RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/11/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

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

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

MARIANA SANTOS COSTA

Rio Claro – SP
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

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

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

MARIANA SANTOS COSTA

Orientadora: Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN-MORALES

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

Rio Claro – SP
2021

C837c

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

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

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: MARIANA SANTOS COSTA

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

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

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

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

Rita de Cássia M. de Miranda

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

Rio Claro, 04 de novembro de 2021

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

Os agrotóxicos são usados no Brasil como a principal estratégia para combater e/ou prevenir pragas agrícolas. O crescente uso desses químicos tornou o país um dos líderes mundiais no consumo dessa substância. O uso contínuo e irregular dos agrotóxicos pode gerar efeitos adversos tanto aos ecossistemas como uma ameaça à saúde pública. Dentre os agrotóxicos disponíveis para utilização, se destacam os pertencentes a classe dos organofosforados, considerados um dos principais responsáveis por intoxicações e óbitos por agrotóxicos registrados no Brasil. O organofosforado clorpirifós, que é muito utilizado no Brasil, exerce sua ação tóxica pela inibição da enzima acetilcolinesterase, o que resulta em excesso de acetilcolina nas sinapses colinérgicas, promovendo sinais e efeitos diversos. Tendo em vista o potencial que esse químico tem em causar alterações citogenotóxicas e mutagênicas, esse trabalho objetivou avaliar diferentes concentrações de clorpirifós, para investigar o seu potencial citogenotóxico e mutagênico, por testes com bioindicadores vegetais e com células de hepatoma humano (C3A). Os bioindicadores vegetais utilizados neste estudo foram *Lactuca sativa,* para avaliação do potencial fitotóxico (ensaios de germinação e de inibição do crescimento de radícula e hipocótilo), *Allium cepa*, para as avaliação dos potenciais tóxico e cito genotóxico (ensaios de germinação, de índice mitótico e de aberrações cromossômicas - AC) e investigação do potencial mutagênico (ensaio do micronúcleo – MN, em células F1). Para os ensaios com organismos vegetais, foram testadas seis concentrações do inseticida Clorpirifós: C1: 10 mg mL^{-1} (concentração de uso na agricultura), C2: concentração de 5 mg mL^{-1}; C3: concentração de 2,5 mg mL^{-1}; C4: concentração de 1, 25 mg mL^{-1} ; C5: concentração de 0,625 mg mL^{-1}; C6: concentração de 0,3125 mg mL^{-1}. Os resultados com *Allium cepa* mostraram potencial fitotóxico para C1, C2e C3. Já os ensaios de avaliação dos potenciais genotóxico e mutagênico, queforam avaliado apenas com C3, C4, C5 e C6, mostraram resultados estatisticamente diferentes do controle negativo para C3, C4, C5. Os ensaios com células HepG2 foram primeiramente realizados com as concentrações acima citadas (C1 a C6),mas, como todas as concentrações foram citotóxicas, pelo ensaio do MTT, houve a necessidade de diminuir as concentrações (C7: 0,15625 mg mL^{-1}; C8: 0,078 mg mL^{-1}; C9:

0,039 mg mL^{-1} e C10: 0,019 mg mL^{-1}). Essas concentrações foram então utilizadas tanto noteste de citotoxicidade do MTT como nos demais ensaios colorimétricos (do Azul de Tripan e Resazurina). O teste do MTT mostrou que, somente C9 e C10 não foram citotóxicas. Quanto aos ensaios de resazurina, todas as concentrações foram citotóxicas. Pelo ensaio do azul de tripan, somente a concentração C7 foi tóxica. Adicionalmente aos ensaios realizados com os bioindicadores, foi feita uma ampla revisão bibliográfica em bases de dados científicas disponíveis, sobre o potencial poluidor dos organofosforados, o uso do inseticida clorpirifós na agricultura brasileira e os bioensaios mais utilizados e indicados para a avaliação da toxicidade desse grupo. Os dados desta pesquisa realizada na literatura científica foram compilados em um artigo de revisão, que também faz parte do conteúdo dessa dissertação.

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

ABSTRACT

Pesticides are used in Brazil as the main strategy to combat and/or prevent agricultural pests. The growing chemical mineral use has made the country one of the global leaders in the consumption of this substance. The continuous and irregular use of pesticides can generate adverse effects on ecosystems as well as a threat to public health. Among the pesticides available for use, those belonging to the class of organophosphates stand out, considered one of the main causes of poisoning and deaths caused by pesticides registered in Brazil. The organophosphate chlorpyrifos, which is widely used in Brazil, exerts its toxic action by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase, which results in excess acetylcholine in cholinergic synapses, promoting different signs and effects. Considering the potential that this chemical has to cause cytogenotoxic and mutagenic changes, this work aimed to evaluate different options of chlorpyrifos, to investigate its cytogenotoxic and mutagenic potential, by testicles with plant bioindicators and with human hepatoma cells (C3A). The plant bioindicators used in this study were *Lactuca sativa*, for evaluation of phytotoxic potential (germination tests and inhibition of radicle and hypocotyl growth), *Allium cepa*, for the needs of toxic and cytogenotoxic potentials (germination tests, mitotic index and of chromosomal aberrations - AC) and investigation of the mutagenic potential (micronucleus assay - MN, in F1 cells). For tests with plant organisms, six requirements of the insecticide Chlorpyrifos were tested: C1: 1 mg mL^{-1} (concentration ofuse in agriculture), C2: concentration of 5 mg mL^{-1}; C3: 2,5 mg mL^{-1} concentration; C4: 1,25 mg mL^{-1} concentration; C5: 0,625 mg mL^{-1}, concentration C6: concentration of 0,3125 mg mL^{-1}. The results with *Allium cepa* excellent phytotoxic potential for C1, C2 and C3. As for the assays for evaluating genotoxic and mutagenic potentials, which were evaluated only with C3, C4, C5 and C6, results were statistically different from the negative control forC3, C4, C5. Assays with HepG2 cells were first performed with the concentrations mentioned above (C1 to C6), but, as all concentrations were cytotoxic, by the MTT assay, it was necessary to decrease the concentrations (C7: 0.15625 mg mL^{-1}; C8: 0.078 mg mL^{-1}; C9: 0.039 mg mL^{-1} and C10: 0.019 mg mL^{-1}). These concentrations were then used both in the MTT cytotoxicity test and in the other colorimetric assays (Trypan Blue and Resazurin). The MTT test showed that only C9 and C10 were not cytotoxic. As for for the resazurin assays, all concentrations were

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do agrotóxico clorpirifós 27

ARTIGO 1

Figura 1. Gráfico do consumo de agotóxicoss e afins entre os anos 200-2017..... 42

Figura 2. Gráfico do registro anual de agrotóxicos no Brasil entre os anos 2000-220. 42

Figura 3. Classificação dos agrotóxicos utilizado para fins de registro e reavaliação segundo a ANVISA 43

Figura 4. Estrutura geral dos OFs 48

Figua 5. Fórmula estrutural do agrotóxico clorpirifós 49

ARTIGO 2

Figura 1. Resultado do ensaio de germinação de *Allium cepa*..... 73

Figura 2. Células meristemáticas de *A. cepa* em intérfase (seta) e prófase (cabeça de seta) com presença de brotos e micronúcleos 75

Figura 3. Células de F1 de *Allium cepa* apresentando micronúcleos. 76

Figura 4. Resultado do ensaio de germinação em *L. sativa*.....77

Figura 5. Resultado do teste de enlongamento radicular e do hipocótilo realizadas com o bioindicador *L. sativa*..... 78

ARTIGO 3

Figura 1. Resultado do teste do MTT 95

Figura 2. Resultado do teste do MTT realizado com baixas concentrações..... 96

Figura 3. Resultado do teste de resazurina 97

Figura 4. Resultado do ensaio do azul de tripan..... 98

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1- Índice mitótico de células meristemáticas de *Allium cepa*..... 74

Tabela 2- Frequência de aberrações cromossômicas obtidas em células de meristema de radícula de *A. cepa*.....74

Tabela 3- Frequência de MNs na região F1 de raízes de *A. cepa*..... 76

Tabela 4- Frequência de MNs nas regiões meristemáticas e F1 de células de *Allium cepa* 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL – Microlitros

ABRASCO- Associação Brasileira de Saúde Coletiva

ACs – Aberrações cromossômicas

Al2O2 – Óxido de Aluminio

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – Adenosina tri fosfato

CCK-8 – *Cell Counting Kit – 8*

Cd – Cádmio

CN – Controle Negativo

CO2 – Dióxido de carbono

COM – Centros organizadores de microtúbulos

CP – Controle Positivo

Cr – Cromo

Cu- Cobre

DDT – Dicloroo-Difenil-Tricloroetano

DL50-Dose letal 50

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EC – Concentrado Emulsionável

EPIs – Equipamentos de Proteção Individual

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

HCL – Ácido clorídrico

IBAMA – Insituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Rescursos Naturais Renováveis

IM – Índice mitótico

IPI-Imposto de Produtos Industrializados

LDH – Lactato Desidrogenase

MEM – Meio Mínimo Essencial Eagle

mg – Microgramas

mL – Mililitros

MNs – Micronúcleos

NIH – National Institute of Enviromental Health

OC – Organoclorados

OF – Orfanofosforados

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONU –Organização das Nações Unidas

OPAS – Organização Pan Americana de Saúde

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

pH – Potencial Hidrogeniônico

Ppm- Partes por milhão

SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação

UNEP – Nações Unidas para o Meio Ambiente

USEPA – U.S. Environmental Protection Agency

WHO – World Health Organization

$ZnSO_4 7H_2O$ – Sulfato de zinco heptahidratado

SUMÁRIO

1. Introdução 17

2. Objetivos 21

3. Revisão de literatura 22

4. Materiais e métodos 31

4.1 Químico testado 31

4.2 Sistemas-testes e tratamentos 31

4.2.1 Bioensaios com bioindicadires vegetais 31

4.2.2 Teste de germinação com *Lactuca sativa* e com *Allium cepa* 31

4.2.3 Ensaio de citogenotoxicidade e mutagenicidade em células meristemáticas de *Allium cepa* 32

4.2.4 Ensaio do micronúcleo em células F1 de *Allium cepa* 33

4.2.5 Bioensaios com cultura de células (Linhagem HepG2/C3A) 33

4.2.5 Teste do MTT 33

4.2.6 Teste da Resazurina 34

4.2.7 Ensaio do Azul de tripan 35

5. Resultados 36

5.1 Artigo 1 37

5.2 Artigo 2 65

5.3 Artigo 3 89

6. Conclusões gerais 111

7. Referências 114

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. CONCLUSÕES GERAIS

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

- A espécie *A. cepa* mostrou ser indicada mais indicada para ser usada como *bioindicador* de fitotoxicidade do clorpirifós do que a espécie L. sativa, visto que as concentrações mais altas desse inseticida inibiram a germinação de *A. cepa* e nãode *L. sativa;*
- A fitotoxicidade do composto estudado foi comprovada pelo ensaio de enlogamento de radícula e hipocótilo de *L. sativa.* Nestes testes foi observado que quanto maior a concentração do herbicida, maior foi o efeito tóxico para o bioindicador;
- Os potenciais citogenotóxico e mutagênico do inseticida Clorpirifós foram avaliados pelo índice de germinação (IG), índice mitótico, índice de frequência de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos MN) em célula meristemática e F1;
- Foi observada uma redução significativa de IG para as concentrações C1, C2 e C3, indicando que essas concentrações foram fitotoxicidade para o bioindicadores testados. Pelos baixos IG de C1 e C2, não foi possível, se quer, obter material suficiente para prosseguir os testes com essas concentrações;
- As concentrações C4, C5 e C6 não apresentaram potencial fitotóxico, nem para *A. cepa* e nem para *L. sativa*;
- As análises de índice mitótico mostraram que as concentrações de C4 a C6 não apresentavam potencial mutagênico para o bioindicador *A. cepa;*
- O ensaio de AC, realizados com células meristemáticas de *A. cepa,* indicaram potencial genotóxico do clorpirifós para as concentrações C3, C4 e C5, comprovado pela presença significativa de brotos nucleares e MN. A presença de brotos está associada ao potencial aneugênico do agrotóxico;

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

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

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITARIA. **Índice Monográfico C20 – Clorpirifos.** portal.anvisa.gov.br: Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/C20%2B%2BClorpirif%25C3%25B3s.pdf/f8ddca3d-4e17-4cea-a3d2-d8c5babe36ae. Acesso em: 01 de dezembro de 2018>.

ANACLETO, L. R., ROBERTO, M. M., & MARIN-MORALES, M. A. **Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system Allium cepa**. Chemosphere v.173. p.31-42, 2017

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FUNKE, V, AM. **Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase mu1and theta1 in patients with acquired aplastic anemia: a Brazilian experience**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 29, n. 4, p. 340-341, 2007

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemos**. La formatión deintercâmbios entre cromátidas hermanas. Tese de Doutorado em Genética. Universidade de Complutense, Madrid, 1987

RAMOS, M. L. H., LIMA, V. DA S., SILVA, R. E. DA, NUNES, J. V. DO N., & SILVA, G. C. DA. **Perfil epidemiológico dos casos de intoxicação por agrotóxicos de2013 a 2017 no Brasil**. Brazilian Journal of Development, v. 6(7), p. 119, 2020

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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