chromatography**, v. 639, n. 2, p.352-358, 1993.

FAN, A.M.; JACKSON, R.J. Pesticides and food safety. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 9, p. 158-174, 1989.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>>. Acesso em 15 jul. 2004.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v.61, p. 759-767, 1990.

FENSKE, R.A. Pesticide exposure assessment of workers and their families. **State of the Arts Reviews Occupational Medicine**, v. 12, p.221-237, 1997.

FLESSEL, P.; QUINTANA, P.J.E.; HOOPER, K. Genetic toxicity of malathion: a review. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 22, p. 7-17, 1993.

GARCIA, E.G. **Segurança e saúde no trabalho rural**: a questão dos agrotóxicos. São Paulo: Fundacentro-Ministério do Trabalho e Emprego; 2001.

GIRI S.; PRASAD S.B.; GIRI, A.; SHARMA, G.D. Genotoxic effects of malation: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays *in vivo*. **Mutation Research**, v. 15, n.1-2, p. 223-231, 2002.

HARTMANN, A.; HELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, F.; MARINS, H.; FJALLMAN, A.; FRIEAU, W.; SUTER, W. Use of alkaline comet assay for the industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, p. 843-858, 2001.

HOPPIN, J.A.; ADGATE, J.L.; EBERHART, M.; NISHIOKA, M.; RYAN, P.B. Environmental exposure assessment of pesticides in farmworker homes. **Environmental Health Perspectives**, v.114, n. 6, p.929-935, 2006.

IMAMURA, T.; TALCOTT, R. Mutagenic and alkylating properties of organophosphorus impurities of commercial malathion. **Mutation Research**, v.155, p. 1-6, 1985.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computadorized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Communication**, v.3, p.103-115, 1995.

KUTZ, F.; COOK, B.T.; CARTER-POKRAS, O.D.; BRODY, D.; MURPHY, R.S. Selected pesticide residues and metabolites in urine from a survey of the US general population. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.37, p. 277-291, 1992.

MEYER, A.; CHRISMAN, J.; MOREIRA, J.C.; KOIFMAN, S. **Cancer Mortality Among Agricultural Workers from Rio de Janeiro, Brazil**. Rio de Janeiro: CESTH/ENSP/FIOCRUZ (mimeo), s.n., 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório de Assessoria Técnica concedida à Coordenação Regional da Bahia (CORE-BA) no Município de Feira de Santana – BA/2003.

OLIVEIRA, R.J.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, A. F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of  $\beta$ -glucan from barley, in CHO-K1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, v.20, p. 1225-1233, 2006.

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

PELLEGRINI, G; SANTI, R. Potentiation of toxicity of organophosphorus compound containing carboxylic ester functions toward warm-blooded animals by some organophosphorus impurities. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.20, p. 944-950, 1972.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Rio Grande do Sul: Ulbra, 2003, 356p.

ROWLEY, J.D. Biological implications of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma. **Cancer Research**, vol. 44, p.3159-3161, 1984.

SALVI, R.M.; LARA, D.R.; GHISOLFI, E.S.; PORTELA, L.V.; DIAS, R.D.; SOUZA, D.O. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. **Toxicological Sciences**, v. 72, p. 267-271, 2003.

SBRANA, I.; MUSIO, A. Enhanced expression of common fragile sites with occupational exposure to pesticides. **Cancer Genetics and Cytogenetics**. v.82, p.123-127, 1995.

SEARLE, C.E. Chemical carcinogenesis. **American Chemical Society Monographs**. 1984, 182 p.

SINGH, S.; SHARMA, N. Neurological syndromes following organophosphate poisoning. **Neurology**, v. 48, p. 308-313, 2000.

SULTATOS, L.G. Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.43, p. 271-289, 1994.

TALCOTT, R.E.; DENK, H.; MALLIPUDI, N.M. Malathion carboxylesterase activity in human liver and its inactivation by isomalathion. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.49, p.373-376, 1979 a.

TALCOTT, R.E.; MALLIPUDI, N.M.; UMETSU, N.M.; FUKUTU, T.R. Inactivation of esterases by impurities isolated from technical malathion. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.49, p. 107-112, 1979 b.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A.M.; SMITH, M.T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: A study of malathion-exposed workers. **Mutation Research**, v. 388, p.85-95, 1997.

THOMPSON, C.W.; FRICK, J.A.; NATKE, B.C.; HANSEN, L.K. Preparation, analysis and anticholinesterase properties of O,O-dimethyl phosphorothioate isomerides. **Chemical Research in Toxicology**, v.2, p.386-391, 1989.

USEPA – U.S. Environmental Protection Agency. Malathion. Office of prevention, pesticides and toxic substances. **Environmental Protection Agency**, Washington, DC. 2000.

WIADERKIEWICZ, R.; WALTER, Z.; REIMSCHUSSEL, W. Sites of methylation of DNA bases by the action of organophosphorus insecticides *in vitro*. **Acta Biochimica Polonica**, p. 73-85, 1986.

WEBSTER, L.; MCKENZIE, G.H.; MORIARTY, H.T. Organophosphate-based pesticides and genetic damage implicated in bladder cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**. v. 133, p. 112-117, 2002.

WOO, Y-T; LAI, D.Y.; FERGUSSON, M.F.; ARCOS, J.C. Carcinogenicity of organophosphorus compounds: an analysis of their structure-activity relationship. **Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, v.16, p.1-42, 1996.

YAMAMOTO, I.K.; KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mutation Research**, v. 71, p.127-131, 1980.

## **7. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS**

---

Diferentes organismos testes como *Allium cepa* (MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; LEME e MARIN-MORALES, 2008), peixes (VENTURA et al., 2008), anfíbios (MOUCHET et al., 2007), mexilhões (MICIC et al., 2004), roedores (POSSAMAI et al., 2007), humanos (AU et al., 2001), dentre outros, têm sido utilizados como indicadores para a avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de químicos ambientais. Muitos autores (GRANT, 1978; RANK e NIELSEN, 1994; CHAUHAN et al., 1999) têm estabelecido uma correlação positiva entre os resultados obtidos com organismos-testes animais e vegetais.

Alguns estudos realizados com diferentes agrotóxicos têm demonstrado a eficiência dos sistemas testes de *Allium cepa* e de células de mamíferos em detectar danos genéticos (KIHLMAN, 1971; GRANT, 1986, PAVLICA et al., 1991). Estudos realizados por Grover et al. (1990) avaliaram os efeitos genotóxicos de agrotóxicos, utilizando vegetais e mamíferos como organismos testes. Suas análises evidenciaram a existência de uma correlação significativa de 91,5% entre estes dois sistemas testes.

No presente trabalho, foram desenvolvidos ensaios com diferentes concentrações do inseticida malation em testes *in vivo* com células de *A. cepa* e *in vitro*, com células

de hepatomas de ratos (HTC). Em um primeiro teste, foi possível verificar uma maior sensibilidade das células HTC, após exposição às baixas concentrações testadas de malation (1,5; 0,75; 0,37 e 0,18 mg/mL), por 24 horas, quando comparadas com as células de raiz de cebola. Para as células de *Rattus norvegicus*, usadas nos ensaios de cultura de celular, todas as concentrações testadas do malation apresentaram-se citotóxicas, enquanto que para *A. cepa*, não foram verificados índices significativos de citotoxicidade.

Para a análise dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do malation em células HTC, foram realizados testes expondo estas células às concentrações obtidas por diluições da menor concentração utilizada nos testes com *A. cepa* (0,18 mg/mL), obtendo-se as concentrações de 54; 5,4 e 0,54 µg/mL de malation. Os ensaios com os dois organismos-testes diferentes mostraram respostas semelhantes quanto à genotoxicidade, observada pela indução de AC em *A. cepa* e de fragmentos de DNA (teste do cometa) em células HTC. A análise do potencial mutagênico, por outro lado, não indicou similaridade entre os resultados obtidos para os dois sistemas testes. Foi observada uma indução significativa de MN em células de *A. cepa*, diferentemente dos resultados encontrados para células HTC, que não apresentaram índices significativos da presença destas estruturas.

A presença de genotoxicidade e ausência de mutagenicidade, observada em células HTC, pode estar relacionada à própria concentração empregada no teste, pois os testes com as células HTC foram desenvolvidos com concentrações bem mais baixas do que as utilizadas nos testes com *A. cepa*. Porém, o produto, mesmo em baixas concentrações, já se mostrou capaz de interagir, de algum modo, no material genético.

Pelos resultados, podemos sugerir que as lesões no DNA, verificadas por meio do ensaio do cometa, devem ter sido reparadas pelas células, não sendo então, fixadas.

Na maioria dos casos, agentes químicos em baixas concentrações agredem menos o DNA do que concentrações mais altas. Segundo Bolognesi (2003), os danos citogenéticos induzidos por pesticidas parecem depender da intensidade da exposição e, segundo ela, pode ser verificada uma relação dose-resposta entre a concentração e o dano promovido. Esta relação dose-resposta, na promoção de danos no DNA, foi descrita por diversos autores que estudaram os efeitos genotóxicos e mutagênicos do inseticida malation (GALLOWAY et al., 1987; GARRY et al.; 1990; TITENKO-HOLLAND et al., 1997).

Frente ao exposto acima, acredita-se que as lesões originadas pelas baixas concentrações de malation, testadas nas células HTC, pelo ensaio do cometa, (maioria de classe 1 e 2) aconteceram por uma menor ação do químico sobre o DNA, acarretando em efeitos mais brandos e passíveis de reparo.

No caso das células de *A. cepa*, a ausência de reparo pode ser explicada, pois, ao contrário das células HTC, estas células foram expostas à concentrações maiores do que as usadas nos testes com cultura de células. Nossos resultados sugerem que as agressões induzidas no DNA, pelas concentrações mais altas testadas para o malation, ocorreram por serem indutoras de uma maior quantidade de danos, não sendo possível de serem reparadas eficientemente pelos mecanismos celulares. Esta afirmação baseia-se na observação de que as AC induzidas em células meristemáticas decorreram em MN em células de gerações subseqüentes, fato que pode ser comprovado pela presença de MN nas células F<sub>1</sub>, bem como pela análise das células expostas a um tratamento de 48 horas ao malation (diminuição dos índices de AC e aumento dos índices de MN).

De acordo com a boa correlação existente entre os sistemas teste vegetal e animal, para testes de genotoxicidade e mutagenicidade de químicos ambientais como descrito acima, podemos inferir que as concentrações testadas em células HTC, por serem muito baixas, podem ter sido insuficientes para a promoção de danos nestas células. Assim, entendemos que, possivelmente, estas concentrações também possam não induzir a formação de MN em células de *A. cepa*. No entanto, para comprovar e correlacionar os efeitos do malation em células de *A. cepa* e células HTC, seria ideal que novos testes fossem desenvolvidos, utilizando concentrações semelhantes para os dois sistemas.

O mecanismo de ação do malation pode ser verificado pela análise, concomitante, dos testes de AC, MN e cometa. Não é possível detectar a ação de agentes aneugênicos por meio do ensaio do cometa (HARTMANN et al., 2001), assim como também não é possível prever a ação ou a potencialidade mutagênica dos compostos testados. O que se obtém com este teste são informações sobre a potencialidade de indução de lesões no DNA e a reatividade do DNA a tais substâncias (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005). Já o teste do MN pode nos fornecer informações sobre o potencial mutagênico dos agentes químicos e, quando realizado conjuntamente com técnicas mais específicas de coloração, pode também nos informar o modo de ação do agente, ou seja, se ele age promovendo quebras no material genético (clastogênico) ou causando distúrbios na maquinaria mitótica (aneugênico). Informações semelhantes podem ser obtidas por meio do teste de AC. Este teste pode nos fornecer informações valiosas sobre a potencialidade genotóxica da substância testada, uma vez que diferentes tipos de AC envolvem mecanismos de ação particulares.

Como exemplo, as aderências cromossômicas são derivadas de interassociações das fibras cromatínicas, resultando em pontes cromatídicas, o que indica uma alta toxicidade, que pode, inclusive, levar a célula à morte. Já a formação de células binucleadas tem origem na inibição da citocinese. A formação de anáfases multipolares, segundo Grant (1978), está relacionada com a inativação parcial do fuso mitótico. Para Fernandes et al. (2007), anáfases multipolares podem aparecer em decorrência da indução de divisões nucleares não acompanhadas de citocinese, o que levaria à formação de vários centros organizadores de microtúbulos (COM). Em uma divisão celular posterior a este evento, os cromossomos migrariam em direção aos vários COM, formando as anáfases multipolares. Os atrasos cromossômicos são decorrentes de problemas no fuso mitótico, que levam a perdas cromossômicas, originando os micronúcleos (GRANT, 1978). Pontes ou fragmentos cromossômicos resultam de quebras cromossômicas ou cromatídicas. Já os cromossomos perdidos indicam um efeito C-mitótico fraco e leva a um risco de aneuploidia. As C-mitoses também são indicações de efeito tóxico fraco e podem ser reversíveis, dependendo do grau de aderência instalado na célula (FISKEJÖ, 1985, FERNANDES et al., 2007).

Com este trabalho, pela associação de três metodologias de detecção de danos genéticos, podemos sugerir um efeito clastogênico para o inseticida estudado. No entanto, para que nossa hipótese seja confirmada, novos testes devem ser desenvolvidos, principalmente, os mais específicos como, por exemplo, análise cromossômica pela técnica de hibridação *in situ* (FISH) com sonda centromérica, em associação com o teste do MN.

O ensaio do cometa em células HTC nos indicou que o inseticida estudado possui potencial genotóxico. Os testes do MN em células de *A. cepa* e em células HTC

nos indicaram um potencial mutagênico, o que levou a uma sugestão de ação clastogênica para este composto, uma vez que a maioria dos MN encontrados, nos dois sistemas teste, apresentou tamanhos muito pequenos. Estudos realizados por Yamamoto e Kikuchi (1980) indicaram que é possível prever a ação do agente indutor de MN, com base em seu tamanho relativo. De maneira geral, MN induzidos por agentes aneugênicos são, consideravelmente, maiores do que aqueles induzidos por agentes clastogênicos (SCHMID, 1975). Além disso, a análise das AC em células meristemáticas de *A. cepa* indicou uma predominância de indução de pontes cromossômicas, que, como descrito anteriormente, resultam de quebras cromossômicas ou cromatídicas nas fases iniciais do ciclo celular.

A análise das células da região  $F_1$  de *A. cepa* também forneceu dados importantes, juntamente com o teste de AC, sobre a fixação dos danos genéticos induzidos pelo malation. Pelas nossas análises pudemos observar que as mesmas concentrações que induziram índices significativos de AC nas células meristemáticas, também induziram índices significativos de MN nas células  $F_1$ .

As análises com células meristemáticas de *A. cepa*, expostas por dois períodos distintos ao malation (24 e 48 horas), indicaram que, na exposição ao malation por 48 horas, não houve uma intensificação da ação do inseticida, pois não observamos aumento nas frequências de AC, em relação às registradas para o teste de 24 horas. Porém, observamos um aumento na frequência de MN, o que nos indicou uma fixação das AC que foram anteriormente induzidas, culminando na formação dos MN.

Também foi realizado, com células de *A. cepa*, um tratamento de recuperação de 48 horas, onde as raízes permaneceram em água Milli-Q, após serem expostas ao malation por 24 horas. Os resultados deste teste nos indicaram que somente as células

expostas às duas menores concentrações testadas (0,37 e 0,18 mg/mL) não apresentaram índices significativos de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, indicando que, quanto menor a concentração de malation, menor os efeitos cumulativos observados nas células expostas. Nossos resultados corroboram os estudos realizados por Van Bao et al. (1974), onde os autores mostraram que pessoas que sofreram intoxicações agudas por um inseticida organofosforado tiveram frequências aumentadas de AC, imediatamente após as intoxicações e até um mês depois da exposição. Seis meses após a exposição, foi observada a restauração da frequência normal de AC.

Em estudos de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de químicos ambientais, vários organismos-testes e diferentes ensaios têm sido utilizados. Para uma melhor visualização e entendimento das propriedades do agente indutor de danos sobre o DNA, sugere-se, com base nos resultados obtidos neste trabalho, que sejam utilizados testes diferentes e, preferencialmente, realizados de maneira simultânea, de modo que, os resultados obtidos por meio de um determinado teste, complementem os dados obtidos em outros. Além disso, a utilização de organismos testes diferentes nos ajuda a entender a atuação de químicos ambientais sobre células com metabolismo e fisiologia diferentes.

Pelos resultados obtidos e pelos dados da literatura (VIG, 1978; FISKEJÖ, 1981; OLIVEIRA et al., 2006), tanto as células de *A. cepa* como as HTC apresentam um sistema de ativação de pró-mutágenos em mutágenos. Assim, o malation, que tem sua toxicidade dada por sua bioativação em malaoxon, pode ser, eficientemente, avaliado pelos dois sistemas.

Os resultados encontrados no presente trabalho reforçam a necessidade de mais estudos que avaliem os efeitos de químicos ambientais, em pequenas concentrações e,

especificamente, dos agrotóxicos sobre os organismos expostos, uma vez que a grande parte das exposições ocorre em concentrações menores do que aquelas indicadas para uso, seja na agricultura ou nas residências.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ABDOLLAH, M.; MOSTAFALOU, S.; POURNOURMOHAMMADI, S.; SHADNIA, S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following sub-chronic exposure to malathion. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 137, p. 29-34, 2004.

ABDOU, H.E.; DE HONDT, H.A.; EL NAHAS, S.M. Chromosome aberrations in spermatogonia and sperm abnormalities in Curacron-treated mice. **Mutation Research**, Amsterdam, v.222, p. 409-414, 1989.

AHMED, R.S.; SETH, V.; PASHA, S.T.; BANERJEE, B.D. Influence of dietary Ginger (*Zingiber officinalis* Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 38, p. 443-450, 2000.

AKHGARI, M.; ABDOLLAHI, M.; KEBRYAEEZADEH, A.; HOSSEINI, R.; SABZEVARI, O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. **Human and Experimental Toxicology**, v.22, p.205-211, 2003.

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINK, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.; TICE, R.; WATER, M.D.; AITIO, A. IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in human, International Program on Chemical Safety. **Mutation Research**, v. 463, p. 111-172, 2000.

AL-SABTI, K. *Allium* test for air and waterborne pollution control. **Cytobios**, v. 58, n. 233, p.71-78. 1989.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.323, p. 121-35, 1995.

AL-SABTI, K.; KURELEC, B. Chromosomal aberrations in onion (*Allium cepa*) induced by water chlorination by-products. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.34, p.80-88, 1985.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. Portaria nº 10/snvs de 08 de Março de 1985. DOU 14/03/85. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/10\\_85.htm#](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/10_85.htm#)>. Acesso em 29 jul. 2005.

ARAÚJO A.J.; ROSÁRIO M.L.S.; ROLDAN, R. (Orgs.). “**Meio Ambiente, Saúde e Trabalho**”, CUT-RJ, Comissão de Meio Ambiente. 1. ed. Rio de Janeiro, 2000. Disponível em: <<http://www.sindipetro.org.br/extra/cartilha-cut/index.htm>> Acesso em 7 jan.2008.

ARAÚJO, J.A.; LIMA, J.S.; MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; SOARES, M.O.; MONTEIRO, M.C.M.; AMARAL, A.M.; KUBOTA, A; MEYER, A.; COSENZA, C.A.N.; NEVES, C.; MARKOWITZ, S. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.12, n. 1, p. 115-130, 2007.

ARCURY, T.A.; QUANDT, S.A.; MELLEN, B.G. An exploratory analysis of occupational skin disease among Latino migrant and seasonal farmworkers in North Carolina. **Journal of Agricultural Safety Health**, v.9, n. 3, p. 221–232, 2003.

ARNAIZ, R.R. **Las toxinas ambientales y sus efectos geneticos**, México, 2 ed., 1995. 267p.

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.

ATSDR – Agencia para Substancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. **Reseña Toxicológica del Malation**. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU, Servicio de la Salud Pública, 2003.

AU, W.W.; BADARY, O.A.; HEO, M.Y. Cytogenetic assays for monitoring populations exposed to environmental mutagens. **Occupational Medicine**, v. 16, n.2, p. 345-357, 2001.

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

AUERBACH, C. **Mutation Research: Problems, results and perspectives**. London: Chapman & Hall, 1976, 504p.

AZEVEDO, J.L. A importância da Mutagênese ambiental: Prefácio. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Orgs.) **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, 356p.

BARLIE, F.B. **Introduction to *in vitro* cytotoxicology: mechanism and methods**. Boca Raton: CRC press, 1994.

BELLINI, M.F.; ANGELI, J.P.F.; MATUO, R.; TEREZAN, A.P.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-K1 and HTC cells. **Toxicology in Vitro**, v.20, p.355-360, 2006.

BERANEK, D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research**, v. 231, p. 11–30, 1990.

BLASIAK, J.; PAWEL, J.; TRZECIAK, A.; SZYFTER, K. *In vitro* studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. **Mutation Research**, v.445, p.275-283, 1999.

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

BOLOGNESI, C.; MORASSO, G. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. **Trends in Food Science and Technology**. v.11, p. 182-187, 2000.

BOLOGNESI, C.; MERLO, F. Biomonitoring of human populations exposed to pesticides. In: CHEREMINISOFF, P.N. (Org.) **Encyclopedia of Environmental Control Technology**. Gulf Publishing Company, v. 8. cap. 28, 1989, p. 673-737.

BONASSI, S.; AU, W.W. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. **Mutation Research**, v. 511, p. 73-86, 2002.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v.20, n. 4, p. 245-254, 2005.

BRENNER, L. Malathion Fact Sheet. **Journal of Pesticide Reform**. v. 12, n.4. 1992.

BRUSICK, D.J. **Principles of Genetic Toxicology**. New York: Plenum Press, 1987, 284p.

CABELLO, G.; JUARRANZ, A.; BOTELLA, Y.; CALAF, G. Organophosphorous pesticides in breast cancer progression. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v.35, p. 1-9, 2003.

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

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

CASTILLO, L.E.; MARTINEZ, E.; RUEPERT, C.; SAVAGE, C.; GILEK, M.; PINNOCK, M.; SOLIS, E. Water quality and macroinvertebrate community response following pesticide applications in a banana plantation Limon Costa Rica. **Science of the Total Environment**, v. 367, p.418–32, 2006.

CECCHINE, G.; GOLOMB, B.A.; HIBLBORNE, L.H.; SPEKTOR, D.M.; ANTHONY, R. **A Review of the Scientific Literature as it Pertains to Gulf War Illness**. v. 8, cap. 7, 2000.

CGG – Comissão on Global Governance. **An overview of our global neighborhood** – The report of the commission on global governance. London: ONU, 1995.

CHAUHAN, L.K.S.; SAXENA, P.N; GUPTA, SK. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, p. 181-89, 1999.

CHEMINOVA BRASIL LTDA, 2002. Disponível em  
<[http://www.cheminova.com.br/pt/inseticidas/fyfanon/informacoes\\_tecnicas.htm](http://www.cheminova.com.br/pt/inseticidas/fyfanon/informacoes_tecnicas.htm).>

Acesso em 25 jul. 2005.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. **Biomaterials**, v. 17, p. 1259-1264, 1996.

CLIVE, D.; SPECTOR, L.F.S. Comparative chemical mutagenesis: An overview. In: SERRES, F.J. (Org.), **Proc. Comparative Chemical Mutagenesis Workshop**, NIEHS, Research Triangle Park, N.C. 1978.

CNUMAD – Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento (ECO-92) – Agenda 21. Brasília: Senado Federal, 1992.

CNUMH – Conferência Mundial das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente Humano. Suécia, Estocolmo, 1972.

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

CONCON, J.M. In: CONCON, J.M. (Org). **Food Toxicology**, New York: Marcel Dekker, 1988, 1133 p.

COX, C. Insecticide Fact Sheet: Malathion. **Journal of Pesticide Reform**, v. 23, n. 4, p. 10-15, 2003.

CRESTANA, S. Harmonia e Respeito entre Homens e Natureza: Uma Questão de Vida – A Contribuição da Agricultura. In: CASTELLANO, E.G.; CHAIDHRY, F.H. (Orgs.) **Desenvolvimento Sustentado: Problemas e Estratégias**. EESC-USP, São Carlos, São Paulo, 2000, p. 169-180.

CRUZ, A.S.; CUPPOLONI, K.M.; MARTINEZ, C.H.O.; GOMES, L.F.S. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 47, n. 1-2, p. 51-57, 1987.

DE FLORA, S.; VIGARIO, L.; D'AGOSTINI, F.; CAMOIRANO, A.; BAGNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed *in situ* to polluted river water. **Mutation Research**, v.319, p.167-77, 1993.

DEAN, C.E.; PENA, C.; VARADY, R.; SUK, W.A. Environmental health and hazardous waste issues related to the US-Mexico border. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, p. 590-594, 1996.

DEAN, R.; BYNUM, G.; KRAM, D.; SCHNEIDER, E.L. Sister-chromatid exchange induction by carcinogens in HTC cells. An *in vitro* system which does not require addition of activating factors. **Mutation Research**, v.74, p. 477-483, 1980.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL., N.E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v. 521, p. 121-135, 2002.

DELORENZO, M.E.; SCOTT, G.I.; ROSS, P.E. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 84–98, 2001.

DEROSA, C.T.; JOHNSON, B.L.; FAY, M.; HANSEN, H.; MUMTAZ, M.M. Public health implications of hazardous waste: sites; findings, assessment an research. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, p. 1131-1138, 1996.

DONALDSON, R.P.; LUSTER, D.G. Multiple forms of plant cytochromes P-450. **Plant Physiology**, v.96, p. 669-674, 1991.

DRISS, M.R.; HENNION, M.C.; BOUGUERRACA, M.L. Determination of carbaryl and some organophosphorus pesticides in drinking water using on-line liquid chromatographic preconcentration techniques. **Journal of Chromatography**, v. 639, n. 2, p.352-358, 1993.

ECOBICHON, D.J. Toxic effects of pesticides. In: KLAASSEN, C.D.; DOULL, J. (Orgs.). **Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 5. ed. New York: MacMillan, 1996, p. 643–689.

ELHAJOUJI, A.; CUNHA, M.; KIRSCH-VOLDERS, M. Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. **Mutagenesis**, v. 13, p. 193-195, 1998.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>>. Acesso em 15 jul. 2004.

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

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

FENSKE, R.A. Pesticide exposure assessment of workers and their families. **State of the Art Reviews Occupational Medicine**, v. 12, p.221-237, 1997.

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

FIGA-TALAMANCA, I.; MEARELLI, I.; VALENTE, P.; BASCHERINI, S. Cancer mortality in a cohort of rural licensed pesticide users in the Province of Rome. **International Journal of Epidemiology**, v. 22, p. 579-583, 1993.

FIRESTONE, J.A.; SMITH-WELLER, T.; FRANKLIN, G.; SWANSON, P.; LONGSTETH, W.T.; CHECKOWAY, H. Pesticides and risk of Parkinson disease: a population-based case-control study. **Archives of Neurology**, v.62, n. 1, p. 91–95, 2005.

FISKEJÖ, G. *Allium* test on copper in drinking water. **Vatten**, v.3, p. 232-240, 1981.

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

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

FISKESJÖ, G. The *Allium* test. An alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, v.197, n. 2, p. 243-60, 1988.

FLESSEL, P.; QUINTANA, P.J.E.; HOOPER, K. Genetic toxicity of malathion: a review. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 22, p. 7-17, 1993.

FRANKART, C.; EULLAFFROY, P.; VERNET, G. Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p.159–68, 2003.

GAD, S. C. Primary hepatocyte culture as an *in vitro* toxicologic system for the liver. In: GAD, S. C. **In Vitro Toxicology**. 2 ed., New York: Taylor & Francis, 2000. 410 p.

GALLOWAY, S.M.; ARMSTRONG, M.A.; REUBEN, C.; COLMAN, S.; BROWN, B.; CANNON, F.; AHMED, M.; DUK, S.; RIMPO, J.; MARGOLIN, B.H.; RESNICK, M.A.; ANDERSON, B.; ZEIGER, E. Chromosome aberrations and sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 10, p. 1-175, 1987.

GALLOWAY, S.M.; AARDEMA, M.J.; ISHIDATE, M.Jr.; IVETT, J.L.; KIRKLAND, D.J.; MORITA, T.; MOSESSO, P.; SOFUNI, T. Report from working group on *in vitro* tests for chromosomal aberrations. **Mutation Research**, v., 312, n.3, p. 241-261, 1994.

GALLOWAY, T.; HANDY, R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. **Ecotoxicology**, v. 12, p. 345-363, 2003.

GARCIA, E.G. **Segurança e saúde no trabalho rural: a questão dos agrotóxicos**. São Paulo: Fundacentro- Ministério do Trabalho e Emprego; 2001.

GARRY, V.; NELSON, R.; GRIFFITH, J.; HARKINS, M. Preparation for human study of pesticide applicators: Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in cultured human lymphocytes exposed to selected fumigantes. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 10, p. 21-29, 1990.

GAUTHIER, J.M; DUBEAU, H.; RASSART, E.; JARMAN, W.M.; WELLS, R.S. Biomarkers of DNA damage in marine mammals. **Mutation Research**, v. 444, p. 427-439, 1999.

GIRI S.; PRASAD S.B.; GIRI, A.; SHARMA, G.D. Genotoxic Effects of Malation: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays *in vivo*. **Mutation Research**, v. 15, n. 514, p. 223-31, 2002.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p.247-279.

GRANDE, M.; ANDERSEN, S.; BERGE, D. Effects of pesticides on fish. **Norwegian Journal of Agricultural Sciences**, p.195–209, 1994.

GRANT, W.F. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. **Environmental Health Perspectives**, v. 27, p.37-43, 1978.

GRANT, W.F.; ZINOV'EVA-STAEVITCH, A.E.; ZURA, K.D. Plant genetic test systems for the detection of chemical mutagens. In: STICH, H.F.; SAN, R.H.C. (Orgs.), **Short term tests for chemical carcinogens**. New York: Springer-Verlag, 1981, p. 200-216.

GRANT, W.F. Chromosome 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. Plants also offer an alternative to animal research: Genetics professor. **Canadian Research**, v. 19, n. 2, p. 71, 1986.

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

GROVER, I.S.; DHINGRA, A.K.; ADHIKARI, N.; LADHAR, S.S. Genotoxicity of pesticides. In: MENDELSON, M.L.; ALBERTINI, R.J. (Orgs.), **Mutation and the Environment**. Part E, New York: Wiley Liss, 1990, p. 91-106.

GUIMARÃES, E.T.; DOMINGOS, M.; ALVES, E.S.; CALDINI JR, N.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; SALDIVA, P.N.H. Detection of genotoxic potential of air pollution in the city of São Paulo (Brazil) with *Tradescantia pallida* using *Tradescantia* micronucleus assay (Trad-MCN). **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, p. 1-8, 2000.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, F.; MARTUS, H.J.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 843-858, 2001.

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

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review. **Mutation Research**, v. 277, p. 91-138, 1992.

HURTIG, A.K.; SAN SEBASTIAN, M.; SOTO, A.; SHINGRE, A.; ZAMBRANO, D.; GUERRERO, W. Pesticide use among farmers in the amazon basin of Ecuador. **Archives of Environmental Health**, v.58, p. 223-228, 2003.

IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISK TO HUMANS, vol. 1, 1971 até vol. 82, 2002.

INTERNATIONAL STANDARD: **Biological Evaluation of Medical Devices** – Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10993-5, 1992.

JOHN, S.; KALE, M.; RATHORE, N.; BHATNAGAR, D. Protective effect of Vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, p. 500-504, 2001.

JOHNSON, M.K. The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: biochemical studies and toxicological applications. **Review of Biochemistry and Toxicology**, v. 4, p. 141-212, 1982.

JOKANOVIC, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, v. 166, p. 139-160, 2001.

KARLSSON, S.I. Agricultural pesticides in developing countries – a multilevel governance challenge. **Environment**, v.46, p. 22-41, 2004.

KIHLMAN, B.A. **Chemical mutagens**: Principles and methods for their detection. In: HOLLAENDER, A. (Org.). v.2, New York: Plenum, 1971, p. 489-514.

KIRKLAND, D. Chromosome aberration testing in genetic toxicology- past, present and future. **Mutation Research**, v. 404, p. 173-185, 1998.

KIRSCH-VOLDERS, M. The CB *in vitro* micronucleus assay in human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 392, n. 1-2, 1997.

KIRSCH-VOLDERS, M.; CUNDARI, E.; VERDOOT, B. Towards a unifying model for the metaphase/anaphase transition. **Mutagenesis**, v.13, p. 321-335, 1998.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504, p. 137-148, 2002.

KNOWLES, B.B.; HOWWE, C.C.; ADEN, D.P. Human hepatocellular carcinoma cell secretes the major plasma protein and hepatitis B surface antigen. **Science**, v. 209, p. 497-499, 1980.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Communication**, v.3, p.103-115, 1995.

KOHN, K.W. Principles and practice of DNA filter elution. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 49, p. 55-77, 1991.

KOPPEN, G.; ANGELIS, K.J. Repair of X-ray induced DNA damage measured by the comet assay in roots of *Vicia faba*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 32, p. 281-285, 1998.

KOURAKIS, A.; MOURATIDOU, M.; BARBOUTI, A.; DIMIKIOTOU, M. Cytogenetic effects of occupational exposure in the peripheral blood lymphocytes of pesticide sprayers. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 99-101, 1996.

LAMOUREX, G.L.; RUSNESS, D.G. Xenobiotic conjugation in higher plants. In: PAULSON, G.D.; CALDWELL, J.; HUSTON, D.H.; MENN, J.J. (Eds.), **Xenobiotic Conjugation Chemistry**, v. 299, p. 62-107, 1986.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. 1. ed. São Paulo: Manole Ltda, 1999, 230p.

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

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.

LIESS, M.; BROWN, C.; DOHMEN, P.; DUQUESNE, S.; HEIMBACH, F.; KREUGER, J.; LAGADIC, L.; REINERT, W.; MAUND, S.; STRELOKE, M.; TARAZONA, J. (Orgs.). **Effects of pesticides in the field** — EPIF. Brussels: SETAC Press, 2005, 136 p.

LIPKOWITZ, S.; GARRY, V.F.; KIRSCH, I.R. Interlocus V-J recombination measures genomic instability in agriculture workers at risk for lymphoid malignancies. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.89, p.5301-5305, 1992.

MA, T.H. Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. A promising mutagen test system. **Mutation Research**, v. 64, p. 307-313, 1979.

MA, T.H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, H.; ZHANG, H. An improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v.334, p.185-195, 1995.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KRISCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimic**, v. 88, p. 1515-1531, 2006.

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

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

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

MEYER, A.; CHRISMAN, J.; MOREIRA, J.C.; KOIFMAN, S. **Cancer Mortality Among Agricultural Workers from Rio de Janeiro, Brazil**. Rio de Janeiro: CESTH/ENSP/FIOCRUZ (mimeo), s.n., 2002.

MICIC, M.; BIHARIA, N.; MLINARIC-RASCAN, I. Influence of herbicide, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, on haemocyte DNA of in vivo treated mussel. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 311, p. 157– 169, 2004.

MIGID, A.H.M.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.66, p.57-64, 2007.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RISSONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pices) from two environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**, v.343, p. 121-35, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório de Assessoria Técnica concedida à Coordenação Regional da Bahia (CORE-BA) no Município de Feira de Santana – BA/2003.

MINTON, N.A.; MURRAY, V.S.G. A review of organophosphate poisoning. **Medical Toxicology**, v. 3 p. 350-375, 1988.

MOHANDAS, T.; GRANT, W.F. Cytogenetic effects of 2,4-D and amitrole in relation to nuclear volume and DNA content in some higher plants. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.14, p. 773-783, 1972.

MOUCHET, F.; GAUTHIER, L.; BAUDRIMONT, M.; GONZALEZ, P.; MAILHES, C.; FERRIER, V.; DEVAUX, A. genotoxicity of cadmium in amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the comet assay and the micronucleus test. **Environmental Toxicology**, v. 22, p.422–435, 2007.

MOURITSEN, O.G.; JORGENSEN, K. A new look at lipid-membrane structure in relation to drug research. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 1507-1509, 1998.

NATARAJAN, A.T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research**, v. 504, p. 3-16, 2002.

NEBERT, D.W.; MCKINNON, R.A. Cytochrome P450: evolution and functional diversity. **Programmes in Liver Diseases**, v. 12, p.63, 1994.

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

NILAN, R.A. Potential of plant genetic systems for monitoring and screening mutagens. **Environmental Health Perspectives**, v.27, p. 181-196, 1978.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTINEZ-LOPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, v. 504, p. 17-36, 2002.

OLIVE, P.L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiation Research**, v.117, p. 79-92, 1989.

OLIVE, P.L.; BANÁTH, J.P. Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: 'the tail moment' as a function of position in the cell cycle. **Mutation Research**, v. 294, p. 275-283, 1993.

OLIVEIRA, R.J.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, A. F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of  $\beta$ -glucan from barley, in CHO-K1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, v.20, p. 1225-1233, 2006.

OLIVEIRA-SILVA, J.J.; MEYER, A. O sistema de notificação das intoxicações: o fluxograma da joeira. In: PERES, F.; MOREIRA, J.C. (Orgs.). **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003.

OMOTO, C. Modo de Ação de Inseticidas e Resistência de Insetos à Inseticidas. In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. (Orgs.) **Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Rio Grande do Sul: CCS/DFS; 2000, p. 31-50.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 123, p. 291-298, 1984.

PANDA, K.K.; LENKA, M.; PANDA, B.B. Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chlor-alkali plant. **Science of the Total Environment**, v.96, p. 281-296, 1990.

PAVLICA, M.D.; PAPES, D.; NAGY, B. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 263, p. 77-81, 1991.

PEÑA, L.F.M. **Uso do teste de micronúcleo em eritrócitos circulantes de peixes para monitorização de um local do rio Tibagi e avaliação da genotoxicidade de agrotóxicos em bioensaios**. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1996. 199f

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

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v.5, n.4, p. 289-302, 2000.

PLEWA, M.J. Activation of chemicals into mutagens by green plants: A preliminary discussion. **Environmental Health Perspectives**, v. 27, p. 45-50, 1978.

PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D. Activation of promutágenos by green plants. **Annual Review of Genetics**, v.27, p. 93-113, 1993.

POSSAMAI, F.P.; FORTUNATO, J.J.; FEIER, G.; AGOSTINHO, F.R.; QUEVEDO, J.; WILHELM FILHO, D.; DAL-PIZZOL, F. Oxidative stress after acute and sub-

chronic malathion intoxication in Wistar rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 198-204, 2007.

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercâmbios entre cromátidas hermanas.** Universidade de Complutense, Madrid, 1987, 276p.

RABELO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.L.R.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação. **Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, São Paulo, 1991.

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

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.

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 methanesulfone. **Mutation Research**, v. 390, p. 121-27, 1997.

RESTREPO, M.; MUNOZ, N.; DAY, N.; PARRA, J.E.; HERNANDEZ, C.; BLETTNER, M.; GIRALDO, A. Birth defects among children born to a population occupationally exposed to pesticides in Colombia. **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, v. 16, p. 239-246, 1990.

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

ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; COSTA, I. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000 a.

ROGERO, S.O.; SOUZA-BAZZI, A.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S.; FERNANDES, K.C.; HIGA, O.Z. Citotoxicidade *in vitro* das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizante. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 59, n. 1-2, p. 1-5, 2000 b.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROJAS, A.; OJEDA, M.E.; BARRAZA, X. Congenital malformations and pesticide exposure. **Revista Medica de Chile**, v. 128, p. 399-404, 2000.

ROSENSTOCK, L.; DANIELL, W.; BARNHART, S.; SCHWARTZ, D.; DEMERS, P.A. Chronic neuropsychological sequelae of occupational exposure to organophosphate insecticides. **American Journal of Industrial Medicine**, v.18, p.321-325, 1990.

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

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p. 201-223.

SALVI, R.M.; LARA, D.R.; GHISOLDFI, E.S.; PORTELA, L.V.; DIAS, R.D.; SOUZA, D.O. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. **Toxicological Sciences**, v.72, p. 267-271, 2003.

SANKARARAMAKRISHNAN, N.; SHARMA, A,K.; SANGHI, R. Organochlorine and organophosphorous pesticide residues in ground water and surface waters of Kanpur, Uttar Pradesh, India. **Environment International**, v. 31, p. 113-120, 2005.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SCHUMAN, S.H.; WAGNER, S.L. Pesticide intoxication and chronic CNS effects. **Lancet**, v. 338, p. 948-949, 1991.

SIGRH: Sistema de Informações para o Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo. Relatório de Situação dos Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Alto Paranapanema - Relatório 1. **Uso de Agrotóxicos na Agricultura**. 2005. Arquivo extraído de

<[http://www.sigrh.sp.gov.br/sigrh/ARQS/RELATORIO/CRH/CBHALPA/1121/uso\\_de\\_agrotoxicos\\_na\\_agricultura.html](http://www.sigrh.sp.gov.br/sigrh/ARQS/RELATORIO/CRH/CBHALPA/1121/uso_de_agrotoxicos_na_agricultura.html)>. Acesso em: 12. nov.2007.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 201-222, 1995.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, S., SHARMA, N. Neurological syndromes following organophosphate poisoning. **Neurology** v. 48, p. 308-313, 2000.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, J.M. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research: Genetic Toxicology**, v.38, n.3-4, p. 171-79, 1997.

SORSA, M.; OJAJARVI, A.; SALOMA, S. Cytogenetic surveillance of workers exposed to genotoxic chemicals. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v.10, p. 215-221, 1990.

STALLONES, L.; BESELER, C. Pesticide illness, farm practices, and neurological symptoms among farm residents in Colorado. **Environmental Research**, v. 90, p. 89–97, 2002.

STIBOROVA, M; ANZENBACHER, P. What are the principal enzymes oxidizing the xenobióticos in plants: cytochromes P-450 or peroxidases? (a hypothesis). **General Physiology and Biophysics**, v.45, p.209-216, 1991.

STRONG, L.L.; THOMPSON, B.; CORONADO, G.D.; GRIFFITH, W.C.; VIGOREN, E.M.; ISLAS, I. Health symptoms and exposure to organophosphate pesticides in farmworkers. **Ameriacn Journal of Industrial Medicine**, v.46, p. 599–606, 2004.

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

THOMPSON, C.W., FRICK, J.A., NATKE, B.C., HANSEN, L.K. Preparation, analysis and anticholinesterase properties of O,O-dimethyl phosphorothioate isomerides. **Chemical Research in Toxicology**, v.2, p.386-391, 1989.

TICE, R.R. The single cell gel/comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIS, D.H.; VENIT, S. (Orgs.), **Environmental Mutagenesis**. Oxford: Bios Scientific Publishers LTD, 1995, p. 315-339.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A.M.; SMITH, M.T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: A study of malathion-exposed workers. **Mutation Research**, v. 388, p.85-95, 1997.

TRAPP, S. Modelling uptake into roots and subsequent translocation of neutral and ionisable organic compounds. **Pest Management Science**, v.56, p.767-778, 2000.

TRAPP, S. Dynamic root uptake model for neutral lipophilic organics. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.21, p.203-206, 2002.

TURGUT, C. The contamination of organochlorine pesticides and heavy metals in surface water in Kucuk Menderes River in Turkey, 2000-2002. **Environment International**, v. 29, p. 29-32, 2003.

TURGUT, C. The impact of pesticides toward parrot feather when applied at the predicted environmental concentration. **Chemosphere**, v. 66, p. 469-473, 2007.

USDA – U.S. Department of Agriculture. 2000. **Programa Cooperativo de Erradicación de la Mosca de la Fruta de las Antillas Valle Más Bajo del Río Grande, Texas.** Evaluación Ambiental.

VALENTIN-SEVERIN, I.; HEGARAT, L.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**, v.536, p.79-90, 2003.

VAN BAO, T.; SZABO, I.; RUZICKSKA, P.; CZEIZEL, A. Chromosome aberrations in patients suffering acute organic phosphate insecticide intoxication. **Humangenetik**, v.24, p. 33-57, 1974.

VED BRAT, S. Genetic Systems in *Allium* 1. Chromosome variation. **Chromosoma**, v.16, p. 486-499, 1965.

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

VIDEIRA, R.A.; ANTUNES-MADEIRA, M.V.; MADEIRA, V.M.C. Interaction of ethylaziphos with the physical organization of model and native membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.128, p. 65-72, 1996.

VIDEIRA, R.A.; ANTUNES-MADEIRA, M.C.; LOPES, V.I.C.F.; MADEIRA, V.M.C. Changes induced by malathion, methylparathion and parathion on membrane lipid physicochemical properties correlate with their toxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1511, p. 360-368, 2001.

VIG, B.K. Somatic mosaicism in plants with special reference to somatic crossing over. **Environmental Health Perspectives**, v. 27, p. 27-36, 1978.

VOGEL, E.W. Assessment of chemically: induced genotoxic events. In: **Prospectives and limitations**. The Netherlands: Universitaire Pers Leiden, v.2, p.24. 1982.

WARE, G.W. **Pesticides: Theory and applications**. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1983, p. 35-67.

WASWA, F.; GACHENE, C.K.K.; EGGERS, H. Assessment of erosion damage in Ndome and Ghazi, Taita Taveta, Kenya. **GeoJournal**, v. 56, p.201-212, 2002.

WITTE, L.; FRASHMAN, E.; JACOBI, H. Comparison of the sensitivity of three toxicity tests determining survival, inhibition of growth and colony forming ability in human fibroblast after incubation with environmental chemicals. **Toxicology in Vitro**, v. 9, p.327–331, 1995.

XING, W.; ZHANG, Z. A comparison of SCE test in human lymphocytes and *Vicia faba*: a hopeful technique using plants to detect mutagens and carcinogens. **Mutation Research**, v.241, p. 109-113, 1990.

YAMAMOTO, I.K.; KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mutation Research**, v. 71, p.127-131, 1980.