



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA**

Hugo Gama Aguiar Silva

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DOS PESTICIDAS
METOMIL E CIPERMETRINA: EFEITOS AGUDOS
IN VIVO**

Vitória de Santo Antão

2013

Hugo Gama Aguiar Silva

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DOS PESTICIDAS
METOMIL E CIPERMETRINA: EFEITOS AGUDOS
IN VIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Chagas

**Vitória de Santo Antão
2013**

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB-4/1605

G184a Gama, Hugo
Avaliação genotóxica dos pesticidas metomil e cipermetrina: efeitos agudos in vivo / Hugo Gama Aguiar Silva. Vitória de Santo Antão: O autor, 2013.
xii, 26 folhas: fig.; tab.

Orientador: Cristiano Chagas.
Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco. CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2013.

1. Agrotóxicos. 2. Pesticidas. 3. Efeito genotóxico. 4. Efeito mutagênico. I. Chagas, Cristiano. Título.

632.95 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-02/2014



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE - Mestrado Acadêmico



Dissertação de Mestrado apresentada por **Hugo Gama Aguiar Silva** à Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "Avaliação Genotóxica dos Pesticidas Metomil e Cipermetrina: Efeitos agudos in vivo", orientada pelo Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas, aprovada no dia 16 de dezembro de 2013 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr. Cristiano Aparecido Chagas
Núcleo de Biologia - CAV/UFPE

Dr. José Eduardo Garcia
Núcleo de Biologia- CAV/UFPE

Dr.^a Erika Maria Silva Freitas
Núcleo de Biologia- CAV/UFPE

Autor

Hugo Gama Aguiar Silva

Ao meu avô Alcides, eterno "otarinho"

AGRADECIMENTOS

Ao professor Cristiano Chagas pela oportunidade e orientação. Os conhecimentos compartilhados foram de grande importância para meu crescimento acadêmico.

Aos membros do grupo GENOTOX, Alyson, Wanessa, Soraya e Charles, pelo apoio nos experimentos.

Ao corpo docente e funcionários do PPGSHMA.

Aos meus amigos e companheiros de mestrado, Débora, Audenes e Kleber, pelos momentos acadêmicos e de descontração.

A minha família por estarem, sempre, me apoiando e incentivando.

A CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1	1
• Introdução	1
• Objetivos	2
• Objetivo Geral	
• Objetivos Específicos	
1.3 Revisão da Literatura	2
CAPÍTULO 2	6
Análise genotóxica de efeitos agudos dos pesticidas metomil e cipermetrina in vivo	
2.1 Resumo	6
2.2 Abstract	7
2.3 Introdução	8
2.4 Material e métodos	9
2.5 Resultados e Discussão	12
2.6 Conclusões	17
2.7 Referências Bibliográficas	17
CAPÍTULO 3	22
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS	22

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Metomil: Teste de Micronúcleos
- Figura 2 Metomil: Ensaio Cometa
- Figura 3 Cipermetrina: Ensaio Cometa
- Figura 4 Cipermetrina: Teste de Micronúcleos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Grupos e tratamentos

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância (Do inglês “Analysis of Variance ”)
APEVISA	Agência Pernambucana de Vigilância Ambiental
AVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEASA/PE	Central de Abastecimento Alimentar de Pernambuco
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (Do inglês “Ethylenediamine tetra-acetic acid”)
IDA	Ingestão diária aceitável (Do inglês “Acceptable daily intake”)
ITEP	Instituto de Tecnologia de Pernambuco
MN	Micronúcleo
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NOAEL	Nível de Efeito Adverso não Observado em Roedores
TRIS	Tris-hidroximetil-amino-metano

RESUMO

O uso de pesticidas, em plantações, aumenta a cada ano e o Brasil é um dos maiores consumidores destes produtos. Seu uso contribuiu historicamente para a maior produção de alimentos. Porém, a utilização de agrotóxicos tem gerado muitas questões quanto aos seus efeitos na saúde dos consumidores expostos. Dentre os efeitos possíveis, pode-se destacar o genotóxico e mutagênicos. Com isso, há um grande número de pesquisas utilizando testes como o micronúcleo e o ensaio cometa, para quantificar danos causados pelos praguicidas. Nesse contexto, este trabalho apresenta testes para avaliar efeitos genotóxicos e mutagênicos pela ingestão dos pesticidas metomil e cipermetrina. Para isso foi utilizado 80 camundongos (swiss albino), que foram divididos oito grupos com 10 animais por grupo (cinco machos, cinco fêmeas). Os grupos foram classificados em: um controle negativo; um controle positivo e seis grupos tratados. Os grupos tratados receberam a concentração do pesticida baseado na ingestão diária aceitável (IDA) de cada um, sendo escolhidas as concentrações para o metomil (0,005 mg/kg; 0,0005 mg/kg e 0,00025 mg/kg) e para cipermetrina (0,05 mg/kg; 0,005 mg/kg e 0,0025 mg/kg). Todos os grupos tratados receberam, por gavagem, sua dose determinada. O metomil apresentou danos genéticos quando foi avaliado pelo teste de micronúcleo nas doses: 0,005 e 0,0005. Pelo ensaio cometa a dose 0,005 teve efeito genotóxico. A cipermetrina não apresentou danos pelo ensaio cometa, porém com micronúcleo houve diferença significativa em todas as concentrações estudadas. Assim, estes pesticidas isolados mostraram ser mutagênicos, sendo necessário um olhar mais crítico, por parte dos órgãos responsáveis, para controlar, ou proibir, se necessário, o uso destes pesticidas ou uma redefinição da IDA referente a tais praguicidas.

Palavras-Chave: micronúcleo, ensaio cometa, agrotóxico

ABSTRACT

Use of pesticides in plantations, increases every year and Brazil is one of the largest consumers of these products. Its use historically contributed to increase food production. However, the use of pesticides has generated many questions about its effects on the health of consumers exposed. Among the possible effects, we can highlight the genotoxic and mutagenic. Therefore, there is a large number of studies using tests such as the micronucleus and the comet assay to quantify damage caused by pesticides. In this context, this paper presents tests to evaluate genotoxic and mutagenic effects by the ingestion of pesticides methomyl and cypermethrin. For this we used 80 mice (Swiss albino) were divided into eight groups with 10 animals in each group (five male, five female). The groups were classified as one negative control, one positive control and six treated groups. The treated groups received the concentration of the pesticide based on the acceptable daily intake (ADI) of each being chosen concentrations for methomyl (0.005 mg/kg; 0.0005 mg/kg e 0.00025 mg/kg) and cypermethrin (0.05 mg/kg; 0.005 mg/kg e 0.0025 mg/kg). All treated groups ingested, by gavage, a given dose. Methomyl showed genetic damage when evaluated by the micronucleus test at doses 0.005 and 0.0005. By comet assay the dose 0.005 ADI had genotoxic effects. The cypermethrin showed no damage by the comet assay, but with micronucleus showed significant differences at all concentrations studied. Therefore, these isolates pesticides showed to be mutagenic, and needed a more critical look, by the bodies responsible for control or prohibit, if necessary, the use of pesticides or a redefinition of ADI with respect to such pesticides.

Keywords: micronucleus, comet assay, pesticides

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

O mercado consumidor tem exigido que os produtores de hortaliças e frutas aumentem sua produtividade e ofereçam produtos com aparência atraente. Isso pressiona os agricultores a fazerem uso de uma grande variedade de pesticidas em suas lavouras. A Agência Pernambucana de Vigilância Ambiental (APEVISA) divulgou os resultados do último Monitoramento de Resíduos em Agrotóxicos em Hortifrutigranjeiros em Pernambuco, realizado em 2008. O levantamento foi feito considerando os produtos colhidos nos principais supermercados do Estado e na Central de Abastecimento Alimentar de Pernambuco (CEASA/PE). Dos produtos analisados mais de 90% apresentaram substâncias inadequadas para o consumo. Em um projeto de pesquisa realizado pelo grupo genotox, em colaboração com o Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP), foi detectado, em amostras de tomate, pimentão e couve-flor, coletados no município de Vitória de Santo Antão, uma variedade de pesticidas, sendo que alguns estavam acima do limite de resíduos tolerado no município de Vitória de Santo Antão (resultados ainda não publicados). Dentre estes pesticidas foram escolhidos o metomil e a cipermetrina para o estudo apresentado aqui.

Dessa forma, as pessoas são expostas simultaneamente a um grande número de pesticidas através da dieta (JACOBSEN, 2004). Acredita-se que a dieta e fatores dietéticos são responsáveis por um grande número de casos de câncer mundialmente. Estimativas sugerem que a dieta pode contribuir para 40% de todos os cânceres no sexo masculino e, possivelmente, 60% no feminino (WYNDER E GORI, 1977). O desenvolvimento do câncer é um processo complexo, no qual células normais apresentam alterações genéticas e instabilidades cromossômicas, ficando insensíveis aos mecanismos de controle celulares, formando tumores (DYBING et al., 2008). A exposição de um organismo a compostos genotóxicos, como pesticidas, pode provocar danos genéticos, propiciando o desenvolvimento de neoplasias. Desde que evidências de carcinogenicidade em animais de laboratório têm sido tomadas como indicadores de potencial perigo carcinogenético em humanos (IARC, 2006), muita ênfase tem sido dada à interpretação dos achados em animais e à extrapolação desses achados para seres humanos (SONICH-MULLIN et al., 2001; BOOBIS et al., 2008).

Estudos sobre a genotoxicidade de pesticidas em animais revestem-se de grande importância, pois permitem determinar as respostas de um dado organismo à contaminação. Permitem, ainda, avaliar o impacto e o efeito destes sobre células, tecidos e órgãos, bem como inferir sobre possíveis perturbações metabólicas. Além disso, as análises de seus efeitos sobre o material genético são importantes na avaliação de seu papel mutagênico e/ou carcinogênico e ainda seus possíveis efeitos sobre as populações.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Avaliar a ação genotóxica aguda em camundongos, através da ingestão, de formulações comerciais dos praguicidas metomil e cipermetrina, considerando os IDAs de cada pesticida.

1.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a frequência de micronúcleos e danos ao DNA pelo ensaio cometa no sangue periférico de camundongos tratados com formulação comercial de metomil nas concentrações: 0,00025 mg/kg, 0,0005 mg/kg e 0,005 mg/kg.
- Avaliar a frequência de micronúcleos e danos ao DNA pelo ensaio cometa no sangue periférico de camundongos tratados com formulação comercial de cipermetrina nas concentrações: 0,0025 mg/kg, 0,005 mg/kg e 0,05 mg/kg.

1.3. Revisão da Literatura

1.3.1. Histórico

O uso de compostos químicos já é conhecido há mais de 2000 anos, com os romanos para manutenção de estradas. Também durante os anos de 1800, diversos herbicidas foram produzidos a partir de compostos inorgânicos (SOLOMON et al., 2010). Mas o primeiro agrotóxico de largo uso no campo e utilizado mundialmente foi descoberto na França em 1885, por Pierre-Marie Alexis Millardet (1838–1902). Ele descobriu a atividade fungicida do sulfato de cobre, que após ser neutralizado por cal hidratada, poderia ser pulverizado nos parreirais no campo, inibindo o desenvolvimento da doença causada por um fungo que

afetou a economia naquela época (MOURA, 2007). Contudo, em 1939, o mais promissor dos agrotóxicos, conhecido como DDT, foi descoberto pelo suíço Paul Hermann Müller (1889–1965). O DDT possuía alto poder inseticida. À época, acreditava-se que, se usado corretamente, não causaria nenhum mal em humanos nem aos animais domésticos, pois não induzia nenhum sintoma que pudesse ser notado. Esse inseticida foi utilizado largamente na agricultura, nas residências e na saúde pública. Porém, com o tempo, verificou-se que ele possuía um alto poder residual, podendo trazer complicações à saúde e ao ambiente (MOURA, 2007).

Com o tempo o uso dessas substâncias trouxe vários benefícios, como o controle de doenças transmissíveis por vetores, como: malária, febre amarela, doença do sono, tifo e muitas outras, as quais foram responsáveis pela diminuição do tempo de vida da humanidade (SOLOMON et al., 2010).

1.3.2. Pesticidas

Os pesticidas são amplamente definidos como substâncias ou misturas destinados a prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga, incluindo insetos, roedores e ervas daninhas. Eles incluem inseticidas, mas também herbicidas, fungicidas, desinfetantes e reguladores de crescimento. Estes produtos agroquímicos tornaram-se inevitáveis na agricultura intensiva para melhorar a produção e proteger as culturas armazenadas. Embora haja benefícios na utilização de pesticidas à população humana, riscos para a saúde têm sido sugeridos nos seres humanos que são ocupacionalmente e ambientalmente expostos a esses produtos agroquímicos (SIMONIELLO et al., 2008).

Os praguicidas são utilizados para atingir algumas metas: aumentar o rendimento e a qualidade da produção de alimentos na agricultura; proteger a saúde de seres humanos e animais e preservar as florestas. Entretanto, o uso inadequado desses praguicidas está afetando, negativamente, o meio ambiente e a saúde humana (SOLOMON et al., 2010).

Um dos grupos mais afetados de pessoas são os que trabalham diretamente com a aplicação do pesticida, isso tem sido mostrado em diversos estudos (DE ROSS et al, 2005; GARRY et al, 2005; CASTILLO-CADENA et al, 2006; Bull et al, 2006). Os consumidores formam outro importante grupo afetado. O Brasil não possui atualmente um programa nacional de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos, e são escassos os dados de resíduos em alimentos prontos para serem consumidos (CALDAS; SOUZA, 2000), deixando exposta toda sua população.

A IDA (ingestão diária aceitável) é estabelecida após a avaliação de estudos toxicológicos com um dado pesticida, realizados em animais de laboratório e/ou de casos de exposição humana (CALDAS, 1999).

O metomil, cujo nome químico é *S-methyl N-(methylcarbamoyloxy)thioacetimidate*, pertence ao grupo químico metilcarbamato de oxima; trata-se de um inseticida e acaricida, com classificação toxicológica *classe I*. Utilizado, por exemplo, para o cultivo de: algodão, batata, couve, milho e tomate (ANVISA).

A cipermetrina, cujo nome químico é (RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS; 1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl cyclopropane carboxylate, pertence ao grupo químico piretróide; é um inseticida e formicida, com classificação toxicológica *classe II*. É utilizado para cultivo de algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, ervilha, feijão, feijão-vagem, fumo, melancia, milho, pepino, repolho, soja e tomate (ANVISA).

Os piretróides são, atualmente, os inseticidas mais utilizados, pois apresentam baixa toxicidade em mamíferos, baixo impacto ambiental, são efetivos contra um largo espectro de insetos e são necessárias baixas quantidades para exercerem sua ação. Porém, o uso inadequado pode exercer nos vertebrados efeitos neuro e cardiotoxicos (SANTOS et al, 2007).

1.3.3. Genotoxicidade

Agentes genotóxicos interagem com o material genético, formando alterações ou até mesmo quebra das moléculas de DNA das células, o qual pode ser reparado ou não, causando, assim, uma mutação no organismo (OBE et al, 2004). A genotoxicidade está entre os mais sérios dos possíveis danos causados por produtos químicos agrícolas e merece atenção especial devido à natureza geralmente irreversível do processo e ao longo período de latência associado à sua manifestação (NUNES; TAJARA, 1998). O estudo da ação genotóxica de pesticidas representa uma contribuição para uma adequada avaliação clínica e epidemiológica do potencial risco para a saúde associados à sua exposição.

Os métodos utilizados nesse projeto, o teste do micronúcleo e o ensaio cometa são amplamente utilizados e aceitos, porque apresentam resultados confiáveis e mostram eficiência em relação à quantificação da genotoxicidade de diversos compostos em diferentes células (KAWAGUCHI et al., 2010).

O teste de micronúcleos proposto por Schmid (1975) é baseado na contagem de micronúcleos que aparecem no citoplasma de células provenientes de outras que sofreram algum dano, revelando a ação de agentes clastogênicos, que quebram cromossomos, e aneugênicos, que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (RIBEIRO et al., 2003). O teste é bastante utilizado como biomarcador de mutagenicidade por ser um procedimento rápido, simples, de alta sensibilidade e baixo custo (LOHMANN, 1995; CARVALHO *et al.*, 2002).

O ensaio cometa é utilizado como uma ferramenta rápida e sensível para mensuração de danos ao DNA em células individuais. A técnica permite a detecção de diversas lesões ao DNA, tais como quebras simples e duplas da cadeia (SINGH et al., 1988; COLLINS, 2008; ROJAS et al., 1999; BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005). O teste também pode ser aplicado para estudos sobre reparo do DNA (TICE et al, 1995; CHARLES, 2012). Trabalhos utilizando técnicas de micronúcleo e ensaio cometa para determinação de genotoxicidade tem mostrado resultados positivos (CASTILLO-CADENA et al, 2006; COSTA et al, 2006; ERGENE et al, 2007).

Ao procurar na literatura científica referências a respeito dos pesticidas isolados e sua ação genotóxica, não foram encontrados muitos artigos que tenham testado a ação genotóxica de tais substâncias em modelos mamíferos, usando o teste do micronúcleo e o ensaio cometa. Considerando a necessidade de se obter respostas sobre a genotoxicidade dos pesticidas isolados, foram testados os praguicidas metomil e cipermetrina isoladamente em concentrações próximas da IDA, que para o homem é a razão entre o Nível de Efeito Adverso Não Observado em roedores (*NOAEL*) e um fator de segurança de 100 (SOLOMON et al., 2010).

CAPITULO 2

Análise genotóxica de efeitos agudos dos pesticidas metomil e cipermetrina in vivo

Hugo Gama Aguiar Silva ^{a, b}, Cristiano Aparecido Chagas ^{a, b*}

^a Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco- Centro Acadêmico de Vitória, Pernambuco, Brasil.

^b Grupo de pesquisa em Genotoxicidade aplicada à Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco- Centro Acadêmico de Vitória, Pernambuco, Brasil.

2.1 Resumo

O uso de pesticidas, em plantações, aumenta a cada ano e o Brasil é um dos maiores consumidores destes produtos. Seu uso contribuiu historicamente para a maior produção de alimentos. Porém, a utilização de agrotóxicos tem gerado muitas questões quanto aos seus efeitos na saúde dos consumidores expostos. Dentre os efeitos possíveis, pode-se destacar o genotóxico e mutagênicos. Com isso, há um grande número de pesquisas utilizando testes como o micronúcleo e o ensaio cometa, para quantificar danos causados pelos praguicidas. Nesse contexto, este trabalho apresenta testes para avaliar efeitos genotóxicos e mutagênicos pela ingestão dos pesticidas metomil e cipermetrina. Para isso foi utilizado 80 camundongos (swiss albino), que foram divididos oito grupos com 10 animais por grupo (cinco machos, cinco fêmeas). Os grupos foram classificados em: um controle negativo; um controle positivo e seis grupos tratados. Os grupos tratados receberam a concentração do pesticida baseado na ingestão diária aceitável (IDA) de cada um, sendo escolhidas as concentrações para o metomil (0,005 mg/kg; 0,0005 mg/kg e

0,00025 mg/kg) e para cipermetrina (0,05 mg/kg; 0,005 mg/kg e 0,0025 mg/kg). Todos os grupos tratados receberam, por gavagem, sua dose determinada. O metomil apresentou danos genéticos quando foi avaliado pelo teste de micronúcleo nas doses: 0,005 e 0,0005. Pelo ensaio cometa a dose 0,005 teve efeito genotóxico. A cipermetrina não apresentou danos pelo ensaio cometa, porém com micronúcleo houve diferença significativa em todas as concentrações estudadas. Assim, estes pesticidas isolados mostraram ser mutagênicos, sendo necessário um olhar mais crítico, por parte dos órgãos responsáveis, para controlar, ou proibir, se necessário, o uso destes pesticidas ou uma redefinição da IDA referente a tais praguicidas.

Palavras-Chave: micronúcleo, ensaio cometa, agrotóxico

2.2 Abstract

Use of pesticides in plantations, increases every year and Brazil is one of the largest consumers of these products. Its use historically contributed to increase food production. However, the use of pesticides has generated many questions about its effects on the health of consumers exposed. Among the possible effects, we can highlight the genotoxic and mutagenic. Therefore, there is a large number of studies using tests such as the micronucleus and the comet assay to quantify damage caused by pesticides. In this context, this paper presents tests to evaluate genotoxic and mutagenic effects by the ingestion of pesticides methomyl and cypermethrin. For this we used 80 mice (Swiss albino) were divided into eight groups with 10 animals in each group (five male, five female). The groups were classified as one negative control, one positive control and six treated groups. The treated groups received the concentration of the pesticide based on the acceptable daily intake (ADI) of each being chosen concentrations for methomyl (0.005 mg/kg; 0.0005 mg/kg e 0.00025 mg/kg) and cypermethrin (0.05 mg/kg; 0.005 mg/kg e 0.0025 mg/kg). All treated groups ingested, by gavage, a given dose. Methomyl showed genetic damage when evaluated by the micronucleus test at doses 0.005 and 0.0005. By comet assay the dose 0.005 ADI had genotoxic effects. The cypermethrin showed no damage by the comet assay, but with micronucleus showed significant differences at all concentrations studied. Therefore, these isolates pesticides showed to be mutagenic, and needed a more critical look, by the bodies responsible for control or prohibit, if necessary, the use of pesticides or a redefinition of ADI with respect to such pesticides.

Keywords: micronucleus, comet assay, pesticides

2.3 Introdução

O mercado consumidor tem exigido que os produtores de hortaliças e frutas aumentem sua produtividade e ofereçam produtos com aparência atraente o que os forçam a fazer uso de uma grande variedade de pesticidas em suas lavouras. Dessa forma, as pessoas são expostas simultaneamente a um grande número de pesticidas através da dieta. (JACOBSEN, 2004). Tal exposição pode ter reflexos na saúde das pessoas e populações expostas. Acredita-se, por exemplo, que a dieta e fatores dietéticos são responsáveis por um grande número de casos de câncer mundialmente. Estimativas sugerem que a dieta pode contribuir para 40% de todos os cânceres no sexo masculino e, possivelmente, 60% no feminino (WYNDER E GORI, 1977). Estudos recentes, também, mostram a relação entre pesticidas e câncer (XIAOHUI et al., 2009; KUMAR et al., 2010).

Desde que evidências de carcinogenicidade em animais de laboratório têm sido tomadas como indicadores de potencial perigo carcinogénico em humanos (IARC, 2006), muita ênfase tem sido dada à interpretação dos achados em animais e à extrapolação desses achados para seres humanos (SONICH-MULLIN et al., 2001; BOOBIS et al., 2008).

Testes de genotoxicidade e mutagenicidade em roedores são importantes ferramentas na análise de riscos de pessoas e populações. Dentre os testes de genotoxicidade, o ensaio cometa vem sendo utilizado para detecção de danos ao DNA por em vários estudos (ROJAS et al., 1999; BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005; COLLINS, 2008), bem como, também, para identificar reparos ao DNA (TICE, 1995; CHARLES, 2012). Já o teste de micronúcleo em sangue periférico de roedores é uma importante ferramenta bastante utilizada como marcador de mutagênese por conta de ser um procedimento rápido, simples, de alta sensibilidade e baixo custo (LOHMANN, 1995; CARVALHO *et al.*, 2002). É baseado na contagem de micronúcleos que aparecem no citoplasma de células provenientes de outras que sofreram algum dano, revelando a ação de agentes clastogênicos, que quebram cromossomos, e aneugênicos, que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (RIBEIRO et al., 2003).

Aqui é mostrado os resultados do teste de micronúcleo e ensaio cometa feitos com formulação comercial do praguicida metomil (Du Pont – Lannate BR), cujo nome químico é *S-methyl N-(methylcarbamoyloxy)thioacetimidate*, pertence ao grupo químico metilcarbamato de oxima; trata-se de um inseticida e acaricida, com classificação toxicológica *classe I*. Utilizado, por exemplo, para o cultivo de algodão, batata, couve, milho

e tomate (ANVISA). Poucos estudos foram feitos sobre a ação genotóxica do metomil, alguns mostram não apresentar danos (USEPA, 1998; IPCS, 2001).

E também os resultados dos mesmos testes feitos com formulação comercial da cipermetrina (Nufarm – Cyprtrin 250 ce), cujo nome químico é (RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS; 1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl cyclopropane carboxylate, pertence ao grupo químico piretróide; é um inseticida e formicida, com classificação toxicológica classe II. Utilizado para cultivo de algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, ervilha, feijão, feijão-vagem, fumo, melancia, milho, pepino, repolho, soja e tomate (ANVISA). Em vários estudos a cipermetrina apresenta efeitos mutagênicos. Porém são estudos feitos com doses muito elevadas, em comparação a IDA (GIRI et al., 2003; EI-KHATIB et al.2005; UCKAN et al, 2010; ÇELIK et al., 2005) ou são avaliados *in vitro* (SUMAN et al., 2006) ou em invertebrados (MUKHOPADHYAY et al., 2004)

O estudo da ação genotóxica de pesticidas representa uma contribuição para uma adequada avaliação clínica e epidemiológica do potencial risco para a saúde associados à sua exposição. Portanto, pesquisas, ainda mais em países em desenvolvimento são essenciais, pois existem populações rurais com condições socioeconômicas particulares que trabalham com agrotóxicos sem as informações necessárias e conhecimento sobre o risco potencial de exposição ocupacional e a importância do uso de medidas de proteção (SIMONIELLO et al., 2008).

2.4 Material e métodos

Animais

Foram utilizados 80 camundongos (*swiss albino*) de ambos os sexos, com aproximadamente oito semanas de idade e pesando em média de 25 a 30 gramas, Durante os experimentos, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno adequadas, com cinco animais do mesmo sexo por caixa e mantidos em uma sala com ar-condicionado, com temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}$, umidade relativa de $50 \pm 5\%$, com ciclo de 12 horas luz/escuro e com água filtrada e comida oferecida a vontade (*ad libitum*). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Protocolo: 23076.018079/2011-16)

Os animais foram divididos em oito grupos de 10 animais (cinco machos e cinco fêmeas) e cada grupo foi submetido por dois dias aos tratamentos demonstrados na tabela 1. A ingestão diária dos pesticidas foi realizada com o processo de gavagem. Os camundongos dos grupos tratados com pesticida receberam suas respectivas concentrações. Já os camundongos do grupo controle negativo receberam apenas água destilada por gavagem. Os animais do grupo controle positivo, receberam uma dose de ciclofosfamida por via intraperitoneal.

Tabela 1: Grupos e tratamentos

Tratamento	Nº de animais	Tempo de tratamento
Controle negativo ²	10 (5M e 5F)	2 dias
Metomil 0,00025 mg/kg - IDA ³ - 0,02 mg/kg(IPCS, 2001)	10 (5M e 5F)	2 dias
Metomil 0,0005 mg/kg	10 (5M e 5F)	2 dias
Metomil 0,005 mg/kg	10 (5M e 5F)	2 dias
Cipermetrina 0,00025mg/kg - IDA - 0,05 mg/kg (FAO, 2005)	10 (5M e 5F)	2 dias
Cipermetrina 0,0005 mg/kg	10 (5M e 5F)	2 dias
Cipermetrina 0,05 mg/kg	10 (5M e 5F)	2 dias
Controle positivo ⁴	10 (5M e 5F)	2 dias
Controle negativo ²	10 (5M e 5F)	2 dias

1. M: machos; F: fêmeas. 2. Os animais deste grupo passaram por todos os procedimentos dos grupos tratados, mas receberam apenas água na gavagem. 3.IDA: doses diárias aceitáveis segundo *FAO*, *IPCS* e *European Comision*. 4. Os animais deste grupo receberam apenas uma dose de ciclofosfamida (20 mg/kg) e foram sacrificados 24 horas após a administração.

Coleta de sangue

Os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com 0,02mL de xilazina e 0,01mL de ketamina na proporção de 2:1. O sangue periférico foi coletado por punção retro-orbital 24 horas após o tratamento com os pesticidas para o ensaio cometa e após 48 horas do tratamento para teste do micronúcleo. Após a última coleta, os animais foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical.

Ensaio Cometa

O dano genético foi avaliado com o uso do ensaio cometa segundo Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000). O sangue coletado ficou o tempo todo em gelo ou geladeira para evitar reparo do dano genético pelo sistema de reparo do DNA. As lâminas permaneceram na solução de lise (com pH 10, 2,5 M de NaCl, 100 mM de Na₂ EDTA, 10 mM de TRIS, 1% de Triton X-100 e DMSO a 10%) por, no mínimo, 24 horas na geladeira. Depois foram imersos na solução tampão (1M de NaOH e 200 de mM EDTA, pH 13) e submetidos a eletroforese a 33 V (0,82 V/cm) e 300mA em 4 °C por 20 minutos. Ao termino foram colocadas no tampão de neutralização (0,4 M de Tris-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, depois mais 5 minutos em álcool absoluto para desidratação. Logo após foram corados com brometo de etídio na concentração de 79,25µM para análise no microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse 80i).

A contagem foi feita qualificando o tamanho da cauda do cometa, numa numeração de zero a quatro. Sendo o zero a célula sem danos e o quatro com o maior índice de dano genético (COLLINS et al., 2008). A viabilidade celular foi medida em cada lâmina preparada pela proporção de nucleóides altamente danificados (em forma de ouriço) sobre o total de 100 nucleóides contados. Sempre que o número de nucleóides em forma de ouriço for maior do que 20% dos do total de nucleóides, a amostra será descartada (COLLINS et al., 2008).

Análise de Micronúcleo

Para análise do micronúcleo em sangue periférico foi utilizada a técnica descrita por Hayashi e colaboradores (1990). Em lâminas previamente preparadas com laranja de acridina foram colocados 5ul de sangue periférico que foram espalhados cobrindo-se com lamínula.

Quatro lâminas referentes a cada animal foram preparadas e avaliadas. A proporção de eritrócitos policromáticos (PCE) em relação ao total de eritrócitos foi estabelecida da seguinte maneira: $PCE / (PCE + NCE)$, onde NCE significa eritrócitos normocromáticos. Uma comparação entre a proporção de PCEs de cada animal tratado será feita com a do grupo controle. A não ser que a proporção de PCE em um dado animal seja menor do que 20% da proporção de PCEs no grupo controle (caso em que o animal é descartado do estudo), 2000 PCEs foram contados por animal para se quantificar a presença de PCEs micronucleados (PCEMn) (OCDE, 2009). Para análise foi utilizado microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse 80i).

Os métodos utilizados nesse projeto, que são o teste do micronúcleo e do ensaio cometa estão sendo amplamente utilizados e aceitos, por possuírem resultado confiável e mostrar eficiência em relação a quantificação da genotoxicidade de diversos compostos em diferentes células (KAWAGUCHI et al., 2010).

Análise Estatística

Para obtenção dos dados, de ambos os testes, de micronúcleo e ensaio cometa, foi utilizado o ANOVA e como pós-teste o Tukey para comparação dos grupos tratados com o grupo controle com o intervalo de confiança de $p < 0,05$. Foi utilizado o software IBM SPSS Statistics 20.

2.5 Resultados e discussão

Os resultados apresentados aqui demonstram que as formulações comerciais dos praguicidas metomil e cipermetrina apresentam, sob as condições deste estudo, efeito genotóxico e mutagênico mesmo em concentrações abaixo da IDA. O metomil mostrou-se mutagênico nas doses 0,005 mg/kg e 0,0005mg/kg ($p < 0,05$) pelo teste do micronúcleo em sangue periférico de roedores. Na dose 0,00025 mg/kg não houve diferença significativa em relação ao grupo controle negativo, sendo esta a dose mais segura dentre as concentrações estudadas (figura 1). Em relação ao ensaio cometa (figura 2), o metomil apresentou diferença apenas na dose 0,005 ($p < 0,05$). Portanto, nos dois testes utilizados houve danos genéticos causados pela formulação comercial do metomil. Em trabalhos anteriores publicados por agências de controle, o metomil isolado não apresentou efeito genotóxico *in vitro* ou *in vivo* (USEPA, 1998; IPCS, 2001). Em estudos mais recentes tem-se observado o

efeito mutagênico do metomil. Porém, estes danos estão sendo avaliados em testes *in vitro* (GUANGGANG et al., 2013; MANSOUR et al., 2009), em invertebrados (PEREIRA & GONÇALVES, 2007; PEREIRA et al., 2009) ou em concentrações muito elevadas (SHALABY et al., 2010; LI et al., 2008; MAHGOUB & EL-MEDANY, 2001). No entanto, estes resultados mostram que a ingestão, por meio da alimentação, das formulações comerciais do pesticida metomil pode causar efeitos mutagênicos, sendo um dado mais compatível com a realidade de consumo pesticida para humanos.

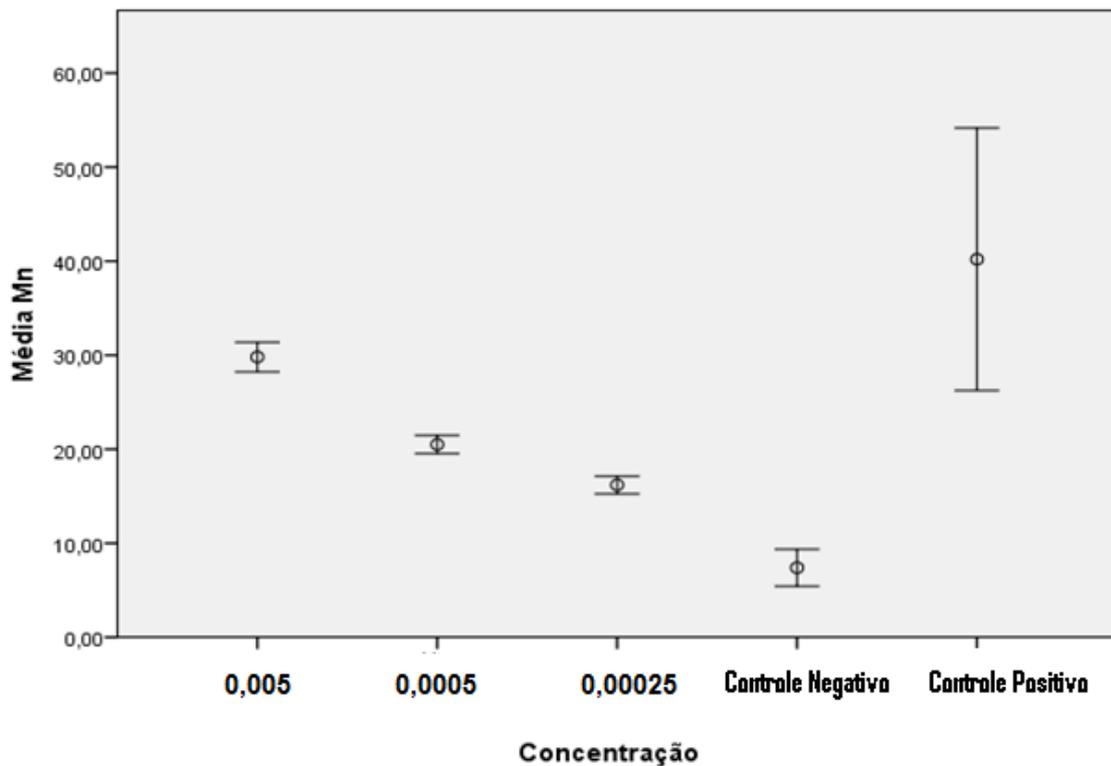


Figura 1. Metomil: Teste de Micronúcleos. Mostra a média de micronúcleo (Mn) em 2000 reticulócitos contados nas diferentes concentrações. A análise estatística (ANOVA) mostrou diferença entre o controle negativo e as concentrações 0,005 e 0,0005 ($p < 0,05$). Não houve diferença entre a concentração 0,00025 com o controle negativo.

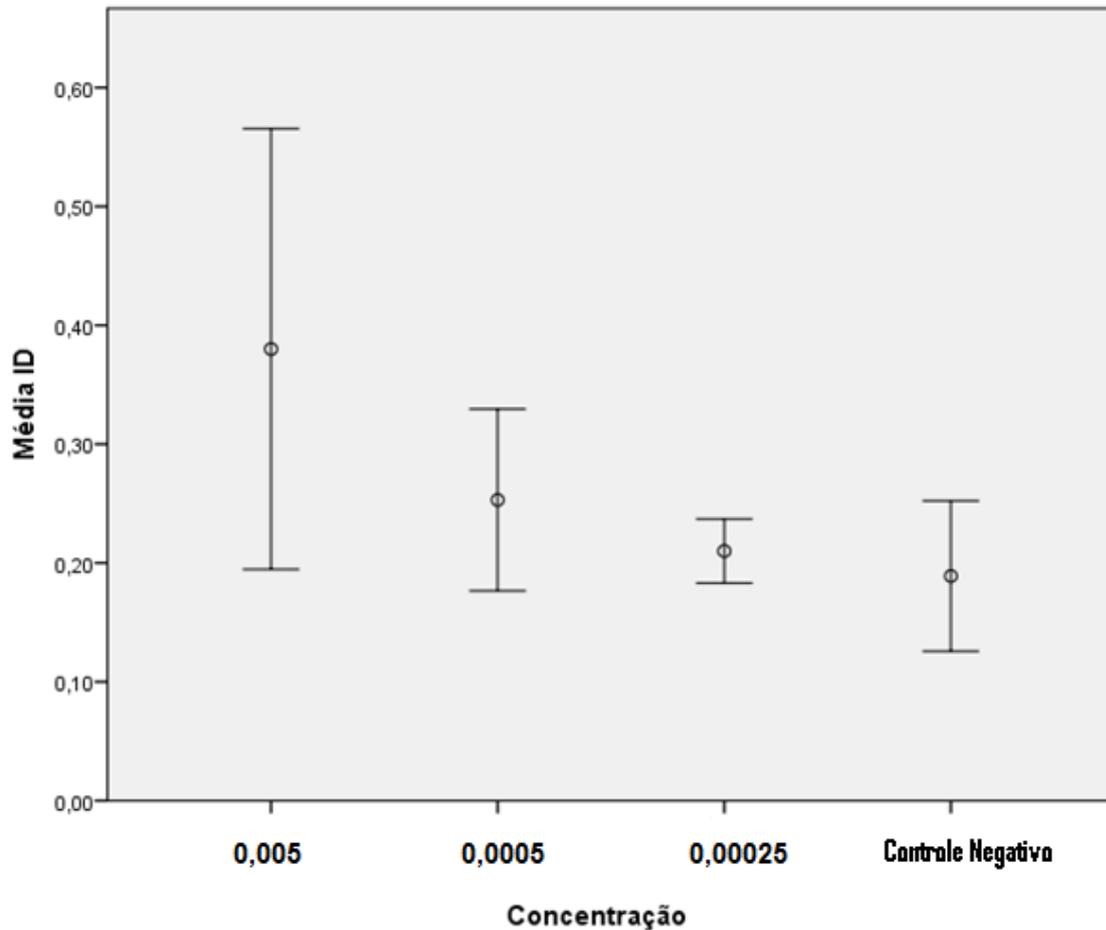


Figura 2. Metomil: Ensaio Cometa. Média. Mostra a média do índice de danos (ID) em 100 nucleoides contados nas diferentes concentrações. Houve diferença apenas entre o grupo controle negativo e 0,005 IDA ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste ANOVA para comparação de médias.

A cipermetrina não apresentou danos genéticos pelo ensaio cometa (figura 3); porém no teste do micronúcleo apresentou mutagênicidade com diferença significativa ($p < 0,05$) em todas as concentrações estudadas quando comparadas ao controle negativo (figura 4). Por ser conhecida como um dos maiores contaminantes de sistemas aquáticos, vários experimentos estão sendo feitos com peixes para estudos genotóxicos (CARRIQUIRIBORDE et al., 2007; SINGH & SINGH, 2008; SAHA & KAVIRAJ, 2009; SIMONIELLO et al., 2009; JIN et al., 2011; KUMAR et al., 2011; POLETTA et al., 2013). Porém, poucos estudos são feitos em modelos mamíferos (JIN et al., 2011; LI et al., 2013) o que é necessário para entender os efeitos em humanos. Os resultados mostraram que a cipermetrina em sua formulação comercial apresentou efeito mutagênico em doses menores que a IDA.

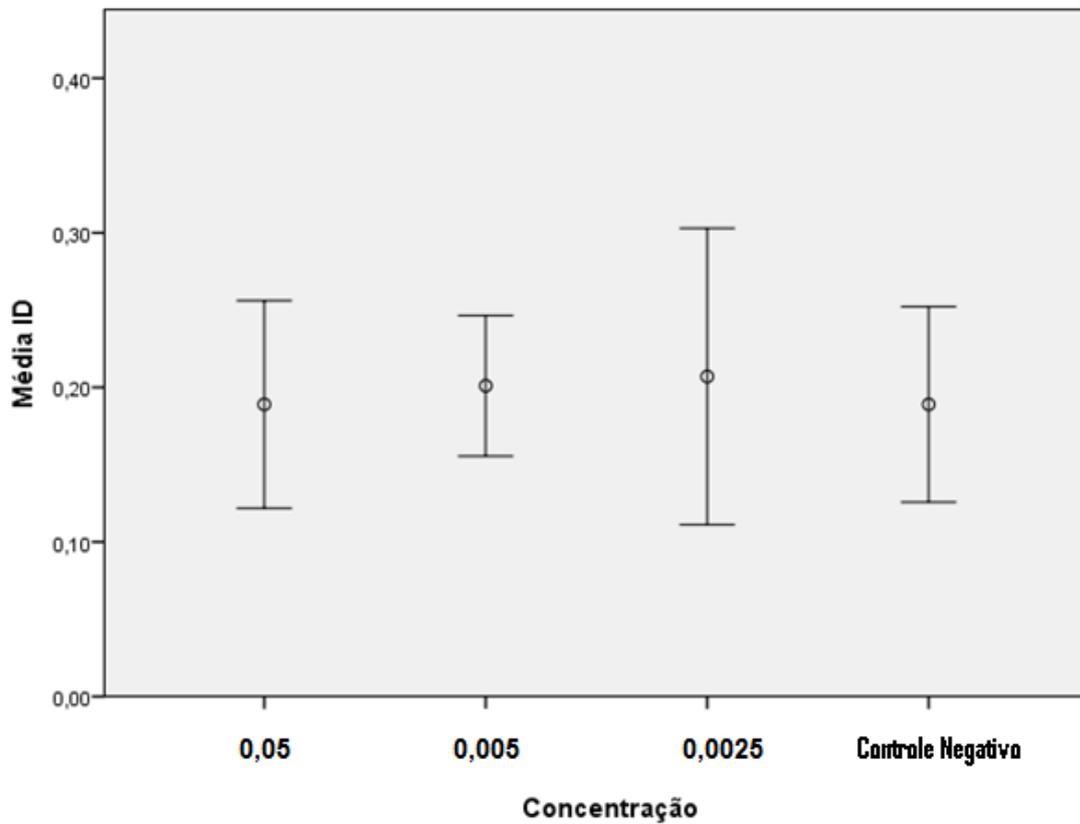


Figura 3. Cipermetrina: Ensaio Cometa. Mostra a média do índice de danos (ID) em 100 nucleoides contados das diferentes concentrações. Não houve diferença significativa entre o controle negativo e nenhuma das concentrações estudadas. Foi utilizado o teste ANOVA para comparação de médias.

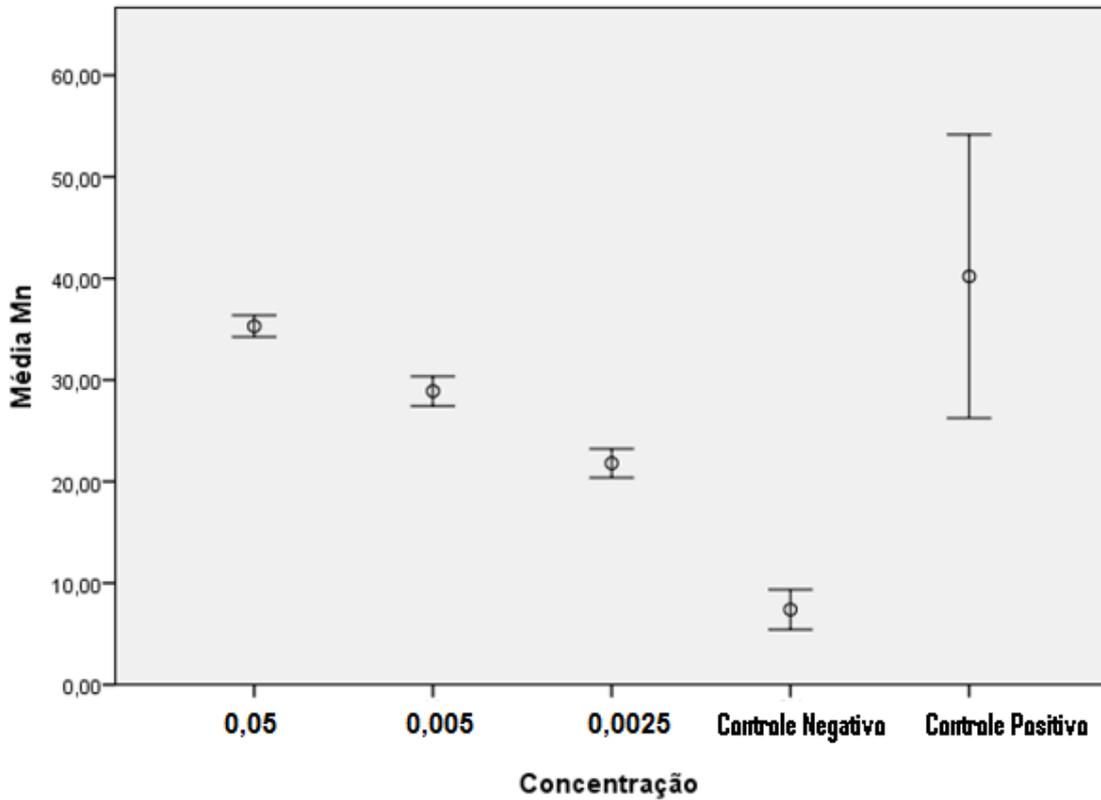


Figura 4. Cipermetrina: Teste de Micronúcleo. Mostra a média de micronúcleos (Mn) em 2000 reticulócitos contados das diferentes concentrações. Houve diferença entre o controle negativo e todas as concentrações estudadas ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste ANOVA para comparação de médias.

A avaliação da indução de micronúcleos é o principal teste *in vivo* em uma bateria de testes genotóxicos tendo um dos resultados mais confiáveis. O mesmo é recomendado pelas agências fiscalizadoras por todo o mundo como parte da avaliação de segurança dos produtos químicos e naturais. O ensaio, quando realizado corretamente, detecta ambos os efeitos: clastogênicos e aneugênicos (KRISHNA E HAYASHI, 2000). Estes danos ao DNA podem ter consequências à longo prazo na saúde dos seres humanos, uma vez que danos estruturais nos cromossomos podem levar a instabilidade genética e, conseqüentemente, ao surgimento de neoplasias ou outras doenças crônicas.

A não detecção de danos ao DNA pelo ensaio cometa pode ser explicada pelo sistema de reparo do organismo. Já que o princípio do teste consiste na detecção de lesões genômicas

(como quebras simples e duplas) que podem resultar em mutações se o sistema de reparo não solucionar o problema (UMBUZEIRO & ROUBICEK et al., 2006).

2.6 Conclusões

Os dados revelaram que ambos os pesticidas são mutagênicos nas doses mais próximas a dose ideal fornecida pelo órgão responsável. O que mostra que é preciso uma revisão nos pesticidas utilizados, bem como suas IDA's, para saber se os mesmos ainda podem continuar no mercado para uso ou reformularem uma dose segura para os consumidores.

2.7 Referências Bibliográficas

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária Retrieved 20 dez 2012, from <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/251109> WHO (World Health Organization). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, Geneva: WHO; 2009

BOOBIS, Alan R. et al. IPCS Framework for Analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. **Critical Reviews In Toxicology**, [s.i.], v. 36, n. 10, p.781-792, 2008.

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

CARRIQUIRIBORDE, Pedro ; Díaz, Juan ; Mugni, Hernán ; Bonetto, Carlos ; Ronco, Alicia E. Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. **Chemosphere**. v.:68(4), p.613 -621, 2007.

ÇELIK, A.; Birgu I Mazmanci; , Yusuf C, amlica; Ali Askin; Uku çomelekoglu. Induction of micronuclei by lambda-cyhalothrin in Wistar rat boné marrow and gut epithelial cells. **Mutagenesis** v. 20 no. 2 pp. 125--129, 2005.

COLLINS, Andrew R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23(3), p.143-151, maio 2008.

EL-KHATIB, E.H. Mona, Abdel-Aziz, Yehia Badr. Nashwah Kamal. In-vivo genotoxicity of the synthetic pyrethroid pesticide "cypermethrin" in rat liver cells by comet assay. **Arab J. Biotech**, v. 8(1), p. 67-82, Jan. 2005.

GIRI, Sarbani, Anirudha Giri; Gouri Dutt Sharma; Surya Bali Prasad. Induction of sister chromatid exchanges by cypermethrin and carbosulfan in bone marrow cells of mice *in vivo*. **Mutagenesis** v.18(1), p.53–58, 2003.

GUANGGANG, Xiang ; Diqui, Li ; Jianzhong, Yuan ; Jingmin, Guan ; Huifeng, Zhai ; Mingan, Shi ; Liming, Tao. Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. **Food and chemical toxicology**. v. 53, p. 352-358, 2013.

HAYASHI, Makoto et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research**, v. 245, p. 245-249, 1990.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). **Toxicological Evaluations: Methomyl (addendum). Pesticides Safety Directorate**, United Kingdom (<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr08.htm>), 2001. Acessado em 06/04/2011.

JACOBSEN, Helene et al. Repeated dose 28-day oral toxicity study in Wistar rats with a mixture of five pesticides often found as residues in food: alphacypermethrin, bromopropylate, carbendazim, chlorpyrifos and mancozeb. **Food And Chemical Toxicology**, [s.i.], v. 42(8), p.1269-1277, 2004.

JIN, Yuanxiang ; Zheng, Shanshan ; Pu, Yue ; Shu, Linjun ; Sun, Liwei ; Liu, Weiping ; Fu, Zhengwei. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, 2011, v..82(3), p.398-404, 2011.

JIN, Yuanxiang ; Wang, Linggang ; Ruan, Meili ; Liu, Jingwen ; Yang, Yuefeng ; Zhou, Cheng ; Xu, Bin ; Fu, Zhengwei. Cypermethrin exposure during puberty induces oxidative stress and endocrine disruption in male mice. **Chemosphere**. v. 84(1), p.124-130, 2011.

KRISHNA, Gopala; HAYASHI, Makoto. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research / Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, [s.i.], v. 455, n. 1-2, p.155-166, 2000.

KUMAR, Amit; Sharma, Bechan ; Pandey, Ravi S. Cypermethrin induced alterations in nitrogen metabolism in freshwater fishes. **Chemosphere**, v..83(4), p.492-501, 2011.

KUMAR, Vivek; Yadav, Chandra Shekhar; Singh, Satyender; Goel, Sanjav; Ahmed, Rafat Sultana; Gupta, Sanjay; Grover, Rajesh Kumar; Banerjee, Basudev. CYP 1A1 polymorphism and organochlorine pesticides levels in the etiology of prostate cancer. **Chemosphere**. v. 81(4), p. 464-468, 2010.

LI, Huixian ; Jiang, Hui ; Gao, Xiwu ; Wang, Xiaojun ; Qu, Weigang ; Lin, Ronghua ; Chen, Jiao. Acute toxicity of the pesticide methomyl on the topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*): mortality and effects on four biomarkers. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 34(3), p. 209-216, 2008.

LI, Yan Fang ; Pan, Chen ; Hu, Jin Xia ; Li, Jing ; Xu, Li Chun. Effects of cypermethrin on male reproductive system in adult rats. **Biomedical and environmental sciences**. v. 26(3), p.201-8, 2013.

LOHMANN, T.H.O. **Análise da radiosensibilidade de linfócitos periféricos de pacientes com câncer de pele e de indivíduos sadios por meio do método do micronúcleo**. São Paulo – SP, 1995, 83p. Dissertação de Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo.

MAHGOUB, Afaf A.; EL-MEDANY, Azza H. Evaluation of Chronic Exposure of the Male Rat Reproductive System to the Insecticide Methomyl. **Pharmacological research**. v. 44(2), p. 73-80, 2001.

MANSOUR, Sameeh A; Mossa, Abdel-tawab H ; Heikal, Tarek M. Effects of methomyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: In vitro studies. **Toxicology and Industrial Health**. v. 25, p. 557-563, 2009.

MUKHOPADHYAY, I; D.Kar Chowdhuri; Mahima Bajpayee; Alok Dhawan. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay **Mutagenesis** v. 19(2), p. 85-90, 2004.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects: Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, França, 2009. Acessado em 7 de agosto de 2011.

PEREIRA, Joana Luísa; GONÇALVES, Fernando. Effects of food availability on the acute and chronic toxicity of the insecticide methomyl to *Daphnia* spp. **Science of the Total Environment**. v.386(1), p.9-20, 2007.

PEREIRA, Joana ; Antunes, Sara ; Castro, Bruno ; Marques, Catarina ; Gonçalves, Ana ; Gonçalves, Fernando ; Pereira, Ruth. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. **Ecotoxicology**. v. 18(4), p. 455-463, 2009.

POLETTA, G.I; Gigena, F.; Loteste, A.; Parma, M.J.; Kleinsorge, E.C.; Simoniello, M.F. Comet assay in Gill cells of *Prochilodus lineatus* exposed in vivo. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 107, p.385-390, 2013.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. 1. ed. Canoas: ULBRA, 2003.

ROJAS, E., LOPEZ, MC. VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 722, no. 1-2, p. 225-254, 1999.

SAHA, Suchismita; KAVIRAJ, Anilava. Effects of cypermethrin on some biochemical parameters and its amelioration through dietary supplementation of ascorbic acid in freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. **Chemosphere**, v. 74(9), p.1254-1259, 2009.

SHALABY, M A; EL ZORBA, H Y; Ziada, Reem M. Reproductive toxicity of methomyl insecticide in male rats and protective effect of folic acid. **Food and chemical toxicology**. v. 48, p. 3221-3228, 2010.

SIMONIELLO, M. F. et al. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. **Journal Application Toxicology**, v.28, p.957–965, 2008.

SIMONIELLO, M. ; Gigena, F. ; Poletta, G. ; Loteste, A. ; Kleinsorge, E. ; Campana, M. ; Scagnetti, J. ; Parma, M. Alkaline Comet Assay for Genotoxic Effect Detection in Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 83(2), p. 155-158, 2009.

SINGH, Narendra P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, [s.i.], v. 175, p.184-191, 1988.

SINGH , Pratap B. ; SINGH, Vandana. Cypermethrin induced histological changes in gonadotrophic cells, liver, gonads, plasma levels of estradiol-17 β and 11-ketotestosterone,

and sperm motility in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Chemosphere**. v. 72(3), p.422-431, 2008.

SONICH-MULLIN, C. IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.i.], v. 34, p.146-152, 2001.

SUMAN, G. R. N; JAMIL, K. *In vitro* cytogenetic of cypermetrin on human lymphocytes. *Indian Journal of Experimental Biology*. v. 44, p. 233-239. 2006.

TICE, R. R. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, [s.i.], v. 35(3), p.206-221, 2000.

Tice, R.R. Butterworth, B.E., Corkum, L.D. and Guzmán-Rincón. Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. **Plenum Press**, New York, p. 69-79. 1995

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A. Genotoxicidade Ambiental. in: ZAGATTO,P.A.;BERTOLETTI. **EcotoxicologiaAquática: princípios e aplicações**, São Carlos:RiMa, cap.14, p.327-346, 2006.

UCKAN F, Sak O. Cytotoxic Effect of Cypermethrin on *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) Larval Hemocytes. **Ekoloji** v. 19, p. 20-26, 2010.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Methomyl: Reregistration Eligibility Decision (RED) (<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0028red.pdf>), 1998. Acessado em 12/08/2013.

WYNDER, E.L.; GORI, G.B. Contribution of the environment to cancer incidence:an epidemiologic exercise. **J. Natl. Cancer Inst.**, [s.i.], v. 48, p. 825–832, 1977.

XIAOHUI Xu; Amy B. Dailey; Evelyn O. Talbott; Vito A. Ilacqua; Greg Kearney; Nabih R. Asal. Associations of serum concentrations of organochloride pesticides with breast cancer and prostate cancer in U.S. adults. **Environ Health Perspect**. v. 118, p. 60-66, 2009.

CAPITULO 3

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A avaliação dos danos genéticos causados pelo metomil e cipermetrina demonstrou uma diferença significativa quando comparados ao grupo controle. A exposição a estes pesticidas via ingestão oral nos camundongos, nas concentrações estudadas mostrou ter capacidade mutagênica. Esses efeitos em longo prazo podem vir a causar diversos distúrbios endócrino, nervoso, imunológico e reprodutivo (PRESTON, 2003). E também associados ao risco de câncer (ALBERTINI et al., 2000; FAUST et al., 2004).

É preciso uma fiscalização mais eficaz quanto ao uso de pesticidas no Brasil. O órgão responsável pela liberação destes produtos é ANVISA e a mesma precisa ser mais crítica em relação aos testes utilizados para a comercialização dos mesmos. A maioria dos testes é feita considerando o composto isolado, porém ao chegar para o cidadão a fórmula comercial possui outros compostos. Os resultados mostraram que estas formulações apresentam efeito mutagênico, sendo necessária uma revisão de seu uso ou de sua IDA.

REFERÊNCIAS

ALBERTINI, RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **Mutat. Res.** v. 463, p. 111–172, 2000.

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária Retrieved 20 dez 2012, from <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/251109> WHO (World Health Organization). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, Geneva: WHO; 2009

BOOBIS, Alan R. et al. IPCS Framework for Analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. **Critical Reviews In Toxicology**, [s.i.], v. 36(10), p.781-792, 2008.

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

BULL, S. et al. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. **Mutagenesis**, v. 21(2), p. 93-106, março 2006.

CALDAS, Eloisa Dutra. Resíduos de pesticidas em alimentos e o Codex Alimentarius. **Bol SBCTA**, v. 6, p. 33-50, 1999.

CALDAS, Eloisa Dutra; SOUZA, Luiz César Kenupp R de. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, [s. L.], v. 34(5), p.529-537, out. 2000.

CASTILLO-CADENA, J. et al. Determination of DNA damage in floriculturists exposed to mixtures of pesticides. **Journal Of Biomedicine And Biotechnology**, [s.i.], v. 2006, p.1-12, 2006.

CHARLES, C. ; Chemais, M. ; Stévigny, C. ; Dubois, J. ; Nachergael, A. ; Duez, P. Measurement of the influence of flavonoids on DNA repair kinetics using the comet assay. **Food Chemistry**, v.135(4), p.2974-2981, 15 December 2012.

COLLINS, Andrew R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23(3), p.143-151, maio 2008.

COSTA, Carla et al. Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. **Oxford Journal**, [s.i.], v. 21(5), p.343-350, 2006.

DE ROOS, Anneclaire J. et al. Cancer Incidence among Glyphosate-Exposed Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. **Environmental Health Perspectives**, v.113, p. 49-54, janeiro 2005.

DYBING, Erik et al. Risk assessment of dietary exposures to compounds that are genotoxic and carcinogenic ? An overview. **Toxicology Letters**, [s.i.], v. 180(2), p.110-117, 2008.

DUESBERG, Peter et al. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.i.], v. 95(23), p.13692-13697, 1998.

ERGENE, Serap et al. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. **Environmental International**, [s.i.], v. 33(7), p.877-885, 2007.

FAUST F, Kassie F, Knasmüller S, Kevekordes S, Mersch-Sundermann V. Use of primary blood cells for the assessment of exposure to occupational genotoxicants in human biomonitoring studies. **Toxicology**. v.198, p. 341–350, 2004.

HAYASHI, Makoto et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research**, v. 245, p. 245-249, 1990.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). **Toxicological Evaluations: Methomyl (addendum). Pesticides Safety Directorate**, United Kingdom (<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr08.htm>), 2001. Acessado em 06/04/2011.

JACOBSEN, Helene et al. Repeated dose 28-day oral toxicity study in Wistar rats with a mixture of five pesticides often found as residues in food: alphacypermethrin, bromopropylate, carbendazim, chlorpyrifos and mancozeb. **Food And Chemical Toxicology**, [s.i.], v. 42(8), p.1269-1277, 2004.

KATARÍNA, Šiviková et al. Evaluation of cytogenetic effects on bovine peripheral lymphocytes after the treatment with tebuconazole. **Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.**, Cairo, Egito, v..2 , p.1-4, 29 maio 2010.

KAWAGUCHI, Satomi et al. Is the Comet Assay a Sensitive Procedure for Detecting Genotoxicity? **Journal Of Nucleic Acids**, [s. L.], p. 1-8. 4 out. 2010.

KRISHNA, Gopala; HAYASHI, Makoto. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research / Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, [s.i.], v. 455, p.155-166, 2000.

LOHMANN, T.H.O. **Análise da radiosensibilidade de linfócitos periféricos de pacientes com câncer de pele e de indivíduos sadios por meio do método do micronúcleo**. São Paulo – SP, 1995, 83p. Dissertação de Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo.

MOURA, R.M. Agrotóxicos: Heróis ou Vilões? A face da questão que todos devem saber. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v.4, p.23-49, 2007.

NUNES, Mônica Vannucci; TAJARA, Eloiza Helena. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Revista de Saúde Pública**, [s. L.], v. 32(4), p.372-383, jun. 1998.

OBE, G. et al. Chromosomal Aberrations: Formation, Identification and Distribution. **Mutation Research**, v. 504(5), p. 17-36, 2004.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects: Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, França, 2009. Acessado em 7 de agosto de 2011.

PRETON J. Molecular epidemiology: potential impacts on the assessment of public health. **Mutation Research**. v. 543, p. 121–124, 2003.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. 1. ed. Canoas: ULBRA, 2003.

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

SANTOS, MAT, AREAS MA, REYS, FG. Piretróides – Uma visão geral. **Alim. Nutr.** v.18(3), p. 339-349, jul./set. 2007.

SIMONIELLO, M. F. et al. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. **Journal Application Toxicology**, v.28, p.957–965, 2008.

SINGH, Narendra P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, [s.i.], v. 175, p.184-191, 1988.

Solomon KR, Stepheson GR, Corrêa CL, Zambrone FAD. 2010. Praguicidas e o Meio Ambiente. First edition. Brazil: ILSL.

SONICH-MULLIN, C. IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.i.], v. 34, p.146-152, 2001.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, [s.i.], v. 35(3), p.206-221, 2000.

TICE, R.R. Butterworth, B.E., Corkum, L.D. and Guzmán-Rincón. Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. **Plenum Press**, New York, p. 69-79. 1995

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Methomyl: Reregistration Eligibility Decision (RED) (<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0028red.pdf>), 1998. Acessado em 12/08/2013.

WHO (World Health Organization). **The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification**, Geneva: WHO; 2009

WYNDER, E.L.; GORI, G.B. Contribution of the environment to cancer incidence:an epidemiologic exercise. **J. Natl. Cancer Inst.**, [s.i.], v. 48, p. 825–832, 1977.