

---

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

---

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E  
MUTAGÊNICOS DE 2 CLASSES DE AGROTÓXICOS UTILIZADOS EM  
CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR NO ESTADO DE SÃO PAULO-BRASIL**

**JAQUELINE BIANCHI AMBRÓSIO**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

**Rio Claro- SP  
Dezembro - 2012**

**JAQUELINE BIANCHI AMBRÓSIO**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E  
MUTAGÊNICOS DE 2 CLASSES DE AGROTÓXICOS UTILIZADOS  
EM CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR NO ESTADO DE SÃO PAULO-  
BRASIL**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia do Câmpus de Rio  
Claro, Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutor  
em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales

Rio Claro- SP  
Dezembro - 2012

*Ao meu marido Gustavo pelo  
companheirismo e compreensão  
durante todo o período de  
desenvolvimento deste trabalho*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida. Por me fazer compreender que tudo é possível quando acreditamos naquilo que desejamos. Por me mostrar que temos que viver um dia após o outro, sem medo do que está por vir.

Aos meus pais, Jorge e Marisa, pelo amor, compreensão e incentivo durante toda minha trajetória acadêmica. Obrigada por me apoiarem e estarem comigo nos momentos de alegrias, tristezas, dúvidas...

Agradeço especialmente à minha mãe por dispensar grande parte de seus dias cuidando exclusivamente do meu pequeno Gabriel todas as vezes que precisei. Sua ajuda foi essencial para que eu pudesse me dedicar integralmente a minha tese, nessa reta final.

A minha irmã Fernanda, pelo interesse que sempre demonstrou pelos meus assuntos do doutorado e por fazer me sentir útil sempre que me procura para auxiliá-la em seu trabalho de mestrado. Ao meu irmão Alexandre, pela tentativa incansável de me ajudar na compra da sonda para a técnica de FISH!

Ao meu marido Gustavo. Sem a sua compreensão e seu incentivo, teria sido muito mais difícil passar quatro anos viajando todos os dias para Rio Claro. Obrigada por entender todas as vezes que precisei ficar trabalhando até tarde e nos finais de semana! Obrigada por sempre me escutar, por tentar me animar nas horas de desânimo e cansaço e por estar sempre ao meu lado nos momentos de alegrias e indecisões. Muito obrigada também por cuidar com tanto carinho do nosso Gabriel...

À minha orientadora e amiga, professora Marin, pela orientação durante esses 10 anos de UNESP. Obrigada por ser um exemplo de pesquisadora e de pessoa. Agradeço também pelos conselhos, pelas boas conversas e pela paciência de sempre!

A todos os meus amigos da mutagênese: Márcia, Raquel, Dânia, Maria, Bruna, Nádia, Thais, Paulinha, Matheus, Laís, Yali, Cris, Lívia, Léo, Jana, Cintya. Trabalhar ao lado de vocês tornou meus dias muito mais divertidos! Obrigada pela amizade!

Agradeço especialmente a Raquel, a Dânia e a Márcia, por sempre me ajudarem com muita boa vontade nos testes com cultura de células. À Márcia, por sempre estar presente em todos

os ensaios do cometa e pelo “help” nas traduções de texto! À Thais, pela grande ajuda com as lâminas de cebola e ao Matheus, por me socorrer sempre que o computador dava problemas!

À amiga Dani Leme, pela sua valiosa amizade e pelas muitas ajudas no teste de Ames.

Aos amigos do Departamento de Biologia: Simone, Edson e Octávio, pela contribuição na técnica de hibridização *in situ*.

Aos professores do Instituto de Biociências: Dra. Patrícia Parise, Dr. Diogo Cavalcante, Dra. Sanae Kasahara, Dr. Mário Sérgio Palma, Dra. Dejanira de F. de Angelis e Dr. Marcos Pizano, pelas diferentes contribuições que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

A Cristiane Mileo, pela amizade e por toda sua ajuda com as figuras e pranchas.

Ao Dr. Sérgio Di Salvo, engenheiro da Bayer Cropscience, por ceder o inseticida imidaclopride.

À Profa. Dra. Franklina M. B. de Toledo, docente do Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação (ICMC/USP), pela sua contribuição na análise dos resultados dos ensaios com a GST.

À REPLAN, pelo apoio aos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Mutagênese Ambiental da UNESP de Rio Claro.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento desta pesquisa.

À todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo. Dentre os Estados brasileiros, São Paulo representa 60% de todo o açúcar produzido e 70% das exportações. Pela alta produção de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo e o conseqüente consumo elevado de agrotóxicos, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de baixas concentrações de dois agrotóxicos utilizados nesta cultura, o herbicida sulfentrazone e o inseticida imidaclopride, tanto em testes individuais quanto associados entre si. As avaliações foram feitas pelos testes de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN) em *Allium cepa*; teste do MN e ensaio do cometa em células HepG2; e teste de Ames com *Salmonella typhimurium*. Para melhor avaliar o modo de ação dos agrotóxicos, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda pan-centromérica foi associada ao teste do MN realizado com células HepG2. Os testes com *A. cepa* indicaram genotoxicidade para todas as concentrações de imidaclopride, após um período de recuperação de 48 horas. A maior indução de pontes e aderências cromossômicas sugeriu uma ação clastogênica para o inseticida. Esta hipótese foi confirmada nos testes com HepG2, pela técnica de FISH, uma vez que a maioria dos MN (76,6%) não apresentou sinal fluorescente, indicando presença de fragmentos cromossômicos. Para o herbicida sulfentrazone, foram observadas AC para todas as concentrações, considerando os diferentes tempos de tratamento. A indução de MN foi observada para a menor concentração, para todos os tempos de tratamento, sugerindo que os danos induzidos por essa concentração persistem ao longo do ciclo celular. A maior concentração testada do herbicida causou uma diminuição no índice mitótico das células, após recuperação de 72 horas. Este efeito pode estar associado à alta indução de aderências cromossômicas observadas. A mistura dos agrotóxicos induziu citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em *A. cepa*, mas os efeitos genotóxicos e mutagênicos foram minimizados após 72 horas de recuperação. As frequências de danos induzidos pela mistura de agrotóxicos, embora significativas, foram menores do que as induzidas pelos agrotóxicos testados isoladamente. Pelos ensaios realizados com as células HepG2 *in vitro*, o inseticida apresentou atividade genotóxica e mutagênica, enquanto que o herbicida mostrou atividade mutagênica, mas não genotóxica. A não correspondência entre o teste do MN e do cometa pode ter sido decorrente de três possíveis fatores: indução de perdas cromossômicas; elevado tempo de exposição das células ao herbicida; indução de *crosslinks*. A mistura dos agrotóxicos levou somente à indução de efeitos genotóxicos, mas sem detecção de indução preferencial de danos (quebras ou perdas cromossômicas). Pelo teste de Ames, não foi observado nenhum resultado significativo de mutagenicidade para o imidaclopride, para o sulfentrazone e para a mistura destes dois agrotóxicos.

**Palavras-chave:** imidaclopride, sulfentrazone, micronúcleo, cometa, aberrações cromossômicas, *Allium cepa*, HepG2.

## ABSTRACT

Brazil is the largest producer of sugarcane in the world. Among the Brazilian states, São Paulo represents 60% of all sugar produced and 70% of exports. Due to the high production of sugarcane in São Paulo state and the great pesticide consumption, this work investigated the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of low concentrations of two pesticides utilized in sugarcane culture: the herbicide sulfentrazone and the insecticide imidacloprid, both individually and combined. The evaluations were made by chromosome aberrations (CA) and micronucleus (MN) tests in *Allium cepa*, MN and comet assay in HepG2 cells and Ames test with *Salmonella typhimurium*. Associated to the MN test in HepG2 cells, the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technique with pan-centromeric probe was applied in order to better evaluate the mode of action of the agrochemicals. The tests with *A. cepa* indicated genotoxicity for all concentrations of imidacloprid, after a recovery period of 48 hours. The higher induction of bridges and chromosome stickiness suggests a clastogenic action for the insecticide. This hypothesis was confirmed in the tests with HepG2, by FISH, since most of the MN (76.6%) did not present fluorescent signal, indicating presence of chromosomal fragments. For the herbicide sulfentrazone, CA were observed in all concentrations, in the different treatment times. The induction of MN was observed for the lowest concentration for all the treatment times, suggesting that the damages induced by this concentration persist throughout the cell cycles. The highest concentration tested of the herbicide caused a decrease in the mitotic index of the cells after 72 hours recovery period. This effect may be associated with the high amount of induced chromosome stickiness. The mixture of pesticides induced cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity in *A. cepa*, but the genotoxic and mutagenic effects were minimized after recovery of 72 hours. Although significant, the frequencies of damages induced by the mixture were lower than of the induced by each pesticide singly. By the assays performed with the HepG2 cells *in vitro*, the insecticide presented mutagenic, but not genotoxic activity. The mismatch between the MN test and comet assay may have been due to three possible factors: induction of chromosome loss; elevated exposure time of the cells to the herbicide; induction of crosslinks. The mixture of pesticides just led to the induction of genotoxic effects. Yet, the mixture did not show induction of a predominant type of damage (chromosomal break or loss). By the Ames test no significant result of mutagenicity was observed, indicating that, although the other tests have disclosed mutagenic potential for imidacloprid and sulfentrazone, the Ames test does not constitute a sensitive test for the detection of this effect for these pesticides.

**Key-words:** imidacloprid, sulfentrazone, micronucleus, comet, chromosome aberrations, *Allium cepa*, HepG2.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução Geral .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos Gerais .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Objetivos específicos .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Revisão da literatura .....</b>	<b>4</b>
3.1 O uso de agrotóxicos no Brasil e a cultura de cana-de-açúcar.....	4
3.1.1 Herbicida Sulfentrazone .....	5
3.1.2 Inseticida Imidaclopride .....	9
3.2 Exposições à mistura de agrotóxicos .....	12
3.3 Organismos testes e ensaios utilizados para detecção de efeitos genotóxicos e mutagênicos de químicos ambientais .....	15
3.3.1 <i>Salmonella typhimurium</i> .....	15
3.3.2 <i>Allium cepa</i> .....	17
3.3.3 Cultura de células HepG2 .....	20
3.3.3.1 Ensaio do cometa .....	21
3.3.3.2 Teste do MN <i>in vitro</i> .....	25
3.3.3.3 Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente (FISH) .....	29
<b>4. Material e Métodos .....</b>	<b>35</b>
4.1 Materiais .....	35
4.1.1 Agrotóxicos .....	35
4.1.2 Controles positivos .....	36
4.1.3 Organismos testes .....	37
4.2 Métodos .....	37
4.2.1 Ensaio de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade com células meristemáticas e F <sub>1</sub> de <i>Allium cepa</i> .....	37
4.2.2 Ensaios <i>in vitro</i> com HepG2 .....	38
4.2.2.1 Teste de citotoxicidade com 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide – MTT .....	39
4.2.2.2 Teste do micronúcleo em células binucleadas .....	39
4.2.2.3 Ensaio do cometa .....	40
4.2.2.4 Técnica de Hibridização <i>in Situ</i> Fluorescente (FISH) .....	42
4.2.2.5 Teste para detecção da atividade da Glutathione-S-Transferase .....	43
4.2.3 Teste de Ames (Protocolo de Pré-Incubação) .....	43

<b>5. Resultados .....</b>	<b>45</b>
ARTIGO 1: Efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida imidaclopride, do herbicida sulfentrazone e da mistura destes dois agrotóxicos para células de <i>Allium cepa</i> .....	45
ARTIGO 2: Ação genotóxica e mutagênica de concentrações ambientais do inseticida imidaclopride, do herbicida sulfentrazone e da combinação destes dois agrotóxicos em células humanas <i>in vitro</i> e em <i>Salmonella typhimurium</i> .....	76
<b>6. Discussão e conclusões gerais .....</b>	<b>105</b>
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>108</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As substâncias químicas, em suas diferentes classes, contribuem, de modo geral, para o sucesso da espécie humana. É por meio delas que muitas doenças são curadas, que plantações são protegidas, que os alimentos são conservados, etc. No entanto, o mau uso destes diversos compostos pode também ser responsável pela contaminação do meio ambiente e pelo surgimento de doenças muitas vezes não perceptíveis em curto prazo.

De modo geral, as substâncias químicas geram resíduos que frequentemente são encontrados no meio ambiente. O descarte inadequado de efluentes (domésticos, industriais, hospitalares) ou mesmo o excesso de agrotóxicos aplicados em uma plantação, ao alcançarem o ambiente, podem causar sérios danos à biota associada. Estes resíduos podem ser encontrados no ar, na água e no solo. Quando as substâncias apresentam propriedades acumulativas nos organismos, seu efeito danoso pode se estender por toda a cadeia trófica e afetar a estrutura de uma comunidade.

Dentre as diversas substâncias passíveis de serem encontradas no meio ambiente, os agrotóxicos se destacam pelo seu grande uso. Os agrotóxicos são utilizados para controlar o aparecimento de espécies animais e vegetais indesejadas. Porém, esses agentes químicos não tem ação exclusiva sobre os organismos alvos, mas também sobre outros organismos eventualmente expostos a eles. Assim sendo, a preocupação quanto ao mau uso ou uso indiscriminado de agrotóxicos faz com que muitos estudos venham sendo realizados, para se estimar os reais efeitos que estes agroquímicos podem causar aos organismos e, assim, poder orientar a população em geral, sobre o perigo ao qual estão expostos.

Além da via direta de contaminação, pela própria exposição dos organismos aos agrotóxicos, temos ainda as vias indiretas, onde os organismos se expõem aos agrotóxicos por meio de ingestão de água e de alimentos contaminados. A água das chuvas também contribui, substancialmente, para o aporte destas substâncias para as águas subterrâneas e superficiais. Somado à contaminação ambiental, dada pelas aplicações de agrotóxicos feitas por meios de implementos agrícolas convencionais, temos ainda a aplicação por via aérea, que vem causando grandes preocupações à humanidade, por contaminarem, além dos solos, as partículas do ar, que podem ser transportadas por grandes distâncias e, assim, se caracterizar em um problema não só de ordem local, mas também regional. Um exemplo ecológico bastante relevante e atual, quanto aos problemas da aplicação aérea, é o caso de morte de abelhas que vem acontecendo em diferentes regiões do Brasil, em decorrência da aplicação de agrotóxicos em culturas onde elas são polinizadoras. Dentre os agrotóxicos mais relacionados com este problema, estão os que têm os princípios ativos imidacloprido, fipronil, tiametoxam

e clotianidina (LESSA, 2012). As abelhas são agentes polinizadores naturais de espécies vegetais e, portanto, intimamente ligadas com o sucesso reprodutivo e com a dispersão de espécies vegetais.

Além das espécies alvos e daquelas expostas ocasionalmente, a espécie humana também é afetada diretamente pelos efeitos nocivos dos agrotóxicos, principalmente os trabalhadores rurais envolvidos com a produção e aplicação destes produtos, que não fazem uso de equipamentos de proteção adequados. Alguns dos efeitos prejudiciais causados pela exposição aos agrotóxicos, muitas vezes não são percebidos de imediato, mas somente em longo prazo. Estes efeitos estão relacionados às características genotóxicas, mutagênicas e/ou carcinogênicas que alguns agrotóxicos possuem.

Quando os agrotóxicos ultrapassam a barreira celular e atingem o material genético dos organismos, eles podem levar ao aparecimento de lesões irreparáveis no DNA, como os eventos de mutação e câncer. Desta forma, o estudo e o conhecimento das lesões induzidas pelos agrotóxicos no DNA dos organismos, são peças fundamentais para que doenças genéticas resultantes da exposição aos agrotóxicos sejam tratadas e evitadas. Além das células somáticas, algumas classes de agrotóxicos podem também afetar as células germinativas e causar lesões que são transmitidas ao longo das gerações.

## 2. OBJETIVOS GERAIS

Frente ao exposto acima, este estudo teve o objetivo de avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de concentrações abaixo das recomendadas para uso em campo de dois agrotóxicos utilizados em cultura de cana de açúcar no estado de São Paulo-Brasil (herbicida Boral® e inseticida Evidence®), por meio de bioensaios com *A. cepa*, HepG2 e *Salmonella*.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- avaliar o efeito da associação dos dois agrotóxicos citados, quando aplicados concomitantemente, por meio de testes de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, em células de *A. cepa*, HepG2 e *Salmonella typhimurium*;
- identificar, por meio de testes com células meristemáticas de *A. cepa*, os tipos de AC possivelmente induzidas pelos agrotóxicos e avaliar a indução da formação de MN em regiões meristemáticas e em regiões F<sub>1</sub> de pontas de raízes deste organismo teste;
- avaliar a persistência dos danos causados pelos agrotóxicos estudados nas células de *A. cepa*, 48 e 72 horas após a exposição, por meio do teste de recuperação em água;
- verificar o potencial genotóxico e mutagênico dos agrotóxicos estudados em células de hepatoma humano (HepG2), por meio do ensaio do cometa e do teste do MN;
- caracterizar o modo de ação (clastogênica ou aneugênica) dos agrotóxicos testados, por meio de técnica específica de hibridização *in situ* (FISH), com sondas centroméricas, para verificação da presença ou ausência de centrômeros nos MN encontrados nas células HepG2;
- verificar o tipo de mutação possivelmente induzida pelos agrotóxicos estudados, por meio do teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (mutação por substituição de pares de bases do DNA ou por modificação no quadro de leitura);
- comparar a eficácia dos três sistemas-teste na detecção de danos genéticos induzidos por baixas concentrações de agrotóxicos;
- comparar a ação tóxica dos agentes testados em organismos diferentes (animal, vegetal e procarioto).

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 O uso de agrotóxicos no Brasil e no cultivo da cana-de-açúcar**

Apesar do crescimento da produtividade agrícola, proporcionado pela aplicação de defensivos agrícolas no campo (PERES; ROZEMBERG; LUCCA, 2005), o uso indiscriminado de agrotóxicos ao longo dos anos tem provocado o acúmulo de resíduos destes compostos na água, no solo e no ar. Dentre as 15.000 formulações existentes para 400 agrotóxicos diferentes, cerca de 8.000 delas estão licenciadas para uso no Brasil. Em 2008, o país tornou-se o maior consumidor mundial de agrotóxicos, ultrapassando os Estados Unidos que, até então, liderava o ranking mundial (PIMENTEL, 2012). A comercialização de agrotóxicos no Brasil tem aumentado anualmente, sendo registrado um acréscimo de 190% no consumo de agrotóxico para 2010, em relação a 2009. Na safra de 2010-2011, mais de um bilhão de litros de agrotóxicos foram usados na agricultura brasileira (GONÇALVES, 2012).

Segundo dados do Sistema de Informações para o Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo (SIGRH), o Estado ocupa a primeira colocação no ranking tanto de consumo nacional de agrotóxicos quanto de fabricação destes químicos (80% dos agrotóxicos produzidos no país). As culturas de soja, milho, citros e cana-de-açúcar consomem 66% do total de defensivos vendidos no Brasil (SIGRH, 2005). Como consequência desse grande consumo, cerca de 150.000 toneladas de agrotóxicos são lançados, anualmente, no território brasileiro (CRESTANA, 2000).

Os agrotóxicos podem contaminar os solos agrícolas por meio de três principais vias (volatilização, lixiviação e escoamento superficial), e quando são aplicados em uma cultura, cerca de 50 % da dose utilizada pode ficar adsorvida no solo. A contaminação do solo por meio da lixiviação tem sido apontada como a principal forma de impacto das águas subterrâneas. Um único evento de chuva pode gerar perdas de até 2% da dose de agrotóxicos aplicada (SIGRH, 2005). Esses resíduos alcançam o meio ambiente e podem ser responsáveis por inúmeros efeitos nocivos para o homem como, por exemplo, alterações no DNA (EVANS, 1985). Os agrotóxicos, de maneira geral, são considerados químicos potencialmente mutagênicos pela capacidade que possuem de induzirem mutação no material genético. Apesar de terem ação tóxica e seletiva contra certos organismos, uma seletividade absoluta é difícil de ser alcançada e, assim, a maioria dos agrotóxicos acaba também atingindo organismos não alvos (BOLOGNESI; MORASSO, 2000).

Estima-se que dois terços da população do Brasil estão expostos, em diferentes níveis, aos efeitos nocivos destes agentes químicos. Tal exposição pode ocorrer por meio ocupacional (PERES; ROZEMBERG; LUCCA, 2005), pela ingestão de água e comida contaminados

(FENSKE, 1997), bem como pelo ar e poeira que alcançam suas residências (HOPPIN et al., 2006).

Dentre as culturas de maior consumo de agrotóxicos no país, a de cana-de-açúcar se destaca pela sua ampla distribuição espacial (SPADOTTO; GOMES; RODRIGUES, 1998). Em 2002, esta cultura foi responsável por 11,5% das vendas de agrotóxicos no Brasil, atrás somente da soja (SINDAG *appud* ARMAS et al., 2005). Segundo dados da União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido pela Índia, Tailândia e Austrália. Em média, 55% da biomassa dos canaviais brasileiros são destinados à produção de álcool e 45% à produção de açúcar. O Estado de São Paulo é responsável por 60% de todo o açúcar produzido no país e por 70% das exportações nacionais. Das 307 centrais energéticas existentes no Brasil, 128 estão localizadas neste estado (UNICA, 2007, 2008). A atividade canavieira no país é responsável por cerca de um milhão de empregos diretos, sendo 400 mil desses só no Estado de São Paulo. Os empregos indiretos agregam uma quantidade de trabalhadores que excede a 1,2 milhão, apenas neste estado. A cana-de-açúcar, que reúne 6% dos empregos agroindustriais brasileiros, é responsável por 35% do PIB e de emprego rural do Estado de São Paulo (UNICA, 2007).

Pelo grande número de trabalhadores envolvidos na produção da cana-de-açúcar no Brasil, particularmente no estado de São Paulo, e pelo grande uso de agrotóxicos no setor, estima-se que grande parte destas pessoas se expõe aos efeitos nocivos de agroquímicos de maneira direta ou indireta.

Dentre os agrotóxicos utilizados na cultura de cana-de-açúcar, os herbicidas representam a classe de maior uso (ARMAS et al., 2005). No Brasil, o herbicida sulfentrazone é amplamente utilizado nesta cultura, para controle de plantas invasoras mono e dicotiledôneas (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998).

Com relação ao controle de insetos pragas, como os cupins e cigarrinhas, que comumente atacam a cana-de-açúcar, os inseticidas de ação sistêmica têm tido maior sucesso (PEREIRA; FERNANDES; VELOSO, 2010).

### 3.1.1 *Herbicida Sulfentrazone*

O herbicida sulfentrazone (N-[2,4-dicloro-5[4-difluorometil]-4,5-dihidro-3metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-il]fenil]metanosulfonamida – Figura 1) é usado em pré-emergência e tem ação sistêmica. Este herbicida pertence ao grupo das triazolinonas, é classificado como de nível toxicológico IV (pouco tóxico) e ambiental III (perigoso). Ele é altamente móvel e

persistente no ambiente e apresenta um alto potencial de lixiviação, tanto vertical quanto horizontalmente (EPA, 1997, MARTINEZ et al., 2008).

O sulfentrazona é substancialmente lixiviado para as águas subterrâneas, cujos resíduos são altamente persistentes nesses ambientes, por terem uma dissipação muito lenta (EPA, 1997). Assim, além da exposição pelo ar e pelos alimentos, a população também pode se expor a este herbicida pela água potável.

Sua ação tóxica para as plantas ocorre pela inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) na via de biosíntese da clorofila, acarretando em um acúmulo de compostos intermediários (WITKOWSKI; HALLING, 1989), que provoca uma rápida dessecação foliar das plântulas (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998).

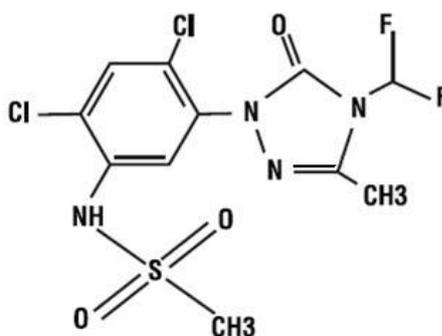


Figura 1 - Estrutura química do herbicida sulfentrazona

A PROTOX atua na oxidação da protoporfirinogênio, produzindo protoporfirinas IX, substâncias precursoras da clorofila nas plantas e do heme da hemoglobina de mamíferos. A clorofila e o heme possuem uma estrutura tetrapirrólica cíclica em comum, chamada porfirina. O último passo na biosíntese da porfirina é a oxidação da protoporfirinogênio em protoporfirina IX, que é realizada pela PROTOX. A protoporfirina IX é convertida em heme pela quelação do  $\text{Fe}^{2+}$  e convertida em clorofila pela quelação do  $\text{Mg}^{2+}$  (BEALE; WEINSTEIN, 1990; MATRINGE; MORNET; SCALLA, 1992). Em mamíferos, a PROTOX está localizada na mitocôndria (SMITH; MARSH; ELDER, 1993) e, nas plantas, esta enzima está localizada nos cloroplastos (MATRINGE; MORNET; SCALLA, 1992). A inibição da PROTOX acarreta em um acúmulo de protoporfirinogênio no cloroplasto e na mitocôndria das células, fazendo com que haja uma difusão desta substância para o citoplasma. No citoplasma, a protoporfirinogênio sofre oxidação por meio de uma reação não-enzimática, produzindo uma protoporfirina IX, que é diferente daquela produzida pela via normal (OLIVEIRA Jr., 2001).

A protoporfirina IX produzida no citoplasma não pode ser consumida na via de biosíntese de porfirina, porque a Fe e a Mg quelatase, proteínas que usam a protoporfirina IX como substrato, somente estão presentes na mitocôndria e no cloroplasto (ALSCHER; DONAHUE; CRAMER, 1997). Na presença de luz e oxigênio, a protoporfirina IX produz a forma reativa do oxigênio (oxigênio singlete), que é responsável pela peroxidação de proteínas e lipídeos das membranas celulares. Este ataque das espécies reativas de oxigênio sobre as células resulta em um rompimento das membranas celulares, fazendo com que as plantas adquiram aspecto clorótico, além de causar necrose e morte dos tecidos sensíveis (OLIVEIRA Jr., 2001).

Os metabólitos resultantes da metabolização do herbicida sulfentrazone (Figura 2) são similares em plantas e animais. O principal metabólito deste herbicida nas plantas é o hidroximetil sulfentrazone (EPA, 2003). Uma das vias de metabolização acontece por oxidação gradual do grupo metil no anel triazolinone. Primeiramente, o sulfentrazone é oxidado, formando o metabólito 3-hidroximetil sulfentrazone, que por nova oxidação deriva no metabólito 3-ácido carboxílico sulfentrazone (figura 2 A, B, C). Outras vias acontecem por desmetilação do anel triazolinone, formando o metabólito 3-desmetilsulfentrazone (figura 2D) e por aminação do grupo metila (DAYAN; WEETE; HANCOCK, 1996, DAYAN; ARMSTRONG; WEETE, 1998) do metanosulfonamida, formando um grupo diaminasulfúrico, característico do metabólito 5'-aminosulfentrazone (figura 2E). O 3-hidroximetil sulfentrazone e o 3-desmetilsulfentrazone são compostos menos tóxicos do que o produto original (DAYAN; ARMSTRONG; WEETE, 1998), sendo que o 3-hidroximetil é um metabólito intermediário, que é rapidamente oxidado em derivados do ácido carboxílico. O ácido carboxílico é um composto inativo ou que rapidamente se conjuga com formas inativas (DAYAN et al., 1997). De acordo com Theodoridis et al. (1992), o grupo metil na posição 3 do anel triazolinone é um radical essencial para a máxima atividade biológica do herbicida sulfentrazone. Foi verificado que a sua substituição por outros grupos químicos causa um decréscimo de cerca de 3 a 6 vezes na sua atividade biológica.

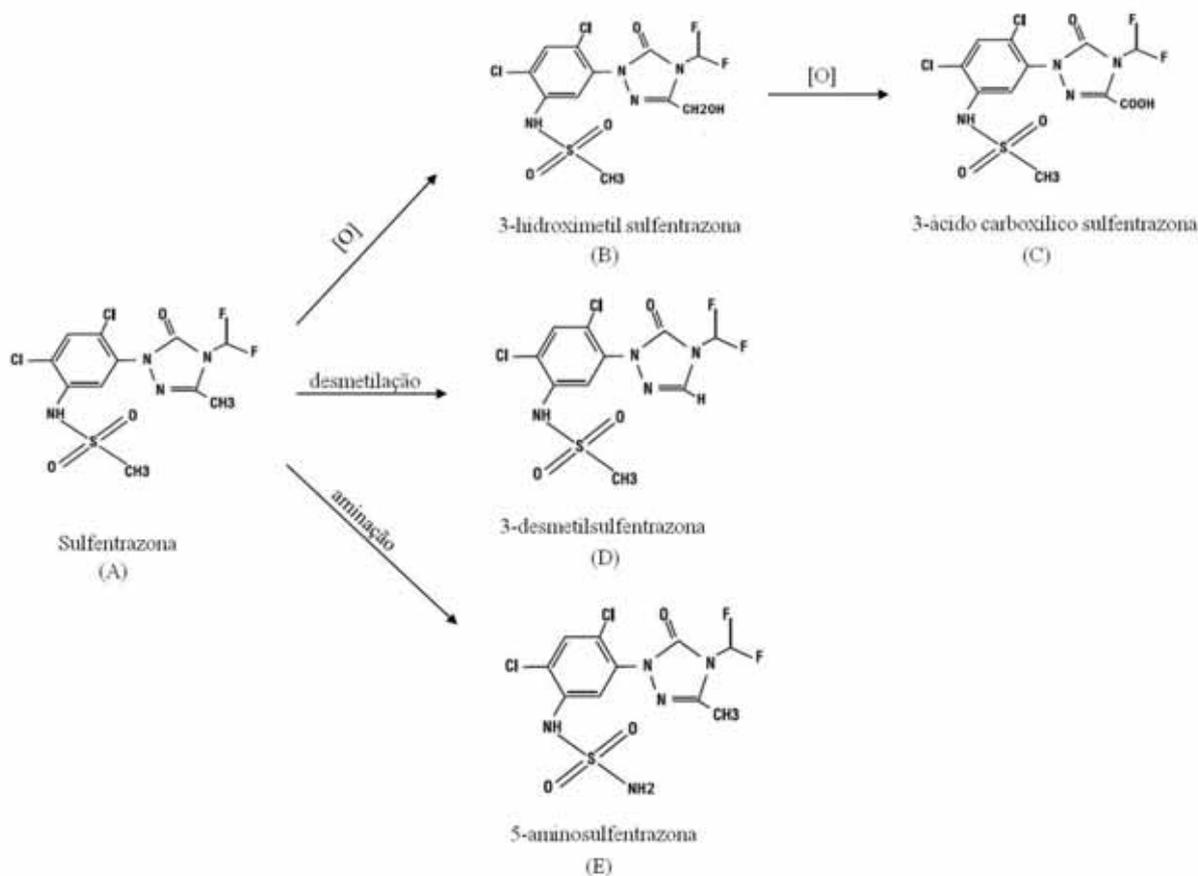


Figura 2 - Rota metabólica do herbicida sulfentrazone (DAYAN et al., 1996, 1998).

A toxicidade deste herbicida para mamíferos ainda é pouco descrita na literatura (KEGLEY; HILL; ORME, 2007). Ainda, segundo a EPA (2006), alguns estudos têm apontado um possível potencial mutagênico para este herbicida, porém, tais resultados foram considerados inconclusivos. Apesar de alguns estudos terem relatado a inexistência da indução de efeitos genotóxicos e carcinogênicos em ratos expostos ao sulfentrazone (EPA, 2006; CASTRO et al., 2007), têm sido observados efeitos teratogênicos (EPA, 2006).

O herbicida estudado no presente trabalho foi o sulfentrazone que, no Brasil, é comercializado com o nome de Boral<sup>®</sup>. Segundo a FMC Square (2006), o Boral<sup>®</sup> é indicado para o combate de tiriricas no cultivo de cana-de-açúcar. O herbicida foi introduzido no mercado em 1997 e, por esta razão, ainda pouco estudado, quanto à sua avaliação genotóxica e mutagênica. Uma vez que o sulfentrazone é considerado persistente no ambiente, somado ao seu alto potencial de lixiviação, existe uma grande necessidade de desenvolvimento de estudos que avaliem esta sua potencialidade genotóxica e mutagênica em organismos não-alvos.

### 3.1.2 Inseticida Imidaclopride

O inseticida imidaclopride (1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine –  $C_9H_{10}ClN_5O_2$ , Figura 3) constitui outro agrotóxico comumente utilizado em culturas de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. Este inseticida, pertencente ao grupo químico dos neonicotinóides, tem ação sistêmica e é indicado para eliminar cigarrinhas da parte aérea da cana-de-açúcar como também cupins da soca desta planta. Sua classificação toxicológica é de nível IV (pouco tóxico) e ambiental de nível III (perigoso). Tem alta mobilidade no solo, podendo atingir, principalmente, as águas subterrâneas (BAYER CROPSCIENCE Ltda, 2007).

Sua ampla utilização está relacionada à sua baixa toxicidade e por possuir ingrediente ativo (imidaclopride) pertencente a um novo grupo químico que apresenta um mecanismo de ação que vem ao encontro da necessidade de alternância de uso de produtos químicos (CORREIO AGRÍCOLA BAYER CROPSCIENCE Ltda, 2006).

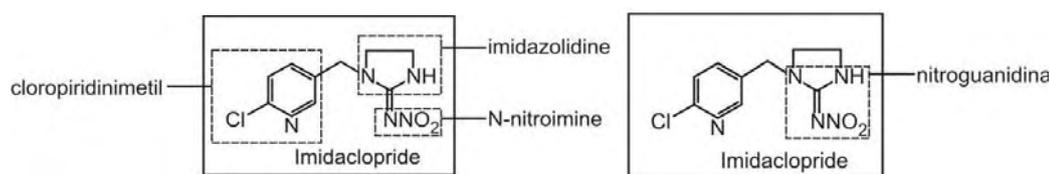


Figura 3- Estrutura química do inseticida imidaclopride

O imidaclopride age no sistema nervoso central do inseto, como um agonista do receptor acetilcolina nicotínico, presente tanto nos insetos quanto nos mamíferos (CHAO; CASIDA, 1997). Inicialmente, o imidaclopride causa uma estimulação nos neurônios, seguida por uma fadiga dos mesmos e uma interferência na transmissão dos impulsos nervosos (SCHULZ-JANDER; CASIDA, 2002; ZHANG et al., 2000; MATSUDA et al., 2000). Sua seletiva toxicidade para insetos e fraca toxicidade para mamíferos e outros vertebrados se dá por meio da alta especificidade para os diversos subtipos de receptores nicotínicos encontrados nos insetos e por sua pobre penetração na barreira hemato-encefálica dos mamíferos (SHEETS, 2001 a, b). No entanto, segundo Costa et al. (2009), o imidaclopride de formulação comercial possui substâncias como dimetilsulfóxido, metilpirrolidona, carbonato de propileno e óleo mineral, que podem alterar a sua biodisponibilidade e sua toxicidade para seres humanos expostos de forma ocupacional. Tais aditivos podem aumentar a toxicidade do inseticida, por aumentar sua absorção pelas membranas celulares.

Nos organismos, o imidaclopride pode seguir diferentes vias de metabolização biológica. A primeira consiste na hidroxilação do anel imidazolidine na posição 4 ou 5, formando o 4- e 5-hidroxi imidaclopride. A dessaturação do anel imidazolidine forma um metabólito insaturado, denominado olefin. A outra via consiste na redução e clivagem do nitroimina da nitroguanidina para formar nitrosoimine, guanidina e uréia (SCHULZ-JANDER; CASIDA, 2002) (Figura 4).

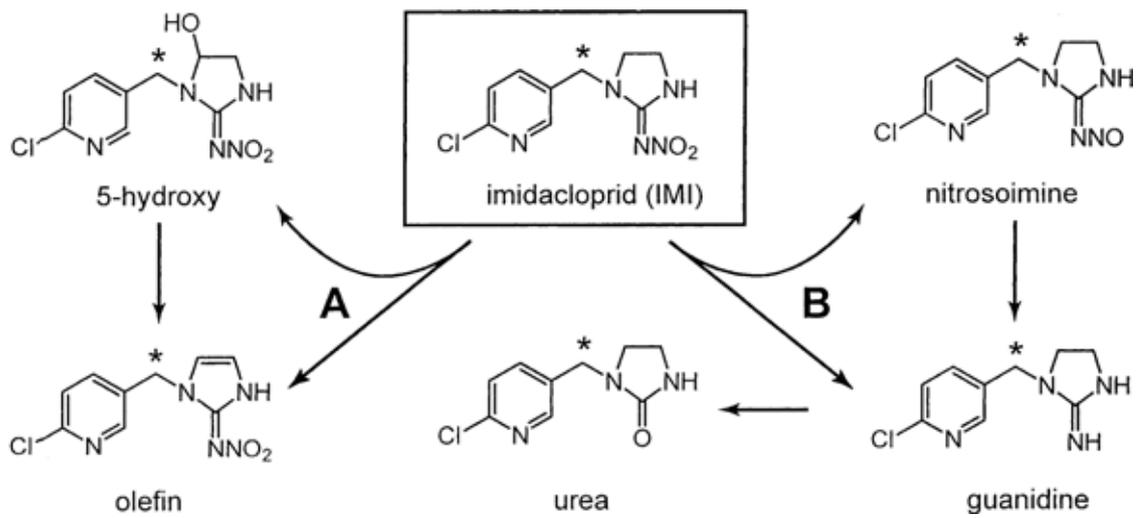


Figura 4 - Vias de metabolização do imidaclopride, proposta por Schulz-Jander; Casida (2002).

Segundo Klein (1987) e Sheets (2010), o imidaclopride pode apresentar outras rotas metabólicas, além daquela descrita por Schulz-Jander; Casida (2002), como a formação do ácido 6-cloronicotínico, pela clivagem oxidativa do imidaclopride. Nesta via, a imidazoilidine é excretada pela urina e a porção nicotínica é posteriormente degradada, por meio da conjugação pela glutatona, originando um derivado do ácido mercapturico e então um ácido metil mercaptonicotínico. Este último é conjugado com a glicina para formar um ácido hipurico conjugado que será excretado ou ainda ser reduzido em guanidina (Figura 5).

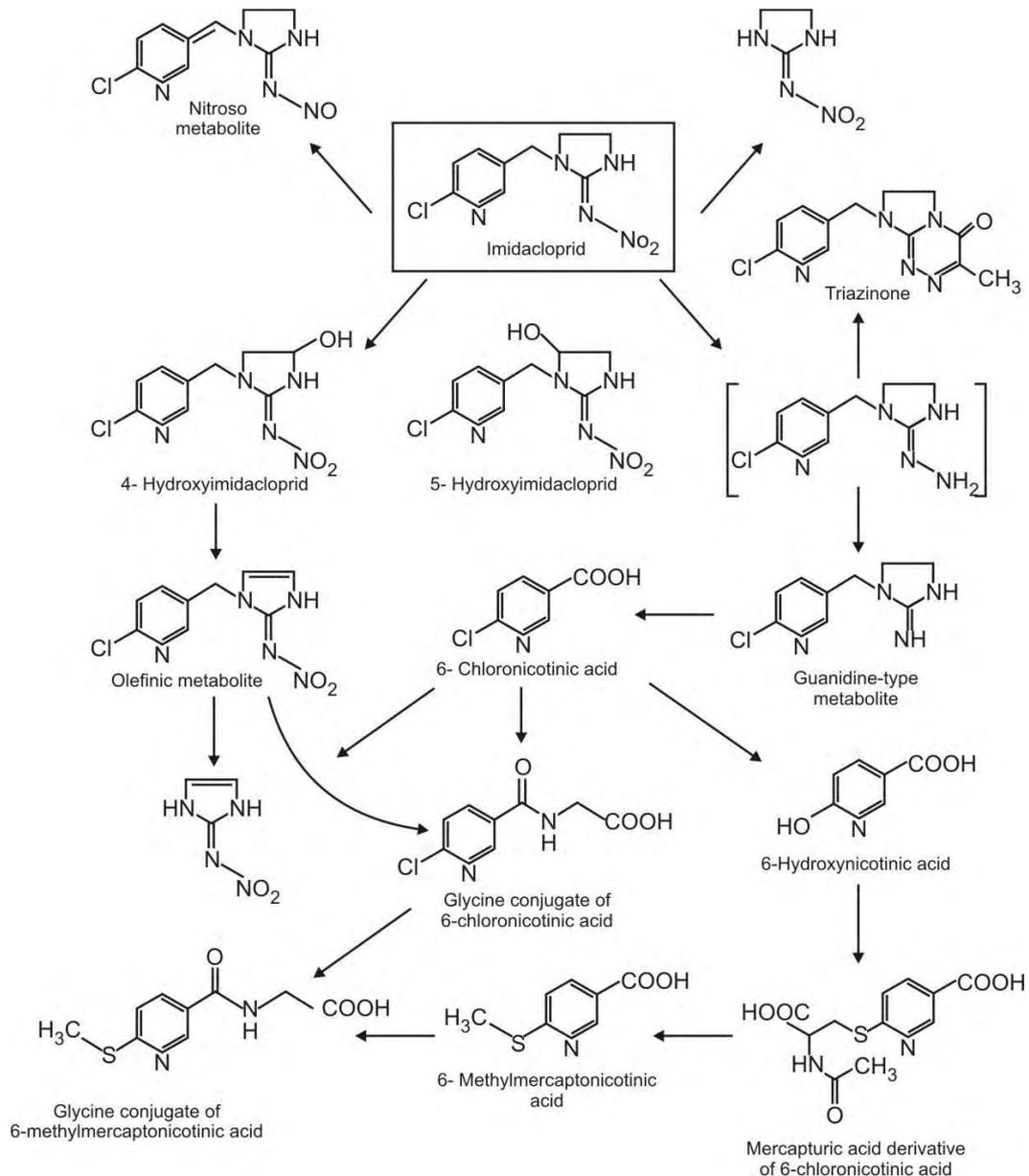


Figura 5 - Vias de metabolização do imidaclopride, proposta por Klein (1987).

As enzimas do citocromo P450 (CYP450), atuantes na fase I da metabolização das drogas, são responsáveis por parte do metabolismo do imidaclopride. Essas enzimas metabolizam o imidaclopride por meio da hidroxilação e desaturação da imidazolidina, formando 5-hidroxi (principalmente) e derivados da oleofina (menor quantidade). Também reduzem e clivam o substituinte nitroimina a metabólitos como o nitrosoimina, a guanidina e a uréia (SCHULZ-JANDER; LEIMKUEHLER; CASIDA, 2002, SCHULZ-JANDER; CASIDA, 2002). De acordo com Guengerich (1987); Ortiz de Montellano (1995); Parkinson (2001), Schulz-Jander; Casida (2002); Schulz-Jander, Leimkuehler e Casida (2002) e Dick, Kanne e Casida (2005), as reações iniciadas pela hidroxilação do carbono são catalisadas,

provavelmente, pelo citocromo P450 (CYP450), enquanto que as reações envolvendo a nitroredução ou a oxidação secundária da amina, podem ser catalisadas tanto pelo CYP450, como pela flavina monooxigenase (FMO) ou pelas aldeído oxidases citosólicas (AOX).

Dada a possibilidade de interação do inseticida imidaclopride com organismos não-alvos, como os mamíferos e outros vertebrados, existe a necessidade da realização de estudos que visam avaliar os efeitos nocivos deste produto sobre o material genético destes organismos. O imidaclopride estudado no presente trabalho foi o inseticida Evidence® (Bayer CropScience, 480 SC). Este inseticida foi introduzido recentemente no mercado brasileiro, uma vez que o seu desenvolvimento, pela Bayer CropScience, começou no início dos anos 2000 (CORREIO AGRÍCOLA BAYER CROPSCIENCE LTDA, 2006).

Especula-se que o inseticida imidaclopride leve à indução de efeitos no DNA das células, por atuar como um agente alquilante. A característica alquilante de um composto está relacionada, segundo Jansen et al. (1994) e Benigni, Palombo e Dogliotte (1992), à sua eletronegatividade, que faz com que ele se torne altamente reativo com os sítios do DNA ricos em elétrons. Os neonicotinóides, como o imidaclopride, possuem um farmacóforo eletronegativo (eletrofílico), chamado N-nitroimine substituinte (=NNO<sub>2</sub>), localizado na sua porção nitroguanidina (TOMIZAWA; LEE; CASIDA, 2000, TOMIZAWA et al., 2003). De acordo com Schwartz (1989) e Sanderson; Shield (1996), os agentes alquilantes bi e trifuncionais podem induzir danos de origem clastogênica nas células. Em um trabalho realizado por Karabay; Oguz (2005) com eritrócitos de ratos expostos ao imidaclopride, os autores associaram a indução de micronúcleos (MN) e de aberrações cromossômicas (AC) como perdas, quebras e aderências cromossômicas, ao potencial clastogênico deste inseticida.

### **3.2 Exposições à mistura de agrotóxicos**

Os seres vivos estão expostos a pequenas quantidades de uma grande variedade de compostos químicos que são encontrados simultaneamente no meio ambiente. Dentre esses compostos, muitos estão incluídos na classe dos agrotóxicos e, segundo Olgun et al. (2004), a exposição de seres humanos aos diferentes tipos desses químicos, ocorre, mais comumente, pelas baixas concentrações. Apesar da grande preocupação existente acerca da exposição dos seres humanos aos agrotóxicos, existem poucos estudos que avaliam o modo pelo qual as misturas de agrotóxicos afetam o homem (DAS; SHAIK; JAMIL, 2007).

A exposição a misturas de agrotóxicos pode ocorrer de modo ocupacional ou acidental (DEMSIA et al., 2007). De acordo com Bolognesi (2003), a exposição ocupacional aos

agrotóxicos envolve uma exposição a misturas complexas de diferentes tipos de químicos, ingredientes ativos e outros produtos da sua formulação, como impurezas e solventes. Assim como a exposição ocupacional, a exposição ambiental dos organismos não-alvos aos agrotóxicos ocorre, na maioria das vezes, não pelo contato com compostos isolados, mas pelo contato com uma mistura de agrotóxicos que apresentam quantidades significantes de compostos genotóxicos. Assim, segundo Das, Shaik e Jamil (2007), é importante analisar os efeitos citotóxicos e genotóxicos dos agrotóxicos mais comumente usados nas áreas agrícolas, para uma avaliação apropriada do risco a que os organismos estão expostos.

Certos agrotóxicos são capazes de interagir quimicamente quando combinados em misturas, sendo que, muitas vezes, o metabolismo de um acaba interferindo no metabolismo do outro (BELDEN; LYDY, 2000). Tais interações entre estes compostos químicos podem levar a diferentes efeitos nos organismos vivos. De acordo com Hodgson (1999), a interação entre os agrotóxicos pode levar a efeitos de ação aditiva, sinérgica ou antagonista. Estas interações podem ocorrer durante a absorção, a distribuição, o metabolismo, ou em sítio de ação tóxica e excreção do composto.

Ainda segundo Hodgson (1999), o efeito aditivo requer mecanismos de ação independente ou que não haja interferência da ação de um dos tóxicos sobre o outro, o que pode mascarar a ação de outro tóxico da mistura. O efeito sinérgico requer que as diferentes substâncias interajam no mesmo ponto de uma mesma molécula, de uma enzima ou de um receptor. Segundo Nash (1967), Marking (1985), Berenbaum (1981) e Calabrese (1999), o efeito aditivo ocorre quando a toxicidade total, resultante da combinação de dois ou mais agrotóxicos, é igual à soma dos efeitos de toxicidade induzida por cada produto isoladamente (a resposta é exatamente igual ao esperado). O efeito sinérgico ocorre quando a toxicidade total, resultante da combinação de dois ou mais agrotóxicos, é maior do que a soma dos efeitos de toxicidade induzida por cada produto isoladamente (a resposta é maior que o efeito aditivo) e o efeito antagonístico ocorre quando a toxicidade total é menor do que a toxicidade induzida por cada produto isoladamente (a resposta é menor que o efeito aditivo). De acordo com McCarty; Borgert (2006), existem vários modelos para se determinar a interação entre os compostos tóxicos. No entanto, o modelo mais simples, que consiste nas relações “menor que aditivo (antagonismo), aditivo, e maior que aditivo (sinérgico)” é, atualmente, considerado o melhor, uma vez que modelos mais sofisticados exigem o conhecimento dos mecanismos dos efeitos tóxicos e interações tóxicas que normalmente não se encontram disponíveis facilmente na literatura.

Pela frequente exposição dos seres humanos a misturas complexas de agrotóxicos, torna-se difícil atribuir um dano genotóxico a um composto em particular (GARAJ-VRHOVAC; ZELJEZIC, 2002, BOLOGNESI, 2003). Por isso, estudos realizados *in vitro*, com diferentes organismos e tipos celulares, têm sido incentivados para se avaliar o efeito genotóxico de diferentes classes de agrotóxicos isoladamente e também quando em associações, permitindo inferir ações específicas para cada composto estudado e predizer sua ação nos seres humanos.

Vários estudos *in vitro* têm sido realizados com o objetivo de avaliar os efeitos causados pela mistura de diferentes agrotóxicos (BIANCHI-SANTAMARIA et al., 1997; SABALIUNAS et al., 1998). Dolara et al. (1992) verificaram, em linfócitos humanos, uma indução significativa de trocas entre cromátides irmãs, quando as células foram expostas a uma mistura de quatro diferentes agrotóxicos. No entanto, os autores não encontraram nenhum resultado relevante quando os agrotóxicos foram analisados isoladamente. Já em estudos realizados por Olgun et al. (2004), os autores constataram que os efeitos citotóxicos (indução de necrose e apoptose) induzidos pela mistura dos inseticidas lindane (organoclorado), malation (organofosforado) e permethrin (piretróide sintético) em timócitos de roedores, foram significativamente maiores do que os efeitos induzidos por cada um dos inseticidas testados isoladamente. Segundo os autores, a indução de enzimas oxidases de função mista, desencadeada pelo lindane, pode ter sido responsável, em parte, pela ativação metabólica do segundo inseticida, levando a um aumento da toxicidade total e confirmando que certos químicos podem interferir no metabolismo de outros. Das, Shaik e Jamil (2007) avaliaram, por meio dos ensaios do cometa e de AC, a genotoxicidade do carbofuran (carbamato), do monocrotophos (organofosforado) e do endosulfan (organoclorado). Os autores verificaram que concentrações muito baixas da mistura destes três agrotóxicos podem levar a uma maior indução de AC e de danos no DNA, do que concentrações mais altas dos agrotóxicos testados individualmente.

Key et al. (2007) avaliaram os efeitos tóxicos do inseticida fipronil (phenyl pyrazole), do herbicida atrazina (triazine) e do imidaclopride (chloronicotinyl nitroguanidine) em larvas de camarão (*Palaemonetes pugio*) e verificaram que, isoladamente, o fipronil e o imidaclopride possuem efeito tóxico sobre as larvas, ao contrário do verificado para a atrazina. Combinações binárias destes três agrotóxicos não demonstraram efeitos tóxicos aditivos, mas quando a atrazina foi adicionada à mistura fipronil/imidaclopride, houve indução de uma toxicidade aditiva muito superior.

A análise da genotoxicidade do inseticida imidaclopride (chloronicotinyl nitroguanidine) e do fungicida metalaxyl (benzenoid), em cultura de linfócitos humanos e em medula óssea de ratos, em testes *in vivo*, não demonstrou um efeito genotóxico claro. Porém, quando estes agrotóxicos foram misturados, foi observada uma diferença significativa na indução de trocas de cromátides irmãs nos linfócitos humanos e de MN nas células da medula óssea dos ratos e nos linfócitos humanos, indicando um possível efeito sinérgico desses dois compostos (DEMSIA et al., 2007).

Algumas misturas de agrotóxicos podem não apresentar comportamento sinérgico ou aditivo. Bianchi-Santamaria et al. (1997) testaram a genotoxicidade de um carbamato (benomyl) e de quatro organofosforados (azinphos-methyl, diazinon, dimethoate, pirimiphos-methyl) isoladamente e em mistura. Os autores verificaram um fraco efeito genotóxico para o carbamato e para três dos organofosforados testados (exceto pirimiphos-methyl). Após a mistura de dois, três e cinco agrotóxicos, os efeitos observados foram os mesmos, indicando ausência de interação para as combinações destes químicos.

### **3.3 Organismos testes e ensaios utilizados para detecção de efeitos genotóxicos e mutagênicos de químicos ambientais.**

Diferentes organismos testes podem ser utilizados para avaliar o potencial de indução de danos genéticos por diferentes substâncias químicas lançadas no ambiente. Os organismos testes utilizados são bastante variáveis e incluem desde espécies vegetais e representantes procariotos, como as bactérias, até representantes da classe dos mamíferos, como amostras de células humanas. O uso de cada organismo teste em específico varia de acordo com o objetivo de cada trabalho.

#### *3.3.1 Salmonella typhimurium*

O uso de bactérias em testes de mutagenicidade constitui um método eficiente para detectar, de maneira rápida, mutações genéticas associadas a alterações no crescimento desses microrganismos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Como representante do grupo que inclui as bactérias, a espécie *Salmonella typhimurium* é uma das mais conhecidas e utilizadas para identificação de compostos químicos com potencial mutagênico.

O teste de mutagenicidade, que utiliza a *S. typhimurium* é conhecido como teste de Ames ou *Salmonella typhimurium*/microsome assay. Este teste utiliza diferentes linhagens de *Salmonella* derivadas da parental LT2, com mutações preexistentes que as tornam incapazes de sintetizar histina e, portanto de crescer em meio de cultura com ausência deste aminoácido,

que é essencial para o seu crescimento e formação de colônias. Novas mutações nos genes do operon da histidina, induzidas pelo mutágeno, fazem com que o gene da bactéria recupere sua função de sintetizar histidina e, conseqüentemente, de crescer e formar colônias. As linhagens de *Salmonella* utilizadas no teste de Ames possuem diferentes mutações em vários genes do operon da histidina que respondem à mutágenos que agem por diferentes mecanismos (ZEIGER, 1999, MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Ainda, as linhagens apresentam características genéticas adicionais (mutação *rfa*, deleção *uvrB*, plasmídeo pKM101, plasmídeo pAQ1, plasmídeo pYG233) que as tornam mais sensíveis na detecção de agentes mutagênicos (MARON; AMES, 1983, HAGIWARA et al., 1993, UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

Os tipos de mutações detectadas pelo teste de Ames incluem deslocamento do quadro de leitura (linhagens TA97a, TA98, TA1537, TA1538) e substituição de pares de base no DNA (linhagens TA100, TA102, TA104, TA1535). Segundo Umbuzeiro; Vargas (2003), as linhagens comumente utilizadas para estudos de triagem de agentes mutagênicos são a TA98 e a TA100. No entanto, a bateria mínima de linhagens para análise de compostos para fins regulatórios incluem as linhagens TA98, TA100, TA97a ou TA1537 e, usualmente, TA1535 ou TA102 (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Séries adicionais de linhagens foram desenvolvidas para fins específicos como a TA98NR e a TA100NR (deficientes em nitroreductase clássica), a TA98 1,8DNP<sub>6</sub> e TA100/1,8DNP<sub>6</sub> (deficientes em O-acetiltransferase), a YG1021 e YG1026 (com alta produção de nitroreductase clássica) e a YG1024 e YG1029 (com alta produção de O-acetiltransferase). As linhagens YG apresentam maior sensibilidade para nitrocompostos como os nitroarenos e as aminas aromáticas (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

As bactérias, ao contrário dos mamíferos e outros vertebrados, são incapazes de metabolizar compostos químicos via citocromo P450. Desta forma, para que o teste de Ames seja eficiente para detecção de mutagenicidade de diferentes compostos que necessitam de ativação metabólica para exercer efeito mutagênico, o teste é realizado na presença de um sistema metabólico exógeno derivado de mamíferos (MALLING, 1971; AMES et al., 1973), constituído de um homogenato de células do fígado de rato Sprague-Dawley, pré tratado com a mistura bifenil policlorinada (Araclor 1254) (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

O teste de Ames é utilizado mundialmente como uma ferramenta inicial para se determinar o potencial mutagênico de novos químicos, devido ao seu alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores, quando uma resposta mutagênica é obtida (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Com todos estes avanços e bons resultados obtidos com o teste de Ames, ele

foi incluído como parte da bateria de ensaios internacionalmente propostos para registro de medicamentos, outras drogas e formulações químicas, incluindo substâncias ou misturas com ampla utilização na agricultura (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). Além disso, esse teste também pode ser utilizado para detecção de mutagenicidade de químicos e misturas ambientais, alimentos, agentes físicos (CLAXTON; UMBUZEIRO; DE MARINI, 2010), produtos químicos naturais, sintéticos, fitoterápicos (SBMCTA, 2004), bem como para avaliar a qualidade do ar, do esgoto, de sedimentos, efluentes do processo industrial, água para consumo humano, tecidos animais e solos (JARVIS et al., 1996).

### 3.3.2 *Allium cepa*

O uso de vegetais como organismo teste para detecção de genotoxicidade/mutagenicidade tem sido validado por várias agências ambientais, como o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), a Organização Mundial da Saúde (WHO) e Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) (SRIVASTAVA; MISHRA, 2009, YÜZBASIOGLU; ÜNAL; SANCAK, 2009, LIMAN et al., 2010, LAUGHINGHOUSE et al., 2012). O Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) validou os ensaios realizados com plantas para monitoramento ambiental e para testes em laboratório para detecção de genotoxicidade de poluentes ambientais, incluindo os testes de aberração cromossômica e micronúcleo em *Allium* e *Vicia*, e o teste do micronúcleo e do pelo estaminal em *Tradescantia* (GOPALAN, 1999).

As plantas constituem membros essenciais do ecossistema e apresentam maior sensibilidade ao estresse ambiental, quando comparadas com outros sistemas testes disponíveis (MA; GRANT; DE SERRES, 1997; MA, 1994; GRANT, 1994). Desta forma, os ensaios com plantas podem servir como o primeiro alerta para a presença de contaminantes ambientais presentes na água, no ar e no solo (GOPALAN, 1999).

Quando comparados com outros sistemas testes, como os animais e os microrganismos, os testes genéticos com vegetais superiores destacam-se pela sua alta sensibilidade (apresentam poucos falsos negativos), baixo custo e facilidade de execução (GRANT, 1994). Além disso, os cromossomos das plantas apresentam uma similaridade morfológica com os cromossomos dos animais, bem como uma similaridade nas respostas aos mutágenos (RADIC' et al., 2010). Tais características fazem destes organismos, excelentes modelos genéticos para detectar agentes de ação mutagênica em diferentes ambientes (LEME; MARIN-MORALES, 2009). De acordo com Grant (1994), a alta sensibilidade das plantas aos mutágenos as tornam capazes de avaliar vários *endpoints* genéticos que vão desde mutações

pontuais até aberrações cromossômicas, tanto em células individuais como em estruturas como folhas, pólen e endosperma.

Segundo Turkoglu (2012), algumas espécies de plantas utilizadas em ensaios de monitoramento ambiental, apresentam respostas mais eficazes do que outras. O gênero *Allium*, especialmente a espécie *Allium cepa*, tem mostrado grande eficiência nestes estudos, principalmente quando usada para detecção de aberrações e testes genéticos (LIMAN et al., 2010; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; YILDIZ; ARIKAN, 2009; SAXENA; GUPTA; MURTHY, 2010).

Dentre as plantas utilizadas para avaliar a contaminação ambiental, destacam-se as espécies *A. cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays* e *Nicotiana tabacum* (GRANT, 1994). Quando comparada com a *N. tabacum*, a espécie *A. cepa* apresentou maior sensibilidade na detecção dos efeitos de mutágenos de ação direta e indireta. Segundo os autores do trabalho, a maior sensibilidade de *A. cepa*, principalmente aos efeitos induzidos pelo etilmetano sulfonato (EMS), está relacionada à organização de seu genoma, mais especificamente ao nível de condensação da cromatina, que reflete a proporção heterocromatina/eucromatina, podendo influenciar as respostas aos mutágenos (BANDYOPADHYAY; MUKHERJEE, 2011).

A espécie *A. cepa* tem sido considerada bastante favorável para avaliar os danos cromossômicos e os distúrbios no ciclo mitótico induzidos por agentes tóxicos. Este vegetal apresenta certas vantagens citogenéticas como cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n=16$ ) (LEVAN, 1938), germinação rápida e fácil disponibilidade. Além disso, este sistema requer condições laboratoriais simples para o desenvolvimento de testes citogenéticos (BANDYOPADHYAY; MUKHERJEE, 2011). Devido às suas características cromossômicas favoráveis, as células de raiz de cebola são frequentemente utilizadas para avaliar uma grande variedade de parâmetros morfológicos e citogenéticos, indicadores de toxicidade, bem como a indução de aberrações cromossômicas e micronúcleos (RANK; NIELSEN, 1994, LEME; MARIN-MORALES, 2009).

O ensaio de aberrações cromossômicas em raízes de *A. cepa* constitui um dos testes vegetais validado pelo Programa Internacional em Segurança Química (IPCS, WHO) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), devido à sua eficiência e boa padronização em testes de triagem química e monitoramento *in situ*, para detecção de genotoxicidade de substâncias encontradas no meio ambiente (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

Estudos realizados por diferentes autores indicaram que os ensaios com *A. cepa* também se destacam pela boa correlação que apresentam com os resultados obtidos por outros sistemas testes (mamíferos e não mamíferos) (GRANT 1982; CONSTANTIN; OWEN, 1982;

CHAUHAN; SAXENA, GUPTA, 1999; NILÜFER et al. 2008). Em testes de citotoxicidade, utilizando *A. cepa* (*in vivo*) e modelos animais *in vitro*, também foram observadas, por diferentes pesquisadores, respostas celulares semelhantes (VICENTINI et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2003; LUBINI et al., 2008).

De acordo com Tedesco; Laughinghouse (2012), *A. cepa* é considerado um excelente modelo *in vivo* para detectar ação de agentes genotóxicos e mutagênicos, e por possibilitar que os danos induzidos no DNA dos eucariotos possam ser preditos e extrapolados para outros animais e plantas. Além disso, para El-Shahaby et al. (2003), a espécie *A. cepa* também é utilizada como um importante indicador para a saúde humana.

Os resultados do teste com *A. cepa* podem indicar a presença de substâncias citotóxicas, genotóxicas e/ou mutagênicas no ambiente, que representam riscos diretos ou indiretos a todos os organismos vivos (EL-SHAHABY et al., 2003). Dentre a grande variedade de poluentes ambientais, detectados pelos testes com *A. cepa*, destacam-se os metais pesados, os agrotóxicos, os hidrocarbonetos aromáticos e as misturas complexas de poluentes (GRANT, 1982, MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004, FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007, VENTURA; DE ANGELIS; MARIN-MORALES, 2007, LEME; MARIN-MORALES, 2008, LEME; MARIN-MORALES, 2009). Segundo estudos realizados por Kumari, Mukherjee e Chandrasekaran (2009), a espécie *A. cepa* constitui também um bom indicador de citotoxicidade e genotoxicidade de nanopartículas de prata e, por esta característica, deveria ser incluída em testes que avaliam o destino, transporte e exposição de nanopartículas encontradas no meio ambiente.

O sistema teste de *A. cepa*, além de indicar os efeitos genotóxicos e mutagênicos de substâncias que agem diretamente no DNA, também pode ser utilizado, com eficiência, para avaliar os efeitos de substâncias que agem indiretamente sobre os organismos, como, por exemplo, o benzo[a]pireno e outros hidrocarbonetos policíclicos que necessitam ser metabolizados por um conjunto de enzimas para exercerem seus efeitos genotóxicos sobre as células (FISKESJÖ, 1981a).

Segundo Vig (1978) e Plewa (1978), as plantas possuem capacidade de ativar promutágenos, podendo metabolizar muitos compostos tóxicos por oxidação, transformação e conjugação e compartimentalizar estes produtos nos seus tecidos (LAMOUREX; RUSNESS, 1986). Os principais sistemas enzimáticos que atuam na ativação de promutágenos em plantas parecem estar envolvidos, segundo Stiborova; Anzenbacher (1991), com a monooxigenação, peroxidação e conjugação. Similarmente aos animais, as plantas possuem múltiplas enzimas do citocromo P450, que catalisam uma grande variedade de reações oxidativas

(DONALDSON; LUSTER, 1991). No entanto, o citocromo P450 das plantas exibe uma variedade altamente restrita de especificidade a substratos (PLEWA; WAGNER, 1993).

### 3.3.3 Cultura de células HepG2

Culturas de células de mamíferos também são utilizadas, com sucesso, nos estudos de avaliação da mutagenicidade de diversas substâncias. Estes testes apresentam vantagens pela facilidade na padronização das condições do ensaio e pela organização do material genético assemelhar-se às células *in vivo* (RABELO-GAY; RODRIGUEZ; MONTELEONE-NETO, 1991). As culturas de células de mamíferos também têm sido utilizadas em testes ambientais para avaliação de risco, tanto para investigar a ação de substâncias carcinogênicas como em testes de monitoramento ambiental (RUSSELL et al., 1984; PURCHASE et al., 1978). Os sistemas utilizados incluem células isoladas em suspensão, cultura de células primárias, linhagens celulares e co-culturas (NAJI-ALI et al., 1994).

Segundo Kirkland et al. (2007), resultados de testes *in vitro* utilizando células de mamíferos geralmente apresentam alta frequência de falsos positivos, quando comparados com os resultados de carcinogenicidade realizados com roedores *in vivo*. Vários pesquisadores têm relacionado tais resultados com a deficiência nos processos de metabolização apresentados pelas células *in vitro*, uma vez que variações nas expressões de enzimas que atuam na metabolização de xenobióticos podem interferir nos resultados obtidos *in vitro* (WESTERINK; STEVENSON; SCHOONEN, 2008, UNO et al., 2009).

Como muitos compostos necessitam de ativação metabólica para exercerem sua atividade sobre as células, a capacidade de metabolização da célula utilizada em testes de genotoxicidade tem importância fundamental para uma interpretação correta dos resultados (AUDEBERT et al., 2010). Desta forma, muitos pesquisadores têm utilizado células derivadas do fígado para realização de testes de genotoxicidade. As células em suspensão e as culturas primárias de hepatócitos foram, por muito tempo, os principais modelos utilizados, já que essas células mantêm grande parte de sua capacidade metabólica por vários dias, quando cultivadas *in vitro* (BLAABOER et al., 1985). No entanto, além das dificuldades no preparo e manutenção de culturas primárias de hepatócitos, as alterações fenotípicas e o baixo índice de divisão destas células, *in vitro*, acabaram limitando seu uso em grande escala.

Como uma alternativa ao uso de hepatócitos normais, as células HepG2 (hepatocarcinoma derivado do fígado humano) têm sido apontadas por diferentes autores como sendo adequadas para utilização em testes de genotoxicidade *in vitro* (KASSIE; KNASMÜLLER, 2000, KNASMÜLLER et al., 1998, SALVADORI; RIBEIRO;

NATARAJAN, 1993). As células HepG2 possuem enzimas de fase I e fase II do processo de metabolização de xenobióticos (WESTERINK; SCHOONEN, 2007a, WESTERINK; SCHOONEN, 2007b, JIN et al., 2009); se mantêm altamente diferenciadas em cultura; retém a maioria das funções normais dos hepatócitos humanos (NAJI-ALI et al., 1994); possuem o gene supressor de tumor p53 (VOLLMER et al., 1999); além de características morfológicas e formato celular compatíveis com as células parenquimais do fígado (KNOWLES; HOWE; ADEN, 1980). De acordo com Song et al. (2012), as HepG2 são utilizadas com sucesso para prever o metabolismo, a citotoxicidade e a genotoxicidade de substâncias químicas.

Naji-Ali et al. (1994) indicam o uso de células HepG2 em ensaios para detecção de citotoxicidade e genotoxicidade de compostos conhecidos e de misturas complexas de poluentes e ainda sugerem que este sistema teste seja utilizado como uma ferramenta sensível para triagem de poluentes ambientais.

A utilização de células humanas na genética toxicológica permite também que os resultados sejam extrapolados para os seres humanos de uma forma mais precisa do que com o uso de outros organismos. Além disso, possibilita avaliações mais realistas dos efeitos de mutágenos e pró-mutágenos de diferentes agentes sobre a saúde humana (NAJI-ALI et al., 1994; KNASMÜLLER et al., 2004). Os testes comumente aplicados à cultura de células, para análise de efeitos genotóxicos e mutagênicos, incluem o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo. Segundo Westerink et al. (2010), alguns estudos tem mostrado que as células HepG2 são adequadas e aplicáveis em ensaios de genotoxicidade que utilizam estes dois testes.

Para que os efeitos citotóxicos, possivelmente induzidos pelas substâncias testes, não mascarem seus efeitos genotóxicos e mutagênicos, é recomendado que se faça, também, o teste do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Este teste de citotoxicidade é baseado na redução do sal tetrazolato pela enzima hidrogenase succínica, presente na mitocôndria das células. A redução do MTT, que só pode ser realizada por células viáveis, produz cristais de formazan. Estes cristais apresentam uma coloração violácea, cuja absorção pelas células é medida por espectrofotometria (MOSMANN, 1983). Assim, os resultados deste teste nos indicam as concentrações citotóxicas que não devem ser utilizadas nos ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade.

### *3.3.3.1 Ensaio do cometa*

O ensaio do cometa é uma técnica que permite detectar lesões transitórias no DNA (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003) que podem ser reparadas ou resultarem em

mutação gênica (PFUHLER et al., 2011). Ao microscópio, a imagem resultante deste teste lembra a figura de um cometa, com uma cabeça distinta e uma cauda proeminente, sendo que a cabeça é composta por DNA intacto e, a cauda, por fragmentos de DNA (KASUBA et al., 2012). Tice; Andrews; Singh (1990), Olive; Wlodeck; Babáth (1991) e Matsumoto et al. (2006), têm mostrado que a sensibilidade do ensaio do cometa em detectar danos no DNA é compatível com outros métodos de avaliação para vários agentes.

A primeira versão do ensaio do cometa foi realizada em pH neutro por Ostling e Johanson em 1984. Neste pH, somente quebras de fita dupla podiam ser detectadas. Em 1988, Singh et al. introduziram a versão alcalina do cometa (pH > 13), permitindo a detecção de quebras de fita simples, sítios álcali-lábeis e *crosslinks* DNA-DNA e DNA-proteínas, em células individuais. Como a maioria das lesões induzidas pelos agentes genotóxicos são quebras de fita simples e/ou sítios álcali-lábeis, a versão alcalina do ensaio do cometa oferece uma maior sensibilidade na identificação de agentes genotóxicos (TICE et al., 2000). Esta nova versão do ensaio tornou-se uma ferramenta muito utilizada na área da genética toxicológica (FAUST et al., 2004), possibilitando a avaliação de danos genéticos *in vivo* e *in vitro* em uma grande variedade de células (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999, TICE et al., 2000, KASSIE; PARZEFALL; KNASMÜLLER, 2000, PANDEY et al., 2009).

O ensaio do cometa não detecta mutações e sim danos no DNA que podem ou não resultar em mutações, após serem processadas pelas enzimas de reparo (GONTIJO; TICE, 2003).

Basicamente, a técnica do cometa consiste em embeber uma suspensão celular em gel de agarose sobre uma lâmina, lisar as células por meio de detergentes e soluções salinas em altas concentrações, e tratá-las com soluções alcalinas para permitir o desenovelamento do DNA e a liberação dos fragmentos existentes que migrarão para o pólo positivo, durante a eletroforese. Após a eletroforese, as lâminas são mergulhadas em solução de neutralização e em seguida, coradas com corantes fluorescentes que se ligam ao DNA, como o brometo de etídio (FAUST et al., 2004).

Na lise celular, as membranas (citoplasmática e nuclear), o citoplasma e o nucleoplasma são removidos, os nucleossomos são desfeitos e quase todas as histonas são solubilizadas. O que resta das células é chamado de nucleóide e consiste de uma matriz nuclear composta de DNA, RNA e proteínas (COLLINS, 2004). Durante a eletroforese (em pH alcalino), os fragmentos de DNA diretamente induzidos pelos agentes genotóxicos ou formados por sítios de reparo transitórios (MOLLER, 2006), migram para o pólo positivo da cuba, devido a sua carga negativa. Quando submetido à eletroforese, a aparência do nucleóide

assemelha-se a de um cometa, apresentando uma cabeça (onde encontra-se o DNA não lesado) e uma cauda (formada pelos fragmentos de DNA arrastados para o ânodo durante a eletroforese) (TICE, 1995).

A análise das lâminas do cometa pode ser feita visualmente ou por meio de softwares de análise de imagem. A análise visual pode ser feita de quatro maneiras distintas: a. contabilização de nucleóides com e sem cauda; b. classificação dos nucleóides em classes de migração (de 0 a 4 ou de 1 a 5, sendo que o “0” ou o “1” representam ausência de danos e o “4” ou “5” representam a quantidade máxima de danos induzidos) e obtenção de escore (multiplicação do número da classificação do cometa pela quantidade de cometa em cada classe); c. comprimento do cometa ou da cauda (com auxílio de uma régua ocular acoplada ao microscópio ou de fotografias para análise); d. razão do comprimento do cometa pelo diâmetro perpendicular da cabeça do cometa. Por meio de analisadores de imagem, os cometas podem ser analisados também de quatro maneiras distintas: a. comprimento do cometa ou da cauda; b. porcentagem de DNA na cauda; c. *tail moment* (ou momento da cauda), que é uma relação entre o comprimento da cauda e a quantidade (%) de DNA que migrou; d. área do cometa (GONTIJO; TICE, 2003).

Quanto maior os danos induzidos no DNA analisado, maior é a cauda do cometa. Assim, células apresentando nenhum ou pouco dano apresentam similaridade com os nucleóides, ou seja, ausência de cauda (TICE, 1995). Quando a migração do DNA é reduzida, ocorrendo em níveis menores do que o observado para o controle negativo, pode-se deduzir que houve indução de *crosslinks* (lesões relacionadas a eventos de mutagênese). Quando a migração do DNA é elevada, pode-se deduzir que houve indução de quebras na fita do DNA ou de sítios alcali-lábeis. Ainda, eventos de reparo do DNA por excisão de bases também podem resultar em elevada migração do DNA (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005).

Células mortas ou em processo de morte apresentam uma imagem típica no ensaio do cometa. Estas células resultam em cometas com uma cabeça pequena ou inexistente e uma cauda grande e difusa, contendo quase todo o DNA do nucleóide (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005).

O ensaio do cometa é uma técnica rápida e sensível para detecção de danos primários no DNA. Comparado com outros testes de genotoxicidade, o teste do cometa apresenta vantagens pelo curto período de tempo necessário para concluir o experimento, pela necessidade de um pequeno número de células por amostra e pela sensibilidade na detecção de baixos níveis de danos no DNA (TICE et al., 2000). Ainda, a análise dos danos no DNA é

menos subjetiva do que as de outros ensaios de genotoxicidade, tem alto poder estatístico e pode ser automatizada (LEE; KWON; CHUNG, 2003).

Apesar destas vantagens, este teste não detecta danos como aneuploidia, rearranjos cromossômicos, mau-reparo do DNA ou adutos de DNA (LEE; KWON; CHUNG, 2003). Os danos primários detectados podem, também, ser corretamente reparados e não resultarem em alterações genéticas permanentes (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005). Contudo, as lesões detectadas pelo ensaio do cometa, por serem lesões iniciais induzidas por agentes genotóxicos, fazem com que este ensaio seja cada vez mais utilizado como um biomarcador de exposição (LEE; KWON; CHUNG, 2003).

Algumas aplicações do ensaio do cometa incluem o monitoramento ecológico (por meio da utilização de organismos biosensores como, por exemplo, os mexilhões, as minhocas e pequenos roedores), testes de triagem química e estudos em humanos (biomonitoramento, estudos nutricionais e diagnóstico de doenças genéticas) (COLLINS, 2004). Segundo Hartmann et al. (2003), o ensaio do cometa é considerado um teste padrão dentre a bateria de testes utilizados para avaliar a segurança de novos medicamentos ou outros químicos.

Ainda, segundo Moller (2006), o ensaio do cometa tem sido aplicado no estudo da genética toxicológica, da ecotoxicologia, do reparo do DNA e da apoptose. De acordo com este mesmo autor, novas aplicações do ensaio do cometa incluem a detecção de crosslinks DNA-DNA e de danos em genes específicos, por meio da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (cometa-FISH). Além disso, uma modificação no ensaio do cometa pode ser realizada para medir a atividade de reparo em células portadoras de lesões oxidativas no DNA.

A introdução de enzimas que reconhecem um tipo particular de dano, torna o ensaio do cometa uma técnica mais específica e sensível. Enzimas como a endonuclease III, a formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG), a T4 endonuclease V e a Alk A são exemplos de proteínas que atuam em locais específicos do DNA, causando quebras adicionais e aumentando a intensidade da cauda do cometa. Particularmente, a endonuclease III e a FPG são enzimas utilizadas com frequência para detecção de danos oxidativos no DNA (COLLINS, 2004). A atuação enzimática ocorre logo após a lise celular. A enzima é colocada sobre a lâmina contendo os nucleóides embebidos em agarose e incubada na temperatura ótima da enzima (GONTIJO; TICE, 2003).

Uma vez que as quebras detectadas pelo ensaio do cometa normalmente são reparadas em um curto período de tempo antes de se fixarem como uma mutação, recomenda-se que

outros testes bem estabelecidos sejam realizados juntamente com este ensaio, para a determinação dos efeitos genotóxicos de um determinado composto (FAUST et al., 2004).

### 3.3.3.2 Teste do MN *in vitro*

O teste do micronúcleo possibilita uma detecção rápida dos danos causados no material genético de organismos expostos a químicos ambientais (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003). 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).

Segundo Salvadori; Ribeiro; Fenech (2003), até bem recentemente, a avaliação de danos cromossômicos induzidos por agentes genotóxicos era comumente realizada por testes de AC em células metafásicas. No entanto, este ensaio requeria pessoal altamente treinado e consumia muito tempo para a análise das metáfases. O desenvolvimento do teste do MN *in vitro* veio, então, como uma alternativa ao teste de AC.

Os MN se originam de fragmentos cromossômicos ou cromatídicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo da célula, ao final da telófase, devido a sua incorreta ligação com as fibras do fuso mitótico durante a segregação na anáfase (MATEUCA et al., 2006; FENECH, 2007; FENECH, 2010). Os cromossomos perdidos ou os fragmentos cromossômicos são eventualmente envolvidos por uma membrana nuclear, formando estruturas morfológica (FENECH et al., 2011) e ultraestruturalmente semelhantes (SCHIFFMANN; DEBONI (1991) ao núcleo principal da célula, porém de menor tamanho (FENECH et al., 2011).

Para que um MN seja classificado como tal, ele deve possuir um diâmetro entre 1/16 e 1/3 do diâmetro do núcleo principal; não ser refringente; não estar conectado e nem sobreposto ao núcleo principal; e apresentar a mesma intensidade de coloração que o núcleo principal da célula (FENECH, 2000).

Os fragmentos cromossômicos acêntricos que originam os MN podem ser resultantes de quebras diretas na dupla fita de DNA que não foram reparadas (HARTLERODE; SCULLY, 2009, O'DONOVAN; LIVINGSTON, 2010); ou de eventos simultâneos de reparo por excisão de bases danificadas ou incorporadas erroneamente no DNA, causando quebras na dupla fita (DIANOV et al., 1991, FENECH; CROTT, 2002, BULL; FENECH, 2008 ); ou de fragmentos cromossômicos resultantes de quebras de pontes nucleoplasmáticas (HOFFELDER et al., 2004). Estudos realizados *in vitro*, em tempo real, por Hoffelder et al., 2004, SHIMIZU et al., 2005), têm mostrado que as pontes anafásicas podem quebrar-se em

mais de uma região durante a anáfase e dar origem à fragmentos cromossômicos acêntricos que eventualmente podem se transformar em MN.

As perdas cromossômicas podem ser originadas: 1) pela hipometilação da citosina em sequências repetidas na região centromérica e pericentromérica do cromossomo. A montagem das proteínas do cinetócoro nos centrômeros geralmente é afetada pelo estado da metilação da citosina e pela metilação das histonas. No caso das histonas, a integridade da heterocromatina pode interferir tanto na ligação microtúbulos-cromossomo como na percepção da correta tensão entre as conexões microtúbulo-cinetocoro (PIRONON; PUECHBERTY; ROIZES, 2010, SCHUELER; SULLIVAN, 2006, XU et al., 1999, GIENI; CHAN; HENDZEL, 2008, SUZUKI; FUJII; AYUSAWA, 2002, GUTTENBACH; SCHMID, 1994, HEIT et al., 2009); 2) por defeitos na maquinaria do fuso mitótico; 3) defeitos nos pontos de checagem da mitose; 4) pela amplificação anormal dos centrossomos (GISSELSSON, 2008, ZYSS; GERGELY, 2009).

Distúrbios na maquinaria mitótica podem ser decorrentes de ligações covalentes ou não-covalentes de certos compostos com as tubulinas do fuso, podendo levar à uma formação defeituosa destas proteínas e, conseqüentemente, a um mau-funcionamento do aparato mitótico (EPE et al., 1990). Além das tubulinas, os agentes que causam perdas cromossômicas também podem alterar as proteínas do cinetócoro, tornando-os não funcionais e levando a defeitos na segregação cromossômica (KIRCHNER et al., 1993, HANDO; NATH; TUCKER, 1994, ECKERT; STOPPER, 1996). Segundo vários autores (PEDEUTOUR et al., 1994, PHILIPPE et al., 1993, SAWYER et al., 1995), a instabilidade genética também pode causar o aparecimento de MN por perdas cromossômicas. Células com cariótipos instáveis tendem a desenvolver um cariótipo mais estável, pelo menos em parte, pela eliminação de cromossomos através da formação de MN (STOPPER; MÜLLER, 1997; FERNANDES et al., 2009).

O modo de ação de um composto, em alguns casos, pode ser indicado pela observação do tamanho dos MN. No caso da presença de fragmentos cromossômicos dentro dos MN, o agente é denominado clastogênico e os MN induzidos são relativamente pequenos. Se o MN for constituído por cromossomos inteiros, então o agente é denominado aneugênico e esses MN apresentam tamanhos relativamente grandes. No entanto, a determinação da ação de um composto, em clastogênico ou aneugênico, pela análise do tamanho do MN não é muito confiável e nem decisivo na maioria dos casos (YAMAMOTO; KIKUCHI, 1980). Segundo Fenech (2011), o uso do tamanho do MN para discriminar a ação aneugênica ou clastogênica de um composto não é recomendado em células humanas ou outros tipos celulares que

apresentam heterogeneidade quanto ao tamanho de seus cromossomos, pois um MN de tamanho pequeno pode conter tanto um fragmento de um cromossomo grande quanto um cromossomo pequeno inteiro.

Estudos sobre o conteúdo cromossômico nos trazem informações importantes sobre o destino dos MN após a sua formação. Segundo estudos realizados por Leach; Jackson-Cook (2004), os cromossomos presentes no MN podem funcionar como uma entidade extra-nuclear independente, com capacidade de replicação e, possivelmente, com capacidade de desempenhar outras funções celulares. Geralmente, quando o MN é formado por um conteúdo cromossômico não funcional ou que não pode se replicar devido a ausência de componentes nucleares necessários, eles são expulsos da célula. De acordo com Gustavino et al. (1994), se o MN contém um cromossomo inteiro e a síntese de DNA dentro do MN é sincrônico com a síntese de DNA no núcleo principal, então é possível que o cromossomo contido dentro do MN se reintegre ao genoma nuclear, no próximo evento de divisão celular. Quando esta reintegração ocorre com sucesso, o resultado é uma célula normal, não danificada (STOPPER; MÜLLER, 1997).

Outra informação interessante obtida pelo teste do MN é que, por meio da análise do tempo transcorrido entre a exposição das células a um agente genotóxico e o aparecimento do MN, pode-se relacionar a sensibilidade de determinada fase do ciclo celular ao tipo de dano induzido pelo agente (STOPPER et al., 1994). Distúrbios na formação do fuso mitótico, por exemplo, leva a um rápido aparecimento do MN, enquanto que danos na fase G1 do ciclo celular levam a um aparecimento tardio de MN nas células (FENECH; NEVILE, 1992). Stopper e Müller (1997) observaram o aparecimento de MN em um período de 5 horas após a exposição das células ao agente aneugênico vimblastina, enquanto que o aparecimento do MN, frente à exposição ao agente clastogênico EMS, apareceu somente após um período de 20 horas.

O teste do MN tem sido um dos métodos mais utilizados na avaliação de danos cromossômicos, devido à possível detecção de quebras e de perdas cromossômicas (FENECH, 2006; FENECH et al., 2003). A perda de cromossomos e a não disjunção cromossômica são eventos chave no desenvolvimento do câncer e do envelhecimento (FENECH, 2000). Desta forma, o ensaio do MN realizado com células humanas tem se tornado um dos testes citogenéticos padrão nos estudos de toxicologia. Além disso, esse ensaio tem sido aplicado em diversas áreas biológicas e da saúde e na identificação do potencial genotóxico de novos produtos farmacêuticos, agrotóxicos e agentes físicos em geral (KIRSCH-VOLDERS, 1997).

Uma vez que os MN são expressos em células que completaram um ciclo de divisão celular, as células que não se proliferam ou que possuem uma cinética de divisão mal estabelecida ou mal controlada, não são indicadas para a realização do teste do MN. Além disso, os índices de divisão celular, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, diferem entre as células de acordo com variações fisiológicas, genéticas e de micronutrientes (FENECH, 2000). Para assegurar que as células analisadas no teste do MN já tenham passado por um ciclo de divisão celular, o teste é comumente realizado com a adição de citocalasina B, uma enzima bloqueadora da divisão citoplasmática, mas não da divisão nuclear.

O teste do MN com bloqueio da citocinese (MNBC), pela citocalasina B, em células de mamíferos, constitui, atualmente, uma técnica citogenética bastante conhecida para quantificar os danos induzidos no DNA das células por compostos químicos e misturas complexas (FENECH, 2000). O uso da citocalasina B foi proposto por Fenech; Morley (1985), no teste do MN *in vitro*, para bloquear a divisão citoplasmática, mas não a divisão nuclear da célula, resultando em células binucleadas. Assim, é observado um acúmulo de células binucleadas, independente do grau de sincronia e da proporção de células em divisão (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003). A citocalasina B inibe a polimerização da actina, que é requerida para a formação do anel contráctil que induz a contração do citoplasma e a subsequente clivagem da célula em duas células filhas (CARTER, 1967).

Uma vez que no teste do MNBC a contagem dos MN é restrita às células binucleadas que já se dividiram e, que, portanto, podem expressar os MN, ele é o método preferido para avaliar a presença de MN em células humanas ou de outros mamíferos (FENECH, 2000). Quando a contagem dos MN é restrita às células binucleadas, os efeitos causados por uma cinética de divisão celular alterada são contornados. Problemas na cinética da divisão celular constitui uma das maiores variáveis no protocolo de testes que não diferenciam as células que não se dividem e, portanto, não podem expressar MN, daquelas que se dividem e podem expressá-los (FENECH, 1997, FENECH, 2000).

O MNBC tem sido utilizado com sucesso na detecção de disfunções celulares e nucleares, *in vitro* ou *in vivo*, decorrentes dos efeitos do envelhecimento, da deficiência ou excesso de micronutrientes, da exposição a compostos genotóxicos e de problemas na manutenção do genoma. Estudos recentes apontam também a utilização deste teste em áreas emergentes da nutrigenômica e toxicogenômica, uma vez que o estado nutricional também está relacionado com a sensibilidade aos compostos genotóxicos exógenos (BEETSTRA, et al., 2005).

Apesar do teste do MN indicar a ocorrência de danos no DNA, ele não fornece informação específica a respeito do tipo de dano sofrido pelas células. Desta forma, têm sido utilizadas, em associação com o teste do micronúcleo, técnicas de detecção de regiões específicas do DNA, como a técnica de hibridação *in situ*, que evidencia os centrômeros dos cromossomos e possibilita o conhecimento da origem da formação do micronúcleo. Com essa ferramenta, pode-se classificar as substâncias químicas, quanto ao tipo de ação que exercem sobre o material genético dos organismos, em aneugênicas ou clastogênicas.

### 3.3.3.3 Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH)

Sumariamente, a técnica de hibridização *in situ* tem por finalidade localizar uma determinada sequência de nucleotídeos dentro de uma célula interfásica ou metafásica e também identificar alterações cromossômicas estruturais e numéricas (HOVHANNISYAN, 2010), de maneira rápida em diferentes tipos celulares (EASTMOND; SCHULER; RUPA, 1995). Esta técnica complementa a citogenética convencional, criando uma ponte entre a citogenética e a genética molecular (KWASNY et al., 2012).

O princípio da técnica consiste em desnaturar a dupla fita de DNA, geralmente por meio de temperaturas próximas de 70-80 °C e, posteriormente, renaturá-la a uma temperatura de 37° C. Se, durante a renaturação do DNA cromossômico, houver várias cópias da sonda específica disponível no meio, estas cópias das sondas complementares competirão com as fitas de DNA e poderão ser hibridizadas *in situ* (GUERRA, 2004). Basicamente, o ensaio compreende o pré-tratamento das lâminas com RNase, desidratação por etanol, lavagens em solução tampão, desnaturação térmica da sonda e dos cromossomos alvo presentes na lâmina (para que ocorra a hibridização das sequências complementares) e lavagens pós-hibridização (para remoção das sondas não pareadas ou pareadas inespecificamente). Os sinais de hibridização são analisados em microscopia e, assim, as sequências alvo, associadas à sonda, podem ser identificadas (KWASNY et al., 2012). Quando a técnica de hibridização *in situ* é feita utilizando-se fluorocromos para marcar a sonda, ela é denominada de FISH (*Fluorescent In situ Hybridization*) (GUERRA, 2004).

Na técnica de FISH, os tipos de sondas mais conhecidas são as de sequências repetitivas organizadas em tandem, como as sondas de DNA satélite, DNA ribossômico 5S e 45S, DNA telomérico e DNA centromérico. Além destas, há também sondas repetitivas dispersas ao longo dos cromossomos, geralmente relacionadas aos elementos transponíveis. Sondas de sequências únicas ou de poucas cópias também podem ser utilizadas para localizar sequências específicas no DNA. Outro tipo de sonda também bastante utilizada é a de ácido

nucleico peptídico (PNA). Elas são sondas sintéticas análogas ao DNA, no qual as bases são ligadas por meio de pontes de carbonil metileno às unidades repetitivas de N-(2-aminoetil)glicina (PELLESTOR et al., 2004). Devido à ausência de grupos fosfatos eletricamente carregados, os duplex PNA-DNA, quando usada na técnica de FISH, possuem uma estabilidade aumentada (SHAPOSHNIKOV; FRENGEN; COLLINS, 2009).

A maioria das sondas já se encontra comercialmente disponível. Sondas que não estão disponíveis comercialmente podem ser preparadas por meio de técnicas padrões de biologia molecular (SHAPOSHNIKOV; FRENGEN; COLLINS, 2009).

Para que a região do DNA-alvo seja detectada pela FISH, a sonda pode ser marcada diretamente com fluorocromos (corantes fluorescentes), ou indiretamente com uma molécula marcadora (como a biotina e a digoxigenina), acoplada a um dos nucleotídeos da sonda, que, posteriormente, é reconhecida por anticorpos ligados a uma enzima ou a um fluorocromo (GUERRA, 2004).

As sequências altamente repetitivas das regiões centroméricas e pericentroméricas, podem ser específicas o suficiente para permitir o desenvolvimento de sondas capazes de reconhecer individualmente quase todos os cromossomos humanos. Essas sondas de DNA satélite ( $\alpha$ -satélite ou alfoíde) estão disponíveis comercialmente e são marcadas diretamente com fluorocromos (TYLER-SMITH; WILLARD, 1993). O reconhecimento de regiões centroméricas, por meio de sondas específicas, trouxe a possibilidade de se utilizar núcleos interfásicos para a identificação de cromossomos, a partir do número de centrômeros, permitindo também, uma avaliação rápida e eficiente da presença de alterações numéricas (VIANNA-MORGANTE, 2004).

Segundo Zeljezic; Mladinic (2011), um estudo realizado por Bolognesi et al. (2004) foi um dos primeiros a utilizar a técnica de FISH, com sonda pan-centromérica para todos os cromossomos humanos, para avaliar a origem dos MN induzidos por misturas de agrotóxicos (organofosfatos, organoclorados, carbamatos, benzimidazoles, tioftalimides, piretroides e bupirimato) em floriculturistas. Os autores encontraram que a maioria dos MN observados na análise era composta por cromossomos inteiros. Segundo Parry et al. (1996) e Harkönen (2005), uma quantidade significativa de agrotóxicos interage com os componentes do ciclo de divisão celular dos organismos alvo, podendo levar a aneuploidias.

A técnica de FISH tem sido muito utilizada na genética toxicológica, em combinação com o ensaio do cometa e o teste do MN. Por meio destas combinações de técnicas, a identificação de certos tipos de aberrações cromossômicas é feita com maior eficiência, proporcionando uma avaliação mais sensível e adequada dos efeitos induzidos pelos agentes

mutagênicos, levando a um melhor entendimento das estruturas biológicas envolvidas (HOVHANNISYAN, 2010). De acordo com Albertini et al. (2000), o ensaio do cometa, o teste do MN e a técnica de FISH foram apresentados no Programa Internacional em Segurança Química (IPCS) como as técnicas mais utilizadas na genética toxicológica para o monitoramento dos efeitos genotóxicos de carcinógenos em humanos.

Com o teste do MN, a FISH possibilita visualizar o conteúdo do MN e caracterizar o agente indutor do dano em aneugênico (indutor de perdas cromossômicas) ou clastogênico (indutor de quebras cromossômicas), dependendo se dentro do MN existe um ou mais cromossomos inteiros ou apenas fragmentos cromossômicos acêntricos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002). Além disso, com a FISH, pode-se determinar o envolvimento de cromossomos e de fragmentos específicos na formação do MN. A detecção do efeito aneugênico ou clastogênico de um composto é mais precisa quando é feita com a utilização de sondas centroméricas ao invés da utilização de anticorpos anti-cinetocóricos (SCHULER; RUPA; EASTMOND, 1997), pois os MN podem ser formados por cromossomos inteiros, mas que não apresentam cinetócoro íntegro e, conseqüentemente, não apresentam sinal ao microscópio de fluorescência (HANDO; NATH; TUCKER, 1994, HANDO et al., 1997, NATH, TUCKER, HANDO, 1995). A identificação do centrômero tem sido usada com sucesso em vários estudos *in vivo* e *in vitro* para examinar o conteúdo do MN, sendo que a FISH tem sido aplicada na maioria deles (NORPPA; FALCK, 2003).

As sondas utilizadas no teste do MN incluem aquelas que fazem o reconhecimento de centrômeros, de outras regiões específicas dos cromossomos e de cromossomos inteiros (HOVHANNISYAN, 2010). A sensibilidade de diferentes cromossomos a diferentes agentes genotóxicos pode ser avaliada pela utilização de sondas centroméricas específicas para cada cromossomo. Além disso, a utilização de sondas cromossomo-específicas também permite detectar eventos de não-disjunção cromossômica, onde uma célula filha torna-se trissômica e a outra, monossômica (PARRY et al., 2002).

Alguns autores demonstraram que podem ocorrer dois ou mais sinais centroméricos dentro de um MN (CATALAN et al., 1995, 1998; HANDE; BOEI; NATARAJAN, 1996; BAKOU et al., 2002; ANDRIANOPOULOS; STEFANOPOULOS; DEMOPOULOS, 2006). Segundo Eastmond; Schuler e Ruppá (1995), os MN contendo dois sinais centroméricos indicam que seu conteúdo pode ser formado tanto pelas duas cromátides de um cromossomo duplicado, como por dois cromossomos distintos. Neste último caso, a FISH com sonda de DNA pan-centromérica não distingue um cromossomo duplicado de duas cromátides não-homólogas (IARMARCOVAI; BOTTA; ORSIÈRE, 2006).

A análise do conteúdo cromossômico de MN induzidos espontaneamente em linfócitos de mulheres normais indicou que a maioria dos MN é formada por um único cromossomo resultante de atraso durante a divisão celular (LEACH; JACKSON-COOK, 2001). Ainda, este estudo mostrou que todos os 23 cromossomos podem estar presentes no MN, embora o cromossomo X apareça mais frequentemente.

De acordo com a OECD (2007), diversas linhagens celulares são indicadas para a realização do teste do MN *in vitro*. Dentre elas, as células de hamster chinês, como as CHL, CHO e V79 são as mais indicadas em testes de genética toxicológica para fins industriais. Mas para determinar a aneugenicidade de um composto com o auxílio da técnica de FISH, as linhagens celulares humanas são as mais indicadas, devido à grande disponibilidade de sondas de DNA humano. As linhagens celulares de hamster chinês são inapropriadas para detecção de aneugenicidade, devido à indisponibilidade de sondas específicas (HASHIMOTO et al., 2010).

A identificação dos efeitos aneugênicos ou clastogênicos nos diz quais compostos interagem diretamente com o DNA e quais causam instabilidade genômica por danificar estruturas proteicas, resultando em má-segregação cromossômica com consequente perda e aneuploidia (ZELJEZIC; MLADINIC, 2011).

No ensaio do cometa, a FISH possibilita avaliar a extensão dos danos no DNA em células individuais e localizar quais regiões estão sendo danificadas pelo agente genotóxico, por meio da visualização de sinais fluorescentes na cauda do cometa ou pela observação da fragmentação dos sinais (SHAPOSHNIKOV; FRENJEN; COLLINS, 2009). Diferente do cometa padrão, no cometa-FISH o processo de desnaturação da sonda e do DNA ocorre por meios químicos, em soluções alcalinas, uma vez que é impossível realizar uma desnaturação por altas temperaturas em cometas fixados em agarose com baixo ponto de fusão (SANTOS; SINGH, NATARAJAN, 1997).

O ensaio do cometa padrão reflete os danos ocorridos no DNA total de células individuais. Quando a FISH é acoplada a este ensaio, ela permite, também, a análise de danos e reparo em diferentes genes, cromossomos e regiões cromossômicas específicas, que podem ser relevantes para a indução de várias doenças, além da visualização de loci genômicos, da elucidação de mecanismos de formação dos cometas e do entendimento da organização do DNA dentro dos cometas (SANTOS; SINGH, NATARAJAN, 1997).

A posição das marcações fluorescentes no cometa indica se a sequência de interesse encontra-se localizada na porção não danificada do DNA (cabeça) ou na região onde estão os fragmentos de DNA (cauda). O reposicionamento da cauda para a cabeça do cometa, de sinais

gene-específicos durante o período de incubação, sugere atividade de reparo das lesões, dentro e no entorno do lócus de interesse (SHAPOSHNIKOV; FRENGEN; COLLINS, 2009). Com a identificação de sequências específicas na cauda do cometa, é possível reconhecer também os sítios de ação de agentes genotóxicos presentes no ambiente (HOVHANNISYAN, 2010). Segundo Rapp et al. (2000), a sensibilidade e a reprodutibilidade da FISH, aplicada conjuntamente à técnica do cometa, produz resultados comparáveis àqueles obtidos em células metafásicas, preparadas com técnicas de citogenética molecular.

No cometa-FISH, o nível de danos e reparos no DNA, em domínios específicos, pode ser expresso como a porcentagem de sinais de fluorescência presentes na cabeça e na cauda do cometa (SPIVAK; COX; HANAWALT, 2009). No entanto, a análise dos cometas, neste tipo de ensaio, não é facilmente automatizada, como normalmente ocorre no ensaio do cometa padrão. De acordo com Shaposhnikov, Frengen e Collins (2009), os sinais dentro do cometa são complexos e variam de célula para célula. Além disso, a posição e orientação dos sinais dentro do cometa, e mesmo entre os sinais, são observações importantes, sujeitas às diferentes interpretações humana. A dificuldade na análise do cometa-FISH está associada à distribuição espacial das preparações. Enquanto que na FISH padrão as células estão fixadas ou adsorvidas em lâminas de microscopia, possibilitando uma visualização bidimensional das estruturas, na FISH associada à técnica do cometa, os cometas exibem um padrão tridimensional. Embora a organização 3-D do DNA nos cometas reflita a organização real da cromatina nas células vivas, ela dificulta o processo de visualização e contagem dos sinais (SHAPOSHNIKOV; FRENGEN; COLLINS, 2009).

Um exemplo prático da aplicabilidade do cometa-FISH, em ensaios ecotoxicológicos, pode ser encontrado no trabalho de Mladinic et al. (2012), onde os autores verificaram que as regiões do DNA contendo os genes reguladores do ciclo mitótico c-Myc (gene supressor de tumor) e TP53 (proto-oncogene) foram danificados (ou seja, migraram para a cauda do cometa), quando linfócitos humanos foram expostos, *in vitro*, a baixas concentrações dos agrotóxicos terbutylazine e carbofuran.

Além da sua aplicação em ensaios toxicológicos, para avaliação da fragilidade de sequências específicas de DNA aos agentes genotóxicos, o cometa-FISH também é utilizado na elucidação de muitos aspectos a respeito da formação do cometa. Sobre a migração das fitas complementares de DNA para a cauda do cometa, McKenna et al.(2003) concluíram que ambas as fitas migram para a cauda, mas de maneira independente, mesmo nos casos em que uma das fitas é quebrada e a fita complementar se mantém intacta. Já a questão sobre a migração de sequências específicas para a cauda do cometa foi elucidada por Shaposhnikov,

Frengen e Collins (2009), Bock et al. (1999) e por McGlynn et al. (1999). Em diferentes ensaios, os autores verificaram que, além da presença de quebras, a natureza do dano e a organização da cromatina também determinam a migração de sequências particulares de DNA para a cauda do cometa. O material genético localizado próximo e associado à matriz nuclear, como as regiões de replicação do DNA, por exemplo, não migram para a cauda em ensaios alcalinos. Além disso, os fragmentos cromossômicos pobres em genes são mais frequentemente encontrados na cauda dos cometas, em comparação às regiões ricas em genes. Esta observação sugere que os cromossomos com alta densidade gênica são mais resistentes aos agentes genotóxicos.

No presente estudo, o inseticida imidaclopride e o herbicida sulfentrazone foram avaliados, isoladamente e em mistura, para avaliar a possível interação destes dois agrotóxicos em diferentes sistemas teste e verificar a indução de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos nos organismos expostos. Uma vez que o inseticida estudado pode ser aplicado tanto na cana planta (para o combate de cigarrinhas), quanto sobre os toletes de cana (sementes/colmo) no sulco de plantio antes de sua cobertura com o solo (para o combate de cupins) e o herbicida é aplicado na planta pré-emergente, a interação destes dois agrotóxicos pode ocorrer na planta pela aplicação em um mesmo momento (na cana ainda em soca) ou em momentos distintos, podendo, neste caso, interagir no ambiente pela mobilidade e persistência que os dois agrotóxicos apresentam.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Agrotóxicos

Neste trabalho, foram testados o herbicida Boral® (50% pureza, adquirido da FMC Agricultural Products) e o inseticida Evidence® (48% pureza, adquirido da Bayer S/A). Para os dois agrotóxicos, foram preparadas três diferentes concentrações para os ensaios com *A. cepa* e HepG2 e cinco diferentes concentrações para o teste de Ames. A maior concentração, para ambos os agrotóxicos, foi baseada na concentração de campo sugerida para uso em cultura de cana-de-açúcar e, a partir delas, foram realizadas diluições subsequentes em água. A concentração do inseticida imidaclopride usada em campo é de 7,5 mL/L e a do herbicida sulfentrazone é de 12 mL/L.

Inicialmente, as concentrações propostas para o estudo do herbicida seriam 12 mL/L, 1,2 mL/L e 0,12 mL/L. Nos ensaios com *A. cepa*, a concentração de campo do herbicida induziu a morte das células e, assim, novos testes foram realizados com concentrações menores, a fim de encontrar a maior concentração não citotóxica para estas células. As concentrações testadas foram: 6 mL/L, 5 mL/L, 4 mL/L, 3 mL/L e 2 mL/L. Os resultados (dados não apresentados), mostraram que as concentrações abaixo de 3mL/L seriam indicadas para os testes de mutagenicidade e genotoxicidade, por não induzirem taxas significativas de morte celular e nem diminuição dos índices mitóticos. Desta forma, foi escolhida a concentração de 2,4 mL/L, por esta estar entre a concentração de 3 mL/L e 2 mL/L e ser correspondente ao dobro de 1,2mL/L, que seria a próxima concentração a ser testada dentre as concentrações inicialmente propostas neste estudo.

Para os ensaios realizados com as células HepG2, as concentrações escolhidas do inseticida e do herbicida foram aquelas que apresentaram resultados negativos de citotoxicidade no ensaio do MTT.

Para o teste de Ames, as cinco concentrações testadas (quantidade necessária para validar o teste) não se apresentaram citotóxicas para as linhagens testadas.

Assim, as concentrações de cada agrotóxico, de acordo com os diferentes testes realizados, estão apresentadas na tabela abaixo:

Tabela 1 - Concentrações testadas dos agrotóxicos (mL/L), nos diferentes testes realizados.

	Herbicida (sulfentrazone)	Inseticida (imidaclopride)	Mistura (herbicida + inseticida)	
Ensaio com <i>A. cepa</i>	12	-	-	-
	2,4	7,5	2,4 + 7,5	(M1)
	1,2	0,75	1,2 + 0,75	(M2)
	0,12	0,075	0,12 + 0,075	(M3)
Ensaio com HepG2	0,12	0,075	0,12 + 0,075	(M1)
	0,012	0,0075	0,012 + 0,0075	(M2)
	0,0012	0,00075	0,0012 + 0,00075	(M3)
Teste de Ames	2,4	7,5	2,4 + 7,5	(M1)
	1,2	0,75	1,2 + 0,75	(M2)
	0,12	0,075	0,12 + 0,075	(M3)
	0,012	0,0075	0,012 + 0,0075	(M4)
	0,0012	0,00075	0,0012 + 0,00075	(M5)

#### 4.1.2 Controles positivos

Para os diferentes testes, foram utilizados controles positivos específicos:

- Metilmetano sulfonato (MMS) (Sigma-Aldrich, CAS No 66-27-3), na concentração de 10 mg/L, nos testes realizados com *Allium cepa*, e na concentração de  $4 \times 10^{-2}$  M, nos testes do MN e ensaio do cometa realizados com as células HepG2;
- Triton X-100 (Merck, CAS No 9036-19-5), 1%, para o teste do MTT, utilizando as células HepG2;
- Óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) (Sigma, CAS No. 56-57-5), na concentração de 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , para os testes realizados com *S. typhimurium* na ausência de ativação metabólica;
- 2-aminoantraceno (2AA) (Sigma, CAS No. 613-13-8), na concentração de 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , para os testes realizados com *S. typhimurium* na presença de ativação metabólica.

O MMS foi diluído em água de osmose reversa nos testes utilizando células de *A. cepa* e em tampão fosfato salino (PBS) nos testes utilizando células HepG2. O Triton X-100 foi diluído em meio MEM e o 4NQO e o 2AA foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO).

Para o desenvolvimento dos testes de Ames, com ativação metabólica, foi utilizado um sistema de metabolização exógeno (sistema microsomal S9, Moltox), constituído de um homogenato de células do fígado de rato Sprague-Dawley, pré tratado com a mistura bifenil policlorinada (Araclor 1254).

#### 4.1.3 Organismos testes

Neste trabalho foram utilizados diferentes organismos testes para análise da ação citotóxica, genotóxica e mutagênica dos agrotóxicos Boral® e Evidence®.

- Sementes da espécie *Allium cepa* (2n = 16), variedade Baia Periforme, da linha Top Seed;
- Células de hepatoma humano, linhagem HepG2 (2n = 46), gentilmente cedidas pela profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira (Laboratório de Toxicologia Ambiental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto);
- Linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, cedidas pela profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira (Laboratório de Toxicologia Ambiental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Ensaio de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade com células meristemáticas e F<sub>1</sub> de *Allium cepa*

Este ensaio foi realizado segundo o protocolo descrito por GRANT (1982), com modificações. Sementes de *A. cepa* foram colocadas para germinar em placas de Petri forradas com papel de filtro umedecido com água de osmose reversa, até as raízes atingirem cerca de 1 cm de comprimento. Em seguida, as radículas foram transferidas para placas contendo o herbicida e o inseticida nas concentrações descritas acima, por um período de 24 horas. Decorrido este tempo de exposição, parte das radículas foi coletada e fixada e parte foi transferida, por 48 e 72 horas, para placas contendo água de osmose reversa, para tratamento de recuperação. Em seguida, as raízes foram coletadas e fixadas. A fixação foi feita em Carnoy (3 partes de etanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial – v:v) por 6 horas em temperatura ambiente. Após este tempo, o fixador foi substituído por um novo fixador, recém-preparado e as radículas fixadas foram mantidas em geladeira, até o momento da confecção das lâminas. O controle negativo (CN) foi feito com água purificada por meio de osmose reversa. As radículas, previamente fixadas, foram submetidas à coloração com o reativo de Schiff, segundo metodologia descrita por Feulgen; Rossenbeck (1924) *appud* Mello; Vidal, (1978). Para o preparo das lâminas, as regiões meristemáticas (M) e F<sub>1</sub> das radículas (Figura 6) foram cobertas com lamínulas e esmagadas suavemente em uma gota de carmim acético 2%. Em seguida, as lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e as lâminas foram montadas em resina sintética. Foram confeccionadas 20 lâminas, das quais foram analisadas 500 células de cada uma, totalizando uma contagem de 10.000 células por tratamento para a avaliação de AC (teste de genotoxicidade), MN (teste de mutagenicidade), morte celular e

índice mitótico (testes de citotoxicidade). Para a análise de morte celular foi considerada a presença de células com citoplasmas vacuolizados e de volume aumentado e células com núcleos heteropicnóticos, condensados e/ou fragmentados (MAJNO; JORIS, 1995).

Todos os testes com *A. cepa* foram feitos em duplicata. As análises das duas regiões das raízes foram feitas em microscopia de luz, com aumento de 400 vezes. Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney, considerando-se significativos os valores de  $p < 0,05$ .

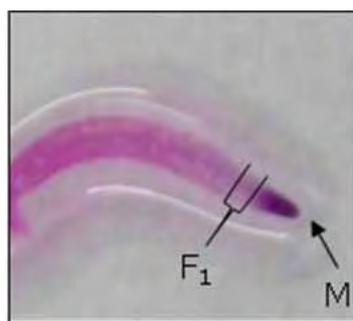


FIGURA 6 – Região meristemática (M) e região F<sub>1</sub> de uma radícula de *A. cepa*

#### 4.2.2 Ensaio *in vitro* com HepG2

As células HepG2 foram estocadas em nitrogênio líquido e cultivadas em *minimal essential medium* (MEM, Cultilab), preparado com 100 mM de piruvato de sódio (Gibco) e solução antibiótica/antimicótica (penicilina 10.000 U.I./mL/estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco). O cultivo celular foi feito em câmara úmida a uma temperatura de 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>.

Tanto para o teste do MN, como para o ensaio do cometa e da atividade da glutathion-s-transferase, as células cultivadas foram lavadas duas vezes com PBS e tripsinizadas, por 5 minutos, com Tripsina-EDTA 0,5 %. Em seguida, a tripsina foi inativada com meio de cultura completo e as células foram desassociadas por meio da sua passagem por seringa de insulina estéril de 1 mL. Foram separados 40 µL da suspensão celular para contagem em câmara de Neubauer. Após obtenção do número adequado de células para a realização de cada teste (5x10<sup>6</sup> células por frasco para os testes do MN e cometa e 1x10<sup>6</sup> células para o ensaio da glutathion-s-transferase), o material foi centrifugado, por 10 minutos, a 1.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o material foi ressuscitado com 10 mL de meio completo. Estas células foram mantidas em câmara úmida a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub>, por 24 horas, para estabilização da cultura.

#### 4.2.2.1 *Teste de citotoxicidade com 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide - MTT*

As células HepG2, cultivadas em frascos de cultura, foram tripsinizadas com 0,5 mL de tripsina 0,5 %, centrifugadas por 10 minutos a 1.500 rpm e ressuspensas em meio MEM completo (com soro). Antes da centrifugação, 40 µL da suspensão celular foi aliquoteada para a realização da contagem do número de células em câmara de Neubauer. Para este ensaio são necessárias  $1,84 \times 10^6$  células para uma microplaca de 96 poços. Após a centrifugação, 100 µL de suspensão celular foram plaqueados em 80 poços das microplacas (cerca de  $2,5 \times 10^4$  células por poço). Os 16 poços restantes, correspondentes ao “branco”, não receberam células, apenas meio MEM completo. As microplacas foram mantidas por 24 horas em câmara úmida a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> para estabilização. Decorrido este tempo, o meio de cultura das placas foi descartado e foram adicionados, em cada poço, 200 µL de cada tratamento (herbicida, inseticida e triton - CP), diluídos em meio de cultura incompleto (sem soro). Nos poços referentes ao “branco” e ao CN, apenas foram adicionados 200 µL de meio incompleto. As placas foram incubadas por mais 24 horas. Em seguida, o meio foi descartado e as placas foram incubadas por 4 horas com 150 µL de MTT (Sigma, CAS No. 298-93-1) (1 mg/mL) por poço, diluído em meio de cultura. Após as 4 horas, o MTT foi descartado e foram adicionados 100 µL de DMSO estéril por poço. Imediatamente após a adição do DMSO, as microplacas foram submetidas ao leitor para medição espectrofotométrica em filtro de 540 nm. Os testes foram realizados em duplicata.

A análise dos resultados foi feita por meio da comparação estatística (Mann-Whitney com  $p < 0,05$ ) entre as absorbâncias do CN e dos tratamentos. Quanto maior o número de células vivas, maior o valor de absorbância, pois somente as células vivas conseguem reduzir o MTT (coloração amarela) nos cristais de formazan (coloração arroxeada).

#### 4.2.2.2 *Teste do Micronúcleo em células binucleadas*

Este teste foi realizado segundo o protocolo descrito por Natarajan; Darroudi (1991). Após a estabilização das células por 24 horas em câmara úmida a 37 °C, com 5 % de CO<sub>2</sub>, foram adicionados os seguintes tratamentos, por 24 horas: a) MMS (CP); b) PBS (CN), c) inseticida imidaclopride; d) herbicida sulfentrazone; e) mistura do inseticida imidaclopride com o herbicida sulfentrazone. Após os tratamentos, seguiu-se a lavagem das células por duas vezes com PBS e a adição de 5 mL de meio de cultura completo contendo 3 µg/mL de citocalasina B (Sigma), onde as células permaneceram por 28 horas (CHEQUER et al., 2009).

Para a colheita das células, o meio dos frascos de cultivo foi transferido para tubos de centrífuga e, em seguida, as células foram lavadas, duas vezes, com 5 mL de PBS e tripsinizadas com 500 µL de Tripsina-EDTA (0,5%), por 5 minutos. A neutralização da tripsina foi feita com o meio de cultura reservado. Em seguida a suspensão celular foi passada por uma seringa de insulina para obtenção de células isoladas e, posteriormente, centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado, reservando-se apenas 0,5 mL ao qual foi adicionado 5 mL de citrato de sódio (0,01 %) e duas gotas de formaldeído 40 %. Após a homogeneização, o material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriormente descritas. O sobrenadante foi descartado, mantendo-se 0,5 mL, e foram adicionados 5 mL de metanol-ácido acético (3:1) para fixação das células. O pellet foi novamente ressuspensionado, centrifugado e o sobrenadante descartado. O novo pellet foi ressuspensionado com algumas gotas de fixador para a 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 contendo um filme de água e, após serem secas em temperatura ambiente, estas foram coradas com Giemsa 5%, em tampão fosfato, por 10 minutos. Foram feitas 3 réplicas por tratamento e a análise dos MN foi feita por meio da contagem de 2000 células binucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração, totalizando 6000 células por tratamento.

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

#### 4.2.2.3 *Ensaio do cometa*

Este ensaio foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Uhl; Helma; Knasmüller (1999, 2000), com algumas modificações. Após a estabilização das células por 24 horas em câmara úmida a 37 °C, com 5 % de CO<sub>2</sub>, as células foram tratadas, por 24 horas, com as mesmas substâncias utilizadas para o teste do MN, como descritas anteriormente. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e tripsinizadas com 500 µL de Tripsina-EDTA 0,5 % por 5 minutos. Decorrido este tempo, o processo de desprendimento celular com a tripsina foi interrompido pela adição de 5 mL de meio de cultura completo. As células foram então coletadas após centrifugação a 1500 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, reservando-se apenas 0,5 mL da solução, onde o pellet foi ressuspensionado.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método da coloração exclusiva com Azul de Trypan. Para isso, 20  $\mu\text{L}$  de suspensão celular de cada tratamento foram misturados com 20  $\mu\text{L}$  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 devido à perda da integridade da membrana plasmática), 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, aceitando-se o limite mínimo de 80 % de células viáveis, para o prosseguimento do experimento.

Após o teste viabilidade, a solução celular foi passada por uma seringa de insulina estéril de 1 mL para obtenção de células isoladas. Em seguida, uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de suspensão celular foi misturada com 120  $\mu\text{L}$  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), 1,5 %. As lâminas (2 por réplica) foram cobertas com lamínula e levadas à geladeira (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 10 N 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 39 V e 300 mA (1 V/cm). 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 50  $\mu\text{L}$  de solução de brometo de etídio 0,002 mg/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.

Os danos induzidos foram avaliados visualmente pela análise de cerca de 100 nucleóides por lâmina, não sobrepostos e escolhidos aleatoriamente, totalizando

aproximadamente 600 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.

O escore foi obtido pela multiplicação do número de nucleóides pertencentes a cada classe, pelo número da classe correspondente, segundo a fórmula:

$$\text{Score} = \sum_{i=0}^3 ni \times i$$

onde  $ni$  é o número de nucleóides de classe  $i$  e  $i$  é classe do dano (0, 1, 2, 3). Os resultados obtidos para todos os tratamentos foram analisados, estatisticamente, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2.4 Técnica de Hibridização In Situ Fluorescente (FISH)

Lâminas contendo células binucleadas, previamente expostas ao herbicida, ao inseticida e a mistura dos dois agrotóxicos, foram fixadas em Carnoy (3 partes de etanol: 1 parte de ácido acético) por 15 minutos, desidratadas em série alcoólica (70, 85 e 100 %) por 5 minutos cada e secas em estufa a 37 °C. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com RNase 100 µg/mL em 2xSSC (37 °C, por 1 hora), com pepsina 10 µg/mL em 0,2N HCl (37 °C, por 20 minutos), com formaldeído 3,7 % em 1xPBD, seguida de desidratações em série alcoólica (70, 85 e 100 % - 5 minutos em cada concentração) e secagem em estufa a 37 °C.

A sonda (*All Human Centromere probe*, Poseidon - Kreatech Diagnostics), já marcada com rodamina, foi desnaturada a 90 °C por 10 minutos, imediatamente colocada em temperatura de 4 °C, por cerca de 5 minutos, e aplicada sobre as lâminas. Após serem cobertas por lamínulas 24x40 mm, as lâminas foram desnaturadas em placa aquecida (75 °C), por 8 minutos. Para que ocorresse a hibridização, as lâminas foram mantidas *overnight*, em câmara úmida, a 37 °C. Após a hibridização, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram submetidas a uma solução de 0,4 x SSC/0,3 % Igepal, por 2 minutos, a 72 °C e, em seguida, em 2 x SSC/0,1 % Igepal, por 1 minuto a temperatura ambiente. A contracoloração das lâminas foi feita pela aplicação de 10 µL de uma solução de DAPI/Vectashield. A análise foi feita em microscópio de fluorescência com filtros para DAPI e rodamina, em aumento de 1.000 vezes, sendo contabilizadas as porcentagens de micronúcleos com sinal de centrômero (MN C+) e micronúcleos sem sinal de centrômero (MN C-).

#### 4.2.2.5 Teste para detecção da atividade da Glutathione-S-Transferase

Este teste foi realizado segundo o manual Glutathione S-Transferase Assay Kit - Cayman Chemical Company (2011), com adaptações descritas em Lamy et al. (2008).

Após a estabilização das células por 24 horas em estufa a 37 °C, com 5 % de CO<sub>2</sub>, foram adicionadas, aos frascos de cultura, as diferentes concentrações do herbicida, do inseticida e da mistura dos dois agrotóxicos (experimento realizado em triplicata). As células permaneceram nestes tratamentos, em estufa a 37° C com 5 % de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Decorrido este tempo, as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril para a retirada dos agrotóxicos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de PBS novo e, com o auxílio de um raspador de borracha, as células foram destacadas dos frascos de cultivo para posterior centrifugação (10 minutos a 2.000 g, 4 °C). Após centrifugação e descarte do sobrenadante, as células foram sonicadas com cerca de 500 µL de PBS gelado, em sonicador de ponta com potência de 17 %, por 1 segundo. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas (16.000 g, 4 °C por 20 minutos) e o sobrenadante foi recolhido e estocado a -80 °C, para posterior leitura da atividade enzimática. Para a leitura, 20 µL do sobrenadante de cada amostra foram misturados com 20 µL de glutathione reduzida, 150 µL de assay buffer e 10 µL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Para o controle negativo e para o controle enzimático, foram adicionados 170 µL de *assay buffer*. Como controle positivo, foi utilizado GST de equino. A absorbância foi medida em leitor de microplacas, a 340 nm, 25 °C, em intervalos de 1 minuto, por dez minutos. A determinação da taxa de reação da enzima ( $\Delta A_{340}/\text{min}$ ) foi calculada pela obtenção da inclinação linear da reta obtida pela plotagem dos valores de absorbância, em função do tempo e a atividade da GST foi calculada por meio da aplicação da fórmula abaixo:

$$\text{Atividade da GST (nmol/min/mL)} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{0,00503 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0,2 \text{ mL}}{0,02 \text{ mL}} \times \text{diluição da amostra}$$

#### 4.2.3 Teste de Ames (Protocolo de Pré-Incubação)

Este teste foi baseado nos protocolos descritos por Maron; Ames (1983) e Mortelmans; Zeiger (2000). Linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium* foram colocadas para crescer em incubadora shaker a uma temperatura de 37 °C, *overnight*, em caldo nutriente. Em seguida, 100 µL de cada linhagem (10<sup>9</sup> células/mL) foram adicionados em tubos de cultura contendo 500 µL de tampão fosfato e 100 µL da substância a ser testada (ou 10 µL de controle positivo). Nos ensaios com presença de ativação metabólica S9, o tampão fosfato foi

substituído por 500 µL de mistura S9 (água destilada estéril, tampão fosfato 0,2 M, NADP 0,1 M, glicose-6-fosfato 1,0 M, solução de sais (KCl 1,65 M e MgCl<sub>2</sub> 0,4 M) e fração S9). Para o CN, 100 µL de cada linhagem de bactéria foram adicionados a tubos de cultura contendo 500 µL de tampão fosfato ou de mistura S9 e 100 µL do solvente utilizado para diluir a substância teste. Os tubos contendo as misturas foram pré-incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, o seu conteúdo, acrescido de 2 mL de ágar de superfície, foi vertido em placas de Petri estéreis contendo ágar mínimo solidificado. As placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica a 37 °C por 66 horas.

Cada teste foi realizado em triplicata. Os CP foram realizados em duplicata e o CN, em quintuplicata.

Para a análise de mutagenicidade, as colônias de bactérias revertentes foram contadas manualmente. Os dados foram avaliados pelo teste ANOVA (software Salanal) e considerados positivos quando os resultados do teste estatístico e de dose resposta foram significativos, segundo o modelo de Bernstein (BERNESTEIN et al., 1982). Os resultados foram expressos pelo número de revertentes por miligrama do agrotóxico testado.

## 5. RESULTADOS

**ARTIGO 1: “Efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida imidaclopride, do herbicida sulfentrazone e da mistura destes dois agrotóxicos para células de *Allium cepa*”**

**Jaqueline Bianchi Ambrósio, Thais Cristina C. Fernandes, Maria Aparecida Marin-Morales.**

### Resumo

A introdução de novos compostos químicos no meio ambiente, principalmente de resíduos de agrotóxicos, tem contribuído, de maneira substancial, para o aumento nas taxas de genotoxicidade e mutagenicidade em organismos não-alvos. Para avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos destes compostos em organismos eventualmente expostos, sementes da espécie *Allium cepa* foram submetidas a diferentes concentrações do inseticida imidaclopride, do herbicida sulfentrazone e da mistura destes dois agrotóxicos, por um período de 24 horas de exposição, seguidos de períodos de recuperação de 48 e 72 horas. As análises isoladas de cada agrotóxico indicaram que o inseticida possui uma ação clastogênica indireta sobre as células de *A. cepa* e que apenas a maior concentração testada (7,5 mL/L, correspondente à concentração de campo), apresentou efeitos persistentes nas células, com indução de aberrações cromossômicas (AC), mesmo após 72 horas de interrupção do tratamento. O herbicida sulfentrazone induziu vários tipos de AC nas células em diferentes tempos de tratamento, enquanto que a indução de micronúcleos (MN) foi observada somente para a menor concentração testada (0,12 mL/L), em todos os tempos de tratamento. A análise da citotoxicidade deste herbicida indicou uma diminuição nos índices mitóticos (IM) das células analisadas, provavelmente pela grande indução de AC do tipo aderência cromossômica. Ainda, a concentração de 12 mL/L (correspondente à concentração de campo) causou a morte das células por apoptose. As análises da mistura do inseticida imidaclopride com o herbicida sulfentrazone indicaram, além de efeitos genotóxicos e mutagênicos, uma redução no IM das células analisadas, especialmente das expostas à mistura das maiores concentrações de herbicida e inseticida. Comparativamente aos resultados apresentados por cada agrotóxico isoladamente, a análise dos efeitos da mistura apontou para uma diferença no mecanismo de ação dos agrotóxicos, quando aplicados conjuntamente. Pelos tipos de danos induzidos, observamos que os agrotóxicos apresentaram, independentemente, uma ação clastogênica predominante. Já as respostas celulares frente à

exposição à mistura mostraram que houve uma manutenção do efeito aneugênico, mas uma diminuição dos efeitos clastogênicos. Ainda, a mistura dos agrotóxicos induziu um efeito antagonista quanto à indução de AC, MN e IM nas células de *A. cepa*, induzindo uma quantidade menor de danos cromossômicos, quando comparado com a indução de tais danos para cada agrotóxico testado isoladamente.

**Palavras-chave:** genotoxicidade, mutagenicidade, aberração cromossômica, micronúcleo, apoptose

## 1. Introdução

A aplicação de agrotóxicos ainda constitui o modo mais efetivo e aceito para proteger as plantas de pragas agrícolas e tem contribuído significativamente para aumentar a produtividade das culturas (BOLOGNESI, 2003). No entanto, o uso massivo e a atividade biocida dos agrotóxicos aumentam a probabilidade de impactos negativos em organismo não-alvos, como os da biota aquática, as plantas, os mamíferos e os microrganismos do solo (EC, 1996). A exposição aos agrotóxicos ocorre, inevitavelmente, por meio da contaminação ambiental, pelo uso ocupacional ou pela alimentação. Esta contaminação, de modo geral, está associada aos resíduos dos agrotóxicos (incluindo seus produtos de degradação física ou biológica) presentes no ar, na água e nos alimentos (BOLOGNESI, 2003). De modo geral, os agrotóxicos não são encontrados isolados no meio ambiente (DEMSIA et al., 2007) e, desta forma, há uma necessidade de se avaliar os efeitos causados por combinações de agrotóxicos que são comumente utilizados nas culturas, para que seja feita uma avaliação real dos efeitos prejudiciais que eles possam promover nos organismos (DAS; SHAIK; JAMIL, 2007).

No Brasil, devido ao grande uso de agrotóxicos na agricultura, estima-se que dois terços da população estão expostos, em diferentes níveis, aos efeitos nocivos destes químicos tanto pela exposição ocupacional (PERES; ROZEMBERG; LUCCA, 2005), como pela contaminação ambiental (FENSKE, 1997, HOPPIN et al., 2006). Em consequência desse elevado consumo, cerca de 150.000 toneladas de agrotóxicos são lançados, anualmente, no território brasileiro (CRESTANA, 2000).

Dentre as culturas que mais utilizam agrotóxicos no Brasil, a de cana-de-açúcar se destaca pela sua ampla distribuição espacial (SPADOTTO; GOMES; RODRIGUES, 1998). Nesta cultura, dois agrotóxicos são bastante utilizados: o herbicida Boral® e o inseticida Evidence®. O herbicida, que tem como ingrediente ativo o sulfentrazone, pertence ao grupo químico das triazolinonas, é classificado como altamente móvel e persistente, e tem um alto

potencial de lixiviação, tanto vertical quanto horizontalmente (AGROFIT, 2004, EPA, 2004). Além disso, ele é substancialmente lixiviado para as águas subterrâneas em áreas com solo arenoso e seus resíduos são altamente persistentes e dissipados lentamente (EPA, 1997). Seu mecanismo de ação se dá por meio da inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX), localizada nos cloroplastos das plantas. Esta enzima atua na oxidação da protoporfirinogênio, produzindo protoporfirina IX, que é convertida em clorofila pela quelação do  $Mg^{2+}$  (BEALE; WEINSTEIN, 1990, MATRINGE; MORNET; SCALLA, 1992). A inibição da PROTOX acarreta em um acúmulo de protoporfirinogênio no cloroplasto fazendo com que haja uma difusão desta substância para o citoplasma, onde ela sofre oxidação por meio de uma reação não-enzimática, produzindo uma protoporfirina IX, que é diferente daquela produzida pela via normal (OLIVEIRA Jr., 2001) e, portanto, não pode ser consumida na via de biosíntese de porfirina (ALSCHER; DONAHUE; CRAMER, 1997). Na presença de luz e oxigênio, a protoporfirina IX produz a forma reativa do oxigênio (oxigênio singlete), que é responsável pela peroxidação de proteínas e lipídeos das membranas celulares, causando ruptura das membranas e fazendo com que as plantas adquiram aspecto clorótico, além de causar necrose e morte dos tecidos sensíveis (OLIVEIRA Jr., 2001).

O inseticida, que tem como ingrediente ativo o imidaclopride, pertence ao grupo químico dos neonicotinóides, tem alto potencial de deslocamento no solo e pode atingir, principalmente, as águas subterrâneas (BAYER CROPS SCIENCE Ltda, 2007). O imidaclopride age no sistema nervoso central dos insetos como um agonista do receptor acetilcolina nicotínico (CHAO; CASIDA, 1997). Inicialmente, ele causa uma estimulação nos neurônios, seguida por uma fadiga dos mesmos e uma interferência na transmissão dos impulsos nervosos (SCHULZ-JANDER; CASIDA, 2002, ZHANG et al., 2000, MATSUDA et al., 2000). Sua seletiva toxicidade para insetos e fraca toxicidade para mamíferos e outros vertebrados se dá por meio da alta especificidade para os diversos subtipos de receptores nicotínicos encontrados nos insetos e por sua pobre penetração na barreira hemato-encefálica de mamíferos (SHEETS, 2001a,b).

Em vista da problemática da contaminação ambiental pelos agrotóxicos e de seus possíveis efeitos nos organismos expostos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do herbicida sulfentrazone, do inseticida imidaclopride e da mistura destes dois, sobre o material genético de células meristemáticas e  $F_1$  de *Allium cepa*, por meio de testes de aberrações cromossômicas e do micronúcleo.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Materiais

Os agrotóxicos utilizados foram o herbicida sulfentrazone (Boral<sup>®</sup>) (50% pureza, FMC *Agricultural Products*) e o inseticida imidaclopride (Evidence<sup>®</sup>) (48% pureza, Bayer S/A).

As concentrações testadas foram baseadas nas concentrações de campo indicadas para cada agrotóxico e, a partir delas, realizadas as diluições em água. A concentração usualmente usada em campo para o inseticida imidaclopride é de 7,5 mL/L e para o herbicida sulfentrazone é de 12 mL/L. Inicialmente, as concentrações propostas para o estudo do herbicida seriam 12 mL/L, 1,2 mL/L e 0,12 mL/L. Em ensaios preliminares, a concentração de campo do herbicida (12 mL/L) induziu a morte das células e, assim, novos testes foram realizados com concentrações menores, a fim de encontrar a maior concentração não citotóxica para as células de *A. cepa*. As concentrações testadas foram: 6 mL/L, 5 mL/L, 4 mL/L, 3 mL/L e 2 mL/L. Os resultados (dados não apresentados), mostraram que concentrações abaixo de 3mL/L seriam indicadas para os testes de mutagenicidade e genotoxicidade, por não induzirem taxas significativas de morte celular e nem de diminuição dos índices mitóticos. Desta forma, a concentração de 2,4 mL/L foi escolhida, por ser o dobro da concentração seguinte a ser testada no teste inicial (1,2 mL/L). As concentrações testadas de cada agrotóxico estão indicadas na tabela 1.

Tabela 1 - Concentrações testadas dos agrotóxicos

Herbicida	Inseticida	Mistura (herbicida + inseticida)
12 mL/L	-	-
2,4 mL/L	7,5 mL/L	2,4 + 7,5 (M1)
1,2 mL/L	0,75 mL/L	1,2 + 0,75 (M2)
0,12 mL/L	0,075 mL/L	0,12 + 0,075 (M3)

### 2.2 Métodos

Os testes de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade com *Allium cepa* foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982), com pequenas adaptações. Sementes da espécie *A. cepa* (2n = 16), variedade baia periforme, foram colocadas para germinar em placas de Petri forradas com papel de filtro umedecidos com água de osmose reversa, até as radículas atingirem cerca de 1 cm de comprimento. Em seguida, estas radículas foram expostas a diferentes concentrações do inseticida imidaclopride

(Evidence®), do herbicida sulfentrazone (Boral®) e da mistura das três concentrações testadas destes dois agrotóxicos, por um período de 24 horas.

Decorrido este tempo, parte das radículas foi coletada e fixada em Carnoy (3 partes de etanol: 1 parte de ácido acético) por 6 horas em temperatura ambiente, e parte foi transferida para placas contendo água de osmose reversa, para tratamentos de recuperação por 48 e 72 horas. Após estes períodos, as radículas foram coletadas, fixadas em Carnoy e mantidas sob refrigeração até o momento da confecção das lâminas. O controle positivo (CP) foi feito com metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS No 66-27-3), na concentração de 10 mg/L e o controle negativo (CN), com água purificada por meio de osmose reversa. O preparo das concentrações dos agrotóxicos testados e do MMS foi feito em água de osmose reversa.

Para confecção das lâminas, as radículas foram submetidas ao reativo de Schiff, segundo metodologia descrita por Feulgen; Rossenbeck (1924) *appud* Mello; Vidal, (1978), por 2 horas. As regiões meristemáticas e F<sub>1</sub> das radículas foram cobertas com lamínula e cuidadosamente esmagadas em uma gota de carmim acético 2%. Após remoção das lamínulas em nitrogênio líquido, as lâminas foram montadas em resina sintética para posterior análise microscópica. Foram confeccionadas 20 lâminas para a avaliação de aberrações cromossômicas (AC), micronúcleos (MN), morte celular (presença de células com citoplasmas vacuolizados e com volume aumentado e células com núcleos heteropicnóticos, condensados e/ou fragmentados, segundo descrição de Majno; Joris, 1995) e índice mitótico para cada tratamento, levando-se em conta a porcentagem de ocorrência de cada uma delas. Em cada lâmina foram analisadas 500 células, totalizando 10.000 células por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney, considerando-se significativos os valores de  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

A tabela 2 traz os resultados das análises de AC, MN e IM, obtidos em células de *A. cepa*, após exposição por 24 horas ao inseticida imidaclopride, ao herbicida sulfentrazone e à mistura destes dois agrotóxicos. Podemos observar que, após a exposição das células ao inseticida imidaclopride, a indução de AC e MN, embora ligeiramente superiores às observadas para as células do CN, não foi significativa, com exceção da indução de MN nas células meristemáticas submetidas à concentração de 0,075 mL/L ( $p = 0,02$ ).

Além disso, a análise dos índices mitóticos indicou que este inseticida não possui efeitos citotóxicos significativos sobre as células estudadas. Já para o herbicida sulfentrazone, foi verificado que a concentração de 12 mL/L causou total inibição da divisão celular,

impossibilitando as análises de genotoxicidade e mutagenicidade. Como pode ser observado na figura 1, todas as células expostas por 24 horas à concentração de 12 mL/L apresentaram indícios de morte celular por apoptose (fragmentação do material genético). As demais concentrações testadas do herbicida permitiram a progressão do ciclo celular e, portanto, o desenvolvimento dos testes de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade. A concentração de 2,4 mL/L induziu índices significativos de AC nas células expostas ( $p = 0,0398$ ), enquanto que a menor concentração (0,12 mL/L) induziu índices significativos de MN nas células da região meristemática das raízes de *A. cepa* ( $p < 0,0001$ ).

A análise dos índices mitóticos, com exceção da concentração de 12 mL/L, nos indicou que as três demais concentrações testadas deste herbicida não possuem efeitos citotóxicos significativos sobre as células de *A. cepa*. Após exposição das células por 24 horas à mistura das três diferentes concentrações do inseticida com o herbicida, verificou-se que a mistura M3 induziu resultados significativos de MN na região meristemática ( $p = 0,0027$ ), enquanto que a mistura M1 causou uma diminuição significativa no IM ( $p = 0,0021$ ).

Tabela 2 – Frequências (Freq), médias (M) e desvio padrão (dp) das aberrações cromossômicas (AC), micronúcleos (MN) e índice mitótico (IM) observados em células de *Allium cepa*, após 24 horas de exposição ao inseticida imidaclopride, ao herbicida sulfentrazone e à mistura destes agrotóxicos.

Agrotóxico	Concentrações	AC		MN-M		MN-F <sub>1</sub>		IM	
		Freq	M±dp	Freq	M±dp	Freq	M±dp	Freq	M±dp
Imidaclopride	CN	0,12	1,65 ± 0,74	0,06	0,30 ± 0,57	0,07	0,40 ± 0,82	27,70	145,2 ± 61,19
	0,075 mL/L	0,22	1,20 ± 1,28	0,23	1,25 ± 1,55*	0,15	0,80 ± 1,00	29,53	160,3 ± 61,49
	0,75 mL/L	0,17	0,90 ± 0,91	0,13	0,70 ± 0,86	0,24	1,25 ± 1,44	21,04	110,1 ± 34,19
	7,5 mL/L	0,26	1,40 ± 1,35	0,14	0,75 ± 1,20	0,16	0,85 ± 1,22	22,27	120,2 ± 43,37
	CP – MMS	0,61	3,15 ± 2,32*	2,66	13,7 ± 7,43**	0,24	1,25 ± 1,37*	42,75	221,1 ± 114,55*
Sulfentrazone	CN	0,09	0,50 ± 0,69	0,07	0,35 ± 0,49	0,21	1,10 ± 1,07	37,26	195,70 ± 49,85
	0,12 mL/L	0,21	1,10 ± 1,45	1,18	6,10 ± 5,67**	0,27	1,40 ± 2,09	37,33	192,10 ± 43,51
	1,2 mL/L	0,09	0,45 ± 0,99	0,10	0,50 ± 0,88	0,10	0,50 ± 0,61	32,64	168,45 ± 62,62
	2,4 mL/L	0,26	1,35 ± 1,31*	0,18	0,95 ± 1,14	0,33	1,70 ± 1,87	33,70	173,55 ± 60,07
	12 mL/L	-	-	-	-	-	-	0	0
	CP – MMS	0,58	2,95 ± 2,06**	4,84	24,7 ± 17,06**	0,31	1,60 ± 1,76	47,92	244,50 ± 51,72*
Mistura	CN	0,09	0,45 ± 0,69	0,09	0,50 ± 0,69	0,09	0,45 ± 0,76	39,40	204,15 ± 54,29
	M3	0,15	0,80 ± 1,06	0,61	3,15 ± 4,04*	0,20	1,05 ± 1,05	34,40	178,20 ± 73,57
	M2	0,19	1,00 ± 1,30	0,21	1,15 ± 1,42	0,06	0,30 ± 0,57	33,94	180,75 ± 60,96
	M1	0,20	1,05 ± 1,60	0,11	0,60 ± 0,88	0,20	1,05 ± 1,14	27,53	142,60 ± 64,35*
	CP - MMS	0,34	1,75 ± 1,71*	4,66	24,25 ± 21,26**	0,62	3,25 ± 4,05**	52,06	270,85 ± 55,08*

- Freq: frequência dos parâmetros analisados: número de AC ou de MN-M ou de MN-F<sub>1</sub> ou de células em divisão/número total de células analisadas\*100.

- MN-M: micronúcleos observados na região meristemática; MN-F<sub>1</sub>: micronúcleos observados na região F<sub>1</sub>.

- M3: mistura do herbicida sulfentrazone (0,12 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,075 mL/L); M2: mistura do herbicida sulfentrazone (1,2 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,75 mL/L); M1: mistura do herbicida sulfentrazone (2,4 mL/L) com o inseticida imidaclopride (7,5 mL/L).

- \* $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,0001$ .

Após o período de recuperação de 48 horas, foram verificadas induções significativas de AC em células de *A. cepa* para todas as concentrações testadas do inseticida imidaclopride (7,5 mL/L:  $p = 0,0016$ ; 0,75: mL/L  $p = 0,0021$  e 0,075 mL/L:  $p = 0,0453$ ), mas nenhum resultado significativo foi verificado para indução de MN ou alterações nos índices mitóticos. Após o período de recuperação de 72 horas, as células expostas à concentração de 7,5 mL/L do inseticida apresentaram índices significativos de AC ( $p = 0,0326$ ). Para o herbicida, verificou-se, após o período de recuperação de 48 horas, que a concentração de 1,2 mL/L induziu índices significativos de AC ( $p = 0,0029$ ), enquanto que a concentração de 0,12 mL/L induziu índices significativos de MN nas células da região meristemática ( $p < 0,0001$ ) e nas células da região F<sub>1</sub> das raízes de *A. cepa* ( $p < 0,0001$ ). Essa concentração também induziu um aumento do IM ( $p = 0,0275$ ), quando comparadas com os resultado obtidos no CN. Após o período de recuperação de 72 horas, a concentração de 0,12 mL/L induziu índices significativos de AC ( $p = 0,0499$ ) e de MN na região meristemática ( $p = 0,0003$ ) e F<sub>1</sub> ( $p < 0,0001$ ) das raízes de *A. cepa*. Com relação ao IM, foi observada uma redução significativa, em relação ao CN, para as células expostas a concentração de 2,4 mL/L. A mistura do inseticida imidaclopride com o herbicida sulfentrazone indicou, após o tratamento de recuperação de 48 horas, uma indução significativa de AC para as três combinações da mistura do herbicida com o inseticida (M1:  $p = 0,0411$ ; M2:  $p = 0,0094$  e M3:  $p = 0,0398$ ). A mistura M2 também induziu índices significativos de MN nas células da região meristemática das raízes de *A. cepa* ( $p = 0,0385$ ). Para o período de recuperação de 72 horas, nenhum efeito genotóxico ou mutagênico foi observado nas células de *A. cepa* analisadas. No entanto, as misturas M1 e M2 induziram efeitos citotóxicos significativos nas células analisadas, verificados pela redução do IM destas células, quando comparadas com o CN (M1:  $p = 0,0003$ ; M2:  $p = 0,0453$ ) (Tabela 3). Foram observadas algumas células em processo de morte celular para a mistura M1, após o período de recuperação de 48 horas, e para a mistura M3, após o período de recuperação de 72 horas. Porém, estes resultados não foram significativos em relação ao CN (Tabela 4).

Tanto para o inseticida, quanto para o herbicida (com exceção da concentração de 12 mL/L), não foram observadas células em processo de morte celular para as concentrações testadas.

O MMS, utilizado como CP nos diferentes testes com *A. cepa*, apresentou resultados significativos para a indução de AC, MN (regiões meristemática e F<sub>1</sub>) e aumento do IM para os ensaios realizados com os dois agrotóxicos testados e com a mistura deles, validando os ensaios com este organismo teste.

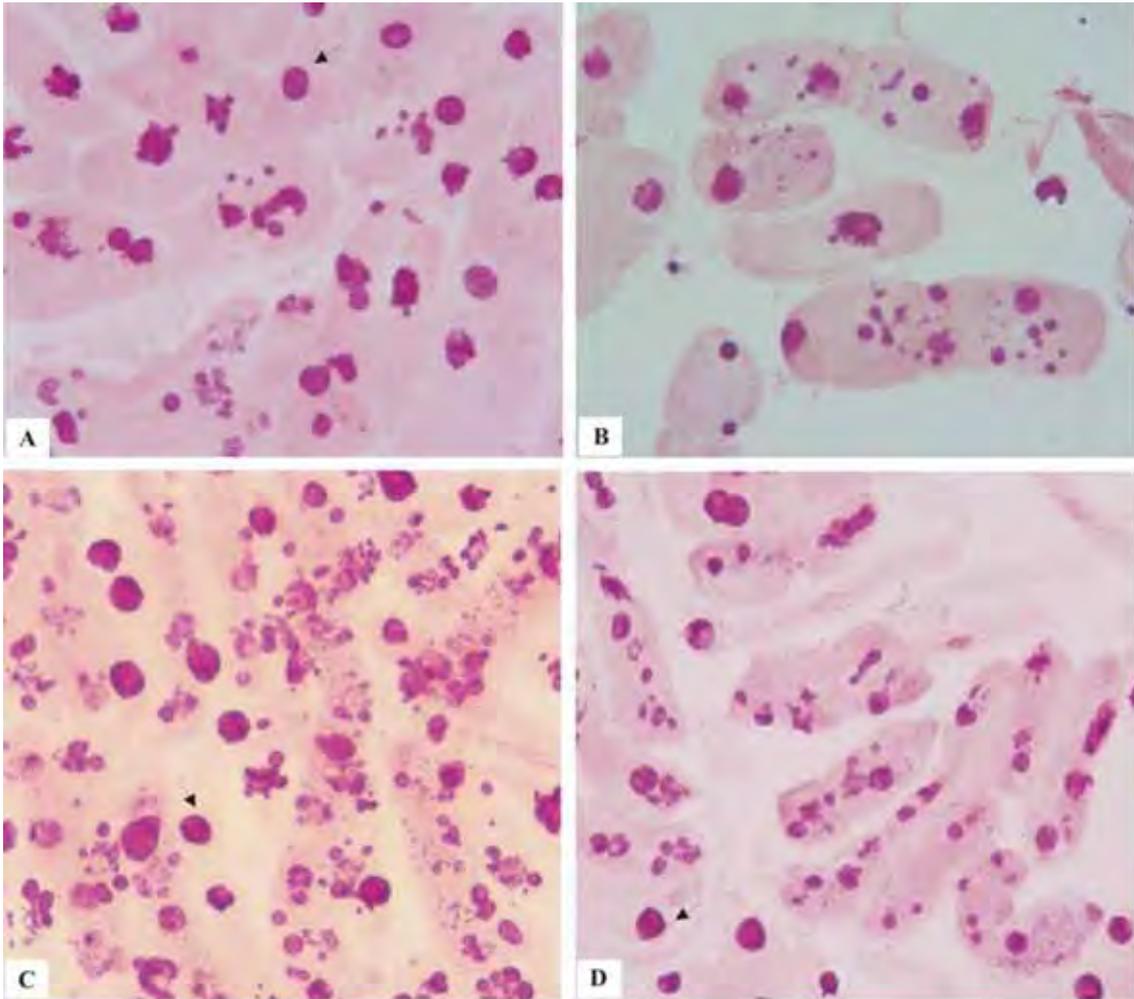


Figura 1 - Células meristemáticas de *Allium cepa* em processo de morte celular por apoptose (fragmentação do material genético nuclear), após exposição por 24 horas à concentração de 12 mL/L de sulfentrazone. Setas: células apresentando condensação da cromatina. Aumento: 400 vezes.

Tabela 3 – Frequências (Freq), médias (M) e desvio padrão (dp) das AC, MN e IM observados em células de *Allium cepa*, após períodos de recuperação de 48 e 72 horas.

Períodos de recuperação	Substâncias teste	Concentrações (mL/L)			AC			MN-M			MN-F <sub>1</sub>			IM		
					Freq	M±dp	Freq	M±dp	Freq	M±dp	Freq	M±dp	Freq	M±dp		
48 horas	CN	-	0,075	0,12	0,65 ± 0,74	0,08	0,45 ± 0,82	0,08	0,40 ± 0,50	0,08	0,40 ± 0,50	30,09	160,4 ± 56,81			
	Imidaclopride	0,075	0,75	0,32	1,65 ± 1,56*	0,04	0,20 ± 0,41	0,09	0,45 ± 0,68	0,09	0,45 ± 0,68	29,92	154,9 ± 46,70			
	CP -MMS	10 (mg/L)	7,5	0,42	2,20 ± 1,88*	0,08	0,45 ± 0,68	0,10	0,50 ± 1,00	0,16	0,85 ± 0,93	30,56	159,9 ± 41,98			
72 horas	CN	-	0,075	0,34	1,75 ± 1,01*	0,13	0,70 ± 1,12	0,13	0,70 ± 1,12	0,16	0,85 ± 0,93	29,18	151,9 ± 47,51			
	Imidaclopride	0,075	7,5	0,27	1,40 ± 1,27*	2,95	15,45 ± 10,24**	0,08	0,40 ± 0,99	0,13	0,70 ± 1,26	31,81	165,05 ± 38,55			
	CP -MMS	10 (mg/L)	7,5	0,26	1,35 ± 1,03	0,09	0,45 ± 0,60	0,12	0,65 ± 0,81	0,24	1,25 ± 1,48	30,15	156,95 ± 55,58			
48 horas	CN	-	0,12	0,10	0,50 ± 0,51	0,13	0,70 ± 1,08	0,13	0,70 ± 1,08	0,08	0,40 ± 0,50	31,77	163,75 ± 65,97			
	Sulfentrazona	0,12	1,2	0,18	0,95 ± 0,89	1,28	6,60 ± 5,41**	0,17	0,90 ± 1,07	1,55	7,90 ± 7,84**	39,07	200,95 ± 46,27*			
	CP -MMS	10 (mg/L)	2,4	0,35	1,80 ± 1,54*	0,17	0,90 ± 1,07	0,18	0,95 ± 1,32	0,29	1,50 ± 1,90	32,00	166,20 ± 50,21			
72 horas	CN	-	0,12	0,14	0,75 ± 1,07	0,10	0,55 ± 0,76	0,10	0,55 ± 0,76	0,07	0,35 ± 0,67	31,62	164,85 ± 39,70			
	Sulfentrazona	0,12	1,2	0,28	1,45 ± 1,19*	0,59	3,00 ± 2,54*	0,26	1,35 ± 1,84	0,64	3,30 ± 3,03**	36,19	184,85 ± 41,51			
	CP -MMS	10 (mg/L)	2,4	0,21	1,10 ± 0,97	0,15	0,80 ± 1,61	0,15	0,80 ± 1,61	0,18	0,95 ± 1,32	29,66	155,10 ± 43,53			
48 horas	CN	-	0,075	0,14	0,75 ± 1,02	0,13	0,79 ± 0,86	0,13	0,79 ± 0,86	0,16	0,85 ± 0,93	31,88	167,15 ± 54,24			
	Mistura	M3	0,75	0,27	1,40 ± 1,04*	0,18	0,95 ± 1,43	0,30	1,55 ± 1,32*	0,23	1,20 ± 1,10	38,14	200,10 ± 55,09			
	CP -MMS	10 (mg/L)	7,5	0,36	1,85 ± 1,63*	0,20	1,05 ± 1,05	0,20	1,05 ± 1,05	0,18	0,95 ± 1,32	34,01	175,60 ± 42,73			
72 horas	CN	-	0,075	0,14	0,60 ± 0,99	0,16	0,85 ± 0,93	0,16	0,85 ± 0,93	0,16	0,85 ± 1,18	31,39	163,25 ± 39,14			
	Mistura	M3	0,75	0,29	1,50 ± 1,85	0,22	1,15 ± 1,42	0,22	1,15 ± 1,42	0,12	0,65 ± 0,74	29,20	150,50 ± 61,65			
	CP -MMS	10 (mg/L)	7,5	0,30	1,60 ± 1,81	0,26	1,40 ± 1,50	0,26	1,40 ± 1,50	0,20	1,05 ± 1,14	25,29	133,25 ± 33,88*			
48 horas	CN	-	0,075	0,14	0,45 ± 0,69	0,28	1,45 ± 1,32	0,18	0,95 ± 0,89	0,18	0,95 ± 0,89	19,36	99,90 ± 52,65*			
	Mistura	M3	0,75	0,09	0,45 ± 0,69	0,28	1,45 ± 1,32	0,18	0,95 ± 0,89	0,18	0,95 ± 0,89	19,36	99,90 ± 52,65*			
	CP -MMS	10 (mg/L)	7,5	0,52	2,70 ± 1,92*	6,30	32,90 ± 22,09**	10,18	52,50 ± 39,93**	10,18	52,50 ± 39,93**	36,39	189,90 ± 60,25*			

- Freq: frequência dos parâmetros analisados; número de AC ou de MN-M ou de MN-F<sub>1</sub> ou de células em divisão/número total de células analisadas\*100.

- MN-M: micronúcleos observados na região meristemática. MN-F<sub>1</sub>: micronúcleos observados na região F<sub>1</sub>.

- M3: mistura do herbicida sulfentrazona (0,12 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,075 mL/L); M2: mistura do herbicida sulfentrazona (1,2 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,75 mL/L); M1: mistura do herbicida sulfentrazona (2,4 mL/L) com o inseticida imidaclopride (7,5 mL/L).

- \* p < 0,05 / \*\* p < 0,0001.

Tabela 4 – Frequências (Freq), médias (M) e desvio padrão (dp) de morte celular (MC) observados em células de *A. cepa* expostas à mistura do inseticida imidaclopride com o herbicida sulfentrazone, após períodos de recuperação de 48 e 72 horas.

Períodos de recuperação	Substância teste	MC	
		Freq	M±dp
48 horas	CN	0	0
	M3	0	0
	M2	0	0
	M1	0,06	0,3 ± 1,34
	CP -MMS	0	0
72 horas	CN	0	0
	M3	0,05	0,25 ± 1,12
	M2	0	0
	M1	0	0
	CP -MMS	0	0

- Freq: frequência dos parâmetros analisados: número de AC ou de MN-M ou de MN-F<sub>1</sub> ou de células em divisão/número total de células analisadas\*100.
- M3: mistura do herbicida sulfentrazone (0,12 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,075 mL/L); M2: mistura do herbicida sulfentrazone (1,2 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,75 mL/L); M1: mistura do herbicida sulfentrazone (2,4 mL/L) com o inseticida imidaclopride (7,5 mL/L).

Os tipos e as quantidades de AC encontradas após os diferentes tempos de exposição ao inseticida e ao herbicida estão indicados, respectivamente, na figura 2 e na tabela 5. De um total de 303 células portadoras de AC induzidas pelo inseticida, 42,57 % corresponderam a AC do tipo clastogênica (pontes e quebras cromossômicas), enquanto que 19,80 % corresponderam a AC do tipo aneugênica (perdas cromossômicas, anáfases multipolares, C-metáfases e células poliplóides). O restante (37,63 %) das AC observadas (aderências cromossômicas, brotos nucleares e células binucleadas) pode ter diferentes origens e, portanto, não pode ser atribuído a um mecanismo específico de formação. Para o herbicida, de um total de 216 células portadoras de AC, 36,57 % corresponderam a AC do tipo clastogênica (pontes e quebras cromossômicas), enquanto que 21,29 % corresponderam a AC do tipo aneugênica (perdas cromossômicas, anáfases multipolares, C-metáfases e células poliplóides). O restante (42,14 %) das AC observadas (aderências cromossômicas, brotos nucleares, células binucleadas e núcleo lobulado) não pode ser atribuído a um mecanismo específico de formação.

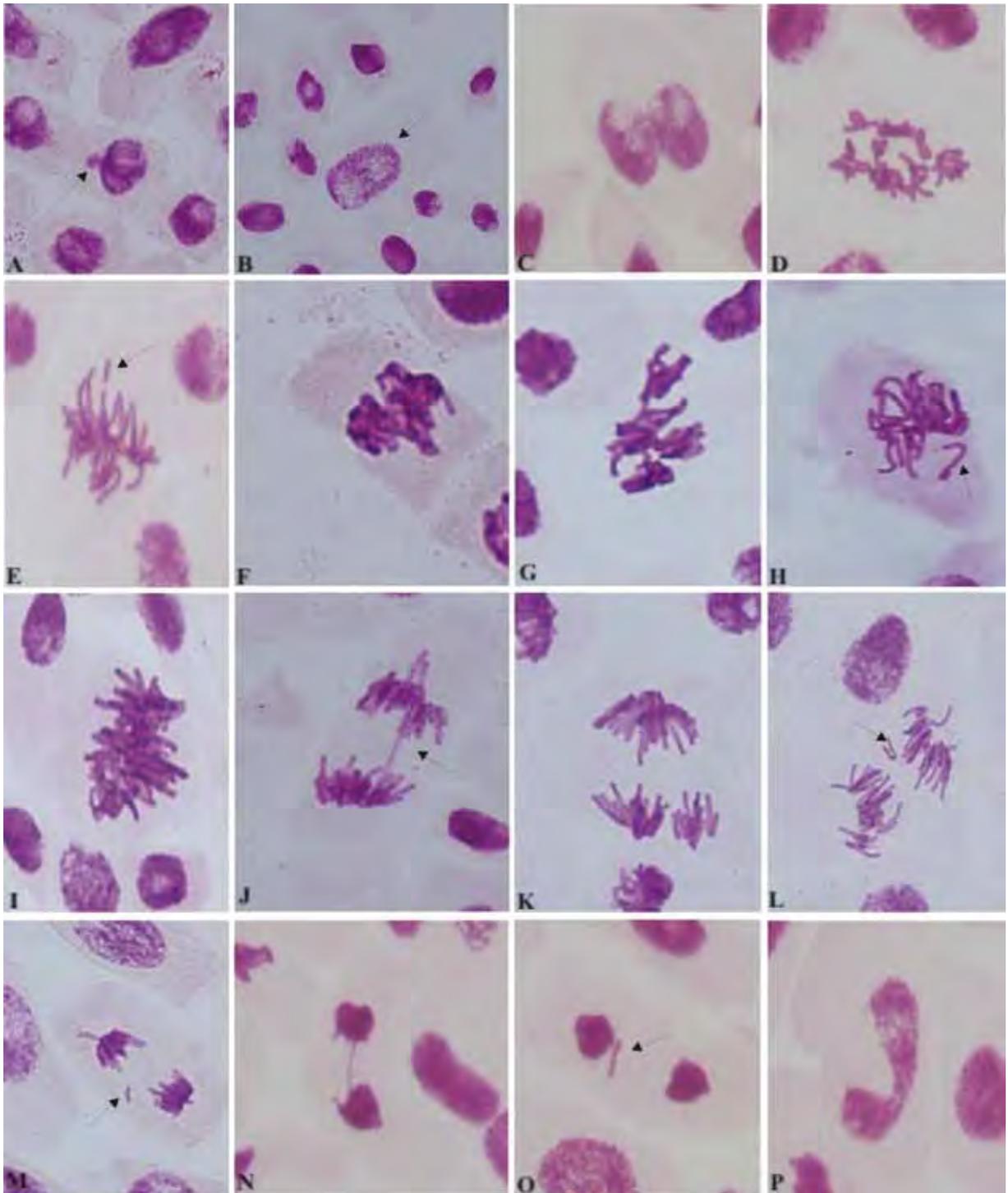


Figura 2 - Aberrações cromossômicas encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa* após exposições ao inseticida imidaclopride e ao herbicida sulfentrazone. A) broto nuclear (seta); B) prófase poliplóide (seta); C) célula binucleada; D) C-metáfase; E) metáfase com quebra cromossômica; F-G) aderências cromossômicas; H) metáfase com perda cromossômica (seta); I) metáfase poliplóide; J) anáfase com ponte cromossômica (seta); K) anáfase multipolar, L) anáfase com perda cromossômica (seta); M) anáfase com quebra cromossômica (seta); N) telófase com ponte; O) telófase com perda cromossômica (seta); P) núcleo lobulado. Aumento: 400 vezes.

Tabela 5 - AC em células de *A. cepa* expostas, por 24 horas ao imidaclopride e ao sulfentrazona, e após recuperação 48 e 72 horas.

Substâncias testes	Tempos de exposição	Concentrações (mL/L)	AC												
			Ponte	Aderência	Quebra	Perda	Anáfase multipolar	C- metáfase	Broto nuclear	Célula binucleada	Célula poliploide	Núcleo lobulado			
Imidaclopride	24 horas	CN	6	5	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		0,075	14	1	4	1	-	1	3	-	-	-	-	-	-
		0,75	10	2	1	2	-	1	1	-	-	-	-	-	-
		7,5	8	16	-	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-
		CP	15	2	31	11	-	-	4	-	-	-	-	-	-
	48 horas (recuperação)	CN	8	2	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
		0,075	14	12	-	2	-	-	-	1	4	-	-	-	-
		0,75	27	10	-	5	1	1	1	-	-	-	-	-	-
		7,5	5	20	-	1	-	1	2	3	3	-	-	-	-
		CP	13	1	6	2	1	3	2	-	-	-	-	-	-
	72 horas (recuperação)	CN	7	7	-	2	1	-	-	-	10	-	-	-	-
		0,075	15	8	-	5	2	1	-	-	5	-	-	-	-
		0,75	13	12	-	2	-	1	1	-	6	-	-	-	-
		7,5	18	13	-	1	2	-	8	-	8	-	-	-	-
		CP	9	2	3	3	-	-	-	1	5	-	-	-	-
Sulfentrazona	24 horas	CN	5	1	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-
		0,12	7	2	4	3	-	1	4	-	1	-	-	-	
		1,2	2	-	-	3	-	1	3	-	-	-	-	-	
		2,4	3	4	1	2	-	2	13	1	-	-	1	-	
		CP	15	1	28	7	-	2	5	-	1	-	-	-	
	48 horas (recuperação)	CN	1	-	-	2	1	1	5	-	-	-	-	-	-
		0,12	8	1	4	-	-	-	2	2	2	-	-	-	-
		1,2	8	12	-	2	1	-	4	5	4	-	-	-	-
		2,4	5	4	1	7	1	-	4	1	1	-	-	-	
		CP	10	-	4	10	1	4	7	1	1	1	1	1	
	72 horas (recuperação)	CN	3	4	2	3	1	1	-	1	-	-	-	-	-
		0,12	13	3	4	4	-	3	2	-	-	-	-	-	-
		1,2	11	8	1	4	1	1	1	1	-	-	-	-	-
		2,4	6	12	1	2	-	-	-	1	1	-	-	-	-
		CP	12	3	1	5	1	1	4	-	-	-	-	-	-

As quantidades e os tipos de AC encontradas nos tratamentos de 24 horas e de 48 e 72 horas de recuperação, para a mistura do imidaclopride com o sulfentrazone, estão indicados na tabela 6 e representados na figura 3.

As tabelas 7 e 8 reúnem os dados das quantidades de AC e MN induzidos pelas três concentrações testadas do inseticida e do herbicida, isoladamente, e pelas misturas resultantes da associação dos dois agrotóxicos, para o período de 24 horas de exposição e de 48 e 72 horas de recuperação, possibilitando uma análise geral dos efeitos destes agrotóxicos.

Tabela 6 - Tipos de aberrações cromossômicas (AC) encontradas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas por 24 horas, e após períodos de recuperação de 48 e 72 horas, às misturas M1, M2, M3 dos agrotóxicos imidaclopride e sulfentrazone.

Tempos de Exposição	Tratamentos	AC										
		Ponte	Aderência	Quebra	Perda	Anáfase multipolar	Ponte e perda	C-metáfase	Atraso	Broto nuclear	Célula binucleada	Célula poliploide
24 horas	CN	1	1	-	1	-	-	-	-	3	1	2
	M3	3	6	-	-	-	-	1	-	3	3	-
	M2	-	7	-	2	2	-	-	-	4	4	1
	M1	1	8	1	3	-	-	1	-	3	4	-
	CP	2	1	24	2	-	-	4	-	2	-	-
48 horas (recuperação)	CN	5	2	-	1	-	-	-	-	1	-	6
	M3	6	12	1	3	-	-	-	1	3	1	1
	M2	5	23	-	4	-	1	-	-	2	2	-
	M1	8	10	-	1	-	1	-	-	4	5	5
	CP	17	-	37	10	-	-	1	3	18	8	7
72 horas (recuperação)	CN	-	4	2	1	-	-	-	-	2	1	2
	M3	6	13	-	2	-	-	-	-	-	5	4
	M2	6	11	2	4	-	-	-	-	5	2	2
	M1	-	5	-	-	-	-	-	-	-	3	1
	CP	11	1	11	2	1	1	2	-	16	4	5

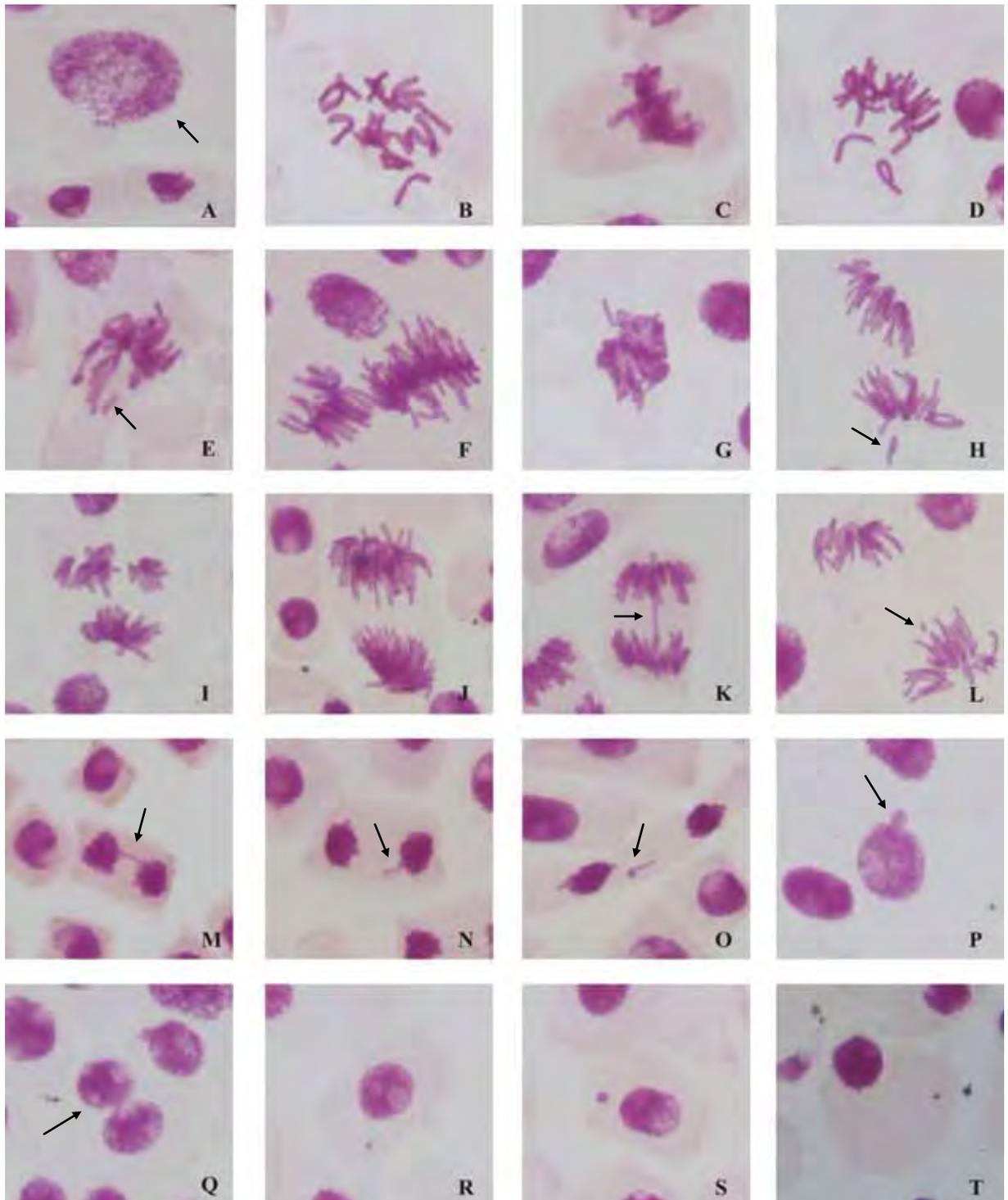


FIGURA 3 - AC observadas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas à mistura do inseticida imidaclopride com o herbicida sulfentrazone. A) prófase poliplóide (seta); B) C-metáfase; C) metáfase com aderência cromossômica; D) metáfase com perda cromossômica; E) metáfase com quebra cromossômica (seta); F) metáfase poliplóide (seta); G) anáfase com aderência cromossômica; H) anáfase com perda cromossômica (seta); I) anáfase multipolar; J) anáfase poliplóide; K) anáfase com ponte cromossômica (seta); L) anáfase com quebra cromossômica (seta); M) telófase com ponte cromossômica (seta); N) telófase com atraso cromossômico (seta); O) telófase com perda cromossômica (seta); P) broto nuclear (seta); Q) célula binucleada (seta), R e S) células micronucleadas; T) célula em processo de morte celular.

Tabela 7 - Frequências de AC, MN-M, MN-F<sub>1</sub> e IM em células de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do inseticida imidaclopride (IMI), do herbicida sulfentrazone (SUL) e as misturas destes dois agrotóxicos (M1, M2 e M3)

	IMI (7,5mL/L)	SUL (2,4mL/L)	MI	IMI (0,75mL/L)	SUL (1,2mL/L)	M2	IMI (0,075mL/L)	SUL (0,12mL/L)	M3
24h	AC	0,26	0,26 <sup>a</sup>	0,17	0,09	0,19 <sup>a</sup>	0,22	0,21	0,15 <sup>a</sup>
	MN-M	0,14	0,11 <sup>a</sup>	0,13	0,10	0,21 <sup>a</sup>	0,23	1,18	0,61 <sup>a</sup>
	MN-F <sub>1</sub>	0,16	0,20 <sup>a</sup>	0,24	0,10	0,06 <sup>a</sup>	0,15	0,27	0,20 <sup>a</sup>
	IM	22,27	27,53 <sup>a</sup>	21,04	32,64	33,94 <sup>a</sup>	29,53	37,33	34,40 <sup>a</sup>
48h	AC	0,34	0,23	0,42	0,35	0,36 <sup>a</sup>	0,32	0,18	0,27 <sup>a</sup>
	MN-M	0,13	0,18	0,08	0,17	0,30 <sup>s</sup>	0,04	1,28	0,18 <sup>a</sup>
	MN-F <sub>1</sub>	0,16	0,29	0,10	0,11	0,18 <sup>a</sup>	0,09	1,55	0,23 <sup>a</sup>
	IM	29,18	31,00	30,56	32,00	34,01 <sup>a</sup>	29,92	39,07	38,14 <sup>a</sup>
72h	AC	0,48	0,21	0,34	0,27	0,30 <sup>a</sup>	0,34	0,28	0,29 <sup>a</sup>
	MN-M	0,11	0,15	0,10	0,26	0,26 <sup>a</sup>	0,09	0,59	0,22 <sup>a</sup>
	MN-F <sub>1</sub>	0,11	0,18	0,24	0,39	0,20 <sup>a</sup>	0,12	0,64	0,12 <sup>a</sup>
	IM	29,53	26,23	27,66	29,66	25,29 <sup>a</sup>	30,15	36,19	29,20 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> - efeito antagonista / <sup>s</sup> efeito sinérgico, segundo Nash (1967), Marking (1985), Berenbaum (1981) e Calabrese (1999).

- Frequência: número de AC ou de MN-M ou de MN-F<sub>1</sub> ou de células em divisão/número total de células analisadas\*100.

- M1: mistura do herbicida sulfentrazone (2,4 mL/L) com o inseticida imidaclopride (7,5 mL/L); M2: mistura do herbicida sulfentrazone (1,2 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,75 mL/L); M3: mistura do herbicida sulfentrazone (0,12 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,075 mL/L)

Tabela 8 - AC, MN e IM induzidos pelo inseticida imidaclopride, pelo herbicida sulfentrazone e pela mistura dos dois agrotóxicos, em células de *A. cepa*.

	AC			MN			IM
	Total	% <sup>a</sup>	% Clastogênicas <sup>b</sup>	Total	% MN-M <sup>a</sup>	% MN-F <sub>1</sub> <sup>a</sup>	-
Imidaclopride	303	2,88	42,57	19,80	1,03	1,36	249,81
Sulfentrazone	216	2,00	36,57	21,29	3,91	3,85	297,78
Mistura	219	2,18	17,80	17,80	2,36	1,65	272,20

<sup>a</sup>: em relação ao número total de células analisadas

<sup>b</sup>: em relação ao número total de AC

#### 4. Discussão e Conclusão

O Brasil, um país de base econômica predominantemente agrícola, é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido pela Índia, Tailândia e Austrália (UNICA, 2008). Apesar da contribuição significativa para a economia brasileira, a cultura de cana-de-açúcar encontra-se entre as que mais consomem agrotóxicos no país (SPADOTTO; GOMES; RODRIGUES, 1998). Dentre os agrotóxicos mais utilizados nesta cultura no Brasil, estão o herbicida Boral®, que tem como princípio ativo o sulfentrazone, e o inseticida Evidence®, que tem como princípio ativo o imidaclopride. Ambos os agrotóxicos podem ser aplicados isoladamente na cultura ou em combinação, para o combate de plantas e insetos invasores.

Alguns estudos têm investigado os efeitos genotóxicos e mutagênicos do imidaclopride em organismos não-alvos como linfócitos humanos (FENG et al., 2005, DEMSIA et al., 2007), células de medula óssea de ratos (KARABAY; OGUZ, 2005, DEMSIA et al., 2007), anfíbios (FENG et al., 2004), organismos aquáticos (JEMEC et al., 2007) e microrganismos (KARABAY e OGUZ, 2005; KREUTZWEISER et al., 2007), em várias concentrações, obtendo alguns resultados positivos e outros, como mostra a revisão de Solecki (2001), resultados negativos (microrganismos, células de ovário de hamster chinês, hepatócitos de rato, medula óssea de hamster e células germinativas de camundongos). Já a toxicidade do sulfentrazone ainda tem sido pouco descrita na literatura e, quando descrita, apresenta dados inconsistentes (KEGLEY; HILL; ORME, 2007). Estudos realizados por alguns autores com ratos expostos ao sulfentrazone não registraram resultados positivos para genotoxicidade/carcinogenicidade (EPA, 2006; CASTRO et al., 2007), mas sim para teratogenicidade (EPA, 2006).

Testes de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade realizados com plantas caracterizam-se em testes simples, rápidos e que trazem bons resultados quando comparados com resultados obtidos em sistemas testes animais (GRANT, 1982, CHAUHAN; SAXENA, GUPTA, 1999). Por serem receptores biológicos diretos dos agrotóxicos, diferentes espécies vegetais como *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Tradescantia sp* e *Vicia faba*, têm sido utilizadas com frequência para avaliação de efeitos destes compostos no meio ambiente (MA et al., 1995). A ampla utilização de plantas em análises de genotoxicidade e mutagenicidade engloba também os testes realizados com herbicidas. Embora estes químicos sejam destinados ao controle de espécies vegetais, diversos trabalhos (ATEEQ et al., 2002, VENTURA, 2004, BOLLE et al., 2004, FATIMA; AHMAD, 2006, FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007, SRIVASTAVA; MISHRA, 2009) têm mostrado que a utilização de plantas consiste em um material eficiente para avaliar os efeitos genotóxicos e

mutagênicos decorrentes da ação dos herbicidas, principalmente aqueles induzidos por baixas concentrações.

Os resultados encontrados neste trabalho para o inseticida imidaclopride mostraram que, após 24 horas de exposição das células de *A. cepa* às três concentrações testadas, não houve indução de efeitos citotóxicos ou genotóxicos significativos, mas foi observado um efeito mutagênico nas células expostas à concentração de 0,075 mL/L. Esse resultado pode estar relacionado à proliferação celular ligeiramente maior observada para esta concentração, em relação às demais concentrações. Quanto maior o índice de divisão celular, maiores as chances de ocorrência de erros que podem levar a quebras ou perda de cromossomos, ou ainda falhas durante a atividade de reparo realizado pelas células. Nos ensaios de recuperação por 48 horas, as induções significativas de AC verificadas para todas as concentrações testadas do inseticida, indicam que o inseticida possa atuar como um agente clastogênico de ação indireta no DNA, corroborando os achados de Galloway (1994), Li, Aubrecht e Fornace (2007) e Bignold (2009). Segundo o primeiro autor, algumas AC podem aparecer pela primeira vez nas células, somente na metáfase do segundo ciclo celular, após a exposição a um agente clastogênico. Li, Aubrecht e Fornace (2007), sugerem que as quebras que se manifestam como diferentes tipos de AC são produzidas, indiretamente, durante a síntese ou o reparo do DNA. Os autores afirmam que apenas uma pequena parte das quebras são induzidas por efeito direto do clastógeno sobre o DNA, e que este efeito pode persistir durante a metáfase. De acordo com Bignold (2009), o DNA lesado de forma não letal persiste durante a primeira divisão celular, por meio de um processo denominado de síntese translesão do DNA (processo de replicação do DNA, realizado por um conjunto de DNAs polimerases especializadas, as polimerases da família Y, que replicam a fita de DNA sem reparar os erros dos locais onde estão as lesões), só acionando sistemas de reparo na fase G1 ou S do próximo evento de divisão, gerando, conseqüentemente, células alteradas, portadoras de AC.

A análise das AC encontradas no presente estudo traz fortes evidências das propriedades clastogênicas do inseticida imidaclopride sobre as células estudadas. A soma das AC resultantes de ação clastogênica foi superior (42,57 %) àquelas originadas por uma ação aneugênica (19,80%), para todas as concentrações e tempos de tratamento testados. O presente trabalho corrobora os trabalhos realizados por Karabay; Oguz (2005), onde os autores encontraram evidências clastogênicas para o imidaclopride. Os autores verificaram que a indução de AC, como perdas, quebras e aderências cromossômicas, bem como de MN, em eritrócitos de ratos expostos ao imidaclopride, estão associados ao potencial clastogênico deste composto.

No presente trabalho, percebemos que, após dois ciclos de divisão celular (período de recuperação de 72 horas), houve uma diminuição das AC induzidas pelas duas menores concentrações testadas do inseticida (0,75 e 0,075 mL/L), enquanto que a maior concentração (7,5 mL/L) continuou induzindo índices significativos de AC, quando comparado com o CN. Esta continuidade de indução de AC nas células meristemáticas de *A. cepa* pode nos indicar que o inseticida, nesta concentração (concentração de campo), induz uma ação genotóxica persistente nas células expostas, por pelo menos 72 horas após a interrupção da exposição ao inseticida.

Ainda, pudemos concluir, por meio da comparação entre os índices de MN observados nas células da região meristemática e da região F<sub>1</sub> (constituída por células filhas resultantes da divisão mitótica de células da região meristemática) das radículas de *A. cepa*, que as concentrações testadas de imidaclopride não possuem caráter mutagênico. Os índices de MN encontrados, em ambas as regiões analisadas das radículas, para todos os tempos de tratamento, foram, de modo geral, muito próximos entre si e não significativos, em relação ao CN. A ausência significativa de MN na região F<sub>1</sub> das radículas expostas ao tratamento de recuperação de 48 horas e em ambas as regiões das radículas expostas ao período de recuperação de 72 horas, nos indicam que as AC induzidas nas células, após o período de recuperação de 48 horas, não se mantiveram na geração seguinte das células, indicando a capacidade da célula de retornar à normalidade celular, portanto não se caracterizando em um evento de mutação.

Os resultados dos testes com o herbicida sulfentrazone indicaram citotoxicidade para a concentração de 12 mL/L. Sabe-se que a ação do herbicida sulfentrazone, sobre as plantas daninhas, se dá pela inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX). Como resultado desta inibição, ocorre produção de oxigênio *singlet*, com conseqüente peroxidação de proteínas e lipídeos das membranas celulares, levando ao rompimento destas membranas e fazendo com que ocorram necrose e morte dos tecidos sensíveis da planta (Oliveira Jr., 2001).

Embora seja descrito que as plantas submetidas ao tratamento com o sulfentrazone, ou a outros herbicidas conhecidos como inibidores da PROTOX, apresentem necrose dos tecidos, em nossas análises, os testes realizados com a concentração de 12 mL/L do herbicida sulfentrazone em *A. cepa*, mostraram indícios de morte celular por apoptose. Uma célula, animal como vegetal, pode entrar em processo de morte por meio de três caminhos distintos: apoptose, necrose ou autofagia. Apoptose e autofagia são descritos como processos de morte celular programada, onde a morte das células é induzida por processos organizados e controlados, enquanto que a necrose está relacionada a um processo caótico e descontrolado

de morte celular (REAPE; MOLONY; McCABE, 2008), que é morfológicamente caracterizada por uma turgescência no citoplasma da célula, decorrente da perda de sua capacidade de osmorregulação (LENNON; MARTIN; COTTER, 1991).

A apoptose, nos animais, caracteriza-se morfológicamente pela retração celular, condensação e fragmentação do núcleo e pela formação de corpos apoptóticos constituídos de fragmentos celulares que podem ser englobados pelos fagócitos (ADRAIN; MARTIN, 2001). Em plantas, embora haja relatos de formação de corpos apoptóticos, esta característica não é comumente encontrada (McCABE; PENNEL, 1996). Por outro lado, a fragmentação do DNA atua como um importante marcador de morte celular por apoptose em plantas. A clivagem do DNA, realizada pelas nucleases, ocorre nos sítios de ligação entre os nucleossomos, originando fragmentos de cerca de 180 pb (MITTLER; LAM, 1997). Esta fragmentação do DNA ocorre cerca de 3 a 5 horas após um estresse. Este tempo decorrido entre o estresse sofrido pela planta e a ocorrência de clivagem do DNA, provavelmente, corresponde ao tempo necessário para a ativação das nucleases. Já na necrose, a degradação do DNA é imediata (McCABE et al., 1997).

Vários pesquisadores têm demonstrado que agentes que causam apoptose também podem causar necrose, dependendo do grau da injúria que eles possam causar às células (McCABE et al., 1997; O'BRIEN et al., 1998; MAMMONE et al., 2000). Quando células de tabaco foram submetidas a uma situação de estresse pela elevação moderada de temperatura (55 °C), Burbridge et al. (2007) observaram que as células morriam por apoptose, ao passo que, quando submetidas a uma temperatura mais elevada (acima de 55 °C), elas morriam por necrose. Segundo Reape, Molony e McCabe (2008), o nível de estresse a que a planta é submetida determina o destino de suas células. Quando populações de células são expostas a baixos níveis de estresse, a maioria das células sobrevive, enquanto que, quando sujeitas a um estresse moderado a maioria morre por apoptose. Quando as células são sujeitas a níveis elevados de estresse, elas morrem por necrose. Estudos com plantas de tabaco, realizados por Burbridge et al. (2007), indicaram que as espécies reativas de oxigênio estão relacionadas com o processo de sinalização e desencadeamento da morte celular programada. De acordo com Jabs (1999), as espécies reativas de oxigênio, provavelmente, atuam como sinalizadores que levam à abertura dos poros de permeabilidade transitória nas mitocôndrias, com conseqüente liberação de citocromo c e geração de mais espécies reativas de oxigênio, causando um mecanismo de *feedback* e amplificando o sinal de estresse original, que levou a célula à apoptose.

A transição dos eventos de apoptose para necrose em células vegetais é possivelmente regulada pela membrana interna da mitocôndria (REAPE; MOLONY; McCABE, 2008). Em animais, a liberação de proteínas apoptóticas da mitocôndria (como o citocromo c e as caspases) pode ocorrer por meio da abertura de poros na membrana (regulada por proteínas específicas Bax/Bcl-2) (SHIMIZU; NARITA; TSUJINOTO, 1999) ou por meio da abertura de poros com permeabilidade transitória (GREEN; REED, 1998). Em uma revisão realizada por Reape, Molony e McCabe (2008), os autores descreveram que, embora não haja evidências da existência de proteínas específicas como as Bax/Bcl-2 em plantas, vários trabalhos indicam fortes indícios da existência de poros com permeabilidade transitória, criados por uma perda do potencial transmembrana da mitocôndria, por onde seriam liberados os citocromos c. Ainda, a ativação de tais poros na membrana das mitocôndrias poderia explicar a transição de células apoptóticas para necróticas. Segundo Lemasters et al. (1998), a apoptose ocorreria quando uma grande quantidade de mitocôndrias, frente a um nível moderado de estresse, apresentasse permeabilidade, em decorrência de uma grande liberação de fatores apoptogênicos como o citocromo c. Uma vez que todas as mitocôndrias se encontrem permeabilizadas, culminando em depleção de ATP, as mortes celulares por apoptose dariam lugar às mortes por necrose.

Uma vez que células apoptóticas possam se tornar necróticas e que a geração de espécies reativas de oxigênio está relacionada ao processo de morte celular por apoptose, uma nova característica pode ser adicionada aos efeitos induzidos pelo herbicida estudado neste trabalho. Além da indução da morte das células por necrose, a inibição da PROTOX, com conseqüente alteração nas membranas celulares, pode levar as células à morte também por apoptose, dependendo, provavelmente, da quantidade de espécies reativas de oxigênio geradas por este estresse.

As análises dos efeitos induzidos pelas demais concentrações do herbicida sulfentrazone estudadas no presente trabalho (2,4; 1,2; e 0,12 mL/L) indicaram que todas as concentrações testadas induziram AC em, pelo menos, um dos tempos de tratamento (24 horas ou recuperação), indicando que este herbicida possui propriedades genotóxicas em concentrações que se encontram abaixo daquela indicada para uso em campo. Apesar do potencial genotóxico, o herbicida testado mostrou efeitos mutagênicos apenas quando as células foram expostas à menor concentração testada (0,12 mL/L). A frequência significativa de MN, observada após as primeiras 24 horas de exposição, pode ser atribuída à grande quantidade de AC do tipo ponte, perda e quebras cromossômicas induzidas nas células por essa concentração. Embora a frequência total de AC induzidas não tenha sido estatisticamente

significativa para este tratamento (0,12 mL/L – 24 horas), a quantidade observada dos três tipos de AC, precursoras dos MN, foi o dobro da observada nas células do CN. Estes três tipos de AC continuaram aparecendo em quantidades elevadas nos ciclos celulares subsequentes. Durante os períodos de recuperação de 48 e 72 horas, a quantidade dessas alterações foi quatro e três vezes maiores, respectivamente, à observada nas células do CN. A presença de MN também nas células da região F<sub>1</sub> de *A. cepa* indica que os danos induzidos por esta concentração possuem caráter persistente. A concentração de 0,12 mL/L do herbicida induziu, ainda, um aumento significativo no IM das células expostas ao tratamento de recuperação por 48 horas. Este aumento pode ter contribuído para a formação dos MN observados, uma vez que as frequências de MN (regiões meristemática e F<sub>1</sub>) também foram maiores para este tempo de tratamento do que as frequências de MN induzidas nos outros tempos (24 horas e 72 horas de recuperação), para esta mesma concentração.

Além da concentração de 0,12 mL/L, a concentração de 2,4 mL/L do herbicida estudado também levou à uma diminuição do IM das células de *A. cepa*, quando estas foram expostas ao tratamento de recuperação de 72 horas. Embora a redução no IM possa estar relacionada a eventos de morte celular, ela é mais frequentemente associada a atrasos no ciclo mitótico (KURODA; YAMAGUCHI; ENDO, 1992). Segundo Kihlman (1966), a inibição da síntese de DNA está associada à produção de AC. Uma vez que a diminuição do IM das células de *A. cepa* pela concentração de 2,4 mL/L ocorreu somente após o período de recuperação de 72 horas, podemos atribuir essa citotoxicidade à indução de um tipo específico de AC que tenha ocorrido com maior frequência neste período de tratamento. As aderências cromossômicas foram as AC encontradas em maior quantidade nas células submetidas ao tratamento de recuperação de 72 horas, quando comparadas aos outros tempos de tratamento. De acordo com Fiskesjo; Levan (1993), as aderências cromossômicas são alterações celulares irreversíveis, que podem levar as células à morte. Elas podem ser resultantes do empacotamento incorreto das fibras cromossômicas dentro das cromátides ou cromossomos, originando inter associações de cromoproteínas que tornam os cromossomos conectados por meio de pontes subcromatídicas (KLÁSTERSKÁ; NATARAJAN; RAMEL, 1976, MCGILL; PATHAK; HSU; 1974, BADR; GHAREEB; EL DIN, 1992). Ainda, segundo Gaulden (1987), esse tipo de alteração cromossômica pode ser resultante de alterações nas proteínas não histônicas associadas aos cromossomos, causando problemas na separação e segregação das cromátides.

As concentrações de 1,2 e 0,12 mL/L de sulfentrazone induziram índices significativos de AC somente nas células que permaneceram, respectivamente, por 48 e 72 horas nos

tratamentos de recuperação. Como em nossas análises não foram observados atrasos mitóticos para essas duas concentrações do herbicida, podemos considerar que as AC observadas nas células expostas devem-se, provavelmente, a formação de lesões no DNA que ocorreram no primeiro ciclo de divisão e que não foram corretamente reparadas, tornando-se AC visíveis nos ciclos celulares seguintes. No entanto, ao contrário do observado para a concentração de 0,12 mL/L, as alterações induzidas pela concentração de 1,2 mL/L não foram persistentes, visto que não foram observados índices significativos de células micronucleadas nos períodos de recuperação.

Quando o inseticida imidaclopride foi misturado com o herbicida sulfentrazone, foi verificado uma indução significativa de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. A combinação M1 dos agrotóxicos estudados causou uma redução significativa no IM das células analisadas para o tratamento de 24 horas e de recuperação de 72 horas. A combinação M2 reduziu o IM das células do período de recuperação de 72 horas. Nenhum efeito citotóxico significativo foi verificado para as células expostas à mistura M3, indicando que a citotoxicidade observada pode estar relacionada ao efeito conferido pela mistura das concentrações mais altas do inseticida e do herbicida. Pelos resultados obtidos, a diminuição do IM observado para a mistura M1 parece não estar relacionada a um determinado tipo de AC, conforme sugerido por Kihlman (1966). As quantidades de cada tipo de AC induzidas pela mistura M1 não foram muito diferentes das induzidas pelas outras misturas (M2 e M3). Assim, podemos atribuir a maior citotoxicidade da mistura M1 à possível formação de quantidades elevadas de compostos citotóxicos como, por exemplo, as espécies reativas de oxigênio, que, segundo Boonstra; Post (2004), podem interferir na progressão do ciclo celular. De acordo com os autores citados, a exposição celular às espécies reativas de oxigênio pode resultar em atrasos na fase G1 do ciclo celular. Nos casos em que a produção destas espécies é muito elevada, a proliferação celular poderá ser interrompida em todas as fases do ciclo celular e, em casos mais severos, as células poderão entrar em apoptose ou em necrose. Compostos citotóxicos podem interferir na progressão da mitose, por impedirem que as células entrem em prófase, bloqueando o ciclo mitótico na intérfase (RIJSTENBIL; POORTVLIET, 1992); ou por induzirem um aumento na duração das fases S e G<sub>2</sub> (DUAN; WANG, 1995, BORBOA; DE LA TORRE, 1996); ou ainda, por atuarem sobre a síntese do DNA ou sobre a síntese protéica (CHAUHAN; SAXENA, GUPTA, 1999).

Segundo Feng et al. (2010), as respostas celulares frente aos danos induzidos no DNA incluem um atraso no ciclo mitótico, principalmente nas fases G1 e G2. Este atraso permite que as células reparem o dano antes de entrarem nas fases S (replicação) e M (mitose). Esta

afirmação corrobora os resultados encontrados neste estudo: foram verificadas frequências elevadas de AC em células de *A. cepa* expostas à mistura M1, em 24 horas de exposição e também após período de recuperação de 48 horas. No ciclo celular seguinte (72 horas de recuperação), verificou-se uma diminuição das AC induzidas, sugerindo que houve algum tipo de reparo aos danos no DNA, justificando também o baixo índice mitótico apresentado pelas células expostas a esta mistura M1.

A análise dos efeitos genotóxicos induzidos pelas combinações do inseticida imidaclopride com o herbicida sulfentrazone indicou uma indução significativa de AC nas células meristemáticas de *A. cepa* para as três misturas testadas, após o período de recuperação de 48 horas. Ainda, as misturas M2 e M3 causaram uma indução significativa de MN nas células de *A. cepa*, em diferentes tempos de tratamento. Tanto os efeitos genotóxicos quanto os efeitos mutagênicos, induzidos pelas misturas dos agrotóxicos, foram minimizados após um período de recuperação de 72 horas.

Uma vez que o inseticida pode ser aplicado tanto na cana planta, quanto na soqueira da cana e o herbicida é aplicado na planta pré-emergente, a interação destes dois agrotóxicos pode ocorrer durante a aplicação num mesmo momento ou em momentos distintos, podendo, neste caso, interagir no ambiente pela mobilidade e persistência que apresentam.

De acordo com Hodgson (1999), a interação entre agrotóxicos pode levar a efeitos de ação aditiva, sinérgica ou antagonista. Para Nash (1967), Marking (1985), Berenbaum (1981) e Calabrese (1999), o efeito aditivo ocorre quando a toxicidade resultante da combinação de dois ou mais agrotóxicos, é igual à soma dos efeitos de toxicidade induzida por cada um isoladamente. O efeito sinérgico ocorre quando a resposta é maior que o efeito aditivo e o efeito antagonístico ocorre quando a toxicidade total é menor que o efeito aditivo.

Conforme pode ser observado pelos resultados apresentados no presente trabalho, de modo geral, a mistura do inseticida imidaclopride com o herbicida sulfentrazone induziu um efeito antagonista sobre as células de *A. cepa*, uma vez que as frequências de AC, MN e IM, induzidos pela mistura, foram diferentes e menores do que o efeito aditivo esperado, conforme definição de Berenbaum (1981).

De acordo com Theodoridis et al. (1992), o grupo metil na posição 3 do anel triazolinone está relacionado com a ocorrência de máxima atividade biológica do herbicida sulfentrazone. Os autores verificaram que a substituição do grupo metil por outros grupos químicos causa um decréscimo de 3 a 6 vezes na atividade biológica deste herbicida. Desta forma, uma hipótese para explicar o efeito antagonista observado, pode estar relacionada com um possível decréscimo na atividade do herbicida sulfentrazone, pela alteração do seu grupo

metil decorrente da reação com o inseticida imidaclopride. Segundo Olgun et al. (2004), um composto químico pode sofrer alteração no seu metabolismo por outro composto, quando em associação.

Os nossos resultados apontam para uma diferença no mecanismo de ação dos agrotóxicos, quando aplicados isoladamente ou em mistura. Pelos tipos de danos induzidos, observamos que os dois agrotóxicos apresentaram, independentemente, ação tanto clastogênica como aneugênica, sendo a clastogênica a mais predominante. As respostas celulares, quando por exposição à mistura, mostraram que houve uma manutenção do efeito aneugênico (IMI = 19,8 %; SUL = 21,29 %; M = 17,80 %), mas uma diminuição dos efeitos clastogênicos (IMI = 42,57 %; SUL = 36,57 %; M = 17,80 %), embora o índice de genotoxicidade da mistura tenha permanecido significativo, em relação ao CN. Por estes dados, podemos inferir que a associação dos agrotóxicos diminui a ação dos químicos na molécula de DNA, porém, mantém a sua ação nas estruturas citoplasmáticas.

Podemos concluir que a mistura do inseticida imidaclopride com o herbicida sulfentrazone, embora não apresente um efeito sinérgico ou potencializador dos efeitos induzidos pelos compostos isoladamente, representa um risco para os organismos, pela potencialidade de indução de danos cromossômicos bem como pelo retardo na progressão do ciclo celular. No entanto, os danos cromossômicos induzidos não são persistentes por muito tempo, podendo ser minimizados, como observado neste trabalho, após 72 horas de interrupção da exposição.

## 5. Referências Bibliográficas

ADRAIN, C.; MARTIN, S.J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, p. 390-397, 2001.

AGROFIT, 2004. Texto disponível em:  
<[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 25 set. 2004.

ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C.L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. **Plant Physiology**, v.100, p. 224-233, 1997.

ATEEQ, B.; FARAH, M.A.; ALI, M.N.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, v. 514, p. 105-113, 2002.

BADR, A.; GHAREEB, A.; EL DIN, H.M. Cytotoxicity of some pesticides in mitotic cells of *Vicia faba* roots. **Egyptian Journal of Applied Science**, v. 7, p. 457-468, 1992.

BAYER CROPSCIENCE LTDA. **Evidence**. Apresenta ficha técnica do Inseticida Evidence. Disponível em: <<http://www.bayercropscience.com.br/PRD/busca>>. Acesso em 28 nov. 2007.

BEALE, S.I.; WEINSTEIN, J.D. Biosynthesis of heme and chlorophylls. In: DAILEY, H. A. (Ed.). New York: McGraw-Hill, 1990. p. 287–391.

BERENBAUM, M.C. Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. **Advances in Cancer Research**, v. 35, p. 269-335, 1981.

BIGNOLD, L.P. Mechanisms of clastogen-induced chromosomal aberrations: A critical review and description of a model based on failures of tethering of DNA strand ends to strand-breaking enzymes. **Mutation Research**, v. 681, p. 271-298, 2009.

BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; TUCCI, P.; EVANDRI, M. G. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.43, p.137-141, 2004.

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

BOONSTRA, J.; POST, J.A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, v. 337, p. 1-13, 2004.

BORBOA, L.; DE LA TORRE, C. The genotoxicity of Zn(II) and Cd(II) in *Allium cepa* root meristematic cells. **New Phytologist**, v. 134, p. 481–486, 1996.

BURBRIDGE, E.; DIAMOND, M.; DIX, P.J.; McCABE, P.F. Use of cell morphology to evaluate the effect of a peroxidase gene on the cell death induction thresholds in tobacco. **Plant Science**, v. 172, p. 853-860, 2007.

CALABRESE, E.J. **Multiple Chemical Interactions**. Chelsea, Mi., USA: Lewis Publishers, 1999.

CASTRO, V.L.S.S.; DESTEFANI, C.R.; DINIZ, C.; POLI, P. Evaluation of neurodevelopmental effects on rats exposed prenatally to sulfentrazone. **Neurotoxicology**, v. 28, p. 1249-1259, 2007.

CHAO, S.L.; CASIDA, J.E. Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 58, p. 77-88, 1997.

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

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

- DAS, P.P.; SHAIK, A.P.; JAMIL, K. Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on human peripheral blood lymphocytes. **Toxicology and Industrial Health**, v. 7, p. 449-458, 2007.
- DEMSIA, G.; VLASTOS, D.; GOUMENOU, M.; MATTHOPOULOS, D. P. Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. **Mutation Research**, v. 634, p. 32-39, 2007.
- DUAN, C.Q.; WANG, H.X Cytogenetical toxic effects of heavy metals on *Vicia faba*, and inquires into the *Vicia* micronucleus. **Acta Botanica Sinica**, v. 37, p. 14-24, 1995.
- EC, 1996. Technical guidance document (TGD) in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new substances and commission regulation (EC) No. 1488/94 on risk assessment for existing substances. Office for Official Publications of the European Commission, Luxembourg.
- EPA, 1997. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Sulfentrazone; Establishment of Tolerances, Federal Register, v.62, p. 10703-10708, 1997. Disponível em: <<http://www.epa.gov/EPA-PEST/1997/March/Day-10/p5874.htm>>.
- EPA, 2004. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Federal Register:sulfentrazone, pesticide tolerances, 2003. Disponível em: <<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2003/September/Day-4/p24011.htm>>. Acesso em 25 set. 2004.
- EPA, 2006. CALIFORNIA EPA DEPARTMENT OF PESTICIDE REGULATION. Summary of Toxicology data: Sulfentrazone (F2865), 2006. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/toxsums/pdfs/5923.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2007.
- FATIMA, R.A.; AHMAD, M. *Allium cepa* derived EROD as a potential biomarker for the presence of certain pesticides in water. **Chemosphere**, v. 62, p. 527-537, 2006.
- FENG, B.; GUO, Y-W.; HUANG, C-G.; LI, L.; CHEN, R-H.; JIAO, B-H. 2'-epi-2'-O-Acetylthevetin B extracted from seeds of *Cerbera manghas* L. induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v.183, p. 142-153, 2010.
- FENG, S.; KONG, Z.; WANG, X.; PENG, P.; ZENG, E. Y. Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 239-246, 2005.
- FENG, S.; KONG, Z.; WANG, X.; ZHAO, L.; PENG, P. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. **Chemosphere**, v. 56, p. 457-463, 2004.
- 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.

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 and Environmental Safety**, v. 72, p. 1680-1686, 2009.

FISKESJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium* test. **Atla**, v. 21, p. 139-149, 1993.

GALLOWAY, S.M. Chromosome aberrations induced in vitro: mechanisms, delayed expression, and intriguing questions. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 23, p. 44-53, 1994.

GAULDEN, M.E. Hypothesis: some mutagens directly alter specific chromosomal proteins (DNA topoisomerases II and peripheral proteins) to produce chromosome stickiness, which causes chromosome aberrations. **Mutagenesis**, v. 2, p. 357-365, 1987.

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.

GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309-1312, 1998.

HODGSON, E. Induction and inhibition of pesticide-metabolizing enzymes: roles in synergism of pesticides and pesticide action. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 6-11, 1999.

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, p.929-935, 2006.

JABS, T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, p. 231-245, 1999.

JEMEC, A.; TISLER, T.; DROBNE, D.; SEPCIC, K.; FOURNIER, D.; TREBSE, P. Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 68, p. 1408-1418, 2007.

KARABAY, N.U.; OGUZ, M.G. Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p. 653-662, 2005.

KEGLEY, S.; HILL, B.; ORME, S. **PAN Pesticide Database**, Pesticide Action Network, North America. 2007. Disponível em [http://www.pesticideinfo.org/Detail\\_Chemical.jsp?Rec\\_Id=PC36355#Toxicity](http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC36355#Toxicity). Acesso em 27 nov.2007.

KIHLMAN, B.A. Deoxyribonucleotide synthesis and chromosome breakage. In: DARLINGTON, C.D.; LEWIS, K.R. (Ed.). **Chromosomes today**. Edinburgh: Oliver & Boyd, 1966, p. 108-117.

KLÁSTERSKÁ, I.; NATARAJAN, A.T.; RAMEL, C. An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations. **Hereditas**, v.83, p.153-162, 1976.

KREUTZWEISER, D.; GOOD, K.; CHARTRAND, D.; SCARR, T.; THOMPSON, D. Non-target effects on aquatic decomposer organisms of imidacloprid as a systemic insecticide to control emerald ash borer in riparian trees. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, p. 315-325, 2007.

KURODA, K.; YAMAGUCHI, Y.; ENDO, G. Mitotic toxicity, sister chromatid exchange, and rec assay of pesticides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 23, p. 13-18, 1992.

LEMASTERS, J.J.; NIEMINEN, A.L.; QIAN, T.; TROST, L.C.; ELMORE, S.P.; NISHIMURA, Y.; CROWE, R.A.; CASCIO, W.E.; BRADHAM, C.A.; BRENNER, D.A.; HERMAN, B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1366, p. 177-196, 1998.

LENNON, S.V.; MARTIN, S.J.; COTTER, T.G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Proliferation**, v. 24, p. 203-214, 1991.

LI, H.H.; AUBRECHT, J.; FORNACE Jr, A.J. Toxicogenomics: overview and potential applications for the study of non-covalent DNA interacting chemicals. **Mutation Research**, v. 623, p. 98-108, 2007.

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.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v.146, p. 3-15, 1995.

MAMMONE, T.; GAN, D.; COLLINS, D.; LOCKSHIN, R.A.; MARENUS, K.; MAES, D. Successful separation of apoptosis and necrosis pathways in HaCaT keratinocyte cells induced by UVB irradiation. **Cell Biology and Toxicology**, v. 16, p. 293-302, 2000.

MARKING, L.L. Toxicity of chemical mixtures. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington DC, USA: Hemisphere Publishing, 1985, p.164-176.

MATRINCE, M.; MORNET, R.; SCALLA, R. Characterization of [<sup>3</sup>H]acifluorfen binding to purified pea etioplasts, and evidence that protoporphyrinogen oxidase specifically binds acifluorfen. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 861-868, 1992.

MATSUDA, K.; SHIMONURA, M.; KONDO, Y.; IHARA, M.; HASHIGAMI, K. Role of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in its interaction with the insecticide imidacloprid and related neonicotinoids. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, p. 981-986, 2000.

McCABE, P.F.; LEVINE, A.; MEIJER, P.J.; TAPON, N.A.; PENNEL, R.I. A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. **The Plant Journal**, v. 12, p. 267-280, 1997.

McCABE, P.F.; PENNEL, R.I. Apoptosis in plant cells in vitro. In: COTTER, T.J.; MARTIN, S.J. (Org.). **Techniques in apoptosis**. London: Portland Press, 1996. p. 301-326.

McGILL, M.; PATHAK, S.; HSU, T.C. Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: A possible material basis for chromosome stickiness. **Chromosoma**, v. 47, p.157-166, 1974.

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

MITTLER, R.; LAM, E. Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. **Plant Molecular Biology**, v. 34, p. 209-221, 1997.

NASH, R.G. Phytotoxic pesticid interaction in soil. **Agronomy Journal**, v. 59, p. 227-230, 1967.

O'BRIEN, I.E.W.; BAGULEY, B.C.; MURRAY, B.G.; MORRIS, B.A.M.; FERGUSON, I.B. Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible. **The Plant Journal**, v.13, p. 803-814, 1998.

OLGUN, S.; GOGAL Jr, R.M.; ADESHINA, F.; CHOUDHURY, H.; MISRA, H.P. Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes. **Toxicology**, v. 196, p. 181-195, 2004.

OLIVEIRA JR, R.S. Mecanismos de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J. (Org.). **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. p. 207-260.

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**, Rio de Janeiro, v.21, n.6, p. 1836-1844, 2005.

REAPE, T.J.; MOLONY, E.M.; McCABE, P.F. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 435-444, 2008.

RIJSTENBIL, J.W.; POORTVLIET, T.C.W. Copper and zinc in estuarine water: chemical speciation in relation to bioavailability to the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*, **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 11, p. 1615-1625, 1992.

SCHULZ-JANDER, D.A.; CASIDA, J.E. Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. **Toxicology Letters**, v. 132, p. 65-70, 2002.

SHEETS, L. Imidacloprid: a neonicotinoid insecticide. In: KREIGER, R. (Ed.). **Handbook of pesticide toxicology**. 2th ed. New York: Academic Press, 2001a. p. 1-8.

SHEETS, L. Nicotinoids. In: MASSARO, E. (Ed.). **Neurotoxicology handbook**. Totowa (NJ): Humana Press, 2001b. p. 77-85

SHIMIZU, S.; NARITA, M.; TSUJINOTO, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. **Nature**, v. 399, p. 483-487, 1999.

SOLECKI, R. **Toxicological evaluations: Imidacloprid**. Joint Meeting on Pesticide Residues – Monographs and Evaluations, Part II Toxicological, 2001. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr07.htm>>. Acesso em 17 abr.2009.

SPADOTTO, C. A., GOMES, M. A. F., RODRIGUES, G. S. Agrotóxicos. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 8, 1998.

SRIVASTAVA, K.; MISHRA, K.K. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.93, p. 8-12, 2009.

THEODORIDIS, G.; BAUM, J.S.; HOLTZMAN, F.W.; MANFREDI, M.C.; MARAVETZ, L.L.; LYGA, J.W.; TYMONKO, J.M.; WILSON, K.R.; POSS, K.M.; WYLE, M.J. Synthesis and herbicidal properties of aryltriazolinones. A new class of pre- and postemergence herbicides. In: BAKER, D.R.; FENYES, J.G.; STEFFENS, J.J. (Ed.). **Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III**. ACS Symposium Series 504. Washington, DC: American Chemical Society, 1992, p. 135–146.

UNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode=9E97665F-3A81-46F2-BF69-26E00C323988>>. Acesso em 13 jan.2012.

VENTURA, B.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como organismos-testes**. 2004. 133f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.

ZHANG, A.; KAYSER, H.; MAIENFISCH, P.; CASIDA, J.F. Insect acetylcholine receptor: conserved neonicotinoid specificity of (3H) imidacloprid binding site. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, p. 1294-303, 2000.

**ARTIGO 2: “Ação genotóxica e mutagênica de concentrações ambientais do inseticida imidaclopride, do herbicida sulfentrazone e da combinação destes dois agrotóxicos em células humanas *in vitro* e em *Salmonella typhimurium*”.**

**Jaqueline Bianchi Ambrósio, Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello, Mário Sérgio Mantovani, Maria Aparecida Marin Morales**

**Resumo**

O inseticida imidaclopride e o herbicida sulfentrazone são duas classes de agrotóxicos bastante utilizados no Brasil para o controle de pragas de cultura de cana-de-açúcar. No presente trabalho, estes dois agrotóxicos foram avaliados quanto ao seu potencial de indução de efeitos genotóxicos e mutagênicos quando aplicados, isoladamente ou em mistura, em baixas concentrações. Para estas avaliações foram realizados o ensaio do cometa e o teste do MN em células HepG2 cultivadas *in vitro*, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com sonda pan-centromérica humana em associação à técnica do MN e o ensaio *Salmonella*/microsoma com as linhagens TA98 e TA100, na ausência e na presença de sistema de metabolização exógeno (S9). Pelos resultados obtidos, verificou-se que o inseticida imidaclopride induziu índices significativos de MN e de danos primários no DNA das células HepG2, enquanto que, para o herbicida sulfentrazone, foi verificada indução de MN, mas não de efeitos primários no DNA (ensaio do cometa). Quando esses dois agrotóxicos foram associados, não foi verificada indução de MN nas células analisadas, porém, o ensaio do cometa revelou uma indução de genotoxicidade significativa. Os danos induzidos no DNA das células HepG2, pelo imidaclopride, foram resultantes da ação clastogênica deste composto, conforme indicado pelos resultados obtidos pela FISH (76,6 % dos MN analisados não apresentaram marcação centromérica: MNC-). Os resultados da FISH, para o herbicida e para a mistura dos agrotóxicos, demonstraram uma frequência semelhante de indução de perdas e quebras cromossômicas (herbicida: 52,45 % MNC-, 47,54 % MNC+; mistura: 48,71 % MNC-, 51,42 % MNC+). A não predominância de um tipo de alteração induzida pelo herbicida (quebra ou perda cromossômica) pode explicar, pelo menos em parte, a não correlação dos resultados obtidos no teste do MN e no ensaio do cometa para este composto: a maioria dos MN induzidos pelo herbicida pode ter tido uma origem aneugênica, o que explicaria a não detecção dos danos pelo ensaio do cometa, mas sim pelo teste do MN. Os resultados do teste do MN e do cometa, para a mistura dos agrotóxicos revelou que os danos induzidos podem ser reparados e não se fixarem nas células. Diante dos resultados deste

estudo, conclui-se que os dois agrotóxicos estudados interagem com o DNA das células HepG2, causando alterações irreparáveis nas mesmas. No entanto, quando estes compostos são misturados, os danos induzidos parecem ser mais brandos e passíveis de reparo. Os resultados do teste de Ames não apontaram resultados significativos, indicando ausência de efeitos mutagênicos para as linhagens estudadas de *S. typhimurium*.

**Palavras-chave:** agrotóxicos, micronúcleo, cometa, FISH, células HepG2, teste de Ames.

## 1. Introdução

A introdução de novos químicos no meio ambiente pode ser responsável pela indução de efeitos genotóxicos e mutagênicos nos organismos expostos, podendo levar a sérios problemas de saúde e afetar também futuras gerações, uma vez que os danos genéticos induzidos podem apresentar caráter herdável (RIBEIRO, 2003). Dentre as diversas substâncias lançadas no meio ambiente, encontram-se os agrotóxicos. De modo geral, tais substâncias são consideradas químicos potencialmente mutagênicos pela capacidade que possuem de induzirem mutação no material genético. Apesar dos agrotóxicos terem ação tóxica e seletiva contra certos organismos, uma seletividade absoluta é difícil de ser alcançada e, assim, a maioria acaba também atingindo organismos não-alvos (BOLOGNESI; MORASSO, 2000).

Devido a grande preocupação existente quanto aos efeitos prejudiciais dos agrotóxicos sobre o material genético de organismos não-alvos, foram avaliadas, neste trabalho, duas classes diferentes de agrotóxicos. O inseticida Evidence®, que pertence ao grupo químico dos neonicotinóides e tem o imidaclopride como ingrediente ativo, e o herbicida Boral®, que pertence ao grupo químico das triazolinonas e tem o sulfentrazone como ingrediente ativo. Ambos os agrotóxicos são utilizados com frequência em cultura de cana-de-açúcar no Brasil e podem ser aplicados isolados ou mesmo em associações.

O inseticida imidaclopride age no sistema nervoso central dos insetos como um agonista do receptor acetilcolina nicotínico (CHAO; CASIDA, 1997) e é amplamente utilizado pela sua seletiva toxicidade para insetos e fraca toxicidade para mamíferos, devido à pobre penetração na barreira hemato-encefálica destes animais (SHEETS, 2001a,b). O herbicida sulfentrazone age por meio da inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX), localizada nos cloroplastos das plantas. Esta enzima atua na oxidação da protoporfirinogênio, produzindo protoporfirina IX, que é convertida em clorofila pela quelação do  $Mg^{2+}$  (BEALE; WEINSTEIN, 1990, MATRINGE; MORNET; SCALLA, 1992). A inibição da PROTOX acarreta em um acúmulo de protoporfirinogênio no cloroplasto,

fazendo com que haja uma difusão desta substância para o citoplasma, onde ela sofre oxidação por meio de uma reação não-enzimática, produzindo uma protoporfirina IX, que é diferente daquela produzida pela via normal (OLIVEIRA Jr., 2001) e, portanto, não pode ser consumida na via de biosíntese de porfirina (ALSCHER; DONAHUE; CRAMER, 1997). Na presença de luz e oxigênio, a protoporfirina IX produz a forma reativa do oxigênio (oxigênio singlete), que é responsável pela peroxidação de proteínas e lipídeos das membranas celulares, causando ruptura das membranas, necrose e morte dos tecidos sensíveis (OLIVEIRA Jr., 2001).

Diante da potencialidade de contaminação ambiental pelos resíduos de agrotóxicos, fica evidente a necessidade de avaliações ecotoxicológicas envolvendo diferentes testes e bioindicadores, para estimar os possíveis efeitos prejudiciais que a contaminação pode causar aos organismos expostos. No campo da genética toxicológica e de monitoramento ambiental, os testes mais utilizados são o do micronúcleo (MN), do cometa (ALI et al., 2009) e o de Ames (CLAXTON; UMBUZEIRO; DE MARINI, 2010). Estes três testes detectam diferentes tipos de danos no DNA. O ensaio do cometa detecta, em pH alcalino, lesões primárias como quebras de fita simples, quebras de fita dupla, sítios álcali-lábeis e excisões indiretas causadas pelas enzimas de reparo, que podem ser reparadas ou resultarem em mutação (VAMVAKAS; VOCK, 1997, ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999, RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). O teste do MN detecta lesões irreparáveis que foram originadas de fragmentação cromossômica ou de perdas de cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal da célula, durante a divisão celular (FENECH, 2000). O teste de Ames detecta mutações causadas por adição ou deleção de um ou poucos pares de bases de DNA (*frameshift*) e por substituição de pares de bases (AMES; McCANN; YAMASAKI, 1975, GATEHOUSE et al., 1994, MORTELMANS; ZEIGER, 2000). O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial genotóxico e mutagênico dos agrotóxicos acima descritos, em células de hepatoma humano (HepG2) mantidas em cultura e em diferentes linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium*, após sua exposição aos agrotóxicos isolados e em combinação. Também foi avaliado o mecanismo de ação destes agrotóxicos por meio da técnica de hibridação in situ fluorescente em células HepG2.

## **2 Materiais e Métodos**

### **2.1 Materiais**

#### *2.1.1 Químicos testados e Organismos testes*

Os agrotóxicos estudados, tanto em ensaios com as células HepG2 como com *S. typhimurium*, foram o herbicida sulfentrazone (Boral<sup>®</sup>) (50 % pureza, FMC Agricultural Products) e o inseticida imidaclopride (Evidence<sup>®</sup>) (48 % pureza, Bayer S/A).

Para os dois agrotóxicos foram preparadas três diferentes concentrações para os ensaios com as células HepG2 e cinco diferentes concentrações para o teste de Ames. A primeira concentração, para ambos os agrotóxicos, foi baseada na menor concentração indicada para uso em campo e, a partir delas, foram realizadas diluições em água. A concentração de campo do inseticida imidaclopride é 7,5 mL/L e a do herbicida sulfentrazone é 12 mL/L. As concentrações finais estudadas no presente trabalho estão apresentadas na tabela 1.

Em testes preliminares com o herbicida, a concentração de campo impediu o crescimento das células HepG2. Desta forma, para o ensaio com estas células, foram testadas concentrações menores, para encontrar a maior concentração não citotóxica a ser utilizada nos ensaios. As concentrações finais foram determinadas pelos resultados dos ensaios de citotoxicidade (teste do MTT), apresentados mais adiante neste trabalho. Para o teste de Ames, foram testadas cinco concentrações (número necessário para validar o teste). A concentração inicial do herbicida a ser testada neste teste foi de 2,4 mL/L, uma vez que a concentração de campo (12 mL/L) foi tóxica para as linhagens testadas de *Salmonella*. A concentração de 2,4 mL/L foi escolhida com base em ensaios já realizados com outro organismo teste (células de *A. cepa*), onde esta concentração foi a maior concentração não citotóxica para elas. A utilização das mesmas concentrações nestes dois ensaios possibilitaria comparações futuras entre a ação deste herbicida em organismos diferentes.

Tabela 1 - Concentrações (mL/L) estudadas dos agrotóxicos, nos testes de mutagenicidade e genotoxicidade com HepG2 e no Teste de Ames.

	Herbicida (sulfentrazone)	Inseticida (imidaclopride)	Mistura (herbicida + inseticida)	
Ensaio com HepG2	0,12	0,075	0,12 + 0,075	(M1)
	0,012	0,0075	0,012 + 0,0075	(M2)
	0,0012	0,00075	0,0012 + 0,00075	(M3)
Teste de Ames	2,4	7,5	2,4 + 7,5	(M1)
	1,2	0,75	1,2 + 0,75	(M2)
	0,12	0,075	0,12 + 0,075	(M3)
	0,012	0,0075	0,012 + 0,0075	(M4)
	0,0012	0,00075	0,0012 + 0,00075	(M5)

Como controles positivos, foram utilizados:

- Metilmetano sulfonato (MMS) (Sigma-Aldrich, CAS No 66-27-3), na concentração  $4 \times 10^{-2}$  M, para os testes do MN e cometa com HepG2;
- Triton X-100 (Merck, CAS No 9036-19-5), 1 %, para o teste do MTT, utilizando as células HepG2;
- Óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) (Sigma, CAS No. 56-57-5), na concentração de 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , para os testes realizados com *S. typhimurium* na ausência de ativação metabólica;
- 2-aminoantraceno (2AA) (Sigma, CAS No. 613-13-8), na concentração de 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , para os testes realizados com *S. typhimurium* na presença de ativação metabólica.

O MMS foi diluído em PBS, o Triton X-100 em meio MEM e o 4NQO e o 2AA foram diluídos em DMSO.

Para o desenvolvimento dos testes de Ames com ativação metabólica foi utilizado um sistema de metabolização exógeno (sistema microssomal S9, Moltox), constituído de um homogenato de células do fígado de rato Sprague-Dawley, pré tratado com a mistura bifenil policlorinada (Araclor 1254).

Para os ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade com os agrotóxicos estudados, foram utilizadas células de hepatoma humanos (linhagem HepG2) cultivadas *in vitro* e as linhagens TA98 e TA100 da bactéria *S. typhimurium*.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Manutenção das células HepG2 para o teste do MN, ensaio do cometa, teste de hibridização *in situ* e quantificação da GST

As células HepG2, gentilmente cedidas pela profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira (Laboratório de Toxicologia Ambiental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto), foram estocadas em nitrogênio líquido e cultivadas em *minimal essential medium* (MEM), preparado com 100 mM de piruvato de sódio, e solução antibiótica/antimicótica (penicilina 10.000 U.I./mL/estreptomicina 10 mg/mL) e suplementado com 10 % de soro bovino fetal - SBF. O cultivo celular foi feito em câmara úmida a uma temperatura de 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>.

### 2.2.2 Determinação das concentrações testadas: teste de citotoxicidade com 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide – MTT

Este teste foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983), com algumas modificações. Basicamente, cerca de  $2,5 \times 10^4$  células HepG2 foram plaqueadas em poços de uma microplaca e mantidas por 24 horas em câmara úmida a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub>,

para estabilização. Decorrido este tempo, as células foram tratadas, por 24 horas, com seis diferentes concentrações dos agrotóxicos testados e depois incubadas, por 4 horas, com MTT (Sigma, CAS No. 298-93-1, 1 mg/mL). Em seguida, o MTT foi descartado e foram adicionados 100 mL de DMSO estéril por poço. Imediatamente após a adição do DMSO, as microplacas foram submetidas ao leitor para medição espectrofotômetro em filtro de 540 nm. Os testes foram realizados em duplicata e a análise dos resultados foi feita por meio da comparação estatística (Mann-Whitney com  $p < 0,05$ ) entre as absorbâncias do CN e dos tratamentos. Três concentrações não citotóxicas obtidas neste ensaio foram utilizadas para a realização dos testes de genotoxicidade e mutagenicidade com as células HepG2.

### 2.2.3 Teste do Micronúcleo em células binucleadas

Este teste foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Natarajan; Durroudi (1991), com pequenas modificações. Cerca de  $5 \times 10^6$  células HepG<sub>2</sub> foram semeadas em meio MEM suplementado com 10 % de SBF (meio de cultura completo), em frascos de 25 cm<sup>2</sup>, e mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, por 24 horas, para estabilização. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações do inseticida imidaclopride (0,075; 0,0075 e 0,00075 mL/L), do herbicida sulfentrazone (0,12; 0,012 e 0,0012 mL/L) e com a mistura destes dois agrotóxicos, por 24 horas. Após este período, seguiu-se a lavagem das células com PBS e a adição de 5 mL de meio de cultura completo contendo 3 µg/mL de citocalasina B (Sigma), onde as células permaneceram por 28 horas (TSUBOY et al., 2007; CHEQUER et al., 2009). Para a colheita das células, estas foram tripsinizadas com 500 µL de Tripsina-EDTA (0,5%), por 5 minutos e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. Ao pellet, foram adicionados 5 mL de solução hipotônica de citrato de sódio gelada (0,01%) e duas gotas formaldeído 40 %. Após nova centrifugação (5 minutos a 1500 rpm), as células foram fixadas com metanol/ácido acético (3/1) e mantidas sob refrigeração, até a confecção das lâminas. Para a detecção dos MN, as células foram coradas com Giemsa 5 %, em tampão fosfato, por 10 minutos. Foram feitas três réplicas por tratamento e a análise dos MN foi feita por meio da contagem de 2000 células binucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração, totalizando 6000 células por tratamento. A análise de significância dos resultados foi feita pelo teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

#### 2.2.4 Técnica de Hibridização In Situ Fluorescente (FISH)

Lâminas contendo células binucleadas, previamente expostas ao herbicida, ao inseticida e a mistura dos dois agrotóxicos, foram fixadas em Carnoy (3 partes de etanol: 1 parte de ácido acético) por 15 minutos, desidratadas em série alcoólica (70, 85 e 100 %) por 5 minutos cada e secas em estufa a 37 °C. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com RNase 100 µg/mL em 2xSSC (37 °C, por 1 hora), com pepsina 10 µg/mL em 0,2 N HCl (37°C, por 20 minutos), com formaldeído 3,7 % em 1xPBD, seguida de desidratações em série alcoólica (70, 85 e 100 %, por 5 minutos em cada concentração) e secagem em estufa a 37 °C.

A sonda (*All Human Centromere probe*, Poseidon - Kreatech Diagnostics), já marcada com rodamina, foi desnaturada a 90 °C por 10 minutos, imediatamente colocada em temperatura de -20 °C, por cerca de 5 minutos, e aplicada sobre as lâminas. Após serem cobertas por lamínulas 24x40 mm, as lâminas foram desnaturadas em placa aquecida (75 °C), por 8 minutos. Para que ocorresse a hibridização, as lâminas foram mantidas *overnight*, em câmara úmida, a 37 °C. Após a hibridização, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram submetidas a uma solução de 0,4 x SSC/0,3 % Igepal, por 2 minutos, a 72 °C e, em seguida, em 2 x SSC/0,1% Igepal, por 1 minuto a temperatura ambiente. A contracoloração das lâminas foi feita pela aplicação de 10 µL de uma solução de DAPI/Vectashield. A análise foi feita em microscópio de fluorescência com filtros para DAPI e rodamina, em aumento de 1.000 vezes, sendo contabilizadas as porcentagens de micronúcleos com sinal de centrômero (MN C+) e micronúcleos sem sinal de centrômero (MN C-).

#### 2.2.5 Ensaio do cometa

Este ensaio foi realizado segundo protocolo descrito por Uhl, Helma e Knasmüller (1999, 2000), com algumas modificações. Resumidamente, cerca de  $5 \times 10^6$  células HepG<sub>2</sub> foram semeadas em meio MEM suplementado com 10 % de SBF (meio de cultura completo), em frascos de 25 cm<sup>2</sup>, e mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, por 24 horas, para estabilização. Após este período, as células foram tratadas, por 24 horas, com as mesmas substâncias utilizadas para o teste do MN, como descritas anteriormente. Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas (500 µL de Tripsina-EDTA 0,5 %), centrifugadas (1500 rpm, 5 minutos) e o pellet, ressuspensionado em 500 µL de meio de cultura. Em seguida, 20 µL de suspensão celular foram misturadas com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5 %). A mistura foi rapidamente gotejada sobre lâminas

previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (1,5 %.), que foram, em seguida, submetidas a uma solução de lise gelada por no mínimo, 1 hora a 4 °C. Após a desnaturação do DNA das lâminas em solução tampão alcalina, por 20 minutos, seguida de eletroforese (4 °C, 39 V, 300 mA), por mais 20 minutos, as lâminas foram neutralizadas, fixadas e mantidas sob refrigeração, até o momento da análise. A coloração foi feita com brometo de etídio (0,002 mg/mL) e a análise feita em microscópio de fluorescência, com filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm, em um aumento de 400X. Os cometas foram avaliados visualmente pela análise de cerca de 100 nucleóides por lâmina, não sobrepostos e escolhidos aleatoriamente, totalizando aproximadamente 600 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. O escore foi obtido pela multiplicação do número de nucleóides pertencentes a cada classe, pelo número da classe correspondente, segundo a fórmula:

$$\text{Score} = \sum_{i=0}^3 ni \times i$$

onde  $ni$  é o número de nucleóides de classe  $i$  e  $i$  é classe do dano (0, 1, 2, 3).

Os testes foram feitos em triplicata e os resultados obtidos foram analisados, estatisticamente, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

A determinação da viabilidade celular foi feita pelo método da coloração exclusiva com Azul de Trypan (20  $\mu$ L de suspensão celular de cada tratamento e 20  $\mu$ L de Azul de Trypan 0,4 %), considerando-se as porcentagens de células viáveis do total de células analisadas e aceitando o limite mínimo de 80 % de células viáveis, para o prosseguimento do ensaio do cometa.

### 2.2.6 Teste para detecção da atividade da Glutathione-S-Transferase

Este teste foi realizado segundo o manual do Glutathione S-Transferase Assay Kit - Cayman Chemical Company (2011), com adaptações descritas em Lamy et al. (2008).

Cerca de  $1 \times 10^6$  células HepG<sub>2</sub> foram semeadas em meio MEM suplementado com 10% de SBF (meio de cultura completo), em frascos de 25 cm<sup>2</sup>, e mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, por 24 horas, para estabilização. Após este período, foram adicionadas aos frascos de cultura as diferentes concentrações do inseticida (0,075; 0,0075 e 0,00075 mL/L), do herbicida (0,12; 0,012 e 0,0012 mL/L) e da mistura dos

dois agrotóxicos (teste realizado em triplicata). As células permaneceram nestes tratamentos, em estufa a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Decorrido este tempo, as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril para a retirada dos agrotóxicos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de PBS novo e, com o auxílio de um raspador de borracha, as células foram destacadas dos frascos de cultivo para posterior centrifugação (10 minutos a 2.000 g, 4 °C). Após centrifugação e descarte do sobrenadante, as células foram sonicadas com cerca de 500 µL de PBS gelado, em sonicador de ponta com potência de 17 %, por 1 segundo. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas (16.000 g, 4 °C por 20 minutos) e o sobrenadante foi recolhido e estocado a -80 °C para posterior leitura da atividade enzimática. Para a leitura, 20 µL do sobrenadante de cada amostra foram misturados com 20 µL de glutathione reduzida, 150 µL de assay buffer e 10 µL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Para o controle negativo e para o controle enzimático, foram adicionados 170 µL de assay buffer. Como controle positivo, foi utilizado GST de equino. A absorbância foi medida em leitor de microplacas, a 340 nm, 25 °C, em intervalos de 1 minuto, por dez minutos. A determinação da taxa de reação da enzima ( $\Delta A_{340}/\text{min}$ ) foi calculada pela obtenção da inclinação linear da reta obtida pela plotagem dos valores de absorbância, em função do tempo e a atividade da GST foi calculada por meio da aplicação da fórmula abaixo:

$$\text{Atividade da GST (nmol/min/mL)} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{0,00503 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0,2 \text{ mL}}{0,02 \text{ mL}} \times \text{diluição da amostra}$$

### 2.2.7 Teste de Ames (Protocolo de Pré-Incubação)

Este teste foi baseado nos protocolos descritos por Maron; Ames (1983) e Mortelmans; Zeiger (2000). Linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium* foram colocadas para crescer em incubadora *shaker* a uma temperatura de 37 °C, *overnight*, em caldo nutriente. Em seguida, 100 µL de cada linhagem (10<sup>9</sup> células/mL) foram adicionados em tubos de cultura contendo 500 µL de tampão fosfato e 100 µL dos agrotóxicos testados (ou 10 µL de controle positivo). Nos ensaios com presença de ativação metabólica S9, o tampão fosfato foi substituído por 500 µL de mistura S9 [água destilada estéril, tampão fosfato 0,2 M, NADP 0,1 M, glicose-6-fosfato 1,0 M, solução de sais (KCl 1,65 M e MgCl<sub>2</sub> 0,4M) e fração S9]. Para o CN, 100 µL de cada linhagem de bactéria foram adicionados a tubos de cultura contendo 500 µL de tampão fosfato ou de mistura S9 e 100 µL do solvente utilizado para diluir a substância

teste. Os tubos contendo as misturas foram pré-incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, o seu conteúdo, acrescido de 2 mL de ágar de superfície, foi vertido em placas de Petri estéreis contendo ágar mínimo solidificado. As placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica a 37 °C por 66 horas.

Cada teste foi realizado em triplicata. Os CP foram realizados em duplicata e o CN, em quintuplicata.

Para a análise de mutagenicidade, as colônias de bactérias revertentes foram contadas manualmente. Os dados foram avaliados pelo teste ANOVA (software Salanal) e considerados positivos quando os resultados do teste estatístico e de dose resposta foram significativos, segundo o modelo de Bernstein (BERNSTEIN et al.,1982). Os resultados foram expressos pelo número de revertentes por miligrama do agrotóxico testado.

### 3. Resultados

As figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, os resultados do teste do MTT obtidos para o inseticida imidaclopride e para o herbicida sulfentrazone.

A concentração inicial do herbicida testado foi 2,4 mL/L, uma vez que a concentração de campo (12 mL/L) foi visivelmente citotóxica para estas células. A concentração de 2,4 mL/L foi escolhida com base em ensaios já realizados com outro organismo teste (células de *A. cepa*), onde esta foi a maior concentração não citotóxica para elas. As concentrações seguintes (1,2; 0,12; 0,012; 0,0012 e 0,00012 mL/L) são derivações diretas da concentração de campo (12 mL/L).

Para o inseticida, apenas a maior concentração (7,5 mL/L) foi citotóxica, enquanto que para o herbicida, as concentrações de 2,4 e 1,2 mL/L foram citotóxicas em relação ao CN. Desta forma, dentre as concentrações não citotóxicas do inseticida, foram selecionadas, para os testes com HepG2, as concentrações: 0,075; 0,0075 e 0,00075 mL/L. Para o herbicida, as três concentrações não citotóxicas selecionadas foram: 0,12; 0,012 e 0,0012 mL/L.

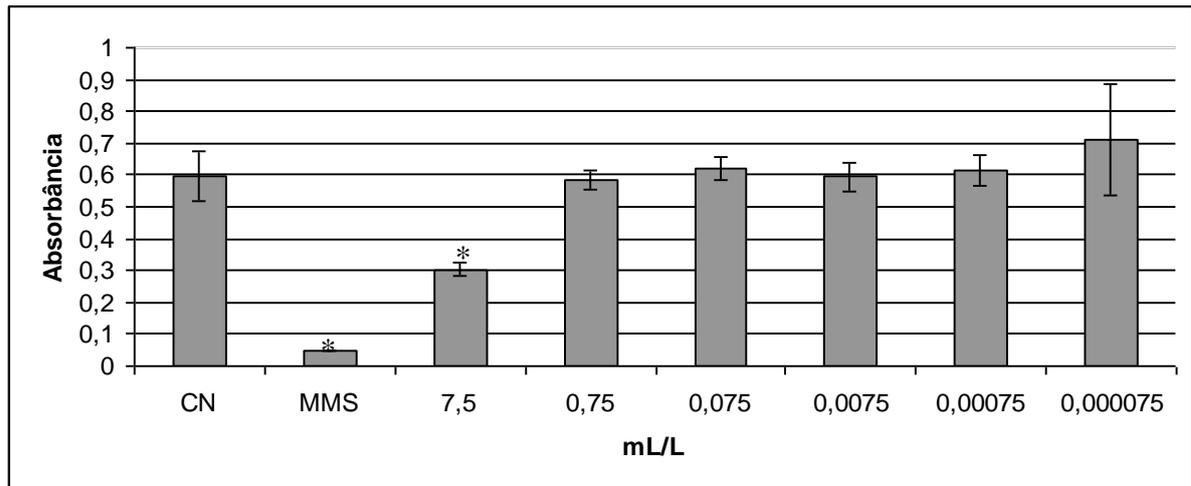


Figura 1 - Médias de absorvância de diferentes concentrações do inseticida imidaclopride.  
\* estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ )

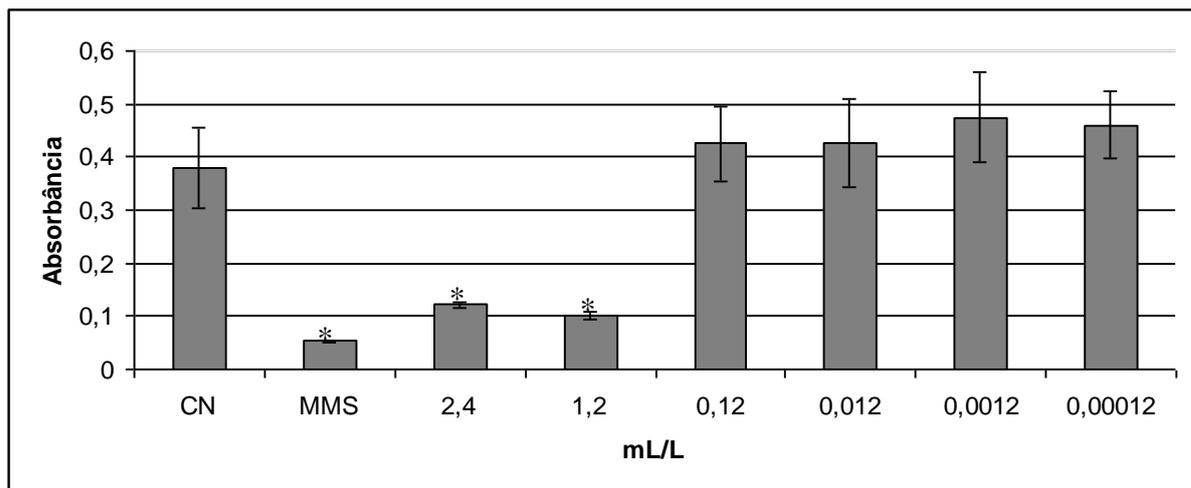


Figura 2 - Médias de absorvância de diferentes concentrações do herbicida sulfentrazone  
\* estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ )

Os resultados do teste do MN (Tabela 2) indicaram mutagenicidade significativa para as três concentrações testadas do inseticida imidaclopride ( $p = 0,0039$  para as três concentrações) e para as duas menores concentrações do herbicida sulfentrazone ( $p = 0,0039$  para as duas concentrações). Não foi observada indução significativa de MN pela mistura dos agrotóxicos. A maioria dos MN induzidos pelo inseticida imidaclopride teve origem clastogênica (MN com fragmentos acêntricos: MNC-). Já os MN induzidos pelo herbicida sulfentrazone e pela sua mistura com o inseticida imidaclopride tiveram tanto origem clastogênica quanto aneugênica (tabela 3, figura 3).

Para o ensaio do cometa (Tabela 4, Figura 4), foi verificado genotoxicidade para as concentrações de 0,0075 e 0,00075 mL/L de imidaclopride ( $p = 0,0453$  e  $p = 0,0306$ , respectivamente) e para as misturas M2 e M3 ( $p = 0,0306$  e  $p = 0,0039$ , respectivamente). Para o herbicida sulfentrazone não foi observado nenhum resultado significativo. Os resultados dos testes de viabilidade celular estão apresentados na tabela 5.

Tabela 2 - Resultados do teste do MN com as células HepG2 expostas por 24 horas às três diferentes concentrações do inseticida imidaclopride, do herbicida sulfentrazone e da mistura destes dois agrotóxicos.

Tratamentos	Concentrações	Total de células analisadas	Frequência de MN	Média $\pm$ dp
CN	-	6032	0,89	9,00 $\pm$ 1,26
Imidaclopride	0,00075 mL/L	6014	4,47	44,83 $\pm$ 15,11**
	0,0075 mL/L	6036	3,01	30,33 $\pm$ 8,91**
	0,075 mL/L	6029	3,30	33,16 $\pm$ 5,71**
CP (MMS)	4x10 <sup>-2</sup> M	6049	5,27	53,16 $\pm$ 14,27**
CN	-	6010	1,89	19,00 $\pm$ 3,16
Sulfentrazone	0,0012 mL/L	6025	4,03	40,50 $\pm$ 9,41**
	0,012 mL/L	6020	3,75	37,67 $\pm$ 7,55**
	0,12 mL/L	6032	2,59	26,00 $\pm$ 4,85
MMS	4x10 <sup>-2</sup> M	6024	5,84	58,66 $\pm$ 5,75**
CN	-	6013	1,65	16,50 $\pm$ 3,27
Mistura	M3	6022	2,84	28,50 $\pm$ 15,37
	M2	6031	1,90	19,17 $\pm$ 3,30
	M1	6029	2,29	23,00 $\pm$ 6,98
CP (MMS)	4x10 <sup>-2</sup> M	6036	7,78	78,33 $\pm$ 15,15**

- Frequência: número de células micronucleadas/número total de células analisadas\*100.

- M3: mistura do herbicida sulfentrazone (0,0012 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,00075 mL/L); M2: mistura do herbicida sulfentrazone (0,012 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,0075 mL/L); M1: mistura do herbicida sulfentrazone (0,12 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,075 mL/L).

- \*\*estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ).

Tabela 3 – Número total e porcentagem de MN centrômero positivo (MNC+) e MN centrômero negativo (MNC-).

	Total MNC+	Total MNC-	% MNC+	% MNC-
Imidaclopride	7	23	23,3	76,6
Sulfentrazone	29	32	47,54	52,45
Mistura	36	34	51,42	48,71

Tabela 4 - Resultados do ensaio do cometa com células HepG2, após exposição por 24 horas às diferentes concentrações do inseticida imidaclopride, do herbicida sulfentrazone e da mistura destes dois agrotóxicos.

		Número de células analisadas	Danos				Total danos (classes 1+2+3)	Score
			Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3		
imidaclopride	CN	670	660	5	1	4	10	19
	0,00075	662	620	23	11	8	42	69*
	0,0075	672	635	19	10	8	37	63*
	0,075	631	619	5	5	2	12	21
	CP- MMS	637	0	253	299	85	637	1106*
Sulfentrazone	CN	604	557	32	7	8	47	70
	0,0012	603	552	32	4	14	50	82
	0,012	614	560	23	18	14	55	101
	0,12	605	542	38	16	9	63	97
	CP- MMS	600	0	43	443	114	600	1271*
Mistura	CN	605	554	35	12	4	51	71
	M3	614	512	67	16	19	102	156*
	M2	615	537	51	11	16	78	121*
	M1	607	552	33	10	12	55	89
	CP- MMS	601	0	0	283	318	601	1520*

- Score: multiplicação do número de nucleóides pertencentes a cada classe, pelo número da classe correspondente.
- M3: mistura do herbicida sulfentrazone (0,0012 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,00075 mL/L); M2: mistura do herbicida sulfentrazone (0,012 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,0075 mL/L); M1: mistura do herbicida sulfentrazone (0,12 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,075 mL/L)
- \* estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

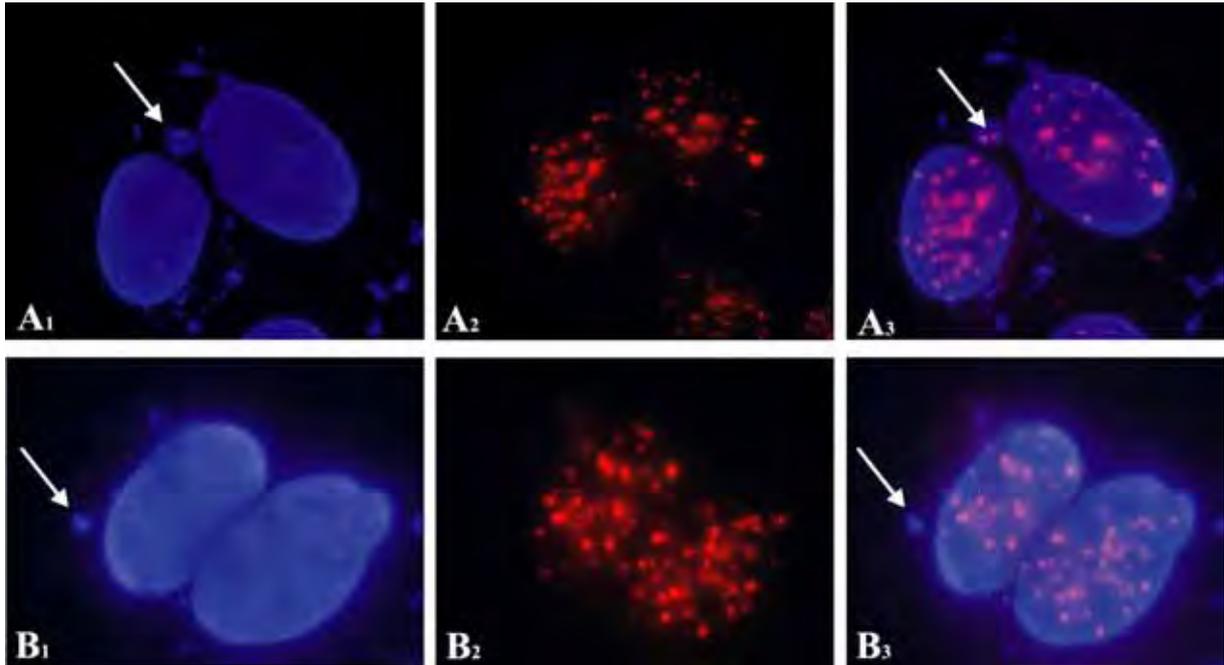


Figura 3 - Célula HepG2 tratada com o herbicida sulfentrazone, submetida à técnica de FISH: A<sub>1</sub> e B<sub>1</sub>) células binucleadas com um micronúcleo (seta), corada com DAPI; A<sub>2</sub> e B<sub>2</sub>) localização dos centrômeros dos cromossomos, com sonda centromérica marcada com rodamina (pontos vermelhos); A<sub>3</sub>) sobreposição das imagens A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, mostrando a localização do centrômero dentro do MN (seta – indicativo de aneugenicidade); B<sub>3</sub>) sobreposição das imagens B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, mostrando ausência de centrômero dentro do MN (indicativo de clastogenicidade).

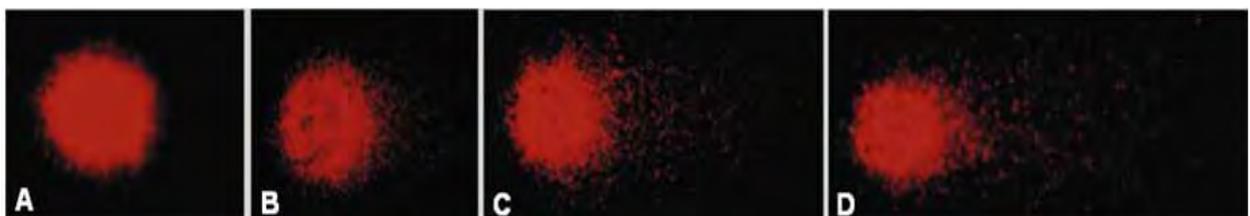


Figura 4 – Nucleóides resultantes do ensaio do cometa. A) Classe 0; B) Classe 1; C) Classe 2; D) Classe 3

Tabela 5 – Viabilidade celular obtida pelo teste de Azul de Trypan em células HepG2, expostas aos diferentes tratamentos como os agrotóxicos estudados.

<b>Tratamentos</b>	<b>Viabilidade (%)</b>
<i>Imidaclopride</i>	
CN	97,29
CP	95,72
0,00075 mL/L	96,98
0,0075 mL/L	97,82
0,075 mL/L	97,33
<i>Sulfentrazone</i>	
CN	97,61
CP	84,86
0,0012 mL/L	93,34
0,012 mL/L	95,85
0,12 mL/L	96,92
<i>Mistura</i>	
CN	99,07
CP	98,08
M3	98,10
M2	98,68
M1	98,58

- M3: mistura do herbicida sulfentrazone (0,0012 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,00075 mL/L); M2: mistura do herbicida sulfentrazone (0,012 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,0075 mL/L); M1: mistura do herbicida sulfentrazone (0,12 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,075 mL/L).

Os resultados referentes à atividade da GST encontram-se resumidos na tabela 6. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as três diferentes concentrações de cada agrotóxico, para as atividades da GST.

Tabela 6 - Atividade da GST nas diferentes concentrações do inseticida imidaclopride, do herbicida sulfentrazone e da mistura destes dois agrotóxicos.

Tratamentos	Concentrações (mL/L)	Atividade da GST (nmol/min/mL)
Branco	-	4,97
Imidaclopride	0,00075	13,91
	0,0075	17,09
	0,075	12,32
Sulfentrazone	0,0012	21,66
	0,012	24,05
	0,12	24,05
Mistura	M3	23,85
	M2	16,1
	M1	14,11
CP	-	64,61

- M3: mistura do herbicida sulfentrazone (0,0012 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,00075 mL/L); M2: mistura do herbicida sulfentrazone (0,012 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,0075 mL/L); M1: mistura do herbicida sulfentrazone (0,12 mL/L) com o inseticida imidaclopride (0,075 mL/L.)

Para o teste de Ames, nenhum resultado significativo foi observado para os agrotóxicos testados e nem para mistura dos mesmos, quando se testou as duas linhagens de *S. typhimurium* (TA98 e TA100), tanto na presença como na ausência de sistema de metabolização exógena (S9), conforme ilustrado na figura 5.

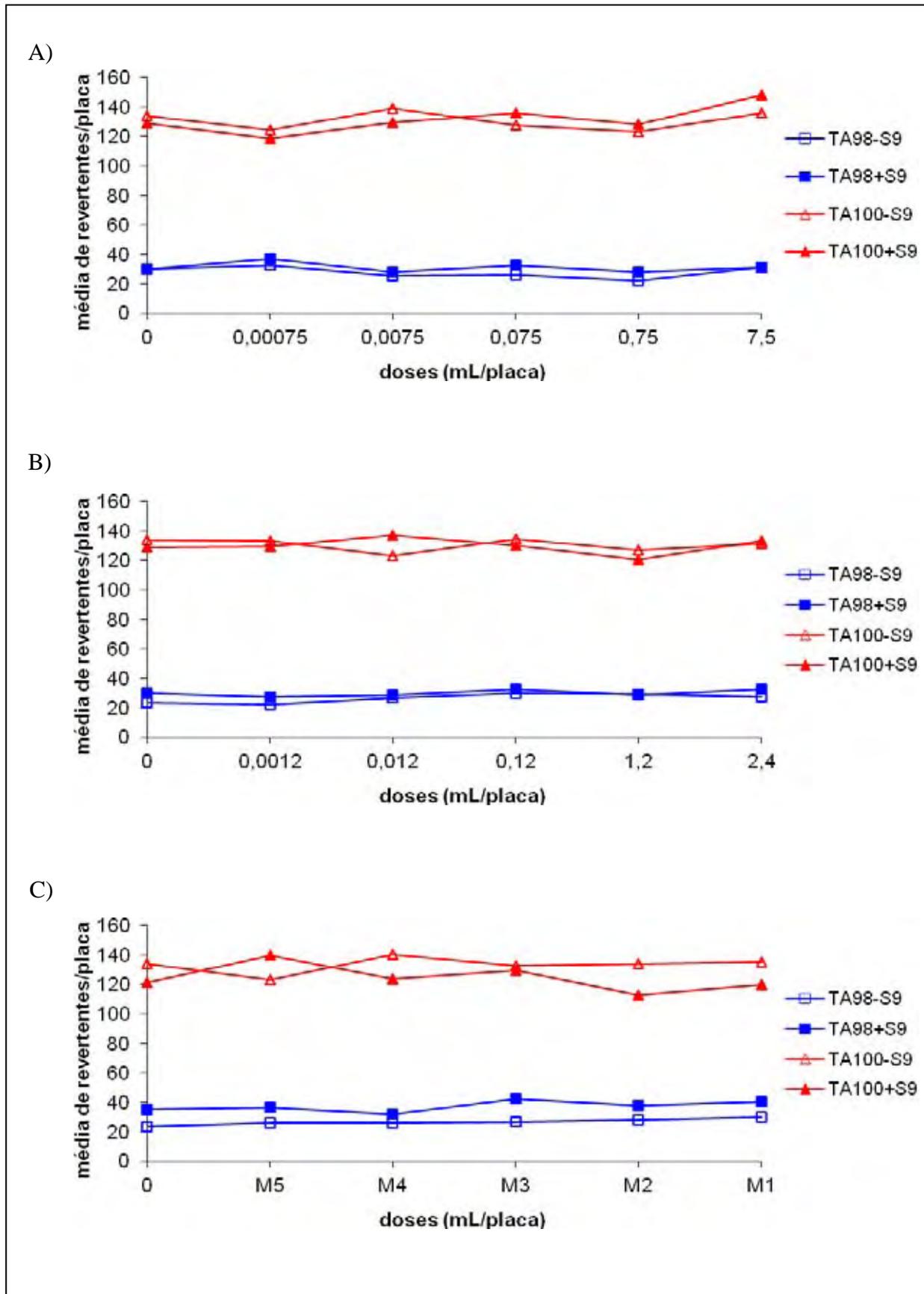


Figura 5 - Curvas dose-resposta para o inseticida imidaclopride (A), para o herbicida sulfentrazone (B) e para a mistura destes dois agrotóxicos (C), na presença e na ausência de sistema de metabolização exógeno (S9) em linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium*.

Mesmo tendo obtido resultados negativos de mutagenicidade para os testes feitos com os agrotóxicos, os testes com os CP nos indicaram que as bactérias responderam eficientemente aos testes de mutagenicidade (Tabela 7).

Tabela 7 - número de colônias revertentes de *S. typhimurium* (linhagens TA98 e TA100), após exposição aos controles positivos 4-nitroquinolina (4NQO) e 2-aminoantraceno (2AA).

Linhagens	4NQO		2AA	
	réplica 1	réplica 2	réplica 1	réplica 2
TA98	648	552	1656	1864
TA100	1984	1888	2432	2814

#### 4 Discussão e Conclusão

O drástico aumento na aplicação de agrotóxicos, que vem ocorrendo nas últimas décadas, tem gerado diversos efeitos prejudiciais para a saúde humana e também para os animais (CRUMPTON, 2001). As exposições, principalmente às baixas concentrações (MOLLER, 2006), são praticamente inevitáveis, devido à contaminação do ar, da água, do solo e dos alimentos (ECOBICHON, 2000). Desta forma, avaliações que visam determinar o potencial de indução de efeitos prejudiciais no material genético de organismos expostos a estes contaminantes têm sido bastante relevantes.

No presente trabalho, tanto o inseticida imidaclopride quanto o herbicida sulfentrazone, induziram índices significativos de MN nas células HepG2, indicando uma ação mutagênica destes agrotóxicos sobre estas células. Também foi observado, embora de modo não significativo, um leve aumento na frequência de MN induzidos pela menor concentração dos dois agrotóxicos testados e uma maior indução de danos no DNA (pelo ensaio do cometa) pelas menores concentrações de imidaclopride e pela combinação das menores concentrações do inseticida com o herbicida. Estudos realizados por Au et al. (1988, 1990) e Cavallo et al. (2010) mostraram que concentrações mais elevadas de um determinado composto pode induzir menos danos no DNA do que as menores concentrações, em decorrência de uma maior atividade de enzimas antioxidantes, em resposta ao elevado potencial de indução de danos pela maior concentração. Alguns autores (BANERJEE et al., 1999, NORDBERG; ARNÉR, 2001, ETEMADI-ALEAGHA; AKHGAR; ABDOLLAHI, 2002, RAI; SHARMA, 2007, RAI et al., 2009) têm demonstrado que os agrotóxicos podem induzir estresse oxidativo nas células, pela produção de radicais livres, aumentando a

peroxidação lipídica e causando um aumento significativo nas atividades das enzimas antioxidantes nos mamíferos. Antioxidantes como a glutathione-S-transferase (GST), removem eficientemente os radicais livres e são parcialmente responsáveis pela proteção contra a peroxidação lipídica das membranas, derivadas de exposição aguda ou crônica aos pesticidas (AGRAWAL; SULTANA; GUPTA,1991; EL-SHARKAWY et al., 1994). Apesar destas afirmações, não foram encontradas, no presente trabalho, alterações significativas na atividade da GST para as três diferentes concentrações testadas do inseticida imidaclopride e nem entre as diferentes combinações das concentrações deste inseticida com o herbicida sulfentrazone.

Para o ensaio do cometa, a indução de maiores danos pelas menores concentrações testadas pode, ainda, ser decorrente das características químicas dos agrotóxicos estudados. Segundo Hartmann et al. (2001), uma maior concentração de um determinado composto pode induzir, quando comparada com concentrações menores, a uma menor migração do DNA no ensaio do cometa, se o agente estudado for um potencial indutor de *crosslinks*. O reparo do DNA, induzido pelas baixas concentrações, pode levar a elevados índices de migração do DNA, enquanto que a elevada quantidade de *crosslinks*, induzida pelas maiores concentrações, pode levar a um decréscimo na migração do DNA.

Por meio dos resultados obtidos no teste do MN e no ensaio do cometa, podemos dizer, de modo geral, que os danos induzidos no DNA das células HepG2 pelo inseticida imidaclopride não foram reparados, o que permitiu a sua fixação sob a forma de MN. Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram obtidos quando o imidaclopride foi testado em outros organismos e tipos celulares. Testes *in vitro* (FENG et al., 2004, 2005, COSTA et al., 2009) realizados com linfócitos humanos e eritrócitos de anfíbios, expostos à diferentes concentrações do imidaclopride puro (>95 %) e do imidaclopride comercial Confidor<sup>®</sup> (17,8 %), indicaram resultados positivos tanto para a indução de MN quanto para a indução de danos primários no DNA, observados pelo ensaio do cometa. No estudo realizado por Costa et al. (2009), também foram verificados os efeitos do imidaclopride puro e comercial, após a exposição das células a um sistema de metabolização exógeno (S9). Os autores observaram um leve aumento dos danos genotóxicos e mutagênicos pelo produto comercial, após a ativação metabólica, quando comparados com os resultados obtidos com o produto puro. O imidaclopride de formulação comercial possui substâncias como dimetilsulfóxido, metilpirrolidona, carbonato de propileno e óleo mineral, que podem alterar a sua biodisponibilidade e sua toxicidade para seres humanos expostos de forma ocupacional. Tais aditivos podem aumentar a toxicidade do inseticida por aumentar sua absorção pelas membranas celulares (Costa et al., 2009).

No presente trabalho, os índices de MN induzidos pelo inseticida imidaclopride foram altamente significativos ( $p < 0,001$ ). Assim como nas descrições de Costa et al (2009), os resultados aqui apresentados, para as células HepG2, podem estar relacionados com uma potencialização do efeito mutagênico do inseticida estudado, pois estas células, segundo Knasmüller et al. (1998), Kassie et al. (2003), Majer et al. (2004) e Knasmüller et al. (2004), apresentam atividade das enzimas de fase I e II da metabolização de xenobiontes, que possuem um papel crucial na ativação de substâncias genotóxicas e mutagênicas.

A ação genotóxica/mutagênica do inseticida imidaclopride, de acordo com os resultados aqui obtidos pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente, ocorre por meio da indução de quebras cromossômicas, sendo, portanto, um agente de ação clastogênica. Segundo Sari-Minodier et al. (2002), a FISH realizada com uma sonda de DNA pan-centrométrica humana, pode ser utilizada para distinguir, de modo preciso, os MN originados de quebras cromossômicas daqueles originados de perdas cromossômicas. Ainda, esta técnica constitui uma ferramenta valiosa na identificação e triagem, *in vitro*, de agentes clastogênicos e indutores de aneuploidia (CHUNG; KANG; KIM, 2002). De acordo com Antoccia et al. (1991), se 70 a 100 % dos MN analisados possuem cinetócoro, então o composto é considerado aneugênico. Se a frequência de MN contendo cinetócoro estiver entre 0 e 30 %, então o composto é considerado clastogênico (STOPPER; MÜLLER, 1997). Nossos resultados mostraram uma ausência de centrômeros na maioria dos MN induzidos pelo inseticida imidaclopride, resultados estes que inferem uma ação clastogênica para este agrotóxico, corroborando os dados apresentados por Karabay; Oguz (2005). Estes autores caracterizaram o inseticida como de ação clastogênica, pela sua capacidade de induzir MN e aberrações cromossômicas, como quebras e aderências cromossômicas, em células de medula óssea de ratos.

Para o herbicida sulfentrazone, não foi observado efeito genotóxico para nenhuma das concentrações testadas, mas a potencialidade de indução de danos no DNA por este herbicida foi confirmada pelo teste do MN, para as duas menores concentrações.

Na literatura existem poucos trabalhos que relatam os efeitos genotóxicos e mutagênicos do sulfentrazone e dos triazolinonas (classe química a qual pertence o herbicida). Os poucos dados disponíveis mostram que o sulfentrazone não apresenta efeito genotóxico e nem carcinogênico, embora alguns estudos tenham apontado um possível potencial mutagênico para este herbicida, porém inconclusivos (BIGGER; CLARKE, 1992, CALIFORNIA EPA DEPARTMENT OF PESTICIDE REGULATION, 2006). Outros autores (BIGGER; CLARKE, 1992, PUTNAM; YOUNG 1992, MURLI 1996) encontraram

resposta negativa de mutagenicidade para o sulfentrazone, ao contrário do observado em nossos estudos. No entanto, os testes realizados pelos autores acima citados não foram realizados com o herbicida sulfentrazone (produto comercial), mas sim com o sulfentrazone com pureza de 94,2 %. Ainda, tais testes foram, em sua maioria, realizados com sistemas *in vivo* e, quando *in vitro*, os autores utilizaram tipos celulares diferentes do que o utilizado no presente trabalho. Quanto ao potencial genotóxico do herbicida sulfentrazone, Castro et al. (2007) observaram, por meio do ensaio do cometa, resultados negativos em leucócitos de ratas em período gestacional, expostas à diferentes doses do herbicida. Tal resposta corrobora os resultados da não genotoxicidade do herbicida sulfentrazone obtidos em nosso estudo, apesar deste último ter sido realizado *in vitro* e não *in vivo*. A falta de genotoxicidade também foi verificada na prole recém-nascida. Apesar disso, os autores puderam constatar que no final do período gestacional (período sem administração de sulfentrazone), os danos induzidos no DNA foram bastante diminuídos em relação ao período subsequente à última administração do sulfentrazone, refletindo o potencial de recuperação celular, após a interrupção do tratamento.

Segundo Singh; Stephen (1997) e Ribeiro, Salvadori e Marques (2003), a análise de 50 células/nucleóides por lâmina, no ensaio do cometa, é suficiente para detectar a indução de danos no DNA pelo agente testado. No presente trabalho, foram analisados 100 nucleóides por lâmina (200 por tratamento), aumentando assim, o poder do teste estatístico. Apesar disso, os resultados obtidos para o herbicida sulfentrazone foram negativos. A presença significativa de MN e a ausência de danos no DNA, verificada pelo ensaio do cometa, realizado com o herbicida sulfentrazone neste trabalho, podem ter sido decorrentes de dois possíveis fatores: 1) a maioria dos MN induzidos pelo herbicida estudado pode ter tido uma origem aneugênica, o que explicaria a não detecção dos danos pelo ensaio do cometa. De acordo com o resultado da FISH obtido no presente trabalho, a exposição ao herbicida sulfentrazone pode levar tanto a quebras como a perdas cromossômicas, uma vez que a porcentagem de indução destes dois tipos de danos foi praticamente igual; 2) a indução de possíveis danos genotóxicos, gerados pelo herbicida através da formação de espécies reativas de oxigênio, tais como as quebras no DNA (TUTEJA et al., 2001, TUTEJA; TUTEJA, 2001, BRITT, 1996), podem não ter sido detectadas pelo ensaio do cometa, pelo fato deste teste ter sido realizado após 24 horas de exposição ao herbicida. De acordo com Brendler-Schwaab et al. (2005), lesões primárias no DNA, que têm uma “vida curta”, como as quebras de fita simples, podem ser rapidamente reparadas e não detectadas, dependendo do tempo de exposição das células ao agente estudado. Para estes autores, um tempo ideal para capturar estas lesões seria algo entre 2 e 6

horas de exposição. Segundo Pandey et al. (2009), o tempo que transcorre entre a exposição a uma determinada substância e a análise das células, pode contribuir para as diferenças de sensibilidade observadas entre o teste do MN e o ensaio do cometa.

Hartmann et al. (2001) avaliaram a diferença de sensibilidade entre o teste do MN e o ensaio do cometa, utilizando 36 compostos diferentes, na ausência de S9. Dos 36 compostos testados, 30 também foram avaliados na presença de S9, o que totalizou a obtenção de 66 resultados. Os autores verificaram que a maioria dos resultados obtidos nos dois testes estava em concordância, ou seja, o composto que apresentou resultado positivo ou negativo em um dos testes, apresentou o mesmo resultado no outro teste. No entanto, também foram observados resultados discrepantes entre os testes. Dos 44 resultados negativos verificados no ensaio do cometa, 16 mostraram resultados positivos no MN e dos 38 resultados positivos verificados no teste do MN, 16 foram negativos no ensaio do cometa. Os autores citam várias justificativas para este resultado, sendo os principais a indução de *crosslinks* e a aneugenicidade dos compostos.

Os efeitos mutagênicos do inseticida imidaclopride e do herbicida sulfentrazone, bem como da mistura deles, foram também avaliados pelo teste de Ames e os resultados observados não foram significativos para nenhuma das linhagens testadas (TA98 e TA100, com e sem S9). Estudos sobre a mutagenicidade do sulfentrazone e do imidaclopride, avaliados pelo teste de Ames, são bastante escassos na literatura. Wojciechowski (1986) testaram o herbicida sulfentrazone (95,5%) com as linhagens TA98 e TA100 (com e sem S9) de *S. typhimurium* e encontraram o mesmo resultado negativo. Para o imidaclopride, Sheets (2010), em um trabalho de revisão de estudos dos efeitos tóxicos, neurotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos do imidaclopride, que fazem parte do banco de dados gerados pela Bayer CropScience, também verificou ausência de mutagenicidade para este inseticida, quando avaliado pelo teste de Ames.

Quando os agrotóxicos imidaclopride e sulfentrazone foram misturados, verificou-se, tanto no ensaio do cometa (com exceção da mistura M3), como no teste do MN, que a quantidade danos induzidos no DNA das células HepG2 foi menor do que a soma dos danos induzidos por cada agrotóxico isoladamente. Esta observação nos leva a concluir que, quando em associação, o inseticida e o herbicida promovem um efeito antagonista no organismo estudado. Pela aplicação da técnica de FISH, podemos ainda inferir que, quando aplicados conjuntamente, os agrotóxicos estudados podem levar a indução de genotoxicidade e mutagenicidade nos organismos expostos, tanto pela promoção de quebras quanto de perdas cromossômicas.

De acordo com Hodgson (1999), a interação entre agrotóxicos pode levar a efeitos de ação aditiva, sinérgica ou antagonista. Segundo o mesmo autor, o efeito aditivo requer mecanismos de ação independentes ou que não haja interferência da ação de um dos tóxicos, sobre o outro, o que pode mascarar a ação de um dos tóxicos envolvidos na mistura. O efeito sinérgico requer que as diferentes substâncias interajam no mesmo ponto de uma mesma molécula, de uma enzima ou de um receptor. Para Nash (1967), Marking (1985), Berenbaum (1981) e Calabrese (1999), o efeito aditivo ocorre quando a toxicidade total, resultante da combinação de dois ou mais agrotóxicos, é igual à soma dos efeitos de toxicidade induzida por cada produto isoladamente (a resposta é exatamente igual ao esperado). O efeito sinérgico ocorre quando a toxicidade total, resultante da combinação de dois ou mais agrotóxicos, é maior do que a soma dos efeitos de toxicidade induzida por cada produto isolado (a resposta é maior que o efeito aditivo) e o efeito antagonístico ocorre quando a toxicidade total é menor do que a toxicidade induzida por cada produto isolado (a resposta é menor que o efeito aditivo).

Frente aos resultados obtidos neste trabalho, podemos dizer que a realização de ensaios complementares, que detectam diferentes tipos de danos no DNA, contribui de modo eficaz para uma melhor avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de compostos cujos modos de ação ainda não estão bem elucidados. Neste estudo, pudemos verificar que ambos os agrotóxicos testados não induzem mutação por substituição de pares de base e nem por deslocamento do quadro de leitura, mas induzem outros tipos de lesões no DNA, como quebra e perda de cromossomos.

## 5. Referências Bibliográficas

- AGRAWAL, D.; SULTANA, P.; GUPTA, G.S. Oxidative damage and changes in the glutathione redox system in erythrocytes from rats treated with hexachlorocyclohexane. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, p. 459–462, 1991.
- ALI, D.; NAGPURE, N.S.; KUMAR, S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; LAKRA, W.S. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 650–656, 2009.
- ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C.L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. **Plant Physiology**, v.100, p. 224-233, 1997.
- AMES, B.N.; McCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, v.31, p.347-364, 1975.

ANTOCCIA, A.; DEGRASSI, F.; BATTISTONI, A.; CILIUTTI, P.; TANZARELLA, C. In vitro micronucleus test with kinetochore staining: evaluation of test performance. **Mutagenesis**, v.6, p. 319-324, 1991.

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.; WARD JR., J.B.; RAMANUJAM, V.M.S.; HARPER, B.L.; MOSLEN, M.T.; LEGATOR, M.S. Genotoxic effects of a sub-acute low-level inhalation exposure to a mixture of carcinogenic chemicals. **Mutation Research**, v. 203, p. 103-115, 1988.

BANERJEE, B.D.; SETH, V.; BHATTACHARYA, A.; PASHA, S.T.; CHAKRABORTY, A.K. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. **Toxicology Letters**, v. 107, 33-47, 1999.

BEALE, S.I.; WEINSTEIN, J.D. Biosynthesis of heme and chlorophylls. In: DAILEY, H. A. (Ed.). New York: McGraw-Hill, 1990. p. 287-391.

BERENBAUM, M.C. Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. **Advances in Cancer Research**, v. 35, p. 269-335, 1981.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, MC. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from *Salmonella* test. **Mutation Research**, v. 97, p. 267-281, 1982.

BIGGER, A.H.; CLARKE, J.J. L5178Y TK +/- Mouse lymphoma mutagenesis assay with a confirmatory assay. Rockville, MD: Microbiological Associates, Inc. Laboratory Study No.

BOLOGNESI, C.; MORASSO, G. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. **Trends in Food Science e 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, p. 245-254, 2005.  
BRITT, A.B. DNA damage and repair in plants. **Annual Review o Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 75-100, 1996.

CALABRESE, E.J. **Multiple Chemical Interactions**. Chelsea, Mi, USA: Lewis Publishers, 1999.

CASTRO, V.L.S.S.; DESTEFANI, C.R.; DINIZ, C.; POLI, P. Evaluation of neurodevelopmental effects on rats exposed prenatally to sulfentrazone. **Neurotoxicology**, v. 28, p. 1249-1259, 2007.

CAVALLO, D.; URSINI, C.L.; FRESEGNA, A.M.; CIERVO, A.; MAIELLO, R.; RONDINONE, B.; D'AGATA, V.; IAVICOLI, S. Direct-oxidative DNA damage and apoptosis induction in different human respiratory cell exposed to low concentrations of sodium chromate. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 218-225, 2010.

CHAO, S.L.; CASIDA, J.E. Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 58, p. 77-88, 1997.

CHEQUER, F.M.D.; ANGELI, J.P.F.; FERRAZ, E.R.A.; TSUBOY, M.S.; MARCARINI, J.C.; MANTOVANI, M.S.; DE OLIVEIRA, D.P. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research**, v. 676, p. 83–86, 2009.

CHUNG, H.W.; KANG, S.J.; KIM, S.Y. A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. **Mutation Research**, v. 516, p. 49-56, 2002.

CLAXTON, L.D.; UMBUZEIRO, G.A.; DE MARINI, D.M. The *Salmonella* Mutagenicity Assay: The Stethoscope of Genetic Toxicology for the 21st Century. **Environmental Health Perspectives**, v.118, p.1515-1522, 2010.

COSTA, C.; SILVARI, V.; MELCHINI, A.; CATANIA, S.; HEFFRON, J.J.; TROVATO, A.; DE PASQUALE, R. Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. **Mutation Research**, v. 672, p. 40–44, 2009.

CRUMPTON, W.G. Using wetlands for water quality improvement in agricultural watersheds the importance of a watershed scale approach. **Water Science and Technology**, v. 44, p. 559– 564, 2001.

ECOBICHON, D.J. Our changing perspectives on benefit and risks of pesticides: a historical overview. **Neurotoxicology**, v. 21, p. 211–218, 2000.

EL-SHARKAWY, A.M.; ABDEL-RAHMAN, S.Z.; HASSAN, A.A.; GABR, M.H.; EL-ZOGHBY, S.M.; EL-SEWEDY, S.M. Biochemical effects of some insecticides on the metabolic enzymes regulating glutathione metabolism. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, p. 505-510, 1994

EPA, 2006. CALIFORNIA EPA DEPARTMENT OF PESTICIDE REGULATION. **Summary of Toxicology data: Sulfentrazone (F2865)**, 2006. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/toxsums/pdfs/5923.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2007.

ETEMADI-ALEAGHA, A.; AKHGAR, I.M.; ABDOLLAHI, M. A Brief review on oxidative stress and cardiac diseases. **Middle East Pharmaceutical**, v. 10, p. 8-9, 2002.

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

FENG, S.; KONG, Z.; WANG, X.; PENG, P.; ZENG, E. Y. Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 239–246, 2005.

FENG, S.; KONG, Z.; WANG, X.; ZHAO, L.; PENG, P. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. **Chemosphere**, v. 56, p. 457-463, 2004.

GATEHOUSE, D.; HAWORTH, S.; CEBULA, T.; GOCKE, E.; KIER, L.; MATSUSHIMA, T.; MELCION, C.; NOHMI, T.; VENITT, S.; ZEIGER, E. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. **Mutation Research**, v. 312, p. 217-233, 1994.

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

HODGSON, E. Induction and inhibition of pesticide-metabolizing enzymes: roles in synergism of pesticides and pesticide action. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 6-11, 1999.

KARABAY, N.U.; OGUZ, M.G. Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p. 653-662, 2005.

KASSIE, F.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; EDENHARDER, R.; PLATT, K.L.; DARROUDI, F.; LHOSTE, E.; HUMBOLT, C.; MUCKEL, E.; UHL, M.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Development and application of test methods for the detection of dietary constituents which protect against heterocyclic aromatic amines. **Mutation Research**, v. 523–524, p. 183–192, 2003.

KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B.J. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants current state of knowledge. **Toxicology**, v.198, p.315-328, 2004.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research** 402, 185–202, 1998.  
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.

LAMY, E.; SCHRÖDER, J.; PAULUS, S.; BRENK, P.; STAHL, T.; MERSCH-SUNDERMANN, V. Antigenotoxic properties of *Eruca sativa* (rocket plant), erucin and erysolin in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo(a)pyrene and their mode of action. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46 p. 2415–2421, 2008.

LANKOFF, A.; WOJCIK, A.; FESSARD, V.; MERILUOTO, J. Nodularin-induced genotoxicity following oxidative DNA damage and aneuploidy in HepG2 cells. **Toxicology Letters**, v. 164, p. 239–248, 2006.

MAJER, B.J.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; DARROUDI, F.; LAKY, B.; DE WIT, K.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. **Mutation Research**, v. 551, p.153–166, 2004.

- MARKING, L.L. Toxicity of chemical mixtures. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington DC, USA: Hemisphere Publishing, 1985, p.164-176.
- MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p.173–214, 1983.
- MATRINGE, M.; MORNET, R.; SCALLA, R. Characterization of [3H]acifluorfen binding to purified pea etioplasts, and evidence that protoporphyrinogen oxidase specifically binds acifluorfen. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 861-868, 1992.
- MOLLER, P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 98, 336–345, 2006.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p.29–60, 2000.
- MOSMANN, T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxic assays. **Journal of Immunological Methods** 1983;65:55–63.
- MURLI, H. Mutagenicity test on F6285 technical, PL96-011, in a dominant lethal assay in rats. Vienna, VA: Corning Hazleton Inc. (CHV), CHV Study No. 17564-0-472, FMC Study No. A96-4429, 1996.
- NASH, R.G. Phytotoxic pesticide interaction in soil. **Agronomy Journal**, v. 59, p. 227-230, 1967.
- NATARAJAN, A.T.; DURROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagen/carcinogens. **Mutagenesis**, v.6, p. 399-403, 1991.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants and mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v 31, p. 1287-1312, 2001.
- OLIVEIRA JR, R.S. Mecanismos de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J. (Org.). **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. p. 207-260.
- PANDEY, A.K.; GURBANI, D.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D.; AJMANI, S.; DHAWAN, A. *In silico* studies with human DNA topoisomerase-II alpha to unravel the mechanism of *in vitro* genotoxicity of benzene and its metabolites. **Mutation Research**, v. 661, p. 57-70. 2009.
- PUTNAM, D.L; YOUNG, R.R. Micronucleus cytogenetic assay in mice. Bethesda, MD: Microbiological Associates, Inc. Laboratory Study No. TA136.122019, 1992.
- RAI, D.K.; RAI, P.K.; RIZVI, S.I.; WATAL, G.; SHARMA, B. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v 61, p. 531-535, 2009.
- RAI, D.K.; SHARMA, B. Carbofuran-induced oxidative stress in mammalian brain. **Molecular Biotechnology**, v. 37, p. 66-71, 2007.

- RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*, in: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES E.K. (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003, p. 201–219.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003, 356p.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M.C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. 225–254, 1999.
- SANDERSON, B.J.S; SHIELD, A.J. Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.335, 1996, p.41-57.
- SARI-MINODIER, I.; ORSIÈRE, T.; BELLON, L.; POMPILI, J.; SAPIN, C.; BOTTA, A. Cytogenetic monitoring of industrial radiographers using the micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 521, p. 37–46, 2002.
- SHEETS, L. Imidacloprid: a neonicotinoid insecticide. In: KRIEGER, R. (Ed.). **Handbook of pesticide toxicology**, 2th ed. New York: Academic Press, 2001a. p. 1-8.
- SHEETS, L. Nicotinoids. In: MASSARO, E. (Ed.). **Neurotoxicology handbook**. Totowa (NJ): Humana Press, 2001b. p. 77-85.
- SHEETS, L.P. Imidacloprid: A Neonicotinoid Insecticide. In: KRIEGER, R. (Ed.). **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology**, 2010, p. 2055-2064.
- SINGH, N.P.; STEPHEN, R.E. Microgel electrophoresis: Sensitivity, mechanisms and DNA electrostretching. **Mutation Research**, v. 383, p.167–175, 1997.
- STOPPER, H.; MÜLLER, S.O. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. **Toxicology in vitro**, v.11, p. 661-667, 1997. TA136.701020, 1992.
- TOMIZAWA, M.; LEE, D.L.; CASIDA, J.E. Neonicotinoid insecticides: molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 12, p. 6016-6024, 2000.
- TOMIZAWA, M.; ZHANG, N.; DURKIN, K.A.; OLMSTEAD, M.M.; CASIDA, J.E. The neonicotinoid electronegative pharmacophore plays the crucial role in the high affinity and selectivity for the *Drosophila* nicotinic receptor: An anomaly for the nicotinoid cation- $\pi$  interaction model. **Biochemistry**, v. 42, p. 7819-7827, 2003.
- TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F.; MANTOVANI, M.S.; KNASMÜLLER, S.; UMBUZEIRO, G.A.; RIBEIRO, L.R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1650–1655, 2007.

TUTEJA, N.; SINGH, M.B.; MISRA, M.K.; BHALLA, P.L.; TUTEJA, R. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 337-397, 2001.

TUTEJA, N.; TUTEJA, R. Unravelling DNA repair in human: molecular mechanisms and consequences of repair defect. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 261-290, 2001.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Single cell gel electrophoresis assay with human-derived hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 441, p. 215–224, 1999.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 468, p. 213-225, 2000.

VAMVAKAS, E.H.; VOCK, W.K.L. On the role of DNA double strand breaks in toxicity and carcinogenesis. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 27, p. 155–174, 1997.

WOJCIECHOWSKI, J.P. **Salmonella/mammalian-microsome plate incorporation mutagenicity assay (Ames Test)**. FMC Corporation, Genetic Toxicology Laboratory, Princeton, NJ, Study No. A86-2033, 11 July 1986.

## 6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

A preocupação mundial acerca dos efeitos prejudiciais que os resíduos de agrotóxicos possam causar no DNA das células, vem crescendo e gerando diferentes estudos que visam entender os mecanismos envolvidos na indução das lesões e, conseqüentemente, maneiras de contornar os efeitos danosos, restaurando a qualidade de vida dos organismos.

Muitos testes genéticos, citogenéticos e moleculares, têm sido aplicados para este fim. Alguns ensaios utilizam-se de modelos *in vivo* e outros de modelos *in vitro* para detectar a indução de uma alteração genética ou cromossômica nas células. A escolha do organismo adequado e do tipo de teste a ser realizado irá depender das hipóteses que se pretendem testar. O teste do MN, de AC e o ensaio do cometa, por exemplo, são técnicas de detecção de mutagenicidade e genotoxicidade que funcionam muito bem para testar uma grande variedade de compostos químicos e de misturas complexas presentes no meio ambiente, em diferentes tipos celulares.

Por meio destas técnicas foi possível, no presente trabalho, detectar o potencial de indução de diferentes tipos de lesões no DNA (tanto as de caráter aneugênico quanto as de caráter clastogênico) pelos agrotóxicos imidaclopride e sulfentrazone, bem como pela mistura deles, e verificar se elas se mantêm ou se são reparadas em ciclos celulares subsequentes. Utilizando ensaios *in vivo*, com o sistema teste vegetal *A. cepa*, verificamos a indução de diferentes tipos de AC, tais como quebras, perdas, pontes, aderências, atrasos, poliploidias, C-metáfases, dentre outras, para os agrotóxicos estudados. Uma análise cuidadosa destas alterações nos permitiu inferir o modo de ação dos agrotóxicos, levando em conta qual o tipo de lesão foi predominantemente induzida por cada composto. Assim, inferimos que, tanto o herbicida quanto o inseticida induziram uma maior quantidade de danos de origem clastogênica, enquanto que a mistura dos agrotóxicos induziu quantidades semelhantes de danos de origem clastogênica e aneugênica.

Além dos efeitos genotóxicos observados pela indução de AC, também pudemos verificar, nos ensaios com *A. cepa*, uma ação mutagênica para o herbicida sulfentrazone, bem como um efeito mitodepressivo para a menor concentração testada, provavelmente, pela grande indução, por esta concentração, de AC do tipo aderência cromossômica. Ainda, por meio dos ensaios com *A. cepa*, observamos que, além da possível indução de morte celular por necrose, conforme descrito na literatura, o herbicida sulfentrazone pode também levar a eventos de apoptose nestas células, dependendo do grau de estresse sofrido por elas.

Por meio de testes de recuperação, realizados com água purificada, também foi possível analisar a fixação ou não dos danos causados nas células. Desta forma, verificamos

que os danos induzidos pelo inseticida e pela mistura dos agrotóxicos estudados foram minimizados, após três ciclos de divisão celular (recuperação de 72 horas). Para o herbicida, verificamos, por meio dos testes de recuperação, que a menor concentração testada foi a mais problemática, continuando a induzir danos no DNA das células de *A. cepa*, mesmo após o período de recuperação de 72 horas em água purificada por osmose reversa.

Pelos ensaios *in vitro*, com células de hepatoma humano (HepG2), pudemos analisar a sensibilidade destas células na detecção dos efeitos genotóxicos e mutagênicos dos agrotóxicos testados e confirmar, por meio da técnica de FISH, associada ao teste do MN, o mecanismo de ação pelo qual estes compostos causam lesões no DNA dos organismos. A FISH confirmou os resultados obtidos em *A. cepa*, ou seja, o imidaclopride como sendo um agente indutor de quebras cromossômicas e o sulfentrazone e a mistura, agentes indutores de quebras e perdas cromossômicas em proporções iguais. Ainda, verificamos uma maior sensibilidade das células HepG2 na detecção de efeitos mutagênicos para o imidaclopride. Neste sistema teste, a FISH também ajudou a explicar, ao menos em parte, a falta de correlação observada entre os resultados do ensaio do cometa (resultados negativos) e do teste do MN (resultados positivos), para o herbicida sulfentrazone.

A comparação entre os resultados do teste do MN e do cometa também nos ajudou a compreender o destino das lesões induzidas pelos agrotóxicos estudados. A presença de resultados significativos no ensaio do cometa e a presença de MN nas células expostas ao imidaclopride, por exemplo, nos indicou que as lesões induzidas pelo inseticida não foram reparadas pelas células e se fixaram na forma de MN. Quando o inseticida foi misturado ao herbicida, observamos que a indução de danos primários no DNA das células HepG2 foram, possivelmente, reparados e não decorreram em MN.

Ainda, por meio dos testes realizados com as linhagens TA98 e TA100 da bactéria *S. typhimurium*, concluímos que os agrotóxicos estudados não causam mutações moleculares do tipo substituição de pares de base e erros no quadro de leitura. Os demais sistemas testes aqui utilizados mostraram-se bons indicadores dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dos agrotóxicos estudados e da sua mistura. Os testes aplicados a estes sistemas também foram adequados e permitiram compreender, não só os efeitos destes compostos químicos, mas também a maneira pelo qual eles afetam o DNA dos organismos.

Frente ao exposto, podemos concluir que o herbicida sulfentrazone e o inseticida imidaclopride, bem como a mistura destes agrotóxicos, são compostos com potencialidades citotóxica, genotóxica e mutagênica. Ainda, a mistura deles não parece causar mais problemas do que os agrotóxicos isolados, uma vez que os danos induzidos por ela foram possivelmente

reparados pelas células, não sendo observados, de maneira significativa, em ciclos celulares subsequentes.

Pela possibilidade da indução de efeitos prejudiciais no material genético dos organismos expostos aos agrotóxicos imidaclopride e sulfentrazone, indicados no presente estudo, reforçamos a necessidade da obtenção de cuidados durante a produção, aplicação e descarte destes agrotóxicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.; TICE, R.; WATERS, M.D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, v. 463, p.111-172, 2000.
- ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C.L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. **Plant Physiology**, v.100, p. 224-233, 1997.
- AMES, B.N.; DURSTON, W.E.; YAMASAKI, E.; LEE, F.D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 70, p. 2281–2285, 1973.
- ANDRIANOPOULOS, C., STEFANOPOULOS, G., DEMOPOULOS, N.A.. Genotoxicity of hydrochlorothiazide in cultured human lymphocytes. I. Evaluation of chromosome delay and chromosome breakage. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.47, p.169–178, 2006.
- ANTOCCIA, A.; DEGRASSI, F.; BATTISTONI, A.; CILIUTTI, P.; TANZARELLA, C. In vitro micronucleus test with kinetochore staining: evaluation of test performance. **Mutagenesis**, v.6, p. 319-324, 1991.
- ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R.; AMÂNCIO, A.V.; CORREA, R.M.L.; GUERCIO, M.A. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, v. 28, p. 975-982, 2005.
- assay with human hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 468, p. 213-225, 2000.
- AUDEBERT, M.; RIU, A.; JACQUES, C.; HILLENWECK, A.; JAMIN, E.L.; ZALKO, D.; CRAVEDI, J.-P. Use of the  $\lambda$ H2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. **Toxicology Letters**, v. 199, p. 182–192, 2010.
- BAKOU, K., STEPHANOPOULOS, G., ANDRIANOPOULOS, C., DEMOPOULOS, N.A. Spontaneous and spindle poison-induced micronuclei and chromosome non-disjunction in cytokinesis-blocked lymphocytes from two age groups of women. **Mutagenesis**, v. 17, p. 233–239, 2002.
- BANDYOPADHYAY, A.; MUKHERJEE, A. Sensitivity of *Allium* and *Nicotiana* in cellular and acellular comet assays to assess differential genotoxicity of direct and indirect acting mutagens. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 860–865, 2011.
- BAYER CROPSCIENCE LTDA. **Evidence**. Apresenta ficha técnica do Inseticida Evidence. Disponível em <http://www.bayercropscience.com.br/PRD/busca>. Acesso em 28 nov. 2007.
- BEALE, S.I.; WEINSTEIN, J.D. Biosynthesis of heme and chlorophylls. In: DAILEY, H. A. (Ed.). New York: McGraw-Hill, 1990. p. 287–391.

BEETSTRA, S.; THOMAS, P.; SALISBURY, C.; TURNER, J.; FENECH, M. Folic acid deficiency increases chromosomal instability, chromosome 21 aneuploidy and sensitivity to radiation-induced micronuclei. **Mutation Research**, v. 78, p. 317–26, 2005.

BELDEN, J.B.; LYDY, M.J. Impact of atrazine on organophosphate insecticide toxicity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, p. 2266–2274, 2000.

BENIGNI, R.; PALOMBO, F.; DOGLIOTTI E. Multivariate statistical analysis of mutation spectra of alkylating agents. **Mutation Research**, v. 267, p. 77-88, 1992.

BERENBAUM, M.C. Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. **Advances in Cancer Research**, v. 35, p. 269-335, 1981.

BIANCHI-SANTAMARIA, A.; GOBBI, M.; CEMBRAN, M.; ARNABOLDI, A. Human lymphocyte micronucleus genotoxicity test with mixtures of phytochemicals in environmental concentrations. **Mutation Research**, v.388, p. 27–32, 1997.

BLAABOER, B.J.; VAN HOLSTEIJN, I.; VAN GRAFT, M.; PAINE, A.J. The concentration of cytochrome P-450 in human hepatocyte cultures. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, p. 2405-2408, 1985.

BOCK ,C.; RAPP, A.; DITTMAR, H.; MONAJEMBASHI, S.; GREULIC, K.O. Localization of specific sequences and DNA single-strand breaks in individual UVA irradiated human lymphocytes by COMET FISH. **Prog Biomed Optics, SPIE** v. 3568, p. 207-217, 1999.

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

BOLOGNESI, C.; LANDINI, E.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P. Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with all-chromosome centromeric probe. **Mutation Research**, v. 557, p. 109-117, 2004.

BOLOGNESI, C.; MORASSO, G. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. **Trends in Food Science e 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, p. 245-254, 2005.

BULL, C.; FENECH, M. Genome-health nutrigenomics and nutrigenetics: nutritional requirements or 'nutriomes' for chromosomal stability and telomere maintenance at the individual level. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.67, p.146–156, 2008.

CABRERA, G.L.; RODRIGUEZ, D.M.G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, v.426, p.211-214, 1999.

CALABRESE, E.J. **Multiple Chemical Interactions**. Chelsea, Mi., USA: Lewis Publishers, 1999.

CARTER, S.B. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature*, v. 213, p. 261-264, 1967.

CASTRO, V.L.S.S.; DESTEFANI, C.R.; DINIZ, C.; POLI, P. Evaluation of neurodevelopmental effects on rats exposed prenatally to sulfentrazone. **Neurotoxicology**, v. 28, p. 1249-1259, 2007.

CATALAN, J., AUTIO, K., KUOSMA, E., NORPPA, H. Age-dependent inclusion of sex chromosomes in lymphocyte micronuclei of man. **American Journal of Human Genetics**, v.63, p.1464–1472, 1998.

CATALAN, J., AUTIO, K., WESSMAN, M., LINDHOLM, C., KNUUTILA, S., SORSA, M., NORPPA, H. Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.68, p.11–16, 1995.

CAYMAN CHEMICAL COMPANY, Ann Arbor, MI. 2011, 20p.

CHAO, S.L.; CASIDA, J.E. Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 58, p. 77-88, 1997.

CHAUHAN, L.K.S.; SAXENA, P.N.; GUPTA, S.K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v.42, p.181–189, 1999.

CHEQUER, F.M.D.; ANGELI, J.P.F.; FERRAZ, E.R.A.; TSUBOY, M.S.; MARCARINI, J.C.; MANTOVANI, M.S.; DE OLIVEIRA, D.P. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research**, v. 676, p. 83–86, 2009.

CLAXTON, L.D.; UMBUZEIRO, G.A.; DE MARINI, D.M. The Salmonella Mutagenicity Assay: The Stethoscope of Genetic Toxicology for the 21st Century. **Environmental Health Perspectives**, v.118, p.1515-1522, 2010.

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

CONSTANTIN, M.J.; OWEN, E.T. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assay, A report of US EPA Gene-Tox programme. *Mutation Research*, v. 99, p. 1–12, 1982.

CORREIO AGRÍCOLA – Publicação Janeiro a Dezembro de 2006. Editado pela Bayer CropScience Ltda.

COSTA, C.; SILVARI, V.; MELCHINI, A.; CATANIA, S.; HEFFRON, J.J.; TROVATO, A.; DE PASQUALE, R. Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. **Mutation Research**, v. 672, p. 40–44, 2009.

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

DAS, P.P.; SHAIK, A.P.; JAMIL, K. Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on human peripheral blood lymphocytes. **Toxicology and Industrial Health**, v. 7, p. 449-458, 2007.

DAYAN, F. E.; DUKE, S. O.; WEETE, J. D.; HANCOCK, H. G. Selectivity and mode of action of carfentrazone-ethyl, a novelphenyl triazolinone herbicide. **Pesticide Science**, v. 51, p. 65-73, 1997.

DAYAN, F.E.; ARMSTRONG, B.M.; WEETE, J.D. Inhibitory activity of sulfentrazone and its metabolic derivatives on soybean (*Glycine max*) protoporphyrinogen oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2024-2029, 1998.

DAYAN, F.E.; WEETE, J.D.; HANCOCK, H.G. Physiological Basis for Differential Sensitivity to Sulfentrazone by Sicklepod (*Senna obtusifolia*) and Coffee Senna (*Cassia occidentalis*). **Weed Science**, v. 44, p. 12-17, 1996.

DEMSIA, G.; VLASTOS, D.; GOUMENOU, M.; MATTHOPOULOS, D. P. Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. **Mutation Research**, v. 634, p. 32-39, 2007.

DIANOV, G.L.; TIMCHENKO, T.V.; SINITSINA, O.I.; KUZMINOV, A.V.; MEDVEDEV, O.A.; SALGANIK, R.I. Repair of uracil residues closely spaced on the opposite strands of plasmid DNA results in double strand break and deletion formation. **Molecular and General Genetics**, v. 225, p. 448–452, 1991.

DICK, R.A.; KANNE, D.B.; CASIDA, J.E. Identification of aldehyde oxidase as a neonicotinoid nitroreductase. **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, p. 317-323, 2005.

DOLARA, P.; SALVADORI, M.; CAPOBIANCO, T.; TORRICELLI, F. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes induced by dimethoate, omethoate, deltamethrin, benomyl and their mixture. **Mutation Research**, v. 283, p. 113–118, 1992.

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

EASTMOND, D.A., SCHULER, M., RUPA, D.S. Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. **Mutation Research**, v. 348, p. 153–162, 1995.

ECKERT, I.; STOPPER, H. Genotoxic effects induced by b-oestradiol in vitro. **Toxicology in vitro**, v. 10, p. 637-642, 1996.

EL-SHAHABY, O.A.; ABDEL MIGID, H.M.; SOLIMAN, M.I.; MASHALY, I.A. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 23-28, 2003.

EPA - Environmental Protection Agency, 1997. Disponível em: <<http://www.epa.gov/EPA-PEST/1997/March/Day-10/p5874.htm>>.

EPA, 2003. **Federal Register: Sulfentrazone: Pesticide Tolerances**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2003/September/Day-24/p24011.htm>>.

EPA, 2006. CALIFORNIA EPA DEPARTMENT OF PESTICIDE REGULATION. **Summary of Toxicology data: Sulfentrazone (F2865)**, 2006. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/toxsums/pdfs/5923.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2007.

EPE, B.; HARTTIG, U.H.; STOPPER, H.; METZLER, M. Covalent binding of reactive estrogen metabolites to microtubular protein as a possible mechanism of aneuploidy induction and neoplastic cell transformation. **Environmental Health Perspectives**, v. 88, p. 123-127, 1990.

EVANS, H.J. Neoplasia and cytogenetic abnormalities. In: DELLARCO, V.L.; VOYTEK, P.E.; HOLLAENDER, A. (Ed). **Aneuploidy etiology and mechanisms**. New York: Plenum Press, 1985, p. 165–178.

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

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, v. 600, p. 58–66, 2006.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v.2, p.1084–1104, 2007.

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

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

FENECH, M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. **Health Physics**, v.98, p. 234–243, 2010.

FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65–75, 2003.

FENECH, M.; CROTT, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes: evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research**, v.504, p.131–136, 2002.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALLE, J.; CROTT, J.W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D.; THOMAS, P.

Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 125–132, 2011.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147, p. 29-36, 1985.

FENECH, M.; NEVILLE, S. Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 19, p. 27–36, 1992.

FENSKE, R.A. Pesticide exposure assessment of workers and their families. **Occupational Medicine: State of the Art Reviews**, 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.

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

FMC SQUARE. Praça das plantas daninhas: livre das más companhias. Revista n. 4 de outubro de 2006. Disponível em: <<http://www.fmcagricola.com.br/square/edicao4.php>>. Acesso em 06 abr. 2010.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, v. 22, p. 249– 255, 2002.

GIENI, R.S.; CHAN, G.; HENDZEL, M.J. Epigenetics regulate centromere formation and kinetochore function. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.104, p. 2027–2039, 2008.

GISSELSSON, D. Classification of chromosome segregation errors in cancer. **Chromosoma**, v.117, p. 511–519, 2008.

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. (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas/RS: ULBRA, 2003.

GOPALAN, H.N.B. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, p.99–102, 1999.

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

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

GUENGERICH, F.P. **Mammalian Cytochromes P450**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1987.vol. I e II.

GUERRA, M. Hibridização *in situ*: Princípios básicos. In: GUERRA, M. (Ed.). **FISH - Conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004, 184p.

GUSTAVINO, B.; DEGRASSI, F.; FILIPPONI, R.; MODESTI, D.; TANZARELLA, C.; RIZZONI, M. Mitotic indirect non-disjunction in phytohemaglutinine-stimulated human lymphocytes. **Mutagenesis**, v.9.,p. 17-21, 1994.

GUTTENBACH, M.; SCHMID, M. Exclusion of specific chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures. **Experimental Cell Research**, v.211, p.127-132, 1994.

HAGIWARA, Y.; WATANABE, M.; ODA, Y.; SOFUNI, T.; NOHMI, T. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. **Mutation Research**, v.291, p.171-180, 1993.

HANDE, M.P., BOEI, J.J., NATARAJAN, A.T. Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X-irradiation analysed by fluorescence *in situ* hybridisation. III. Chromosome malsegregation/aneuploidy. **Mutagenesis**, v. 12, p.125-131, 1996.

HANDO, J.C.; NATH, J.; TUCKER, J.D. Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. **Chromosoma**, v.103, p. 186-192, 1994.

HANDO, J.C.; TUCKER, J.D.; DAVENPORT, M.; TEPPERBERG, J.; NATH, J. X chromosome inactivation and micronuclei in normal and Turner individuals. **Human Genetics**, v. 100, p. 624-628, 1997.

HARKÖNEN, K. Pesticides and the induction of aneuploidy in human sperm. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 111, p. 378-383, 2005.

HARTLERODE, A.J.; SCULLY, R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. **Biochemical Journal**, v.423, p.157-168, 2009.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v.18, p. 45-51, 2003.

HASHIMOTO, K.; NAKAJIMA, Y.; MATSUMURA, S.; CHATANI, F. An *in vitro* micronucleus assay with size- classified micronucleus counting to discriminate aneugens from clastogens. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 208-216, 2010.

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, p.125-133, 1998.

HEIT, R.; RATTNER, J.B.; CHAN, G.K.T.; HENDZEL, M.J. G2 histone methylation is required for the proper segregation of chromosomes. **Journal of Cell Science**, v.122, p. 2957–2968, 2009.

HODGSON, E. Induction and inhibition of pesticide-metabolizing enzymes: roles in synergism of pesticides and pesticide action. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 6–11, 1999.

HOFFELDER, D.R.; LUO, L.; BURKE, N.A.; WATKINS, S.C.; GOLLIN, S.M.; SAUNDERS, W.S. Resolution of anaphase bridges in cancer cells. **Chromosoma**, v.112, p.389–397, 2004.

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, p.929-935. 2006.

HOVHANNISYAN, G.G. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Molecular Cytogenetics* 2010, 3:17. Disponível em: < <http://www.molecularcytogenetics.org/content/3/1/17>>. Acesso em 5 nov.2012.

IARMARCOVAI, G.; BOTTA, A.; ORSIÈRE, T. Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. **Toxicology Letters**, v. 166, p. 1–10, 2006.

JANSEN, J.G.; DE GROAT, A.J.L.; VAN TEIJLINGEN, C.M.M.; LOHMAN, P.H.M.; MOHN, G.R.; VRIELING, H.; VAN ZEELAND, A.A. Formation and persistence of DNA adducts in pouch skin fibroblasts and liver tissue of rats exposed in vivo to the monofunctional alkylating agents N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. **Mutation Research**, v.307, p. 95-105, 1994.

JARVIS, A.S.; HOKEYCETT, M.E.; McFARLAND, V.A.; BULICH, A.A.; BOUNDS, H.C. A comparison of the Ames assay and Mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.33, p.193-200, 1996.

JIN, X.; CHEN, Q.; TANG, S-S; ZOU, J-J.; CHEN, K-P.; ZHANG, T.; XIAO, X-L. Investigation of quinocetone-induced genotoxicity in HepG2 cells using the comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and RAPD analysis. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p.1209–1214, 2009.

KARABAY, N.U.; OGUZ, M.G. Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p. 653-662, 2005.

KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). **Chemico-Biological Interactions**, v. 127, p. 163–180, 2000.

KASSIE, F.; PARZEFALL, W.; KNASMÜLLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 463, p. 13–31, 2000.

KASUBA, V.; ROZGAJ R., MILIC, M.; ZELJEZIC, D.; KOPJAR, N.; PIZENT, A.; KLJAKOVIC-GASPIC, Z.; JAZBEC, A. Evaluation of genotoxic effects of lead in pottery-glaze workers using micronucleus assay, alkaline comet assay and DNA diffusion assay. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 85, p. 807–818, 2012.

KEGLEY, S.; HILL, B.; ORME, S. PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America. 2007. Disponível em [http://www.pesticideinfo.org/Detail\\_Chemical.jsp?Rec\\_Id=PC36355#Toxicity](http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC36355#Toxicity). Acesso em 27 nov.2007.

KEY, P.; CHUNG, K.; SIEWICKI, T.; FULTON, M. Toxicity of three pesticides individually and in mixture to larval grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, p. 272-277, 2007.

KIRCHNER, S.; STOPPER, H.; PAPP, T.; ECKERT, I.; YOO, H.J.; VIG, B.K.; SCHIFFMANN, D. Cytogenetic changes in primary, immortalized, and malignant mammalian cells. *Toxicology Letters*, v. 67, p. 283-295, 1993.

KIRKLAND, D.; PFUHLER, S.; TWEATS, D.; AARDEMA, M.; CORVI, R.; DARROUDI, F.; ELHAJOUJI, A.; GLATT, H.; HASTWELL, P.; HAYASHI, M.; KASPER, P.; KIRCHNER, S.; LYNCH, A.; MARZIN, D.; MAURICI, D.; MEUNIER, J.R.; MULLER, L.; NOHYNEK, G.; PARRY, J.; PARRY, E.; THYBAUD, V.; TICE, R.; VAN BENTHEM, J.; VANPARYS, P.; WHITE, P. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. **Mutation Research**, v. 628, p. 31–55, 2007.

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

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

KLEIN, O. [<sup>14</sup>C]-NTN 33893: Biokinetic part of the ‘General metabolism study’ in the rat. Unpublished report from Bayer AG, report No. PF2889, dated 9 November 1987, GLP. Submitted to WHO by Bayer AG, Mannheim, Germany.

KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B.J. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants current state of knowledge. **Toxicology**, v.198, p.315-328, 2004.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v. 402, p. 185–202, 1998.

KNOWLES, B.B.; HOWE, C.C.; ADEN, D.P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins 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.

KUMARI, M.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 5243–5246, 2009.

KWASNY, D.; VEDARETHINAM, I.; SHAH, P.; DIMAKI, M.; SILAHTAROGLU, A.; TUMER, Z.; SVENDSEN, W.E. Advanced microtechnologies for detection of chromosome abnormalities by fluorescent *in situ* hybridization. **Biomedical Microdevices**, v. 14, p. 453–460, 2012.

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

LAMY, E., SCHRÖDER, J., PAULUS, S., BRENK, P., STAHL, T., MERSCH-SUNDERMANN, V. Antigenotoxic properties of *Eruca sativa* (rocket plant), erucin and erysolin in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo(a)pyrene and their mode of action. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46 p. 2415–2421, 2008.

LANKOFF, A.; WOJCIK, A.; FESSARD, V.; MERILUOTO, J. Nodularin-induced genotoxicity following oxidative DNA damage and aneuploidy in HepG2 cells. **Toxicology Letters**, v. 164, p. 239–248, 2006.

LAUGHINGHOUSE IV, H.D.; PRÁ, D.; SILVA-STENICO, M.E.; RIEGER, A.; DAL-SOUTO FRESCURA, V.; FIORE, M.F.; TEDESCO, S.B. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, v. 432, p.180–188, 2012.

LEACH, N.T., JACKSON-COOK, C. The application of spectral karyotyping (SKY) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technology to determine the chromosomal content(s) of micronuclei. **Mutation Research**, v. 495, p.11–19. 2001.

LEACH, N.T.; JACKSON-COOK, C. Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei? **Mutation Research**, v.554, p. 89-94, 2004.

LEE, M.; KWON, J.; CHUNG, M.-K. Enhanced prediction of potential rodent carcinogenicity by utilizing comet assay and apoptotic assay in combination. **Mutation Research**, v. 541, p. 9–19, 2003.

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

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**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LESSA, V., 2012. **Defensivos: Aplicação de agrotóxicos por via área é suspensa e agricultores temem prejuízos**. AgroDebate Notícias. Disponível em: <[http://www.agrodebate.com.br/\\_conteudo/2012/08/noticias/3467-aplicacao-de-agrotoxicos-por-via-area-e-suspensa-e-agricultores-temem-prejuizos.html](http://www.agrodebate.com.br/_conteudo/2012/08/noticias/3467-aplicacao-de-agrotoxicos-por-via-area-e-suspensa-e-agricultores-temem-prejuizos.html)>. Acesso em: 10 out. 2012.

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

LIMAN, R.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium* Test. **Chemosphere**, v. 80, p.1056-1061, 2010.

LUBINI, G.; FACHINETTO, J.M.; LAUGHINGHOUSE IV, H.D.; PARANHOS, J.T.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. **Biologia**, v.63, p. 647-51, 2008.

MA, T.H. Environmental monitoring with *Tradescantia* bioassays for ecosystem protection. In: **Abstracts: International symposium on Ecosystem Health and Medicine, Integrating Science, Policy and Management**. Ottawa, Ontario, Canada, 1994, p. 64.

MA, T.H.; GRANT, W.F.; DE SERRES, F.J. The genotoxicity monitoring of the air, water and soil - a preliminary report of the International Programme on Plant Bioassays (IPPB). **Mutation Research**, v. 379, p. S99, 1997.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v.146, p. 3-15, 1995.

MALLING, H.V. Dimethylnitrosamine: formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes. **Mutation Research**, v. 13, p. 425-429, 1971.

MARKING, L.L. Toxicity of chemical mixtures. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington DC, USA: Hemisphere Publishing, 1985, p.164-176.

MARON, D.M; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v.113, p.173-214, 1983.

MARTINEZ, C.O.; SILVA, C.M.M.S; FAY, E.F.; ABAKERLI, R.B.; MAIA, A.H.N.; DURRANT, L.R. The effects of moisture and temperature on the degradation of sulfentrazone. **Geoderma**, v. 147, p. 56-62, 2008.

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

MATRINGE, M.; MORNET, R.; SCALLA, R. Characterization of [3H]acifluorfen binding to purified pea etioplasts, and evidence that protoporphyrinogen oxidase specifically binds acifluorfen. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 861-868, 1992.

MATSUDA, K.; SHIMONURA, M.; KONDO, Y.; IHARA, M.; HASHIGAMI, K. Role of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in its interaction with the insecticide imidacloprid and related neonicotinoids. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, p. 981-986, 2000.

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, p.399-408, 2004.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTII, 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.

MCCARTY, L.S. BORGERT, C.J. Review of the toxicity of chemical mixtures: Theory, policy, and regulatory practice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.45, p.119-143, 2006.

MCGLYNN, A.P.; WASSON, G.; O'CONNOR, J.; MCKERR, G.; MCKELVEY-MARTIN, V.J.; DOWNES, C.S. The bromodeoxyuridine Comet assay: detection of maturation of recently replicated DNA in individual cells. **Cancer Research**, v 59, p. 5912-5916, 1999.

MCKENNA, D.J.; RAJAB, N.F.; MCKEOWN, S.R.; MCKERR, G.; MCKELVEY-MARTIN, V.J. Use of the Comet-FISH assay to demonstrate repair of the TP53 gene region in two human bladder carcinoma cell lines. **Radiation Research**, v.159, p.49-56, 2003.

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

MLADINIC, M.; ZELJEZIC, D.; SHAPOSHNIKOV, S.A.; COLLINS, A.R. The use of FISH-comet to detect c-Myc and TP 53 damage in extended-term lymphocyte cultures treated with terbuthylazine and carbofuran. **Toxicology Letters**, v. 211, p. 62– 69, 2012.

MOLLER, P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.98, p. 336–345, 2006.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29–60, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxic assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.  
NAJI-ALI, F.; HASSPIELER, B.M.; HAFFNER, D.; ADELI, K. Human Bioassays to Assess Environmental Genotoxicity: Development of a DNA Repair Assay in HepG2 Cells. **Clinical Biochemistry**, v. 27, p. 44-448, 1994.

NASH, R.G. Phytotoxic pesticide interaction in soil. **Agronomy Journal**, v. 59, p. 227-230, 1967.

NATH, J.; TUCKER, J.D.; HANDO, J.C. Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and aging in men. **Chromosoma**, v. 103, p. 725-731, 1995.

NILÜFER, A.; SERAP, C.; SENAY, S.; DILEK, Y.; ÖZELM, Ö. Evaluation of clastogenicity of 4,6-Dinitro-ocresol (DNOC) in *Allium* root tip test. **Journal of Biological and Environmental Science**, v. 2, p. 59–63, 2008.

NORPPA, H.; FALCK, G.C. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, v. 18, p. 221–233, 2003.

O'DONOVAN, P.; LIVINGSTON, D.M. BRCA1 and BRCA2: breast/ ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double strand break repair. **Carcinogenesis**, v.31, p. 961–967, 2010.

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 487: In Vitro mammalian Cell Micronucleus Test (MNvit), 2007.

OLGUN, S.; GOGAL Jr, R.M.; ADESHINA, F.; CHOUDHURY, H.; MISRA, H.P. Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes. **Toxicology**, v. 196, p. 181-195, 2004.

OLIVE, P.L; WLODECK, D.; BABÁTH, J.P. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. **Cancer Research**, v.51, p.4671-4676, 1991.

OLIVEIRA JR, R.S. Mecanismos de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J. (Org.). **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. p. 207-260.

ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. **Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry**. New York; Ed. Plenum Press, 1995.

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

PANDEY, A.K.; GURBANI, D.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D.; AJMANI, S.; DHAWAN, A. *In silico* studies with human DNA topoisomerase-II alpha to unravel the mechanism of *in vitro* genotoxicity of benzene and its metabolites. **Mutation Research**, v. 661, p. 57-70. 2009.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: KLAASSEN, C.D. (Ed.), **Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill, 2001, p. 133-224.

PARRY, E.M., PARRY, J.M., CORSO, C., DOHERTY, A., HADDAD, F., HERMINE, T.F., JOHNSON, G., KAYANI, M., QUICK, E., WARR, T., WILLIAMSON, J. Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals. **Mutagenesis**, v. 17, p.509–521, 2002.

PARRY, J.M., PARRY, E.M., BOURNER, R., DOHERTY, A., ELLARD, S., O'DONOVAN, J., HOEBEE, B., DE STOPPELAAR, J.M., MOHN, G.R., ONFELT, A., RENGLIN, A., SCHULTZ, N., S'ODERPALM-BERNDEN, C., JENSEN, G., KIRSCH-VOLDERS, M., ELHAJOUJI, A., VAN HUMMELEN, P., DEGRASSI, F., ANTOCCIA, A., CIMINI, D., IZZO, M., TANZARELLA, C., ADLER, I.D., KLIESCH, U., SCHRIEVER-SCHWEMMER, G., GASSER, P., CREBELLI, R., CARERE, A., ANDREOLI, C., BENIGNI, R., LEOPARDI, P., MARCON, F., ZINJO, Z., NATARAJAN, A.T., BOEI, J.J.W.A.A., KAPPAS, A., VOUSINAS, G., ZARANI, F.E., PATRINELLI, A., PACHIEROTTI, F., TIVERON, C., HESS, P. The detection and evaluation of aneugenic chemicals. **Mutation Research**, v. 353, p. 11–46, 1996.

PEDEUTOUR, F.; SUIJKERBUIJK, R.F.; FORUS, A.; VAN GRAAL, J.; VAN DE KLUNDERT, W.; COINDRE, J.M.; NICOLO, G.; COLLIN, F.; VAN HAELST, U.; HUFFERMANN, K.; TURC-CAREL, C. Complex composition and co-amplification of SAS and MDM2 in ring and giant rod marker chromosomes in well-differentiated liposarcoma. **Genes Chromosomes cancer**, v.10, p. 85-94, 1994.

PELLESTOR, F., PAULASOVA, P., MACEK, M. AND HAMAMAH, S. The peptide nucleic acids: a new way for chromosomal investigation on isolated cells? **Human Reproduction**, v. 19, p. 1946–1951, 2004.

PEREIRA, J.M.; FERNANDES, P.M.; VELOSO, V.R.S. Efeito fisiológico do inseticida thiamethoxam na cultura da cana-de-açúcar. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v.77, p.159-164, 2010.

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**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 1836-1844, 2005.

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

PHILIPPE, C.; NGUYEN, V.C.; SLIM, R.; HOLVOET-VERMAUT, L.; HORS-CAYLA, M.C.; BERHEIM, A. Rearrangements between irradiated chromosomes in three species radiation hybrid cell lines revealed by two-color in situ hybridization. **Human Genetics**, v. 92, p. 11-17, 1993.

PIRONON, N.; PUECHBERTY, J.; ROIZÈS, G. Molecular and evolutionary characteristics of the fraction of human alpha satellite DNA associated with CENP-A at the centromeres of chromosomes 1, 5, 19, and 21. **BMC Genomics**, v.11, p.195–203, 2010.

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.

PURCHASE, I.F.; LONGSTAFF, E.; ASHBY, J.; STYLES, J.A.; ANDERSON, D.; LEFEVRE, P.A.; WESTWOOD, F.R. Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use. **British Journal of Cancer**, v. 37, p. 873–903, 1978.

RABELO-GAY, M.N.; RODRIGUEZ, M.A.R.; MONTELEONE-NETO, R. Testes com organismos superiores. In: **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, 1991, 75p.

RADIĆ, S.; STIPANIČEV, D.; VUJČIĆ, V.; MARIJANOVIĆ RAJČIĆ, M.; ŠIRAC, S.; PEVALEK-KOZLINA, B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, v. 408, p.1228–1233, 2010.

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.

RAPP, A.; BOCK, C.; DITTMAR, H.; GREULICH, K-O. UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by COMET-FISH depends on gene density and not on the chromosome size. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 56, p. 109–117, 2000.

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

RODRIGUES, B.N; ALMEIDA, F.S. Guia de Herbicidas. 4. ed. Londrina: IAPAR, 1998, 648p.

ROJAS, E.; LOPEZ, M.C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. S. 225–254, 1999.

RUSSELL, L.B.; AARON, C.S.; DE SERRES, F.; GENEROSO, W.M.; KANNAN, K.L.; SHELBY, M.; SPRINGER, J.; VOYTEK, P. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Evaluation of mutagenicity assays for purpose of genetic risk assessment. **Mutation Research**, v. 134, p. 143-58, 1984.

SABALIUNAS, D.; LAZUTKA, J.; SABALIUNIENE, I.; SODERGREN, A. Use of semi-permeable membrane devices for studying effects of organic pollutants: comparison of pesticide uptake by semi-permeable membrane devices and mussels. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, p. 1815–1824, 1998.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; NATARAJAN, A.T. The anticlastogenicity of betacarotene evaluated on human hepatoma cells. **Mutation Research**, v. 303, p.151– 156, 1993.

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. (Eds.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p. 201-223.

- SANDERSON, B.J.S; SHIELD, A.J. Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.335, 1996, p.41-57.
- SANTELLI, G.M.M. Mutagênese e Carcinogênese. In: Oga, S. (Ed.). **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 2003, v. 1, p. 76-88.
- SANTOS, S.J., SINGH, N.P., NATARAJAN, A.T. Fluorescence in situ hybridization with comets. **Experimental Cell Research**, v. 232, p. 407–411, 1997.
- SAWYER, J.R.; SWANSON, C.M.; WHEELER, G.; CUNNIF, C. Chromosome instability in ICF syndrome: formation of micronuclei from multibranching chromosomes demonstrated by fluorescence in situ hybridization. **American Journal of Medical Genetics**, v. 56, p. 203, 209, 1995.
- SAXENA, P.N.; GUPTA, S.K.; MURTHY, R.C. Carbofuran induced cytogenetic effects in root meristem cells of *Allium cepa* and *Allium sativum*: a spectroscopic approach for chromosome damage. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, p. 93–100, 2010.
- SCHIFFMANN, D.; DEBONI, U. Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise. **Mutation Research**, v. 246, p. 113-122, 1991.
- SCHUELER, M.G.; SULLIVAN, B.A. Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v.7, p.301–313, 2006.
- SCHULER, M.; RUPA, D.S.; EASTMOND, D.A. A critical evaluation of centromeric labeling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage in vitro. **Mutation Research**, v. 392, p.81-95, 1997.
- SCHULZ-JANDER, D.A.; CASIDA, J.E. Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. **Toxicology Letters**, v. 132, p. 65-70, 2002.
- SCHULZ-JANDER, D.A.; LEIMKUEHLER, W.M.; CASIDA, J.E. Neonicotinoid insecticides: reduction and cleavage of imidacloprid nitroimine substituent by liver microsomal and cytosolic enzymes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, p. 1158-1165, 2002.
- SCHWARTZ, J.L. Monofunctional alkylating agent-induced S-phase-dependent DNA damage. **Mutation Research**, v. 216, p.111-118, 1989.
- SCHWEIZER, D. Fluorescent chromosome bands in plants: applications, mechanisms and implications for chromosome structure. In: DAVIES, D.R.; HOPWOOD, R.A (Org.). **The Plant Genome: Proceedings of the 4th John Innes Symposium**. Norwich: John Innes Charity, 1980, p. 61-72.

SHAPOSHNIKOV, S., FRENGEN, E., COLLINS, A.R. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization—a review. **Mutagenesis**, v. 24, p.383–389, 2009.

SHEETS, L. Imidacloprid: a neonicotinoid insecticide. In: KRIEGER, R. (Ed.). **Handbook of pesticide toxicology**, 2th ed. New York: Academic Press, 2001a. p. 1-8.

SHEETS, L. Nicotinoids. In: MASSARO, E. (Ed.). **Neurotoxicology handbook**. Totowa (NJ): Humana Press, 2001b. p. 77-85.

SHEETS, L.P. Imidacloprid: A Neonicotinoid Insecticide. In: KRIEGER, R. (Ed.). **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology**, 2010, p. 2055-2064.

SHIMIZU, N.; SHINGAKI, K.; KANEKO-SASAGURI, Y.; HASHIZUME, T.; KANDA, T. When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. **Experimental Cell Research**, v. 302, p. 233–243, 2005.

**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. Disponível em: <[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.

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.

SMITH, A.G.; MARSH, O.; ELDER, G.H. Investigation of the subcellular location of the tetrapyrrole-biosynthesis enzyme coproporphyrinogen oxidase in higher plants. **Biochemical Journal**, v. 292, p. 503–508, 1993.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL (SBMCTA). São Paulo, 2004. UMBUZEIRO, G.A.; I.; VARGAS, V.M.F.; FELZENSZWALB, I.; ENRIQUERS, J.A.P.; VARANDA, E. **Orientações básicas de execução de teste de mutagenicidade para proteção da saúde humana e do meio ambiente. Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium*** (Teste de Ames, Ensaio *Salmonella*/microsoma). (Série de Documentos, 1). Disponível em <<http://www.sbmcta.org.br>>. Acesso em 06 fev. 2012.

SONG, M-K.; KIM, Y-J.; SONG, M.; CHOI, H-S.; PARK, Y-K.; RYU, J-C. Formation of a 3,4-diol-1,2-epoxide metabolite of benz[a]anthracene with cytotoxicity and genotoxicity in a human in vitro hepatocyte culture system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 33, p. 212-225, 2012.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; RODRIGUES, G.S. Agrotóxicos. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 8, 1998.

SPIVAK, G.; COX, R.A.; HANAWALT, P.C. New applications of the Comet assay: Comet-FISH and transcription-coupled DNA repair. **Mutation Research**, v 681, p. 44-50, 2009.

SRIVASTAVA, K.; MISHRA, K.K. Cytogenetic effects 250 of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*, Pestic. **Biochemistry and Physiology**, v. 93, p. 8–12, 2009.

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.

STOPPER, H.; ECKERT I.; SCHIFFMANN, D.; SPENCER, D.L.; CASPARY, W.J. Is micronucleus induction by aneuploids an early event leading to mutagenesis? *Mutagenesis*, v.9, p. 411-416, 1994.

STOPPER, H.; MÜLLER, S.O. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. **Toxicology in vitro**, v.11, p. 661-667, 1997.

SUZUKI, T.; FUJII, M.; AYUSAWA, D. Demethylation of classical satellite 2 and 3 DNA with chromosomal instability in senescent human fibroblasts. *Exp. Gerontol.*, v. 37, p. 1005–1014, 2002.

TEDESCO, S.B.; LAUGHINGHOUSE IV, H.D. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. In: SRIVASTAVA, J.K. (Ed.). **Environmental Contamination**. Rijeka: InTech Publisher; 2012. p. 137–56.

TEIXEIRA, R.O.; CAMPAROTO, M.L.; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E.P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p. 551–5, 2003.

THEODORIDIS, G.; BAUM, J.S.; HOLTZMAN, F.W.; MANFREDI, M.C.; MARAVETZ, L.L.; LYGA, J.W.; TYMONKO, J.M.; WILSON, K.R.; POSS, K.M.; WYLE, M.J. Synthesis and herbicidal properties of aryltriazolinones. A new class of pre- and postemergence herbicides. In: BAKER, D.R.; FENYES, J.G.; STEFFENS, J.J. (Ed.). **Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III**. ACS Symposium Series 504. Washington, DC: American Chemical Society, 1992, p. 135–146.

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

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.

TICE, R.R.; ANDREWS, P.W.; SINGH, N.P. The single cell gel assay. A sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In: SUNTHERLAND, B.M.; WORDHEAD, A.D. (Ed.). **DNA Damage and Repair in Human Tissues**. New York: Plenum, 1990.

TOMIZAWA, M.; LEE, D.L.; CASIDA, J.E. Neonicotinoid insecticides: molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 12, p. 6016-6024, 2000.

TOMIZAWA, M.; ZHANG, N.; DURKIN, K.A.; OLMSTEAD, M.M.; CASIDA, J.E. The neonicotinoid electronegative pharmacophore plays the crucial role in the high affinity and selectivity for the *Drosophila* nicotinic receptor: An anomaly for the nicotinoid cation- $\pi$  interaction model. **Biochemistry**, v. 42, p. 7819-7827, 2003.

TÜRKOGLU, S. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 224–230, 2012.

TUTEJA, N.; AHMAD, P.; PANDA, B.B.; TUTEJA, R. Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. **Reviews in Mutation Research**, v. 681, p. 134-149, 2009.

TUTEJA, N.; SINGH, M.B.; MISRA, M.K.; BHALLA, P.L.; TUTEJA, R. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 337-397, 2001.

TUTEJA, N.; TUTEJA, R. Unravelling DNA repair in human: molecular mechanisms and consequences of repair defect. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 261-290, 2001.

TYLER-SMITH, C.; WILLARD, H.F. Mammalian chromosome structure. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.3, p. 390-397, 1993.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Single cell gel electrophoresis assay with human-derived hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 441, p. 215–224, 1999.

UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003.p.81-112.

UNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 28 nov. 2007.

UNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode=9E97665F-3A81-46F2-BF69-26E00C323988>> Acesso em 13 jan. 2012.

UNO, S., ENDO, K., ISHIDA, Y., TATENNO, C., MAKISHIMA, M., YOSHIZATO, K., NEBERT, D.W. CYP1A1 and CYP1A2 expression: Comparing ‘humanized’ mouse lines and wild-type mice; comparing human and mouse hepatoma-derived cell lines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 237, p. 119–126, 2009.

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.

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, 2007.

VIANNA-MORGANTE, A.M. FISH no estudo dos cromossomos humanos. In: GUERRA, M. (Ed.). FISH - Conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004, 184p.

VICENTINI, V.E.P.; CAMPAROTO, M.L.; TEIXEIRA, R.O.; MANTOVANI, M.S. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, v. 23, p.593–598, 2001

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

VOLLMER, C.M.; RIBAS, A.; BUTTERFIELD, L.H.; DISSETTE, V.B.; ANDREWS, K.J.; EILBER, F.C.; MONTEJO, L.D.; CHEN, A.Y.; HU, B.; GLASPY, J.A.; MCBRIDE, W.H.; ECONOMOU, J.S. p53 selective and nonselective replication of an E1B-deleted adenovirus in hepatocellular carcinoma. **Cancer Research**, v. 59, p.4369–4374, 1999.

WEISBURGER, J. H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. **Mutation Research**, v.437, p.105–112, 1999.

WESTERINK, W.M., STEVENSON, J.C., SCHOONEN, W.G. Pharmacologic profiling of human and rat cytochrome P450 1A1 and 1A2 induction and competition. **Archives of Toxicology**, v. 82, p. 909–921, 2008.

WESTERINK, W.M.; SCHOONEN, W.G. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells, **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1581–1591, 2007a.

WESTERINK, W.M.; SCHOONEN, W.G. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells, **Toxicology in Vitro**, v.21, p.1592–1602, 2007b.

WESTERINK, W.M.A; STEVENSON, J.C.R.; HORBACH, G.J.; SCHOONEN, W.G.E.J. The development of RAD51C, Cystatin A, p53 and Nrf2 luciferase-reporter assays in metabolically competent HepG2 cells for the assessment of mechanism-based genotoxicity and of oxidative stress in the early research phase of drug development. **Mutation Research**, v. 696, p. 21–40, 2010.

WITKOWSKI, D.A.; HALLING, B.P. Inhibition of plant protoporphyrinogen oxidase by the herbicide acifluorfen-methyl. **Plant Physiology**, v. 90, p. 1239–1242, 1989.

XU, G.L.; BESTOR, T.H.; BOURC'HIS, D. HSIEH, C.L.; TOMMERUP, N.; BUGGE, M.; HULTEN, M.; QU, X.; RUSSO, J.J.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. **Nature**, v. 402, p. 187–191, 1999.

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.

YILDIZ, M.; ARIKAN, E.S. Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase–telophase chromosome aberration assay. **Caryologia**, v. 61, p. 45–52, 2008.

YÜZBASIOGLU, D.; ÜNAL, F.; SANCAK, C. Genotoxic effects of herbicide Illoxan (Diclofop- Methyl) on *Allium cepa* L, Turk. **Journal of Biology**, v. 33, p. 283–290, 2009.

ZELJEZIC, D.; MLADINIC, M., 2011. Novel Approaches in Genetic Toxicology of Pesticides by Applying Fluorescent in Situ Hybridization Technique. In: STOYTCHEVA, M. (Ed.). **Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure**. ISBN: 978-953-307-531-0, InTech. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/pesticides-the-impacts-of-pesticides-exposure/novel-approaches-in-genetic-toxicology-of-pesticides-by-applying-fluorescent-in-situ-hybridization-t>>. Acesso em 5 nov.2012.

ZHANG, A.; KAYSER, H.; MAIENFISCH, P.; CASIDA, J.F. Insect acetylcholine receptor: conserved neonicotinoid specificity of (3H) imidacloprid binding site. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, p. 1294-303, 2000.

ZYSS, D.; GERGELY, F. Centrosome function in cancer: guilty or innocent? **Trends in Cell Biology**, v.19, p. 334–346, 2009.