



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA**

Talita Giselly dos Santos Souza

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA *IN VIVO* DOS EFEITOS
AGUDOS DA MISTURA DOS PRAGUICIDAS
METOMIL E CIPERMETRINA**

Vitória de Santo Antão

2016

Talita Giselly dos Santos Souza

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA *IN VIVO* DOS EFEITOS
AGUDOS DA MISTURA DOS PRAGUICIDAS
METOMIL E CIPERMETRINA**

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 Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas

**Vitória de Santo Antão
2016**

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Lúcia Feliciano dos Santos, CRB4: 2005

S719a Souza, Talita Giselly dos Santos.

Avaliação genotóxica *in vivo* dos efeitos agudos da mistura dos praguicidas metomil e cipermetrina./ Talita Giselly dos Santos Souza. - Vitória de Santo Antão, 2016.

xv, 72 folhas: il.; tab., fig.

Orientador: Cristiano Aparecido Chagas.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Agroquímicos. 2. Saúde pública. 3. Genotoxicidade. I. Chagas, Cristiano Aparecido (Orientador). II. Título.

363.1792 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-116/2016



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 **Talita Giselly dos Santos Souza** ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA *IN VIVO* DOS EFEITOS AGUDOS DA MISTURA DOS PRAGUICIDAS METOMIL E CIPERMETRINA**", orientada pelo Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas, aprovada no dia 04 de março de 2016 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

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

Dr.^a Ana Cristina Lauer Garcia
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

Dr.^a Claudia Rohde
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

Autora

Talita Giselly dos Santos Souza

Dedico este trabalho aos meus queridos e amados
avós (*in memoriam*), que sempre me serviram de
inspiração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre esteve ao meu lado, me concedeu força e sabedoria para chegar até aqui. Por ter sido meu refúgio nos momentos difíceis e o caminho correto nas incertezas. A Ele devo tudo que sou.

Aos meus pais, Ednaldo e Jedisíia, e ao meu irmão Saulo, pelo apoio, por estarem sempre presentes, me aconselharem, e, principalmente, me aguentarem nos momentos de ansiedade, cansaço e tensão.

A Diógenis Moura, por me ajudar sempre nas situações mais difíceis, pela motivação, por amenizar meu cansaço, transformar minha fraqueza em força, o medo no sonho, à incerteza na certeza. Por me ouvir nos momentos de aflição, segurar na minha mão e mostrar que juntos somos mais fortes e chegamos mais longe.

Ao meu orientador, Dr. Cristiano Chagas, por ter confiado em mim, por estar sempre presente, pela paciência, dedicação, conselhos, acessibilidade e ajuda. Que não me orientou apenas com os seus conhecimentos científicos, mas, também, mesmo sem perceber, me ensinou que a sabedoria, a competência e o conhecimento é resultância da humildade. Tornou-se um exemplo profissional e para a vida.

Aos meus tios, primos, avós (*in memoriam*), todos os familiares que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

A professora Dr^a Erika Freitas, que esteve comigo nos primeiros passos dentro do meio acadêmico, me deu as primeiras orientações, conselhos, direcionamento, sempre com muita paciência, dedicação e afabilidade.

A Elisângela Silva e Sídnei Dias, que inicialmente me ensinaram todos os conhecimentos técnicos que desenvolvi durante o mestrado. A contribuição de vocês foi de suma importância para que nesses dois anos eu tivesse mais autonomia e confiança ao realizar minha pesquisa.

Aos meus amigos, em especial Cícero Verçosa, Ilaniu Nunes e Lucas Gabriel, que me proporcionaram momentos de descontração, me ouviram, aconselharam e me deram forças em situações difíceis.

Aos amigos de laboratório e membros do grupo GENOTOX, Sarana, Danielle, Alexandre, Tamires, Nando e André, que estiveram ao meu lado durante os procedimentos experimentais, me deram todo o suporte e compartilharam conhecimentos. Pela amizade fora do laboratório.

Aos técnicos de laboratório, em especial Rafael Albuquerque, que sempre esteve disposto a me ajudar e ensinar.

Aos amigos de mestrado da turma 2014.1 e aos demais profissionais que fazem parte do PPGSHMA, em especial aos professores que contribuíram para minha formação profissional.

A UFPE/CAV por toda a infraestrutura e recursos que auxiliaram no desenvolvimento da pesquisa.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer aos camundongos que fizeram parte do todo procedimento experimental e contribuíram para ciência.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
CAPÍTULO 1	16
1.1 Introdução	16
1.2 Objetivos	18
1.2.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
1.3 Revisão da Literatura	18
1.3.1 Histórico do uso de agrotóxicos no Brasil.....	18
1.3.2 Classificação e aspectos legais dos agrotóxicos.....	22
1.3.3 Agrotóxicos estudados	25
1.3.3.1 Cipermetrina	25
1.3.3.2 Metomil.....	27
1.3.4 Impacto dos agrotóxicos na saúde humana.....	30
1.3.5 Bioensaios utilizados na identificação de danos no DNA.....	34
1.3.5.1 Ensaio cometa ou eletroforese de gel em célula única	35
1.3.5.2 Teste de micronúcleo	37
2 CAPÍTULO 2	41
AVALIAÇÃO GENOTÓXICA <i>IN VIVO</i> DOS EFEITOS AGUDOS DA MISTURA DOS PRAGUICIDAS METOMIL E CIPERMETRINA	41
Resumo	42
Abstract.....	43
Introdução.....	44
Materiais e métodos	45
Animais	45

Grupos experimentais	45
Coleta de material biológico.....	46
Ensaio Cometa	46
Teste do Micronúcleo	47
Análise Estatística.....	48
Resultados e discussão	48
Conclusão	50
3 CONCLUSÃO GERAL.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Uso m larga escala do DDT na população a fim de combater vetores que causavam doenças prejudiciais à saúde. Figura adaptada retirada da internet: http://goo.gl/0jdw8F .	20
Figura 1.2	Pesquisadora Rachel Carson (à esquerda), que em 1962 publicou o livro Primavera Silenciosa (à direita). Este livro denunciou os impactos do uso intensivo do DDT no ecossistema. Figura retirada da internet: http://goo.gl/9mf8Ge	20
Figura 1.3	Classificação toxicológica dos rótulos. Figura adaptada retirada de ALMEIDA, 2009	24
Figura 1.4	Processo de bioacumulação e biomagnificação de agrotóxicos. Figura adaptada retirada da internet: http://goo.gl/DIPE5d	30
Figura 1.5	Classificação visual dos danos nos nucleóides de acordo com a quantidade e tamanho de fragmentos de DNA no arrastro. Dano 0 (sem dano); 1 (pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo).	35
Figura 1.6	Processo de formação de micronúcleo por meio dos efeitos clastogênicos e aneugênico durante a divisão celular. Figura adaptada retirada da internet: http://goo.gl/fq0t4U	36
Figura 1.7	Eritrócitos Normocromáticos corados em verdes; Eritrócitos Policromáticos corados em vermelho; Eritrócito Policromático com Micronúcleo apontado pela seta vermelha.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Características dos agrotóxicos Cipermetrina e Metomil	28
Tabela 1.2	Principais efeitos agudos e crônicos causados pela exposição aos agrotóxicos, de acordo com a praga que controlam e o grupo químico a que pertencem.	31
Tabela 2.1	Resultados dos testes de micronúcleo e ensaio cometa	46

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Do alfabeto grego -Alfa
g	Grama
Kg	Quilograma
mA	Miliampere
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
V	Volt
mM	Milimol
$^{\circ}$ C	Grau(s) Celsius

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BOBEA	Colégio Brasileiro para Experimentação Animal
BPA	Boas Práticas Agrícolas
CEUA-UFPE	Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco
Cp	Cipermetrina ($C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$)
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DI 50	Dose Letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Ensaio Cometa (Do ingles: <i>Comet Assay</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético- Do inglês — <i>Ethylenediamine TetraAcetic Acid</i>
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura (Do ingles: <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDA	Índice Diário Aceitável
LM	Baixo Ponto de Fusão- Do inglês- <i>Low Melting Point</i>
LMR	Limite Máximo de Resíduo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MN	Teste de Micronúcleo (Do ingles: <i>Micronucleus test</i>)
Mt	Metomil ($C_5H_{10}N_2O_2S$)
NCE	Eritrócitos normocromáticos
OCDE	Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económico
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PCE	Eritrócitos policromáticos
PCEMn	Eritrócitos policromáticos micronucleados
pH	Potencial de Hidrogênio iônico
PND	Plano Nacional de Desenvolvimento
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
TRIS	Tris-hidroximetil-amino-metano

RESUMO

Os agrotóxicos foram utilizados primeiramente na saúde pública, a fim de combater vetores que causam doenças. Posteriormente seu uso tornou-se intensivo na agricultura, com intenção de melhorar a produção e a aparência dos produtos. Atualmente o Brasil é o maior consumidor de defensivos agrícolas do mundo, e isto é um fato preocupante, visto que a exposição a esses agentes tóxicos pode trazer sérios riscos à saúde humana e meio ambiente. A Cipermetrina (Cp) e Metomil (Mt) são agrotóxicos largamente utilizados na agricultura brasileira. Conquanto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tenha estabelecido a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de ambos isoladamente, é sabido que o consumidor está exposto a misturas de praguicidas por meio de sua dieta. No entanto, a maioria das pesquisas estudam os efeitos dos agrotóxicos isoladamente, sendo limitado o número de trabalhos que analisam as combinações desses compostos. Diante disso, avaliamos o potencial genotóxico, pelo ensaio cometa, e mutagênico, pelo teste do micronúcleo, de misturas de formulações comerciais de Mt e Cp em doses baixas. Setenta camundongos foram distribuídos em sete grupos. O grupo controle negativo (CN) recebeu água destilada (veículo de diluição). O controle positivo (CP) recebeu ciclofosfamida (20 mg/kg). Três grupos receberam misturas: A (0,05mg Mt + 0,0625 mg Cp), B (0,005mg Mt + 0,0125mg Cp) e C (0,0005mg Mt + 0,00125mg Cp). O grupo D recebeu apenas Mt (0,05mg) e o E apenas Cp (0,0625 mg). Os resultados de cada grupo foram comparados entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com análise *a posteriori*, usando a estratégia de testes t par-a-par com correção de Bonferroni ($p < 0,05$). Todas as misturas apresentaram efeito genotóxico e apenas a mistura na maior concentração (A) foi mutagênica. Quando isolados, apenas a Cp apresentou atividade genotóxica significativa; entretanto, a média do dano de E foi menor que a encontrada nas três misturas estudadas. Desta forma, conclui-se que os efeitos do Mt e Cp são potencializados quando estes estão associados, mesmo em doses baixas, podendo causar danos à saúde.

Palavras chave: Ensaio cometa. Micronúcleo. Agrotóxicos. Saúde humana. Genotoxicidade.

ABSTRACT

Pesticides were firstly used in public health in order to tackle disease vectors. Afterwards, in order to improve agricultural production and products good appearance, their use in crops became intensive. Currently, Brazil is the largest consumer of pesticides in the world; the exposure to these toxic agents can pose serious risks to human health and to the environment. Cypermethrin (Cp) and Methomyl (Mt) are pesticides widely used in Brazilian agriculture. While the National Health Surveillance Agency (ANVISA) has established their Acceptable Daily Intake (ADI), consumers are exposed to mixtures of pesticides through food. Nonetheless, most of studies consider the effects of isolated pesticides, when few studies analyze the combinations of compounds. Here, we evaluated the genotoxic and mutagenic effects of low doses of Mt and Cp mixtures obtained from commercial formulations. To do that, seventy mice, divided in seven groups, were used to perform comet assay and micronucleus test. The negative control group received distilled water (dilution vehicle of pesticides), while positive control group received cyclophosphamide (20 mg / kg). Three groups received mixtures of Mt and Cp: A (0.05 mg Mt + 0.0625 mg Cp), B (0.005 mg Mt + 0.0125 mg Cp) and C (0.0005 mg Mt + 0.00125 mg Cp). The D group received only Mt (0.05 mg) and E group received only Cp (0.0625 mg). Kruskal-Wallis test was performed for statistical analysis; subsequently, a multiple comparison was performed using t tests and Bonferroni correction ($\alpha = 0.05$). All mixtures presented genotoxic effect and only the mixture at the highest concentration (A) has presented mutagenic effect. The mixtures presented higher genotoxic and mutagenic effects than isolated pesticides at same concentrations ($p < 0.05$); only Cp showed significant genotoxic activity. Thus, the effects of Mt and Cp are enhanced when they are associated, even at low doses. Results presented here suggest that mixtures of Mt and Cp have different effects in health than that shown by them when isolated. Therefore, the relationship pesticides-health must be investigated with basis in real exposure patterns.

Keywords: Comet assay. Micronucleus. Pesticides. Human health. Genotoxicity.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Os agrotóxicos foram desenvolvidos para matar e combater pragas agrícolas (SAÚDE, 1996; GARCIA, 2001). O DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) foi o primeiro inseticida sintético usado em larga escala para prevenir e evitar a disseminação de diversas doenças causadas por vetores, como malária, febre amarela, doença do sono, dentre outras, sendo considerado inicialmente como forte aliado da sociedade (SPADOTTO, 2006).

Posteriormente os agrotóxicos passaram a ter aplicabilidade na agricultura, com o intuito de otimizar a produção e suprir a procura por alimentos (KICKBUSCH, 1996; DA SILVA *et al.*, 2005; WAICHMAN *et al.*, 2007). Esse aumento na produtividade levou o Brasil a ocupar o primeiro lugar no ranking de exportação de açúcar, soja, café, suco de laranja, tabaco e álcool, e a vice-liderança com o milho (SILVA, 2014). Apesar de trazer benefícios econômicos, a ampliação na produção também fez com que o país aumentasse o consumo de agrotóxicos, sendo considerado líder no mercado consumidor (PELAEZ *et al.*, 2013).

Diante do aumento no consumo destes compostos químicos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), após a avaliação de estudos toxicológicos, estabeleceu o índice da ingestão diária aceitável (IDA) de cada agrotóxico (CALDAS, 1999). No entanto, nem sempre o preceito de aplicação é seguido corretamente, e a contaminação ambiental e dos alimentos pode expor a população a doses mais altas, tornando o uso de praguicidas uma questão importantes de saúde pública (KOIFMAN e KOIFMAN, 2003; DOMINGUES *et al.*, 2004; CARNEIRO *et al.*, 2015).

Alguns estudos mostram os efeitos dos agrotóxicos na saúde humana, como: perturbações na reprodução, infertilidade masculina, malformação congênita, aborto, parto pré-maturo e interferências endócrinas (GRISOLIA, 2005; FONTENELE *et al.*, 2010; SEEGER *et al.*, 2016). Também podem causar alterações nas moléculas de DNA, induzindo a danos genéticos e mutações que, quando acumuladas em linhagens celulares, podem provocar alterações

no controle do ciclo celular e levar ao câncer (GRISOLIA, 2005). Trabalhos demonstram a existência da associação entre agrotóxicos e cânceres de estômago, testículos, melanoma, cérebro, próstata, pulmão e mama (GRISOLIA, 2005; PIMENTEL *et al.*, 2006; ARREBOLA *et al.*, 2015; RIVERO *et al.*, 2015; YOSHIDA *et al.*, 2015; CARON-BEAUDOIN *et al.*, 2016).

Diante disto, a avaliação do potencial genotóxico e mutagênico dos agrotóxicos tornou-se uma área prioritária de pesquisa (BAGRI *et al.*, 2016). Para avaliar esses danos genéticos, existem diferentes testes genotóxicos, dentre eles podemos destacar o ensaio cometa (EC) e o teste de micronúcleo (MN). Trabalhos que utilizam essas técnicas para determinação de efeitos genotóxicos ocasionados por exposição a defensivos agrícolas têm mostrado resultados positivos (CASTILLO-CADENA *et al.*, 2006; ERGENE *et al.*, 2007; GUANGGANG *et al.*, 2013; AKYIL e KONUK, 2015).

Dentre os agrotóxicos que são ingeridos cotidianamente nas refeições, estão a Cipermetrina (Cp) e o Metomil (Mt). A Cp ($C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$) é um inseticida e formicida, pertence ao grupo dos piretróides, e é considerada altamente tóxica. Pode ser utilizada no cultivo de algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, ervilha, feijão, fumo, melancia, milho, pepino, repolho, soja e tomate (ANVISA, 2008). O Mt ($C_5H_{10}N_2O_2S$), classificado como extremamente tóxico, é do grupo químico do metilcarbamato de oxima, possui atividade inseticida e acaricida, podendo ser utilizado em algodão, batata, couve, milho e tomate (ANVISA).

A população é exposta à mistura destes defensivos agrícolas através da dieta, e o conhecimento a respeito dos efeitos adversos dessas misturas ainda são limitados, já que a prática de avaliação dos resíduos químicos nos alimentos geralmente se baseia em dados obtidos de estudos sobre um único praguicida (JACOBSEN *et al.*, 2004; REFFSTRUP *et al.*, 2010). Trabalhos que analisem os impactos da associação de praguicidas são de suma importância, pois a interação entre contaminantes químicos pode potencializar seus efeitos nocivos (COX e LEHNINGER, 2006).

Pouco se sabe em relação aos efeitos causados pela mistura do Mt e Cp. Desta forma, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que a

associação destes agrotóxicos pode causar maior dano genético e mutagênico do que quando isolados, mesmo em doses consideradas seguras pela ANVISA.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de misturas de formulações comerciais de Metomil e Cipermetrina em doses relacionadas à Ingestão diária aceitável.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a frequência de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico de camundongos tratados com mistura de formulações comerciais dos praguicidas Metomil e Cipermetrina em três doses próximas da Ingestão diária aceitável.
- Analisar a frequência de danos noDNA, pelo Ensaio cometa, de células sanguíneas de camundongos tratados com mistura de formulações comerciais dos praguicidas Metomil e Cipermetrina em três doses próximas da Ingestão diária aceitável.
- Verificar o potencial genotóxicos e mutagênico do Metomil e Cipermetrina isolados, por meio do Ensaio cometa e micronúcleos, a partir de células sanguíneas de camundongos.
- Comparar as médias do índice de dano, frequência de dano e frequência de micronúcleos entre os grupos tratados com as misturas e os tratados com o Metomil e Cipermetrina isolados.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Histórico do uso de agrotóxicos no Brasil

A etapa histórica que originou o surgimento de indústria do ramo químico no Brasil foi a Primeira Guerra Mundial. Nesse período aconteceu a chamada

corrida armamentista, quando foram realizadas pesquisas para inovação de produtos, desenvolvendo-se moléculas tóxicas que foram utilizadas como poderosas armas durante a guerra (ZAMBRONE, 1986).

Em 1945, no final da Segunda Guerra Mundial, as empresas do ramo químico buscaram a diversificação para novos mercados, com o intuito de aproveitar e aprimorar as moléculas tóxicas desenvolvidas durante a Primeira Guerra Mundial. Assim, criaram empresas-subsidiárias que produziam agrotóxicos organossintéticos (BULL e HATHAWAY, 1986), fazendo com que o uso dessas substâncias fosse efetivamente difundido pelo mundo.

Outro fato histórico que contribuiu com a produção de agrotóxicos foram as mudanças no processo tradicional da produção agrícola ocorridas durante a Revolução Verde (1940-1970), período também conhecido como a modernização da agricultura nacional. Durante este período houve a mecanização rural, a seleção de sementes mais produtivas e o uso de fertilizantes e agrotóxicos (PINOTTI e SANTOS, 2013), fazendo com que as principais empresas em nível mundial se instalassem no Brasil (PELAEZ *et al.*, 2011).

Dentre os agrotóxicos que começaram a se popularizar, pode-se destacar o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). Este foi desenvolvido em 1939 pelo químico suíço Paul Hermann Müller, que recebeu o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em reconhecimento ao seu trabalho em 1948. Após sua descoberta, o DDT transformou-se rapidamente no agrotóxico mais consumido mundialmente (CARRARO, 1997). Em 1943 o Brasil começou a usar esse praguicida para prevenir doenças causadas por vetores que apresentavam um índice de dispersão alto, como a malária, doença do sono, tifo, febre amarela, dentre outras (SPADOTTO, 2006)(Figura 1.1).

O DDT ficou então rotulado como sendo de baixo custo e eficiente, uma vez que combatia vetores, diminuindo a incidência de algumas doenças preocupantes na saúde pública, e acreditava-se que não apresentava nenhum problema para saúde do homem e animais domésticos, pois não induziam sintomas imediatos que pudessem ser notados (DE MOURA, 2014). Assim, esse composto químico foi utilizado em larga escala nas residências, na saúde

pública e agricultura, antes que seus efeitos nocivos tivessem sido totalmente pesquisados.

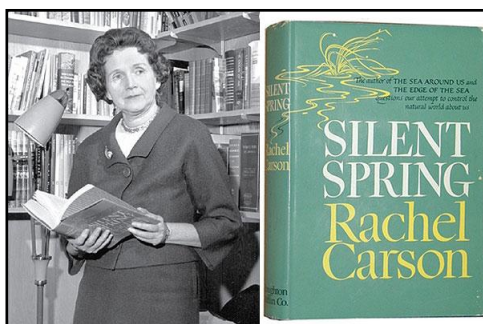
Figura 1.1 - Uso em larga escala do DDT na população a fim de combater vetores que causavam doenças prejudiciais à saúde.



Fonte: Figura adaptada retirada da internet: <http://goo.gl/0jdw8F>.

Em 1962, Rachel Carson publicou o livro “Silent Spring” (Primavera Silenciosa) (Figura 1.2), que chamou atenção para a forma de como deveria se tratar a introdução de novos agentes químicos no ambiente (DE MOURA, 2013). Ela realizou vários estudos, os quais mostraram que esses praguicidas possuíam um alto poder de disseminação e poderiam alcançar regiões e organismos que se encontravam distantes dos locais em que eles eram utilizados. Conseguiu comprovar a toxicidade e também a capacidade desses compostos de se acumularem no organismo, causando danos irreversíveis à saúde humana e ao meio ambiente (RACHEL, 2010).

Figura 1.2 - Pesquisadora Rachel Carson (à esquerda), que em 1962 publicou o livro Primavera Silenciosa (à direita).



Este livro denunciou os impactos do uso intensivo do DDT no ecossistema. Fonte: Figura retirada da internet: <http://goo.gl/9mf8Ge>

Como os praguicidas apresentavam efeitos imediatos contra pragas, o Brasil, buscando melhorias em sua produção agrícola, começou a usar esses

agentes químicos nas lavouras. Assim, pode-se afirmar que eles foram utilizados primeiramente na saúde pública, e, posteriormente, seu uso tornou-se intenso na agricultura (SAÚDE, 1996; WAICHMAN *et al.*, 2007). O consumo se tornou maior devido a incentivos como o Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), que destinou recursos financeiros para criação de empresas nacionais de trabalho agrícola, também realizaram financiamento que estimulava os agricultores a adquirirem praguicidas (TERRA e PELAEZ, 2008)

Assim, o Brasil começou a se tornar um grande consumidor de agrotóxicos. Segundo a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO), os 1986 o país já era considerado um dos que mais exagerava na aplicação de agrotóxicos por hectares (ALVES, 1986). Só em 2004, foram utilizadas aproximadamente 187.000 toneladas de agrotóxicos, que correspondeu a 1 kg por habitantes/ano ou 6kg por habitante/ano da zona rural (PIGNATI, 2005). Esse uso intensivo de defensivos agrícolas manteve o país entre 1970 e 2007 entre os seis maiores consumidores do mundo (TERRA, 2008).

No entanto, recentemente, o Brasil se destacou como o maior consumidor mundial de agrotóxico, seguido dos Estados Unidos (PELAEZ *et al.*, 2013). Um levantamento realizado pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG) mostrou que as vendas de agrotóxicos no Brasil somaram US\$ 7,1 bilhões, enquanto que nos EUA, somaram US\$ 6,6 bilhões (ANDEF, 2009).

Vale ressaltar que essa força do país no mercado dos agrotóxicos está relacionada com o crescimento da agricultura. Economicamente, o uso de agrotóxicos potencializou a produção agrícola, ajudando a suprir o aumento na procura por alimentos ao longo dos anos (DA SILVA *et al.*, 2005). O uso desses agroquímicos fez o Brasil se tornar líder mundial em exportação de açúcar, soja, café, suco de laranja, tabaco e álcool, e a vice-liderança com o milho (SILVA, 2014).

No entanto, apesar de trazer benefícios econômicos, o grande problema está na forma inapropriada que esses praguicidas estão sendo utilizados ultimamente, seja no tratamento prévio das sementes, durante o cultivo ou

após a colheita (CAMAROTTO, 2004). Isto é um fato preocupante, pois a população pode ser exposta a resíduos de agrotóxicos por meio da ingestão de verduras, frutas ou legumes (ARAÚJO *et al.*, 2000; CALDAS e DE SOUZA, 2000).

Tal fato foi evidenciado pela ANVISA, ao realizar uma análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos nos estados brasileiros. Dentre as culturas monitoradas (abobrinha, alface, feijão, tomate e uva), todas elas apresentaram percentuais de irregularidades devido à presença de resíduos de agrotóxicos, com concentrações acima do Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido (ANVISA, 2011).

Dentro desta problemática, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA é de suma importância, pois estima a exposição da população a resíduos de agrotóxicos em alimentos, avaliando os riscos à saúde. Os resultados permitem um diagnóstico da utilização dos defensivos agrícolas nas culturas analisadas, servindo de subsídios ao Poder Público para a realização de ações de natureza regulatória, fiscalizatória e educativa.

1.3.2 Classificação e aspectos legais dos agrotóxicos

De acordo com aFAO, pode-se considerar um agrotóxico qualquer substância ou mistura de substâncias utilizadas para prevenir, destruir ou controlar pragas. Dentre as utilizações, estão: em vetores de doenças, espécies indesejadas de plantas e animais, controle de insetos, aracnídeos, pestes que acometem os corpos de animais de criação, causadoras de danos na produção agrícola, seja no processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos (PERES e MOREIRA, 2003).

Essas substâncias químicas, que são designadas à proteção das culturas agrícolas e áreas urbanas, além de serem conhecidas como agrotóxicos, também podem ser denominadas de praguicidas, pesticidas, biocidas, fitossanitários, defensivos agrícolas e agroquímicos (MOURA, 2008). Também podem ser chamados de “veneno”, pelos próprios trabalhadores rurais, e,

ainda, de remédios, termo utilizado por vendedores e técnicos ligados à indústria química (PERES e MOREIRA, 2003).

Estas substâncias são constituídas por uma vasta gama de compostos químicos ou biológicos. A constituição básica de um agrotóxico contém ingrediente ativo, diluente e aditivo. O ingrediente ativo corresponde ao produto químico que é agente responsável pelo combate à praga ou doença que se deseja tratar. O diluente ajuda a manter a dispersão e suspensão do ingrediente ativo. Já os aditivos são substâncias surfactantes que alteram as propriedades químicas, físicas e biológicas dos agrotóxicos, melhorando sua eficiência (SANTOS, 2000).

Para se obter o registro de um agrotóxico no Brasil, a Lei 7.802/89 impõem ao setor executivo um mecanismo que envolve três órgãos federais no processo de aprovação (BRASIL e ABASTECIMENTO, 1998), sendo eles o órgão federal competente do setor de saúde, ANVISA, que faz a avaliação toxicológica para humanos; o Ministério do Meio Ambiente, através do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que avalia os efeitos no ecossistema e a poluição ambiental; o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que avalia a eficácia agrônômica ou veterinária (GRISOLIA, 2005).

A ANVISA solicita testes toxicológicos: dose letal 50 (DL₅₀) para a toxicidade aguda, inalatória e ocular; toxicidade dérmica; potencial carcinogênico; efeito sobre reprodução e prole (em três gerações sucessivas); teste de irritação e sensibilização cutânea; efeitos teratogênicos, mutagênicos e neurotoxicidade retardada; testes de metabolismo e vias de excreção; meia vida biológica em animais de laboratório e a toxicidade dos metabólitos e ensaios sobre resíduos.

O IBAMA solicita testes para analisar: estado físico, cor, odor e aspecto do produto; impurezas metálicas; pressão de vapor, solubilidade; pH; densidade; identificação molecular; grau de pureza; ponto/faixa de fusão e ebulição; dentre outros. Para os organismos não alvos são solicitados testes com microrganismos, algas, organismos do solo, abelhas, microcrustáceos,

peixes e plantas. Ainda são requisitados testes de biodegradabilidade, mobilidade e absorção do solo (IBAMA, 1996).

O IBAMA também solicita testes de toxicidade em animais superiores, sendo eles: toxicidade aguda oral, inalatória, cutânea, para ratos e ocular para coelhos; solicita dados sobre o potencial genotóxico, embriofetotóxico e carcinogênico; também a toxicidade de curto prazo para cães e metabolismo, via de excreção e meia vida biológica em animais de laboratório (DE SOUZA OLIVEIRA, 2005).

Após estes testes, o esquema do processo de registro de agrotóxico se baseia na emissão dos relatórios técnicos realizados pela ANVISA e IBAMA para que o MAPA libere ou não o registro dos produtos (BEDOR, 2008). Depois de registrados, os agrotóxicos estão devidamente classificados de acordo com a espécie-alvo, o modo de ação, a natureza química e a toxicidade (CARAPETO, 1999).

Em relação à espécie-alvo, os praguicidas podem ser classificados em inseticidas: controle de insetos; fungicidas: destruir ou inibir fungos; herbicidas: combate de plantas invasoras; raticidas: ataca ratos e outros roedores; moluscocidas: acaba com moluscos; nematocidas: elimina nematoides; acaricidas: utilizados no combate a ácaros; desfolhantes: têm função de eliminar folhas indesejáveis; e fumigante: combatem bactérias do solo (YAMASHITA, 2008).

Quanto à ação, podem ser sistêmicos ou não sistêmicos. Os não sistêmicos têm ação de contato. Esses, além de atingirem a espécie-alvo são capazes de atingir outros animais, sendo também responsáveis por causar alterações fisiológicas do próprio vegetal (DELLA LUCIA e CHANDLER, 1985). Já os agrotóxicos sistêmicos são aplicados na lavoura, penetram os tecidos vegetais e são transportados pela seiva em quantidade letal para a praga, sem prejudicar a planta e os demais animais (CARVALHO, 2009).

Na classificação química, os agrotóxicos podem ser separados de acordo com a composição estrutural das moléculas que fazem parte do seu princípio ativo, sendo divididos primeiramente em orgânicos, que apresentam átomos de

carbono em sua estrutura química, e os inorgânicos, constituídos de agentes tóxicos, como o arsênico, mercúrio e chumbo (CARAPETO, 1999). Observando-se agrupamento químico, estas moléculas recebem outra classificação a depender do radical que compõe o pesticida; as principais classificações são: carbamatos, ditiocarbamatos, organoclorados, organofosforados, piretrinas e triazinas (GARCIA, 2001).

A classificação toxicológica, realizada pela ANVISA, traz um importante alerta para os efeitos à saúde humana provocada por esses compostos por meio da DL50. Assim, os agrotóxicos são classificados quanto a sua periculosidade, que pode variar de acordo com a classe I (extremamente tóxico) até classe IV (pouco tóxico) (TERRA, 2008) (Figura 1.3).

Figura 1.3 – Classificação toxicológica dos rótulos.

Classe toxicológica	DL50 oral (mg/Kg)	Doses letais para o homem	Toxicidade	Faixa colorida no rótulo do produto
I	≤ 5	Algumas gotas	Extremamente tóxico	VERMELHA
II	Entre 5 e 50	Algumas gotas a uma colher de chá	Altamente tóxico	AMARELA
III	Entre 50 e 500	1 colher de chá a 2 colheres de sopa	Mediamente tóxico	AZUL
IV	Entre 500 e 5.000	2 colheres de sopa a 2 copos	Pouco tóxico	VERDE

Fonte: Figura adaptada retirada de ALMEIDA(2009).

Todos os produtos lançados no mercado devem exibir estas informações no rótulo e bulas, bem como procedimento de uso e de segurança, dentre outras informações (BEDOR, 2008).

1.3.3 Agrotóxicos estudados

1.3.3.1 Cipermetrina

Algumas plantas do gênero *Chrysanthemum* produzem piretrinas, amplamente utilizadas no combate a pragas devido a sua atividade inseticida e baixa toxicidade em mamíferos (VIJVERBERG e VANDEN BERCKEN, 1990;

SPENCER *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2008). Porém, esses compostos naturais apresentam uma alta instabilidade ao ar e luz solar, o que diminui sua eficácia, principalmente quando utilizados na agricultura (CHEN e WANG, 1996).

Na década de 70, as piretrinas foram aperfeiçoadas com a inclusão de átomos de halogênios, nitrogênio e enxofre, originando os piretróides sintéticos, moléculas similares às piretrinas extraídas das plantas, porém, com maior estabilidade e potencial inseticida (GALERA *et al.*, 1996). A introdução dessa nova substância no mercado foi bastante aceita na agricultura, assim como em outras áreas (VALENTINE, 1990).

A cipermetrina ($C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$), disponível em várias formulações comerciais, é um dos piretróides mais utilizados no controle de pragas atualmente. Seu nome químico é (RS)- α -ciano-3-fenoxibenzil (1RS, 3RS; 1RS, 3SR)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato; utilizado como inseticida e formicida, possui ação não sistêmica (de contato), classe toxicológica é nível II (altamente tóxica) e IDA é de 0,05 mg/kg. É aplicável principalmente nos cultivos de algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, ervilha, feijão, fumo, melancia, milho, pepino, repolho, soja e tomate (AGROFIT; ANVISA; 2008) (Tabela 1.1).

Associada a sua utilidade em culturas agrícolas, a Cp também foi bastante utilizada na saúde pública, no combate ao *Aedes aegypti*, seja na pulverização, ou dissolvida em criadouros (AUGUSTO *et al.*, 2000). Também surtiu efeito como quimioterapêutico no controle de ectoparasitas, piolhos, infestações de pragas e insetos (DAS e MUKHERJEE, 2003; TRIPATHI e SINGH, 2004; JAENSSON *et al.*, 2007). Devido a essa alta eficiência, a maioria dos trabalhos foca no seu potencial de combate e controle de parasitas (VEROCAI *et al.*, 2008; CAMILLO *et al.*, 2009; BARATA *et al.*, 2011) e, apesar de seu uso ter relação direta com o organismo em vários casos, são escassos os estudos relacionados com seu impacto na saúde humana.

Na literatura estudos mostraram os efeitos prejudiciais da Cp em algumas populações. Alguns autores observaram efeitos em aves relacionados a diminuição no número de ninhos, aumento na mortalidade dos filhotes, assim

como baixo peso nos sobreviventes (PASCUAL e PERIS, 1992). Em peixes, a Cp causou hiperatividade, perda de equilíbrio, dispneia e convulsões (KUMAR *et al.*, 2007; MONTANHA *et al.*, 2014); além de apresentar efeitos tóxicos para bovinos e polinizadores (DE SOUZA MENDONÇA *et al.*, 2010; FREITAS e PINHEIRO, 2010).

Um estudo mostrou a atividade mutagênica da Cp ao detectar aberrações cromossômicas e aumento de micronúcleos na medula óssea de ratos (BHUNYA e PATI, 1988). Efeitos genotóxicos foram observados em fígado, medula, baço, cérebro e rim de camundongos (PATEL *et al.*, 2006). Em um estudo mais atual, camundongos foram expostos através da dieta a três concentrações da Cp que estavam abaixo do IDA sugerida. Nenhum efeito genotóxico foi observado, mas todas as doses mostraram-se mutagênicas (SILVA, 2013).

A carência de estudos frente aos efeitos nocivos da Cp em mamíferos é um fato preocupante, pois além de ser altamente tóxico, esse agrotóxico é de natureza lipofílica e já foi encontrado em vários tecidos de indivíduos contaminados, tais como: adipócitos, pele, fígado, rins, glândulas adrenais, ovários e cérebro (TIAN *et al.*, 2008). Diante desses fatos, torna-se evidente a necessidade de mais estudos para elucidar os impactos do uso da Cp em humanos.

1.3.3.2 Metomil

Os carbamatos foram descobertos inicialmente em extratos de sementes de *Physostigma venenosum* que possuíam fisostigmina, substância natural com grande atividade inseticida. Assim, devido ao seu amplo espectro de atividade biológica para controle de pragas, baixa ação residual e baixa toxicidade em longo prazo, esses compostos químicos começaram a ser largamente utilizados na agricultura (HAYES e LAWS, 1991; MIDIO e SILVA, 1995).

Os compostos químicos desse grupo podem ser absorvidos por via respiratória, dérmica ou oral. Depois de absorvido pelos organismos, os carbamatos inibem a enzima acetilcolinesterase, o que causa o aumento de acetilcolina na fenda sináptica e pode provocar sintomas de intoxicação, como

dores e cólicas abdominais, vômitos, tremores musculares, convulsões, sudorese e salivação intensa, midríase, dificuldades respiratórias, visão turva e embaçada, lacrimejamento, fraqueza, tontura, e até morte (TSAO *et al.*, 1990; HAYES e LAWS, 1991; MACHEMER e PICKEL, 1994; DA SILVA FILHO *et al.*, 2008b).

Dentre os agrotóxicos incluídos nesse grupo, o Mt (S-metil-N-[(metilcarbamoil) oxi]-tioacetamidato de oxima) foi fabricado em 1966 e inserido no mercado para consumo. Este biocida, de fórmula química $C_5H_{10}O_2N_2S$, possui atividade inseticida e acaricida; faz parte do grupo dos N-metilcarbamatos de oximas, tem estabelecido um IDA de 0,02 mg/Kg e é considerado extremamente tóxico (classe I) (PADILLA *et al.*, 2007; AKTAR *et al.*, 2011; VAN SCOY *et al.*, 2013). A contaminação pode se dar através do contato, ou de forma sistêmica, pois também tem a capacidade de ser absorvido por plantas e transferido principalmente para animais sugadores. A ANVISA autoriza o uso desse pesticida em culturas de algodão, batata, brócolis, couve, milho, repolho, soja, tomate e trigo (Tabela 1.1) (ANVISA).

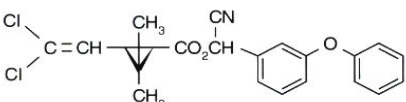
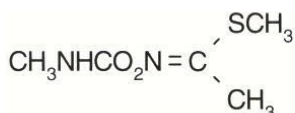
Seus afeitos na saúde ambiental são descritos principalmente em organismos aquáticos, pois o tempo de meia vida do Mt em águas superficiais é de 6 dias e em águas subterrâneas cerca de 50 semanas (FARRÉ *et al.*, 2002). Alguns trabalhos mostram que a contaminação dessas águas pode ocorrer durante a aplicação do produto ou mesmo depois do período de utilização (AKTAR *et al.*, 2011), e que seu uso inadequado pode causar efeitos negativos em populações de invertebrados aquáticos e peixes (FARRÉ *et al.*, 2002).

A quantidade de estudos sobre os impactos do Mt na saúde humana ainda é limitada. Alguns trabalhos mostram a intoxicação por Mt em pessoas que consumiam alimento proveniente de culturas contaminadas, como a intoxicação de 57 pessoas que consumiram tapioca feita com fécula de mandioca contaminada com o Mt (DA SILVA FILHO *et al.*, 2008a). Silva *et al.* (2012) observaram que o Mt causou danos genético e mutagênico em células sanguínea de roedores, mesmo em doses abaixo do IDA (SILVA, 2013). Na

agricultura também já foram relados intoxicações pelo uso desse inseticida (PIRES *et al.*, 2005).

Desta forma, torna-se evidente a necessidade de se ampliar os estudos com o Mt, pois ele pode trazer sérios riscos para os organismos expostos. Testes toxicológicos confirmaram que altas concentrações de Mt no sangue podem causar envenenamento, e, conseqüentemente, morte (KINOSHITA *et al.*, 2013). Por tanto, é necessário cada vez mais estudos que enriqueçam a literatura a respeito dos efeitos nocivos de agrotóxicos no meio ambiente, e, principalmente, na saúde humana.

Tabela 1.1- Características dos agrotóxicos Cipermetrina e Metomil.

	Cipermetrina	Metomil
Ingrediente ativo ou nome comum	Cipermetrina (cypermethrin)	Metomil (methomyl)
Nome químico	(RS)- α -ciano-3-fenoxibenzil (1RS, 3RS; 1RS, 3SR)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetil ciclopropano carboxilato	S-metil-N-[(metilcarbamoil) oxi]-tioacetamidato de oxima
Fórmula bruta	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	$C_5H_{10}N_2O_2S$
Fórmula estrutural		
Grupo químico	Piretróide	Metilcarbamato de oxima
Classe	Inseticida e formicida	Inseticida e acaricida
Classificação toxicológica	Classe II	Classe I
IDA	0,05 mg/kg	0,02 mg/Kg
Modalidade de emprego	Aplicação foliar nas culturas de algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, citros, ervilha, feijão, feijão-vagem, fumo, mandioca, melancia, milho, pepino, repolho, soja e tomate.	Aplicação foliar nas culturas de algodão, batata, brócolis, café, couve, feijão, milho, repolho, soja, tomate e trigo.

IDA: Ingestão Diária Aceitável;

Fonte: AGROFIT <http://goo.gl/M4VeYq>/ANVISA:

<http://goo.gl/ioC7y3> (cipermetrina).

<http://goo.gl/GhDIkj> (metomil)

1.3.4 Impacto dos agrotóxicos na saúde humana

O consumo descontrolado de agrotóxicos pode causar impactos no ecossistema e na saúde humana (BEDOR, 2008). O uso inapropriado dessas substâncias químicas pode fazer com que populações, até mesmo as que não estão vinculadas diretamente com a cadeia produtiva dessas substâncias, sejam expostas em função de contaminação ambiental ou por alimentos, tornando o uso de praguicidas uma questão importante de saúde pública (KOIFMAN e KOIFMAN, 2003; CARNEIRO *et al.*, 2015).

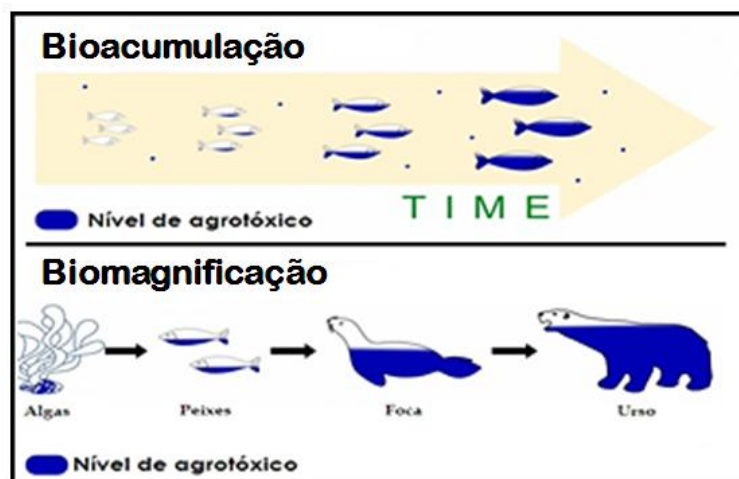
Os primeiros alertas com relação ao uso de agrotóxico foram dados por Rachel Carson ao publicar *Primavera Silenciosa*. Neste livro ela condenou a liberação de grandes quantidades da substância no ambiente sem o conhecimento integral de seus efeitos nocivos. Seus resultados geraram debates sobre o uso do DDT e de outros agrotóxicos, além de provocar um movimento social que passou a exigir controle e regulação de praguicidas, além de pressionar para a produção de substâncias que favoreçam a agricultura sem agredir o meio ambiente e a saúde humana (LUCCHESI, 2005).

Os males na saúde do homem causados pelo DDT só apareceram cerca de 20 a 30 anos depois do seu uso intenso (PIMENTEL *et al.*, 2006). Isso provavelmente aconteceu porque os resíduos químicos que permaneceram no meio ambiente e na cadeia alimentar podem ser bioacumulados, biomagnificados e biotransformados. A bioacumulação é o acúmulo ao longo do tempo em organismos vivos, em concentrações maiores do que o das águas ou dos alimentos consumidos; já a biomagnificação é o acúmulo progressivo observado em cada nível da cadeia alimentar; e a transformação da substância em outras, no organismo, é conhecida como biotransformação (BEDOR, 2008).

A Figura 1.4 mostra uma ilustração a respeito da bioacumulação e da biomagnificação. A bioacumulação é evidenciada em um organismo, neste caso peixes, que podem acumular moléculas químicas em seus tecidos com o passar do tempo. O processo de biomagnificação pode ser visto na cadeia

alimentar quando o consumidor primário se alimenta do produtor e incorpora os resíduos de agrotóxico deste. Com o consumo ao longo da vida, a quantidade de agrotóxico acumulado na gordura corporal vai sendo multiplicada a cada ingestão. O mesmo acontecerá com os demais consumidores, sendo a máxima concentração no último elo da cadeia.

Figura 1.4 - Processo de bioacumulação e biomagnificação de agrotóxicos.



Fonte: Figura adaptada retirada da internet: <http://goo.gl/DIPE5d>

Desta forma, pode-se perceber que, mesmo em concentrações baixas, os pesticidas podem causar algum dano aos animais ao longo do tempo. Além disso, uma vez que os agrotóxicos entram na cadeia alimentar e se bioacumulam, eles podem ser transferidos para os seres humanos através da alimentação e causar riscos à saúde (TURGUT, 2007).

Vale ressaltar que a ingestão de alimentos contaminados é a principal via de penetração dos praguicidas no corpo humano, seguido pela respiração e absorção dérmica. A penetração pela pele ocorre principalmente em profissionais que têm contato com os agrotóxicos, como aqueles do setor agropecuário, saúde pública, transporte e comércio de alimentos, e trabalhadores de indústrias de formulações e síntese (BRASIL, 1997). Além desses, famílias de agricultores que manipulam roupa contaminada ou moram próximo a áreas que são pulverizadas também estão expostas a este tipo de contaminação (BEDOR, 2008).

Dependendo do grupo químico do agrotóxico, a forma de exposição, o tempo e as características do indivíduo exposto, os quadros de intoxicação podem diferir entre agudas e crônicas. Nas intoxicações agudas, os organismos entram em contato com o composto químico num evento único ou em múltiplos em curto período de tempo; o agente químico é rapidamente absorvido e os efeitos são imediatos. As intoxicações crônicas resultam da interação nociva da substância com o organismo vivo; neste caso, no entanto, os organismos são expostos a baixas concentrações sucessivamente num longo período de tempo, e os efeitos se desenvolvem lentamente (BRASIL., 2006). Cada tipo de intoxicação pode gerar sintomas diferentes (Tabela 1.2).

No Brasil existem dois principais sistemas que fazem as notificações de intoxicação: O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), gerenciado pela Fiocruz, e o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), gerenciado pelo Ministério da Saúde. Em 2012 só a SINITOX registou 4.656 casos de intoxicação por agrotóxico de uso agrícola e 2.146 de uso doméstico, sendo a faixa etária mais acometida de 20 a 39 anos e 1- 4 anos, respectivamente (SINITOX, 2012).

O número de intoxicações registrado anualmente no país representa uma amostra dos riscos aos quais a população se expõe com o uso massivo destes produtos. Vários estudos mostram os agravos na saúde humana provenientes da exposição a agrotóxicos: perturbações na reprodução, infertilidade masculina, malformação congênita, aborto, parto pré-maturo e interferências endócrinas (GRISOLIA, 2005; FONTENELE *et al.*, 2010; SEEGER *et al.*, 2016), além de dificuldades respiratórias, problemas de memória, efeitos na pele e depressão (ALIMENTARIUS, 2000; CALDAS *et al.*, 2004).

Além disso, os agrotóxicos possuem, em sua composição, moléculas com poder oxidante que podem formar radicais livres nos sistemas biológicos (LUZ, 2003). Esses radicais livres são moléculas muito instáveis que, ao reagirem com as estruturas celulares, podem alterar a permeabilidade da célula (JUNIOR *et al.*, 2005). Podem ainda atingir a dupla fita de DNA, causando danos na molécula, levando a mutações, que alteram o processo de divisão

celular, especialmente relacionados com seu controle e alterações na sua diferenciação, resultando na perda de características funcionais e na formação de tumores (CUNNINGHAM e MATTHEWS, 1995; LOUREIRO *et al.*, 2002).

Tabela 1.2 - Principais efeitos agudos e crônicos causados pela exposição aos agrotóxicos, de acordo com a praga que controlam e o grupo químico a que pertencem.

Classificação quanto à praga que controlam	Classificação quanto ao grupo químico	Sintomas de intoxicação aguda	Sintomas de intoxicação crônica
Inseticidas	Organofosforados/Carbomatos	Fraqueza Cólicas abdominais Vômitos Espasmos musculares Convulsões	Efeitos neurotóxicos retardados Alterações cromossomais Dermatites de contato
	Organoclorados	Náuseas Vômitos Contrações musculares involuntárias	Lesões hepáticas Arritmias cardíacas Lesões renais Neuropatias periféricas
	Piretróides sintéticos	Irritações das conjuntivas Espirros Excitação Convulsões	Alergias Asma brônquica Irritações nas mucosas Hipersensibilidade
Fungicidas	Ditiocarbamatos	Tonteiras Vômitos Tremores musculares Dor de cabeça	Alergias respiratórias Dermatites Mal de Parkinson Cânceres
	Fentalamidas	-	Teratogêneses
Herbicidas	Dinitrofenóis/Pentaclorofenol	Dificuldade respiratória Hipertermia Convulsões	Cânceres (PCP-formação de dioxinas) Cloroacnes
	Fenoxiacéticos	Perda de apetite Enjôo Vômitos Fasciculação muscular	Indução da produção de enzimas hepáticas Cânceres Teratogênese
	Bipiridilos	Sangramento nasal Fraqueza Desmaios Conjuntivites	Lesões hepáticas Dermatite de contato Fibrose pulmonar

Fonte: Tabela adaptada retirada de PERES; MOREIRA, 2003.

Segundo Bolognesi (2000), os resíduos de agrotóxicos presentes nos vegetais e na água de beber possuem um grande potencial em causar efeitos de longo prazo, como o câncer (BOLOGNESI e MORASSO, 2000). Alguns trabalhos demonstram a existência de associação entre agrotóxicos e cânceres de estômago, testículos, melanoma, cérebro, próstata, pulmão e mama (GRISOLIA, 2005; PIMENTEL *et al.*, 2006; ARREBOLA *et al.*, 2015; RIVERO *et al.*, 2015; YOSHIDA *et al.*, 2015; CARON-BEAUDOIN *et al.*, 2016). Também se pode observar riscos ocupacionais: o câncer de estômago foi a

principal causa de mortes por neoplasias malignas em trabalhadores rurais (MEYER *et al.*, 2003), e as leucemias representam causa de morte significativa entre os agricultores rurais brasileiros (LEE *et al.*, 2004).

Tendo em vista os problemas mencionados, as medidas mais importantes para minimizar o risco da contaminação por agrotóxicos em humanos são, não somente monitorá-los, mas também propor e empregar formas alternativas que visem à redução desses compostos durante, principalmente, as etapas de plantio de uma cultura (HILL, 2000; WATANABE *et al.*, 2007). Em geral, quando os agrotóxicos são aplicados seguindo as Boas Práticas Agrícolas (BPA) (JARDIM *et al.*, 2009), os LMR não são excedidos, no entanto, a má utilização desses compostos é que se torna preocupante, podendo deixar quantidades significativas de resíduos tanto em alimentos (THURMAN *et al.*, 2006), quanto em compartimentos ambientais (WANG *et al.*, 2007).

1.3.5 Bioensaios utilizados na identificação de danos no DNA

Os danos celulares causados por substâncias mutagênicas podem ser induzidos por agentes químicos, físicos ou biológicos, que afetam os processos vitais, como a replicação do DNA e a transcrição gênica, causando alterações cromossômicas e formação de processos cancerosos e morte celular. Pelo fato de causarem lesões no material genético, essas substâncias são conhecidas como genotóxicas (DA COSTA e MENK, 2000).

Um composto é dito mutagênico quando possui a capacidade de aumentar o número de mutação em um organismo. Uma mutação pode ser definida como uma mudança estável numa sequência nucleotídica do DNA, de modo que essas modificações podem ser cromossômicas ou gênicas (GATEHOUSE *et al.*, 1990). As mutações gênicas são devidas à substituição de bases (transições e transversões); ou inserções, deleções e translocações (GATEHOUSE *et al.*, 1990). Já as alterações cromossômicas podem estar relacionadas à estrutura cromossômica, em consequência de deleções, duplicações, inversões e translocações maiores, ou ao número de cromossomos, em decorrência de falhas na citocinese. Os agentes que

causam mutações são considerados genotóxicos, apesar de nem todos os agentes genotóxicos serem mutagênicos (VOGEL, 1989).

Diante da comprovação científica de que a origem de mutações pode ser proveniente do efeito genotóxico de substâncias químicas, e que pode estar relacionada a vários tipos de câncer, foi necessário desenvolver testes que oferecessem a possibilidade de se avaliar o potencial genotóxico dessas moléculas variadas (AMES, 1979; NATARAJAN, 2002; OBE *et al.*, 2002).

Atualmente, diversos bioensaios com capacidade de identificar efeitos biológicos precoces estão sendo usados para monitorar populações expostas a um grande número de clastogênos ocupacionais e ambientais (ASHBY, 1988; GARRETT *et al.*, 1992; DA SILVA AUGUSTO *et al.*, 1997; SIMONIELLO *et al.*, 2008). Dentre estes bioensaios, o MN e EC se destacam como ferramentas importantes na identificação de agentes químicos com potencial mutagênico e genotóxico (OBE *et al.*, 2002).

1.3.5.1 Ensaio cometa ou eletroforese de gel em célula única

Em 1989 a denominação “teste cometa” foi sugerida por Olive para esse ensaio, devido à aparência que cada nucleóide apresenta quando submetido à eletroforese. Entretanto, os primeiros a desenvolver a técnica foram Östling e Johanson (1984), a fim de detectar danos no DNA em células individualizadas. Para isso, células lisadas com detergente e alta concentração de sais eram submetidas à eletroforese em pH neutro; porém, a utilidade do teste era limitada, pois somente quebras de fita dupla podiam ser detectadas (OSTLING e JOHANSON, 1984; TICE *et al.*, 2000).

Posteriormente, uma nova versão do ensaio foi proposta por Singh *et al.* (1988), agora em condições alcalinas (pH >13) (SINGH *et al.*, 1988). Nestas condições, foi possível detectar um aumento na migração do DNA em decorrência do aumento nos níveis de quebras de fitas simples, quebras de fita simples associadas à excisão de sítios incompletos de reparo, *cross-links* DNA-DNA e DNA-proteínas e sítios álcali lábeis (sítios apurínicos), além das quebras de fita dupla.

Devido ao fato de que quase todos os agentes genotóxicos induzem mais quebras de fita simples e/ou sítios álcali lábeis do que quebras de fita dupla no DNA, a versão alcalina do EC ofereceu um aumento na sensibilidade do teste para identificar agentes genotóxicos. Vale ressaltar que o EC detecta apenas danos no DNA, que podem resultar em mutações se o dano não for reparado, caso isso aconteça, as mutações são detectadas por outros testes (TICE *et al.*, 2000; GONTIJO e TICE, 2003).

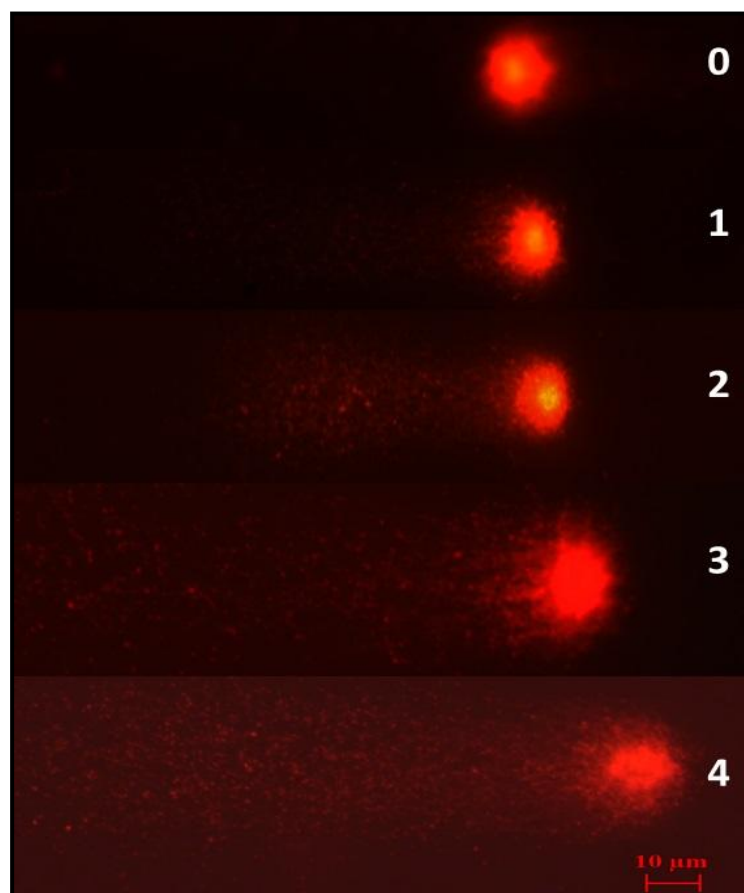
A técnica do EC consiste em encharcar células em gel de agarose, usar detergente e soluções salinas para a lise celular, e, posteriormente, induzir a desespiralização do DNA e a liberação dos fragmentos por meio de soluções alcalinas. Durante a corrida eletroforética, O DNA migra para o polo positivo; fragmentos menores migram mais rapidamente; essa migração forma uma arrasto, com os fragmentos menores à frente dos maiores, visto ao microscópio como uma cauda de cometa (SINGH *et al.*, 1988; KAŠUBA *et al.*, 2012). Assim, as lâminas são avaliadas de acordo com comprimento e quantidade de material genético presente na cauda, comparada à chamada cabeça, do cometa. A análise pode ser feita visualmente ou por meio de *softwares* de análise de imagem (GONTIJO e TICE, 2003; OCDE, 2014) (Figura 1.5).

A eletroforese de gel em célula única foi considerada um instrumento fundamental na genética toxicológica (FAUST *et al.*, 2004). Além da alta sensibilidade ao detectar baixos níveis de danos no DNA, quando comparado com os demais testes genotóxicos, o EC é vantajoso porque requer pequeno número de células por amostra, apresenta baixo custo, é de fácil aplicação e é necessário pouco tempo para realização do procedimento completo (TICE *et al.*, 2000). Além disso, pode ser aplicado tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo* (DE SOUZA *et al.*, 2013; GONÇALVES, 2013; LOURO, 2014; KAHL *et al.*, 2015).

Desta forma, diversos trabalhos na literatura já utilizam a técnica em vários organismos, como anfíbios (GONÇALVES *et al.*, 2015), cagado (SILVA, 2015), crustáceos (MOURA *et al.*, 2015), peixes (MATOZO *et al.*, 2015; MOURA *et al.*, 2015), roedores (MENEQUETTI e FACUNDO, 2015; BALDISSERA *et al.*, 2016), moluscos (VILLAR *et al.*, 2015), *Drosophila* (MUKHOPADHYAY *et al.*,

2004; GAIVÃO e SIERRA, 2015), dentre outros. Na agricultura o teste é amplamente utilizado na identificação de agrotóxicos com potencial genotóxico (KUNST *et al.*, 2014; CARBAJAL-LÓPEZ *et al.*, 2016). Estes trabalhos demonstram a validade do teste que apresenta ainda protocolo validado pela OCDE (Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay) (CO-OPERATION e DEVELOPMENT, 2014).

Figura 1.5 - Classificação visual dos danos nos nucleóides de acordo com a quantidade e tamanho de fragmentos de DNA no arrastro. Dano 0 (sem dano); 1 (pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo).



Fonte: autor, 2016.

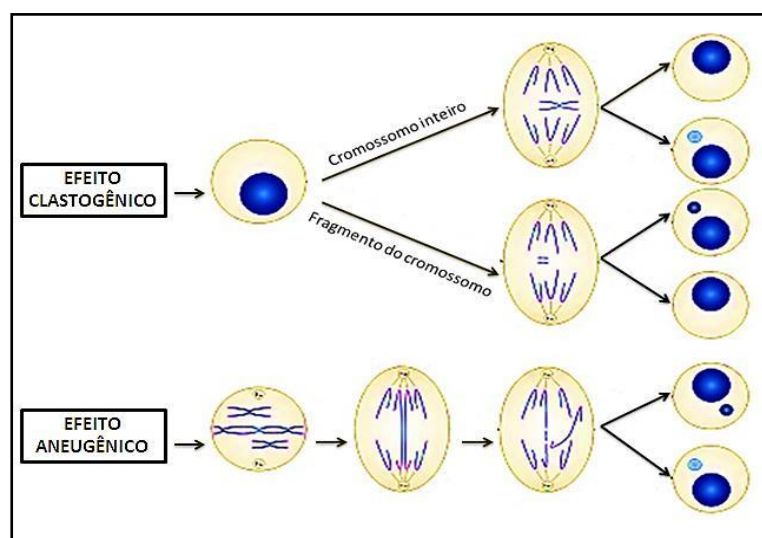
1.3.5.2 Teste de micronúcleo

Os MNs foram descobertos em 1900 por Howel no citoplasma de eritrócitos, que inicialmente receberam o nome de “fragmento de material nuclear”, proposto por Jolly. Apenas em 1970 Boller e Schimid passaram a

chamar esses fragmentos de micronúcleos (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003). Em 1973 Von Ledebur e Schmid desenvolveram um procedimento em medula óssea de roedores (*in vivo*) para analisar danos citogenéticos através desses MNs (HEDDLE *et al.*, 1983; RABELLO-GAY, 1991). Em 1976 Heddle adaptou o procedimento inicial para utilizá-lo em estudos *in vitro* (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003).

O MN é formado por fragmentos cromossômicos acêntricos ou por cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal da célula. Isso acontece porque alguns agentes podem danificar o cromossomo diretamente, produzindo quebras (clastogênese), ou podem afetar o fuso mitótico, levando à perda de cromossomos inteiros (aneugênese) (NATARAJAN, 2002; MATEUCA *et al.*, 2006; FENECH, 2007; 2010). O fragmento ou o cromossomo inteiro fica no citoplasma da célula e é envolvido por um envoltório nuclear, adquirindo características semelhantes às do núcleo principal (FENECH *et al.*, 2011)(Figura 1.6).

Figura 1.6 - Processo de formação de micronúcleo por meio dos efeitos clastogênicos e aneugênicos durante a divisão celular.

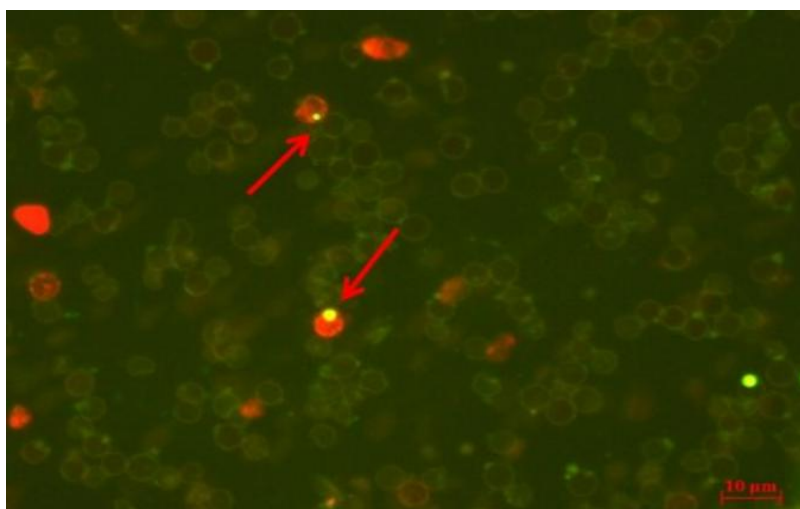


Fonte: Figura adaptada retirada da internet: <http://goo.gl/fq0t4U>

Para ser considerado um MN, essa estrutura de material genético presente no citoplasma precisa apresentar as seguintes características: possuir um tamanho entre 1/6 a 1/3 do diâmetro do núcleo principal, apresentar

envoltório nuclear visivelmente distinto, não apresentar nenhuma conexão com o núcleo principal, ter intensidade de coloração similar ou igual à do núcleo principal e não ser birrefringente (FENECH, 2000) (Figura 1.7).

Figura 1.7 - Eritrócitos Normocromáticos corados em verdes; Eritrócitos Policromáticos corados em vermelho; Eritrócito Policromático com Micronúcleo apontado pela seta vermelha.



Fonte: Imagem retirada de Rocha (2015).

Sabe-se que um evento importante para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer é a perda de um cromossomo ou a sua disjunção (FENECH, 2000). Como o teste de MN consegue avaliar esses eventos, o ensaio se tornou uma ferramenta importante nos estudos toxicológicos, tendo aplicabilidade em diversas áreas (KIRSCH-VOLDERS, 1997). Desde então, esse teste tem sido aceito internacionalmente como um dos ensaios necessários para o registro de novos produtos químicos lançados no mercado, dentre eles os agrotóxicos (CHOY, 2001).

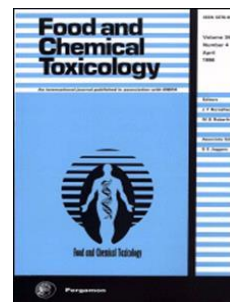
Outros fatores que contribuem para a ampla utilização da análise de MNs são as vantagens frente a outros ensaios de genotoxicidade. O teste de MN é simples, confiável, sensível, de baixo custo, eficiente, pode ser realizado em qualquer população celular em proliferação (HAYASHI *et al.*, 1998; KRISHNA e HAYASHI, 2000), e pode ser aplicado em testes *in vivo* e *in*

vitro(KRISHNA e HAYASHI, 2000; SEVERIN *et al.*, 2010). Vários trabalhos demonstram a eficiência do teste na detecção de efeitos mutagênicos (FLORES e YAMAGUCHI, 2009; BATISTA e CAMPOS, 2015), alguns desses estudos estão relacionados aos danos na saúde humana e ambiental causados pelo uso de agrotóxicos (MORON *et al.*, 2006; KUNST *et al.*, 2014; CARBAJAL-LÓPEZ *et al.*, 2016).

2 CAPÍTULO 2

Artigo a ser submetido para Revista: **Food and Chemical Toxicology**

B1Biodiversidade, Fator de Impacto: 2, 895



AVALIAÇÃO GENOTÓXICA *IN VIVO* DOS EFEITOS AGUDOS DA MISTURA DOS PRAGUICIDAS METOMIL E CIPERMETRINA

T. G. S. SOUZA^a, M. A. SILVA^a, T. A. ROCHA^b, D. F. MOURA^a, S. H. PEREIRA^a, E. M. FREITAS^a, C. A. CHAGAS^a

^a Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Autor para correspondência:

Cristiano Aparecido Chagas

Núcleo de Ciência Biológicas – CAV/UFPE

Rua Alto do Reservatório, s/n – CEP: 55608-680 - Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE – Brasil.

Fone/Fax: (00 55 81) 35233351

E-mail: chagas.cris@gmail.com

E-mail dos demais autores:

talitagiselly@hotmail.com

ameixas2013@outlook.com

tamialvesinsl@gmail.com

danielle.feijo@hotmail.com

sarana_pereira@hotmail.com

emsfreitas@hotmail.com

Palavras chave: Ensaio cometa, Micronúcleo, agrotóxicos, saúde humana, genotoxicidade.

Resumo

Os agrotóxicos foram utilizados primeiramente na saúde pública, a fim de combater vetores que causam doenças. Posteriormente seu uso tornou-se intensivo na agricultura, com intenção de melhorar a produção e a aparência dos produtos. Atualmente o Brasil é o maior consumidor de defensivos agrícolas do mundo, isto é um fato preocupante, visto que a exposição a esses agentes tóxicos pode trazer sérios riscos à saúde humana e meio ambiente. A Cipermetrina (Cp) e Metomil (Mt) são agrotóxicos largamente utilizados na agricultura brasileira. Conquanto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tenha estabelecido a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de ambos isoladamente, é sabido que o consumidor está exposto a misturas de praguicidas por meio de sua dieta. No entanto, a maioria das pesquisas estudam os efeitos dos agrotóxicos isoladamente, sendo limitado o número de trabalhos que analisam as combinações desses compostos. Diante disso, avaliamos o potencial genotóxico, pelo ensaio cometa, e mutagênico, pelo teste do micronúcleo, de misturas de formulações comerciais de Mt e Cp em doses baixas. Setenta camundongos foram distribuídos em sete grupos. O grupo controle negativo recebeu água destilada (veículo de diluição). O controle positivo recebeu ciclofosfamida (20 mg / kg). Três grupos receberam misturas: A (0,05mg Mt + 0,0625 mg Cp), B (0,005mg Mt + 0,0125mg Cp) e C (0,0005mg Mt + 0,00125mg Cp). O grupo D recebeu apenas Mt (0,05mg) e o E apenas Cp (0,0625 mg). Todas as misturas apresentaram efeito genotóxico e apenas a mistura na maior concentração (A) foi mutagênica. Quando isolados, apenas a Cp apresentou atividade genotóxica significativa; entretanto, a média do dano foi menor que a encontrada nas três misturas estudadas. Desta forma, conclui-se que os efeitos do Mt e Cp são potencializados quando estes estão associados, mesmo em doses baixas, podendo causar danos à saúde.

Palavras chave: Ensaio cometa, Micronúcleo, agrotóxicos, saúde humana, genotoxicidade.

Abstract

Pesticides were firstly used in public health in order to tackle disease vectors. Afterwards, in order to improve agricultural production and products good appearance, their use in crops became intensive. Currently, Brazil is the largest consumer of pesticides in the world; the exposure to these toxic agents can pose serious risks to human health and to the environment. Cypermethrin (Cp) and Methomyl (Mt) are pesticides widely used in Brazilian agriculture. While the National Health Surveillance Agency (ANVISA) has established their Acceptable Daily Intake (ADI), consumers are exposed to mixtures of pesticides through food. Nonetheless, most of studies consider the effects of isolated pesticides, when few studies analyze the combinations of compounds. Here, we evaluated the genotoxic and mutagenic effects of low doses of Mt and Cp mixtures obtained from commercial formulations. To do that, blood of seventy mice, divided in seven groups, was used to perform comet assay and micronucleus test. The negative control group received distilled water (dilution vehicle of pesticides), while positive control group received cyclophosphamide (20 mg / kg). Three groups received mixtures of Mt and Cp: A (0.05 mg Mt + 0.0625 mg Cp), B (0.005 mg Mt + 0,0125mg Cp) and C (0,0005mg Mt + 0,00125mg Cp). The D group received only Mt (0.05 mg) and E group received only Cp (0.0625 mg). All mixtures presented genotoxic effect and only the mixture at the highest concentration (A) has presented mutagenic effect. The mixtures presented higher genotoxic and mutagenic effects than isolated pesticides at same concentrations ($p < 0,05$); only Cp showed significant genotoxic activity. Thus, the effects of Mt and Cp are enhanced when they are associated, even at low doses. Results presented here suggest that mixtures of pesticides have different effects in health than that shown by isolated ones. Therefore, the relationship pesticides-health must be investigated with basis in real exposure patterns.

Keywords: Comet assay, micronucleus, pesticides, human health, genotoxicity

Introdução

Os agrotóxicos se apresentam em uma grande variedade de substâncias químicas ou produtos biológicos que são largamente utilizados em todo o mundo, aumentando o rendimento da agricultura, através do controle de pragas e a redução de doenças causadas por insetos (PERES *et al.*, 2005; AMARAL, 2014). No entanto, a exposição inapropriada a pesticidas pode causar efeitos negativos sobre organismos terrestres e aquáticos, bem como intoxicação humana pelo consumo de água e alimentos contaminados (MOZETO e ZAGATTO, 2006).

A alimentação à base de frutas, legumes e verduras pode acarretar na ingestão de resíduos de agrotóxicos (ARAÚJO *et al.*, 2000; CALDAS e DE SOUZA, 2000). Fato preocupante, pois a ingestão de alimentos contendo resíduos de agrotóxicos, mesmo em baixas doses, pode causar, em longo prazo, lesão tecidual, frequentemente associada ao câncer, (RICHTER e CHLAMTAC, 2001). Ao entrar nas células, pesticidas e seus metabólitos podem causar alterações nas moléculas de DNA. Estas alterações podem provocar danos genéticos e mutações que, quando acumuladas em linhagens celulares, podem provocar alterações no controle do ciclo celular e conduzir tais linhagens aos passos da carcinogênese. Portanto, a avaliação do potencial genotóxico e mutagênicos destes agentes tornou-se uma área prioritária de pesquisa (BAGRI *et al.*, 2016).

Diversas técnicas de pesquisa básica na detecção da genotoxicidade, como o ensaio cometa (EC) e o teste de micronúcleo (MN) têm sido empregadas com o objetivo de avaliar alterações que precederiam o desenvolvimento do câncer. A metodologia do EC permite avaliar quebras de fitas-simples e sítios álcali-lábeis, e passou a ser amplamente utilizada como teste de genotoxicidade confiável em mamíferos e células humanas (GODSCHALK *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2014). O MN também constitui uma ferramenta eficiente por ser indicativo de danos no DNA (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003). Esse teste analisa a frequência de micronúcleos que aparece elevada em tecidos expostos bem antes de sintomas clínicos evidentes, tornando-o uma valiosa ferramenta como biomarcador precoce para o risco do desenvolvimento de câncer (GARAJ-VRHOVAC e ZELJEZIC, 2001). Estudos anteriores que utilizaram essas técnicas para determinação de efeitos genotóxicos ocasionados por exposição a agrotóxicos têm mostrado resultados positivos (CASTILLO-CADENA *et al.*, 2006; ERGENE *et al.*, 2007; BAGRI *et al.*, 2016).

Dentre os agrotóxicos que são ingeridos cotidianamente nas refeições, estão a Cipermetrina (Cp) e o Metomil (Mt). A Cp é um inseticida e formicida, de nome químico (RS)- α -ciano-3-fenoxibenzil (1RS, 3RS; 1RS, 3SR)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetil

ciclopropano carboxilato ($C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$); pertence ao grupo dos piretróides e é considerada altamente tóxica. A Ingestão Diária Aceitável (IDA) é de 0,05 mg/Kg e é utilizada para cultivo de algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, ervilha, feijão, feijão-vagem, fumo, melancia, milho, pepino, repolho, soja e tomate. O Mt (S-metil-N-[(metilcarbamoil) oxi]-tioacetamidato de oxima), é do grupo químico carbamato; possui atividade inseticida e acaricida e classificado como extremamente tóxico. Seu IDA é de 0,02 mg/Kg, e pode ser utilizado em algodão, batata, couve, milho e tomate (ANVISA; 2008).

Alguns estudos têm mostrado as atividades desses pesticidas de forma isolada, porém pouco se sabe em relação aos efeitos causados a partir da mistura dessas substâncias. É comum na agricultura que diferentes formulações sejam simultaneamente utilizadas com combinações variadas dependendo da época e do tipo de cultura. Isto torna a exposição complexa, e o biomonitoramento de compostos específicos para a avaliação da exposição se torna difícil (FALCK *et al.*, 1999). Supõe-se que a associação da Cp e Mt pode potencializar seus efeitos e gerar maiores danos à saúde humana. Desta forma, avaliamos o potencial genotóxico e mutagênico de misturas de formulações comerciais do Mt e Cp em doses próximas ao IDA.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados 70 camundongos (*Swiss albino*), sendo 35 machos e 35 fêmeas, com aproximadamente oito semanas de idade, pesando em torno de 40g. Durante o experimento, os animais foram acomodados em caixas de polipropileno adequadas (cinco camundongos por caixa), mantidas em uma sala com temperatura de $22^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$, umidade relativa de $50 \pm 5\%$, com ciclo de 12 horas luz/escuro. Os animais receberam água potável e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais com os animais obedeceram às normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) (protocolo nº 23076.052054/2014-86).

Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos igualmente em sete grupos, organizados de acordo com os tratamentos realizados. Três grupos receberam a mistura dos agrotóxicos Cp (Nufarm®) e Mt (lannate® br): grupo A (0,05mg Mt + 0,0625 mg Cp), B

(0,005mg Mt + 0,0125mg Cp) e C (0,0005mg Mt + 0,00125mg Cp). Os grupos D e E receberam as maiores concentrações dos praguicidas isolados: o grupo D foi tratado com 0,05 mg de Mt e o grupo E com 0,0625 mg de Cp. O controle negativo (CN) recebeu apenas água destilada, o veículo no qual os praguicidas foram diluídos. Os animais destes grupos receberam seus respectivos tratamentos por gavagem (1 mL). O grupo controle positivo (CP) para o MN recebeu ciclofosfamida (20 mg/kg – Sigma), um agente mutagênico bem estabelecido na literatura científica, por injeção intraperitoneal. Para o CP do ensaio cometa, lâminas preparadas com o sangue dos animais do CN foram expostas a peróxido de hidrogênio a 200 mM por 10 minutos antes da etapa de eletroforese (abaixo).

Coleta de material biológico

Após 48 horas de tratamento, os camundongos foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal e 1mL de sangue periférico foi coletado de cada animal por punção retro-orbital. Logo depois, os animais sofreram eutanásia com uma injeção letal da combinação de quetamina (300 mg/kg) + xilazina (30 mg/kg).

Ensaio Cometa

Para esse teste é preciso que todo procedimento após a coleta do material seja feito em uma sala com luz vermelha (sem a presença da luz branca), pois o experimento é fotossensível. Primeiramente, 15 µL do sangue coletado foram homogeneizados com 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão, e tal mistura foi depositada em lâminas previamente preparadas com uma cobertura de agarose padrão. Estas lâminas foram cobertas com lamínulas e levadas para o refrigerador (temperatura de 4°C) por 10 minutos. Depois da refrigeração, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram depositadas em cubas (sempre protegidas da luz) com solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100, DMSO 10%, com pH 10). Após 48 horas na lise, as lâminas foram submetidas à eletroforese em uma cuba horizontal contendo solução tampão alcalino (1M NaOH e 200 mM sal dissódico EDTA, pH 13) por 20 minutos, com corrente de $\pm$ 300 mA e diferença de potencial de 32V. As lâminas que serviram de controle positivo foram expostas durante 10 minutos a uma solução de peróxido de hidrogênio a 200 mM, diluído no tampão de eletroforese entre as etapas de lise e eletroforese. Depois deste tempo, o tampão de eletroforese foi trocado por um novo e seguiu-se o protocolo convencional do ensaio cometa. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas durante 15 minutos em tampão Tris- HCl 0,4 M, pH 7,5, fixadas por 5 minutos em álcool absoluto. Para a

revelação, cada lâmina foi corada com 30µL de solução de brometo de etídio (0,0002%, p/v).

A avaliação foi feita em microscópio de fluorescência (*Zeiss-Imager*, M2), com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 546. Foram analisados 100 nucleoides por animal, com observação da relação entre o comprimento da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. Cada nucleoide analisado foi classificado em uma de cinco classes: 0 (sem dano); 1 (pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo). Desta forma, os valores obtidos para cada indivíduo podem variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4); a este valor damos o nome de índice de dano (ID) por animal. Assim, o ID foi calculado da seguinte forma:

$$\text{ID total} = 0 (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe } 0) + 1 (\text{n}^\circ \text{ classe } 1) + 2 (\text{n}^\circ \text{ classe } 2) + 3 (\text{n}^\circ \text{ classe } 3) + 4 (\text{n}^\circ \text{ classe } 4)$$

Outro parâmetro analisado foi a frequência de danos (FD%), que foi calculada de acordo com a porcentagem de todos os nucleoides com algum dano (classe 1 até classe 4) em relação ao total de nucleoides contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total) (COLLINS *et al.*, 2008). Seguindo a fórmula:

$$\text{FD} = \frac{[(\text{n}^\circ \text{ total} - \text{n}^\circ \text{ classe } 0) \cdot 100]}{\text{n}^\circ \text{ total}}$$

Teste do Micronúcleo

Cinco microlítros do sangue coletado de cada animal foram depositados em lâmina com laranja de acridina, cobrindo-se com uma lamínula para espalhar uniformemente o material biológico. As lâminas passaram por uma preparação prévia para receber o material biológico. Inicialmente, foram lavadas com detergente neutro e água destilada, depois foram banhadas em álcool 70% e depositadas em estufa (80°C) por 15 minutos. Ainda aquecidas, espalhou-se uniformemente 10 µL de laranja de acridina (1 mg/mL) em cada lâmina, depois foram colocadas para secar em temperatura ambiente (mínimo 30 minutos) (EIJL *et al.*, 1992).

Antes do MN, a citotoxicidade dos tratamentos foi analisada. Para isso, 100 eritrócitos foram avaliados, contabilizando-se a proporção de eritrócitos policromáticos (PCE) em relação ao total de eritrócitos da seguinte maneira: $\text{PCE} / (\text{PCE} + \text{NCE})$, onde NCE significa eritrócitos normocromáticos. Assim, a toxicidade de cada

tratamento é indicada por uma redução significativa (menos de 20%) na percentagem de PCE, quando o grupo tratado é comparado com o CN (RIBEIRO, 2003). Para o MN propriamente dito, 2000 PCE por animal foram analisados para se quantificar a presença de PCE micronucleados (PCEMn) (OCDE, 2014). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Zeiss-Imager M2, com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 488.

Análise Estatística

Para a análise da genotoxicidade e mutagênese, os grupos tratados e o controle negativo foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis com análise *a posteriori* usando a estratégia de fazer testes t par-a-par com correção de Bonferroni. Para se verificar a eficiência dos testes, os grupos CN e CP foram comparados entre si pelo teste de Wilcoxon. O nível de significância estabelecido em todos os testes foi $p \leq 0,05$ e o *software R* foi usado para todas as análises (RDEVELOPMENT, 2012).

Resultados e discussão

A Tabela 2 mostra os resultados para os testes do MN e do EC (ID e FD). No teste do MN, apenas o grupo que recebeu a mistura de Mt e Cp com as maiores doses mostrou aumento significativo em relação ao grupo CN ($p \leq 0,05$). A análise estatística também demonstrou neste grupo teve aumento significativo de micronúcleos quando comparado com os dois grupos que receberam os pesticidas Mt e Cp, isoladamente, nas mesmas doses (0,05 mg Mt + 0,0625 mg Cp). Nas duas comparações obteve-se $p < 0,001$.

Os resultados do EC demonstraram que apenas o grupo tratado com Mt isolado não apresentou diferença significativa com o CN; os demais tratamentos mostraram efeitos genotóxicos tanto para ID quanto para FD%. Quando os grupos foram comparados entre si, verificou-se que as misturas nas três doses tiveram aumento significativo no ID e no FD em relação aos resultados dos grupos tratados com os praguicidas isolados. Em todos os casos obteve-se $p < 0,001$.

Sob as condições experimentais deste estudo, os resultados demonstram que a mistura de Mt e Cp apresenta efeitos genotóxicos e mutagênicos maiores do que os praguicidas isolados. Os resultados do EC sugerem que, mesmo quando a dose dos praguicidas na mistura é 50 vezes menor do que a dose dos praguicidas isolados, o tratamento com a mistura de Mt e Cp ainda causa mais danos no DNA do que o tratamento com tais praguicidas isolados. Em relação aos efeitos mutagênicos, a mistura dos praguicidas causou aumento no número de micronúcleos em relação a

ambos os praguicidas isolados nas mesmas doses, mas não quando as doses nas misturas eram menores.

Alguns trabalhos anteriores analisaram os efeitos causados pela exposição a vários praguicidas simultaneamente e evidenciaram danos genotóxicos causados tanto por misturas contendo Mt (LANDER *et al.*, 2000; PASTOR *et al.*, 2001), como por misturas contendo Cp (RUPA *et al.*, 1989a; b). Muchut avaliou a Cp e o Glifosato, isolados e misturados. Os resultados mostraram que tanto as formulações isoladas como a mistura apresentaram um índice de dano significativo (MUCHUT *et al.*, 2011). Kocaman também observou danos no DNA de linfócitos causados pela mistura de α -cipermetrina e acetamiprida (KOCAMAN e TOPAKTAŞ, 2010).

Tabela 2.1: Resultados dos testes de micronúcleo e ensaio cometa

	Testes		
	MN	ID	FD
Grupos	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
CN	3.1 (1.19)	18.3 (6.41)	15.1 (4.86)
A	8.2* (2.09)	128.8* (24.09)	61.7* (9.29)
B	2.6 (1.26)	113.4* (29.27)	71.9* (6.95)
C	3.0 (1.33)	89.7* (26.68)	70.1* (10.17)
D	1.5 (1.26)	36.9 (18.29)	21.1 (9.64)
E	2.5 (2.12)	47.7* (9.52)	26.9* (4.68)
CP	49.5* (23.88)	341.6* (26.33)	100* (0.00)

MN: micronúcleo; ID: índice de dano pelo ensaio cometa; FD: frequência de dano em percentagem pelo ensaio cometa; DP: desvio padrão; * = diferença significativa com o controle negativo; A (0,05mg Mt + 0,0625 mg Cp); B (0,005mg Mt + 0,0125mg Cp); C (0,0005mg Mt + 0,00125mg Cp); D: Mt 0,05mg e o E: Cp 0,0625 mg; CN: controle negativo; CP: Controle positivo.

Essas análises são de suma importância, pois há escassez de trabalhos que analisem a exposição de populações a diversos agrotóxicos simultaneamente, o que corresponde à realidade mais frequente atualmente (MATOS *et al.*, 2002). A aplicação de vários praguicidas em plantações é comum no Brasil e no resto do mundo, fazendo com que a população seja exposta a uma mistura de defensivos agrícolas através da dieta (JACOBSEN *et al.*, 2004).

Isoladamente, a Cp apresentou danos significativos pelo EC e os impactos causados pelo Mt isolado não foram estatisticamente significativos em nenhum dos testes realizados. Os trabalhos com a Cp focam mais no seu potencial de combate e

controle de parasitas (VEROCAI *et al.*, 2008; CAMILLO *et al.*, 2009; BARATA *et al.*, 2011). Seus efeitos nocivos em relação à genotoxicidade ainda são pouco abordados, principalmente na saúde humana. Seus impactos foram testados em populações de peixes e, naquelas condições experimentais, não foi visto efeito mutagênico significativo (MOREIRA-NETO e NETO, 2010). Já o efeito genotóxico foi evidenciado em uma pesquisa com tecidos e órgãos de camundongos (PATEL *et al.*, 2006). O mesmo foi observado neste estudo, no qual a Cp isolada apresentou apenas atividade genotóxica.

Em relação ao Mt, alguns trabalhos publicados por agências de controle não relataram efeito genotóxico tanto *in vitro* como *in vivo* (SAMUELS, 1993), o que também foi evidenciado neste estudo. No entanto, outros experimentos já verificaram danos significativos no DNA (PEREIRA e GONÇALVES, 2007; GUANGGANG *et al.*, 2013). Isso pode ser explicado pelas altas doses testadas na maioria dos trabalhos recentes, afastando-se do IDA sugerido pela ANVISA e por outras agências de controle (MAHGOUB e EL-MEDANY, 2001; PEREIRA e GONÇALVES, 2007; PEREIRA *et al.*, 2009).

Em relação aos testes utilizados neste estudo, nossos resultados demonstraram que o EC apresenta maior sensibilidade do que o teste do MN. Ambos estão bem estabelecidos na literatura e muitos pesquisadores costumam relacionar os resultados de um e de outro. Kim e Hyun expuseram organismos aquáticos a dois diferentes agentes químicos e ao compararem os resultados do EC com os do MN, verificaram elevada concordância entre os testes, com maior sensibilidade do EC em detectar danos (KIM e HYUN, 2006). Essa evidência também foi observada em outros estudos (HARTMANN *et al.*, 2001; KLOBUČAR *et al.*, 2003; ARANHA, 2013). Essa maior sensibilidade pode ser decorrente da natureza do dano que cada teste detecta. O MN identifica danos bruscos ao DNA, o EC uma quebra mais sutil (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998). Além disso, a menor sensibilidade do MN também pode ser explicada pelo sistema de reparo da célula, de modo que este teste só detecta quebras estabelecidas, enquanto o EC pode detectar lesões genômicas que podem ser ainda reparadas por enzimas celulares (MOZETO e ZAGATTO, 2006).

Conclusão

Em nossas condições experimentais, a associação do Mt com a Cp apresentou maior dano genotóxico e mutagênico do que os praguicidas isolados. Todas as misturas, mesmo em doses consideradas seguras pela ANVISA, apresentaram risco para saúde do consumidor. Estudos como estes são indispensáveis, pois o

conhecimento científico a respeito dos riscos associados ao uso dos agrotóxicos tende a ser desenvolvido a partir da comercialização destes produtos. Os resultados observados servem para alertar sobre os impactos desses defensivos agrícolas na saúde humana, além de agregar mais informações que impulsionam os órgãos competentes a realizarem rigorosas reanálises desses produtos, propondo, quando necessário, mudança da formulação, doses (IDA) ou método de aplicação, amenizando os riscos para população exposta.

REFERÊNCIAS

AMARAL, A. F. Pesticides and asthma: challenges for epidemiology. **Frontiers in public health**, v. 2, 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Metomil Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8edbab00474596939e7fde3fbc4c6735/m17.pdf?MOD=AJPERES> >. Acesso em: 20 de fevereiro.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Cipermetrina 2008. Disponível em: < <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B23506-1-0%5D.PDF> >. Acesso em: 20 de fevereiro.

ARANHA, R. C. **Potencial de toxicidade dos herbicidas glifosato e imazetapir em Colossoma macropomum (PISCES)**. p.56. 2013

ARAÚJO, A. C.; NOGUEIRA, D. P.; AUGUSTO, L. G. Pesticide impact on health: a study of tomato cultivation. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 309-313, 2000. ISSN 0034-8910.

BAGRI, P.; KUMAR, V.; SIKKA, A. K. Assessment of imidacloprid-induced mutagenic effects in somatic cells of Swiss albino male mice. **Drug and Chemical Toxicology**, p. 1-6, 2016. ISSN 0148-0545.

BARATA, R. A. et al. Assessment of sand fly (Diptera, Psychodidae) control using cypermethrin in an endemic area for visceral leishmaniasis, Montes Claros, Minas Gerais State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 11, p. 2117-2123, 2011. ISSN 0102-311X.

CALDAS, E.; DE SOUZA, L. [Assessment of the chronic risk for ingestion of pesticide residues in the Brazilian diet]. **Revista de saúde publica**, v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000. ISSN 0034-8910.

CAMILLO, G. et al. In vitro evaluation of acaricides efficiency to bovine's ticks of Rio Grande do Sul State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 490-495, 2009. ISSN 0103-8478.

CASTILLO-CADENA, J. et al. Determination of DNA damage in floriculturists exposed to mixtures of pesticides. **BioMed Research International**, v. 2006, 2006. ISSN 1110-7243.

COLLINS, A. et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 759, p. 27-39, 2014. ISSN 1383-5742.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008. ISSN 0267-8357.

EIJI, Y. et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides with triethylenemelamine. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 278, n. 2, p. 127-130, 1992. ISSN 0165-1218.

ERGENE, S. et al. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. **Environment international**, v. 33, n. 7, p. 877-885, 2007. ISSN 0160-4120.

FALCK, G. C.-M. et al. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. **Mutation Research/Genetic toxicology and environmental Mutagenesis**, v. 441, n. 2, p. 225-237, 1999. ISSN 1383-5718.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. **Toxicology**, v. 165, n. 2, p. 153-162, 2001. ISSN 0300-483X.

GODSCHALK, R. W. et al. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 757, n. 1, p. 60-67, 2013. ISSN 1383-5718.

GUANGGANG, X. et al. Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 352-358, 2013. ISSN 0278-6915.

HARTMANN, A. et al. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 8, p. 843-858, 2001. ISSN 0278-6915.

JACOBSEN, H. 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**, v. 42, n. 8, p. 1269-1277, 2004. ISSN 0278-6915.

KIM, I.-Y.; HYUN, C.-K. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 64, n. 3, p. 288-297, 2006. ISSN 0147-6513.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 540, n. 2, p. 153-163, 2003. ISSN 1383-5718.

KLOBUČAR, G. I. et al. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquatic toxicology**, v. 64, n. 1, p. 15-23, 2003. ISSN 0166-445X.

KOCAMAN, A. Y.; TOPAKTAŞ, M. Genotoxic effects of a particular mixture of acetamiprid and α -cypermethrin on chromosome aberration, sister chromatid exchange, and micronucleus formation in human peripheral blood lymphocytes. **Environmental toxicology**, v. 25, n. 2, p. 157-168, 2010. ISSN 1522-7278.

LANDER, F. et al. Chromosome aberrations in pesticide-exposed greenhouse workers. **Scandinavian journal of work, environment & health**, p. 436-442, 2000. ISSN 0355-3140.

MAHGOUB, A. A.; EL-MEDANY, A. H. Evaluation of chronic exposure of the male rat reproductive system to the insecticide methomyl. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 2, p. 73-80, 2001. ISSN 1043-6618.

MATOS, G. B.; SANTANA, O. A. M. D.; NOBRE, L. C. D. C. Intoxicação por agrotóxico. In: (Ed.). **Manual de normas e procedimentos técnicos para a vigilância da saúde do trabalhador**: Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador, 2002. p.249-280.

MITCHELMORE, C.; CHIPMAN, J. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 2, p. 135-147, 1998. ISSN 0027-5107.

MOREIRA-NETO, J. F. M. N.; NETO, J. M. TESTE DE MICRONÚCLEO E ESTERASES COMO BIOMARCADORES DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DA CIPERMETRINA. **Horizonte Científico**, v. 3, n. 2, 2010. ISSN 1808-3064.

MOZETO, A.; ZAGATTO, P. Ecotoxicologia aquática—princípios e aplicações. **ZAGATTO, PA. and BERTOLETTI, E. Introdução de agentes químicos no ambiente**. São Carlos: Rima Editora, p. 15-38, 2006.

MUCHUT, S. et al. Evaluación de genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a mezclas de biocidas mediante electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa). **FABICIB**, v. 15, n. 1, p. 108-118, 2011. ISSN 2362-5546.

OCDE. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, 2014. Disponível em: < <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9714541e.pdf?expires=1455135783&id=id&accname=guest&checksum=FAA3E240036470DE7F48522BC3B7FFFA> >.

PASTOR, S. et al. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 495, n. 1, p. 147-156, 2001. ISSN 1383-5718.

PATEL, S. et al. Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: evidence from the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 607, n. 2, p. 176-183, 2006. ISSN 1383-5718.

PEREIRA, J. L. et al. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 4, p. 455-463, 2009. ISSN 0963-9292.

PEREIRA, J. L.; GONÇALVES, F. Effects of food availability on the acute and chronic toxicity of the insecticide methomyl to *Daphnia* spp. **Science of the total environment**, v. 386, n. 1, p. 9-20, 2007. ISSN 0048-9697.

PERES, F. et al. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Cien Saude Colet**, v. 10, n. Supl, 2005.

RDEVELOPMENT, C. TEAM 2009: R: A Language and Environment for Statistical Computing. **Vienna, Austria**. Internet: <http://www.R-project.org>, 2012.

RIBEIRO, L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. **Mutagênese Ambiental. ULBRA, Canoas**, p. 173-178, 2003.

RICHTER, E.; CHLAMTAC, N. Ames, pesticides, and cancer revisited. **International journal of occupational and environmental health**, v. 8, n. 1, p. 63-72, 2001. ISSN 1077-3525.

RUPA, D.; REDDY, P.; REDDI, O. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of cotton field workers exposed to pesticides. **Environmental research**, v. 49, n. 1, p. 1-6, 1989a. ISSN 0013-9351.

_____. Frequencies of chromosomal aberrations in smokers exposed to pesticides in cotton fields. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 222, n. 1, p. 37-41, 1989b. ISSN 0165-1218.

SAMUELS, S. METHOMYL (addendum). **Pesticide Residues in Food**, n. 73, p. 101, 1993.

VEROCAI, G. et al. Efficacy of cypermethrin on the control of *Struthiolipeurus* spp. (Phthiraptera: Philopteridae) in ostrich. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1274-1276, 2008. ISSN 0102-0935.

3 CONCLUSÃO GERAL

Os praguicidas Mt e Cp foram capazes de induzir danos genéticos, mesmo em concentrações consideradas seguras para a saúde; os danos genéticos aumentam quando os praguicidas são ingeridos simultaneamente. Estes resultados demonstram a importância de se analisar o potencial genotóxico e mutagênico de misturas de agrotóxicos. Os produtos agrícolas costumam apresentar resíduos de diferentes princípios ativos simultaneamente. Assim, o consumidor se expõe a diferentes praguicidas cada vez que consome esses produtos. Estudos de genética toxicológica, e de toxicologia em geral, se limitam a testar princípios ativos isolados, o que dificilmente reflete a realidade da exposição humana e ambiental a substâncias tóxicas. No caso dos agrotóxicos, uma visão mais holística da exposição e dos efeitos é necessária no sentido de proteger as pessoas e organismos não-alvo. Tanto estudos acadêmicos, quanto de órgãos de saúde e ambientais deveriam considerar rigorosas reanálises desses produtos, além de fiscalização e mudanças nas formulações e doses seguras (IDA). Por fim, mais estudos precisam ser realizados para demonstrar os efeitos à saúde e ao ambiente ocasionados por misturas de agrotóxicos.

REFERÊNCIAS

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Consulta de ingrediente ativo. 2003. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 de fevereiro.

AKTAR, M. W. et al. Degradation dynamics of an oxime carbamate insecticide (methomyl) in aqueous medium of varying pH under laboratory simulated condition. **Orbital-The Electronic Journal of Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 225-234, 2011. ISSN 1984-6428.

AKYIL, D.; KONUK, M. Detection of genotoxicity and mutagenicity of chlorthiophos using micronucleus, chromosome aberration, sister chromatid exchange, and Ames tests. **Environmental toxicology**, v. 30, n. 8, p. 937-945, 2015. ISSN 1522-7278.

ALIMENTARIUS, C. Pesticide Residues in Food: Methods of Analysis and Sampling, part 1. **CODEX ALIMENTARIUS, Roma**, 2000.

ALVES, A. Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? Consumo: usos e abusos. **Ciência Hoje, São Paulo**, v. 4, n. 22, p. 49-52, 1986.

AMARAL, A. F. Pesticides and asthma: challenges for epidemiology. **Frontiers in public health**, v. 2, 2014.

AMES, B. N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. **science**, v. 204, n. 4393, p. 587-593, 1979. ISSN 0036-8075.

ANDEF, A. N. D. V. Tecnologia em primeiro lugar: o Brasil a caminho de se tornar o maior produtor mundial de grãos. **Revista Defesa Vegetal** 2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Metomil
Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8edbab00474596939e7fde3fbc4c6735/m17.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 de fevereiro.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Cipermetrina
2008. Disponível em: < <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B23506-1-0%5D.PDF> >. Acesso em: 20 de fevereiro.

_____. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos 2011.
Disponível em: < <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/z> >. Acesso em: 20 de janeiro.

ARANHA, R. C. **Potencial de toxicidade dos herbicidas glifosato e imazetapir em Colossoma macropomum (PISCES)**. p.56. 2013

ARAÚJO, A. C.; NOGUEIRA, D. P.; AUGUSTO, L. G. Pesticide impact on health: a study of tomato cultivation. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 309-313, 2000. ISSN 0034-8910.

ARREBOLA, J. P. et al. Risk of female breast cancer and serum concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls: a case-control study in Tunisia. **Science of the total environment**, v. 520, p. 106-113, 2015. ISSN 0048-9697.

ASHBY, J. Comparison of techniques for monitoring human exposure to genotoxic chemicals. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 204, n. 3, p. 543-551, 1988. ISSN 0165-1218.

AUGUSTO, L. G. D. S. et al. Avaliação crítica do programa de erradicação do *Aedes aegypti*: contribuições técnicas para medidas de controle. **Rev. IMIP**, v. 14, n. 1, p. 90-7, 2000. ISSN 0102-8847.

BAGRI, P.; KUMAR, V.; SIKKA, A. K. Assessment of imidacloprid-induced mutagenic effects in somatic cells of Swiss albino male mice. **Drug and Chemical Toxicology**, p. 1-6, 2016. ISSN 0148-0545.

BALDISSERA, M. D. et al. Relationship between DNA damage in liver, heart, spleen and total blood cells and disease pathogenesis of infected rats by *Trypanosoma evansi*. **Experimental parasitology**, v. 161, p. 12-19, 2016. ISSN 0014-4894.

BARATA, R. A. et al. Assessment of sand fly (Diptera, Psychodidae) control using cypermethrin in an endemic area for visceral leishmaniasis, Montes Claros, Minas Gerais State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 11, p. 2117-2123, 2011. ISSN 0102-311X.

BATISTA, C. R.; CAMPOS, E. O. AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE PACIENTES FUMANTES E NÃO FUMANTES POR MEIO DO TESTE DO MICRONÚCLEO. **Revista GeTeC**, v. 3, n. 6, 2015. ISSN 2238-4405.

BEDOR, C. N. G. **Estudo do potencial carcinogênico dos agrotóxicos empregados na fruticultura e sua implicação para a vigilância da saúde**. 2008.

BHUNYA, S.; PATI, P. Genotoxic effects of a synthetic pyrethroid insecticide, cypermethrin, in mice in vivo. **Toxicology letters**, v. 41, n. 3, p. 223-230, 1988. ISSN 0378-4274.

BOLOGNESI, C.; MORASSO, G. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 4, p. 182-187, 2000. ISSN 0924-2244.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. . Brasília, 1997. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>>. Acesso em: 20 de fevereiro.

BRASIL; ABASTECIMENTO, M. D. A. E. D. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989: Dispõe sobre a pesquisa, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o

controle, a inspeção ea fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Legislação federal de agrotóxicos e afins**, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes para Atenção Integral à Saúde do Trabalhador de Complexidade Diferenciada: Protocolo de Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos a agrotóxicos., Brasília, 2006.

BULL, D.; HATHAWAY, D. Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo. 1986.

CALDAS, E.; DE SOUZA, L. [Assessment of the chronic risk for ingestion of pesticide residues in the Brazilian diet]. **Revista de saúde pública**, v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000. ISSN 0034-8910.

CALDAS, E. et al. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 11, p. 1877-1883, 2004. ISSN 0278-6915.

CALDAS, E. D. Resíduos de pesticidas em alimentos e o Codex Alimentarius. **Bol SBCTA**, v. 33, n. 1, p. 50-56, 1999.

CAMAROTTO, J. A. C., D. M.; BRASIL, F.; . **Riscos no setor, alimentação e trabalho rural: A saúde do trabalhador rural e o risco invisível dos agrotóxicos** 2004. Engenharia de Produção Química

CAMILLO, G. et al. In vitro evaluation of acaricides efficiency to bovine's ticks of Rio Grande do Sul State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 490-495, 2009. ISSN 0103-8478.

CARAPETO, C. Poluição das águas. **Lisboa: Universidade Aberta**, 1999.

CARBAJAL-LÓPEZ, Y. et al. Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 3, p. 2513-2520, 2016. ISSN 0944-1344.

CARNEIRO, F. F. et al. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. 2015.

CARON-BEAUDOIN, É.; DENISON, M. S.; SANDERSON, J. T. Effects of neonicotinoids on promoter-specific expression and activity of aromatase (CYP19) in human adrenocortical carcinoma (H295R) and primary umbilical vein endothelial (HUVEC) cells. **Toxicological Sciences**, v. 149, n. 1, p. 134-144, 2016. ISSN 1096-6080.

CARRARO, G. Agrotóxico e meio ambiente: uma proposta de ensino de ciências e química. **Porto Alegre: Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 1997.

- CARVALHO, P. H. V. D. **Desenvolvimento de método para determinação de resíduos de pesticidas em plantas medicinais Cordia salicifolia por GC/MS e HPLC/UV empregando dispersão da matriz em fase sólida**. 68 p. Dissertação-Universidade Federal do Sergipe. Sergipe 2009.
- CASTILLO-CADENA, J. et al. Determination of DNA damage in floriculturists exposed to mixtures of pesticides. **BioMed Research International**, v. 2006, 2006. ISSN 1110-7243.
- CHEN, Z.-M.; WANG, Y.-H. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 754, n. 1, p. 367-395, 1996. ISSN 0021-9673.
- CHOY, W. N. Genotoxic and non-genotoxic mechanisms of carcinogenesis. **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**, p. 47-72, 2001.
- CO-OPERATION, O. F. E.; DEVELOPMENT. **Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**. OECD Publishing, 2014. ISBN 9264224173.
- COLLINS, A. et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 759, p. 27-39, 2014. ISSN 1383-5742.
- COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008. ISSN 0267-8357.
- COX, M.; LEHNINGER, N. D. Principios de bioquímica. **São Paulo**, 2006.
- CUNNINGHAM, M. L.; MATTHEWS, H. Cell proliferation as a determining factor for the carcinogenicity of chemicals: studies with mutagenic carcinogens and mutagenic noncarcinogens. **Toxicology letters**, v. 82, p. 9-14, 1995. ISSN 0378-4274.
- DA COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Projeto Genoma do Câncer**, p. 24, 2000.
- DA SILVA AUGUSTO, L. G. et al. Micronucleus monitoring to assess human occupational exposure to organochlorides. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 29, n. 1, p. 46-52, 1997. ISSN 1098-2280.
- DA SILVA FILHO, J. et al. Intoxicação alimentar provocada por consumo de tapiocas contidas com carbamato em Sobral, Ceará, Brasil. **SANARE-Revista de Políticas Públicas**, v. 7, n. 1, 2008a. ISSN 2317-7748.
- _____. Intoxicação alimentar provocada por consumo de tapiocas contaminadas com carbamato em sobral, ceará, brasil. **SANARE-Revista de Políticas Públicas**, v. 7, n. 1, 2008b. ISSN 2317-7748.
- DA SILVA, J. M. et al. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciênc Saúde Coletiva**, v. 10, n. 4, p. 891-903, 2005.

DAS, B. K.; MUKHERJEE, S. C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 134, n. 1, p. 109-121, 2003. ISSN 1532-0456.

DE MOURA, R. M. RACHEL CARSON E OS AGROTÓXICOS 45 ANOS APÓS PRIMAVERA SILENCIOSA. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 5, p. 44-52, 2013. ISSN 1980-0258.

_____. Agrotóxicos: Heróis ou vilões? A face da questão que todos devem saber. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 4, p. 23-49, 2014. ISSN 1980-0258.

DE SOUZA, A. P. et al. Genotoxicidade associada ao extrato das folhas de *Cynara scolymus* L. em células humanas HepG2. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, v. 1, n. 11, 2013. ISSN 2317-4323.

DE SOUZA MENDONÇA, F. et al. Intoxicação por diclorvós e cipermetrina em bovinos em Mato Grosso—relato de caso. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 743-749, 2010. ISSN 1809-6891.

DE SOUZA OLIVEIRA, S. **O papel da avaliação de riscos no gerenciamento de produtos agrotóxicos: diretrizes para a formulação de políticas públicas**. 2005. Universidade de São Paulo

DELLA LUCIA, T.; CHANDLER, L. Tabela de vida das culturas aplicada as pragas de *Phaseolus vulgaris* L., sob tratamentos com carbofuran, em quatro níveis de adubação NPK. Parte de tese. **Revista Ceres**, 1985. ISSN 0034-737X.

DOMINGUES, M. R. et al. Agrotóxicos: risco à saúde do trabalhador rural. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 45-54, 2004. ISSN 1679-0367.

EIJI, Y. et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides with triethylenemelamine. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 278, n. 2, p. 127-130, 1992. ISSN 0165-1218.

ERGENE, S. et al. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. **Environment international**, v. 33, n. 7, p. 877-885, 2007. ISSN 0160-4120.

FALCK, G. C. M. et al. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. **Mutation Research/Genetic toxicology and environmental Mutagenesis**, v. 441, n. 2, p. 225-237, 1999. ISSN 1383-5718.

FARRÉ, M. et al. Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 373, n. 8, p. 704-709, 2002. ISSN 1618-2642.

FAUST, F. et al. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 566, n. 3, p. 209-229, 2004. ISSN 1383-5742.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 81-95, 2000. ISSN 0027-5107.

_____. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007. ISSN 1754-2189.

_____. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. **Health physics**, v. 98, n. 2, p. 234-243, 2010. ISSN 0017-9078.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011. ISSN 0267-8357.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do Micronúcleo: Uma triagem para avaliação genotóxica. **Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2009. ISSN 2176-9206.

FONTENELE, E. G. P. et al. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecologia australis**, v. 14, n. 1, p. 282-298, 2010. ISSN 2177-6199.

GAIVÃO, I.; SIERRA, L. M. Drosophila comet assay: insights, uses, and future perspectives. **30 years of the Comet Assay: an overview with some new insights**, p. 13, 2015. ISSN 2889196496.

GALERA, M. M. et al. Determination of cypermethrin, fenvalerate and cis-and trans-permethrin in soil and groundwater by high-performance liquid chromatography using partial least-squares regression. **Journal of Chromatography A**, v. 727, n. 1, p. 39-46, 1996. ISSN 0021-9673.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. **Toxicology**, v. 165, n. 2, p. 153-162, 2001. ISSN 0300-483X.

GARCIA, E. G. Segurança e saúde no trabalho rural: a questão dos agrotóxicos. In: (Ed.). **Segurança e saúde no trabalho rural: a questão dos agrotóxicos**: Fundacentro, 2001.

GARRETT, N. et al. Genotoxic and carcinogenic potential of anticholinesterases. **BUTTERWORTH-HEINEMANN, STONEHAM, MA(USA). 1992.**

GATEHOUSE, D. et al. Bacterial mutation assays. **Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part**, v. 1, p. 13-61, 1990.

GODSCHALK, R. W. et al. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 757, n. 1, p. 60-67, 2013. ISSN 1383-5718.

GONÇALVES, C. D. P. Avaliação dos danos genotóxicos ao DNA de camundongos expostos a hortaliças cultivadas sobre depósitos controlados de rejeitos de carvão. 54p. CRICIÚMA 2013.

GONÇALVES, M. W. et al. Avaliação de Danos Genômicos em Anfíbios Anuros do Cerrado Goiano. **Estudos**, v. 41, p. 89-104, 2015. ISSN 1983-781X.

GONTIJO, A.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. **Mutagênese ambiental. Canoas: Ulbra**, p. 173-200, 2003.

GRISOLIA, C. K. Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. **Brasília: Universidade de Brasília**, 2005.

GUANGGANG, X. et al. Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 352-358, 2013. ISSN 0278-6915.

HARTMANN, A. et al. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 8, p. 843-858, 2001. ISSN 0278-6915.

HAYASHI, M. et al. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 2, p. 125-133, 1998. ISSN 0027-5107.

HAYES, W. J.; LAWS, E. R. Handbook of pesticide toxicology. In: (Ed.). **Handbook of pesticide toxicology**: Academic Press, 1991.

HEDDLE, J. A. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983. ISSN 0165-1110.

HILL, A. Residue variability and sampling practical problems and consequences for residues monitoring. **Food Additives & Contaminants**, v. 17, n. 7, p. 539-546, 2000. ISSN 0265-203X.

IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Portaria Normativa IBAMA N° 84. 1996. Disponível em: < servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf >. Acesso em: 15 de fevereiro.

- JACOBSEN, H. 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**, v. 42, n. 8, p. 1269-1277, 2004. ISSN 0278-6915.
- JAENSSON, A. et al. Effects of a pyrethroid pesticide on endocrine responses to female odours and reproductive behaviour in male parr of brown trout (*Salmo trutta* L.). **Aquatic toxicology**, v. 81, n. 1, p. 1-9, 2007. ISSN 0166-445X.
- JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. D. A.; QUEIROZ, S. C. D. N. D. Residues of pesticides in food: a global environmental preoccupation-Focussing on apples. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009. ISSN 0100-4042.
- JUNIOR, D. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J Bras Pneumol**, v. 31, n. Suppl 1, p. 60-68, 2005.
- KAHL, V. F. S. et al. A influência da origem geográfica de amostras de acerola (*Malpighia glabra* L.) em relação ao seu potencial genotóxico e antígenotóxico. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, v. 7, n. 7, 2015. ISSN 2317-4323.
- KAŠUBA, V. et al. 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, n. 7, p. 807-818, 2012. ISSN 0340-0131.
- KICKBUSCH, I. Promoción de la salud: una perspectiva mundial. **Promoción de la salud: una antología**, p. 15-24, 1996.
- KIM, I.-Y.; HYUN, C.-K. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 64, n. 3, p. 288-297, 2006. ISSN 0147-6513.
- KINOSHITA, H. et al. Application of energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDX) in a case of methomyl ingestion. **Forensic science international**, v. 227, n. 1, p. 103-105, 2013. ISSN 0379-0738.
- KIRSCH-VOLDERS, M. The CB in vitro micronucleus assay in human lymphocytes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 392, n. 1-2, 1997.
- KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 540, n. 2, p. 153-163, 2003. ISSN 1383-5718.
- KLOBUČAR, G. I. et al. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquatic toxicology**, v. 64, n. 1, p. 15-23, 2003. ISSN 0166-445X.
- KOCAMAN, A. Y.; TOPAKTAŞ, M. Genotoxic effects of a particular mixture of acetamiprid and α -cypermethrin on chromosome aberration, sister chromatid exchange,

and micronucleus formation in human peripheral blood lymphocytes. **Environmental toxicology**, v. 25, n. 2, p. 157-168, 2010. ISSN 1522-7278.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 544, n. 2, p. 305-311, 2003. ISSN 1383-5742.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 155-166, 2000. ISSN 0027-5107.

KUMAR, A.; SHARMA, B.; PANDEY, R. S. Preliminary evaluation of the acute toxicity of cypermethrin and λ -cyhalothrin to *Channa punctatus*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 79, n. 6, p. 613-616, 2007. ISSN 0007-4861.

KUNST, L. R. et al. Medial olivocochlear system and genotoxicity in students of the tobacco-producing region. **Revista CEFAC**, v. 16, n. 6, p. 1751-1762, 2014. ISSN 1516-1846.

LANDER, F. et al. Chromosome aberrations in pesticide-exposed greenhouse workers. **Scandinavian journal of work, environment & health**, p. 436-442, 2000. ISSN 0355-3140.

LEE, W. J. et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to alachlor in the Agricultural Health Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 159, n. 4, p. 373-380, 2004. ISSN 0002-9262.

LOUREIRO, A. P. M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 777-793, 2002. ISSN 0100-4042.

LOURO, M. H. Nanomateriais manufaturados: avaliação de segurança através da caracterização dos seus efeitos genéticos. 240p. Tese - Universidade de Nova Lisboa. Lisboa, 2014.

LUCCHESI, G. Agrotóxicos—construção da legislação. **Brasília, DF: Consultoria Legislativa**, 2005.

LUZ, N. B. S., H. P.; MELO, G. W. . Avaliação da resposta spectral de folhas de aveia preta (*Avena strigosa*) cultivadas em diferentes solos da Serra Gaúcha, com adição de cobre e material orgânico. **In: anais do SBSR**, 2003.

MACHEMER, L. H.; PICKEL, M. Carbamate insecticides. **Toxicology**, v. 91, n. 1, p. 29-36, 1994. ISSN 0300-483X.

MAHGOUB, A. A.; EL-MEDANY, A. H. Evaluation of chronic exposure of the male rat reproductive system to the insecticide methomyl. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 2, p. 73-80, 2001. ISSN 1043-6618.

MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515-1531, 2006. ISSN 0300-9084.

MATOS, G. B.; SANTANA, O. A. M. D.; NOBRE, L. C. D. C. Intoxicação por agrotóxico. In: (Ed.). **Manual de normas e procedimentos técnicos para a vigilância da saúde do trabalhador**: Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador, 2002. p.249-280.

MATOZO, F.; TUREK, J. A.; NOLETO, R. B. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DO FUNGICIDA RIDOMIL EM *Astyanax altiparanae* (PISCES, CHARACIFORMES). **LUMINÁRIA**, v. 17, n. 01, 2015. ISSN 2359-4373.

MENEGUETTI, D. U. D. O.; FACUNDO, V. A. Análise genotóxica e antiparasitária de extratos e substâncias isoladas de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae), Chichuá (Xixuá) amazônico. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 4, p. 69-70, 2015. ISSN 2176-6223.

MEYER, A. et al. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental research**, v. 93, n. 3, p. 264-271, 2003. ISSN 0013-9351.

MIDIO, A. F.; SILVA, E. S. D. **Inseticidas-acaricidas organofosforados e carbamatos**. Roca, 1995. ISBN 8572411135.

MITCHELMORE, C.; CHIPMAN, J. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 2, p. 135-147, 1998. ISSN 0027-5107.

MONTANHA, F. et al. Clinical, biochemical and haemathological effects in *Rhamdia quelen* exposed to cypermethrin. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 3, p. 697-704, 2014. ISSN 0102-0935.

MOREIRA-NETO, J. F. M. N.; NETO, J. M. Teste de micronúcleo e esterases como biomarcadores dos efeitos genotóxicos da cipermetrina. **Horizonte Científico**, v. 3, n. 2, 2010. ISSN 1808-3064.

MORON, S. E. et al. Estudo de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida atrazina. **J Braz Soc Ecotox**, v. 1, n. 1, p. 27-30, 2006.

MOURA, A. O. Síntese e aplicação de Magadiíta na liberação controlada de herbicidas. 2008.126 f. **Química Inorgânica, Instituto de Química-UnB, Brasília**, 2008.

MOURA, D. C. D.; RIEGER, A.; ALCAYAGA, E. A. L. Utilização do ensaio cometa com *daphnia magna* (STRAUS, 1820) como organismo bioindicador para a avaliação da qualidade da água das nascentes do arroio andreas, rs, brasil. **Seminário de Iniciação Científica**, p. 25, 2015.

MOZETO, A.; ZAGATTO, P. Ecotoxicologia aquática–princípios e aplicações. **ZAGATTO, PA. and BERTOLETTI, E. Introdução de agentes químicos no ambiente.** São Carlos: Rima Editora, p. 15-38, 2006.

MUCHUT, S. et al. Evaluación de genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a mezclas de biocidas mediante electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa). **FABICIB**, v. 15, n. 1, p. 108-118, 2011. ISSN 2362-5546.

MUKHOPADHYAY, I. et al. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 19, n. 2, p. 85-90, 2004. ISSN 0267-8357.

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1, p. 3-16, 2002. ISSN 0027-5107.

OBE, G. et al. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1, p. 17-36, 2002. ISSN 0027-5107.

OCDE. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, 2014. Disponível em: < <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9714541e.pdf?expires=1455135783&id=id&accname=guest&checksum=FAA3E240036470DE7F48522BC3B7FFFA> >.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984. ISSN 0006-291X.

PADILLA, S. et al. Time course of cholinesterase inhibition in adult rats treated acutely with carbaryl, carbofuran, formetanate, methomyl, methiocarb, oxamyl or propoxur. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 219, n. 2, p. 202-209, 2007. ISSN 0041-008X.

PASCUAL, J. A.; PERIS, S. J. Effects of forest spraying with two application rates of cypermethrin on food supply and on breeding success of the blue tit (*Parus caeruleus*). **Environmental toxicology and chemistry**, v. 11, n. 9, p. 1271-1280, 1992. ISSN 1552-8618.

PASTOR, S. et al. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 495, n. 1, p. 147-156, 2001. ISSN 1383-5718.

PATEL, S. et al. Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: evidence from the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 607, n. 2, p. 176-183, 2006. ISSN 1383-5718.

PELAEZ, V.; DA SILVA, L. R.; ARAÚJO, E. B. Regulation of pesticides: A comparative analysis*. **Science and Public Policy**, v. 40, n. 5, p. 644-656, 2013. ISSN 0302-3427.

PELAEZ, V.; TERRA, F. H. B.; DA SILVA, L. R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, v. 36, n. 1, 2011. ISSN 2316-9397.

PEREIRA, J. L. et al. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 4, p. 455-463, 2009. ISSN 0963-9292.

PEREIRA, J. L.; GONÇALVES, F. Effects of food availability on the acute and chronic toxicity of the insecticide methomyl to *Daphnia* spp. **Science of the total environment**, v. 386, n. 1, p. 9-20, 2007. ISSN 0048-9697.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2003. ISBN 8575413171.

PERES, F. et al. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Cien Saude Colet**, v. 10, n. Supl, 2005.

PIGNATI, W. A. Saúde - doença dos trabalhadores rurais e os agrotóxicos. 2005. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/trabalhador/pdf/texto_agrotoxicos.pdf >. Acesso em: 13 fevereiro.

PIMENTEL, L. C. F. et al. O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1138, 2006. ISSN 0100-4042.

PINOTTI, M. M. Z.; SANTOS, J. C. P. From the ancient times of the agriculture to the biological control in plants: a little of the history. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p. 1797-1803, 2013. ISSN 0103-8478.

PIRES, D. X.; CALDAS, E. D.; RECENA, M. C. P. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. **Cad Saúde Pública**, v. 21, n. 3, p. 804-14, 2005.

RABELLO-GAY, M. Teste do micronúcleo em medula óssea. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação, Sociedade Brasileira de Genética (ed)**, p. 83-90, 1991.

RACHEL, C. La primavera silenciosa. **Colección Drakontos Bolsillo. Editorial Crítica, Barcelona (1ª edición 1962)**, 2010.

RDEVELOPMENT, C. TEAM 2009: R: A Language and Environment for Statistical Computing. **Vienna, Austria. Internet: <http://www.R-project.org>**, 2012.

REFFSTRUP, T. K.; LARSEN, J. C.; MEYER, O. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. **Regulatory toxicology and Pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 174-192, 2010. ISSN 0273-2300.

RIBEIRO, L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. **Mutagênese Ambiental. ULBRA, Canoas**, p. 173-178, 2003.

RICHTER, E.; CHLAMTAC, N. Ames, pesticides, and cancer revisited. **International journal of occupational and environmental health**, v. 8, n. 1, p. 63-72, 2001. ISSN 1077-3525.

RIVERO, J. et al. In vitro evaluation of oestrogenic/androgenic activity of the serum organochlorine pesticide mixtures previously described in a breast cancer case-control study. **Science of the total environment**, v. 537, p. 197-202, 2015. ISSN 0048-9697.

ROCHA, T. A. Avaliação da citotoxicidade e ação genotóxica de extratos orgânicos e ácido úsnico de *cladonia substellata* (líquen) e derivados pirazólicos sintéticos. 104 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2015.

RUPA, D.; REDDY, P.; REDDI, O. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of cotton field workers exposed to pesticides. **Environmental research**, v. 49, n. 1, p. 1-6, 1989a. ISSN 0013-9351.

_____. Frequencies of chromosomal aberrations in smokers exposed to pesticides in cotton fields. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 222, n. 1, p. 37-41, 1989b. ISSN 0165-1218.

SAMUELS, S. METHOMYL (addendum). **Pesticide Residues in Food**, n. 73, p. 101, 1993.

SANTOS, F. **Aplicação de pesticidas em agriculturas**. 2000. Departamento de Fitotecnia e Engenharia Rural., Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

SANTOS, M. D.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides—uma visão geral. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2008. ISSN 2179-4448.

SAÚDE, O. P.-A. D. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**: Secretaria de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde Brasília 1996.

SEEGER, B. et al. Mixture Effects of Estrogenic Pesticides at the Human Estrogen Receptor α and β . **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0147490, 2016. ISSN 1932-6203.

SEVERIN, I. et al. Genotoxic activities of the food contaminant 5-hydroxymethylfurfural using different in vitro bioassays. **Toxicology letters**, v. 192, n. 2, p. 189-194, 2010. ISSN 0378-4274.

SILVA, H. G. A. Avaliação genotóxica dos pesticidas metomil e cipermetrina: efeitos agudos in vivo. Dissertação - Universidade Federal de Pernambuco. Vitória de Santo Antão, 2013.

SILVA, M. I. A. D. Estudo das alterações bioquímicas em sangue e diferentes órgãos de *Phrynos geoffroanus* (Schweigger, 1812)(Testudines: Chelidae) coletados em ambiente contaminado ou expostos ao benzo [a] pireno. 2015.

SILVA, R. H. C. Mapa agrícola brasileiro registrou alterações relevantes nos últimos 20 anos, em busca de espaço para expansão da fronteira agrícola com custos mais competitivos. Departamento de pesquisas e estudos econômicos, 2014. Disponível em:

<
http://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/AGRO_ANALISE_25_08_14.pdf >. Acesso em: 12 de março.

SIMONIELLO, M. et al. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 8, p. 957-965, 2008. ISSN 1099-1263.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988. ISSN 0014-4827.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas. Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Faixa Etária. 2012. Disponível em: <
http://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Tabela%207_2012.pdf.
 >. Acesso em: 22 de fevereiro.

SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar, São Miguel**, 2006.

SPENCER, C. I. et al. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, n. 3, p. 1067-1082, 2001. ISSN 1521-0103.

TERRA, F. H. B. A indústria de agrotóxicos no Brasil. **Curitiba: UFPR**, 2008.

TERRA, F. H. B.; PELAEZ, V. A história da indústria de agrotóxicos no Brasil: das primeiras fábricas na década de 1940 aos anos 2000. Simpósio de Pós-Graduação em História Econômica/IV Congresso de Pós-Graduação em História Econômica/IV Encontro de Pós-Graduação em História Econômica/II Conferência Internacional de História Econômica, 2008.

THURMAN, E. M. et al. Feasibility of LC/TOFMS and elemental database searching as a spectral library for pesticides in food. **Food additives and contaminants**, v. 23, n. 11, p. 1169-1178, 2006. ISSN 0265-203X.

TIAN, Y.-T. et al. Effects of alpha-and theta-cypermethrin insecticide on transient outward potassium current in rat hippocampal CA3 neurons. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 90, n. 1, p. 1-7, 2008. ISSN 0048-3575.

TICE, R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000. ISSN 0893-6692.

- TRIPATHI, P. K.; SINGH, A. Toxic effects of cypermethrin and alpermethrin on reproduction and oxidative metabolism of the freshwater snail, *Lymnaea acuminata*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 58, n. 2, p. 227-235, 2004. ISSN 0147-6513.
- TSAO, T. et al. Respiratory failure of acute organophosphate and carbamate poisoning. **CHEST Journal**, v. 98, n. 3, p. 631-636, 1990. ISSN 0012-3692.
- TURGUT, C. The impact of pesticides toward parrotfeather when applied at the predicted environmental concentration. **Chemosphere**, v. 66, n. 3, p. 469-473, 2007. ISSN 0045-6535.
- VALENTINE, W. M. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n. 2, p. 375-382, 1990. ISSN 0195-5616.
- VAN SCOY, A. R. et al. Environmental fate and toxicology of methomyl. In: (Ed.). **Reviews of environmental contamination and toxicology**: Springer, 2013. p.93-109. ISBN 146144716X.
- VEROCAI, G. et al. Efficacy of cypermethrin on the control of *Struthiolipeurus* spp.(Phthiraptera: Philopteridae) in ostrich. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1274-1276, 2008. ISSN 0102-0935.
- VIJVERBERG, H. P.; VANDEN BERCKEN, J. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. **Critical reviews in toxicology**, v. 21, n. 2, p. 105-126, 1990. ISSN 1040-8444.
- VILLAR, S. et al. Single cell gel electrophoresis as a tool to assess genetic damage in *Heleobia cf. australis* (Mollusca: Gastropoda) as sentinel for industrial and domestic pollution in Montevideo bay (Uruguay). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 63, n. 3, p. 347-354, 2015. ISSN 1679-8759.
- VOGEL, E. An Introduction into Basic Principles of Genetic Toxicology. **Block: Milieuverstoring Genotoxische Stoffen, Leiden (The Netherlands)**, 1989.
- WAICHMAN, A. V.; EVE, E.; DA SILVA NINA, N. C. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian Amazon. **Crop Protection**, v. 26, n. 4, p. 576-583, 2007. ISSN 0261-2194.
- WANG, H. et al. Analysis of pyraflufen-ethyl residues in apples and soil by high-performance liquid chromatography. **International Journal of Environmental and Analytical Chemistry**, v. 87, n. 2, p. 99-109, 2007. ISSN 0306-7319.
- WATANABE, E. et al. Application of a commercial immunoassay to the direct determination of insecticide imidacloprid in fruit juices. **Food chemistry**, v. 102, n. 3, p. 745-750, 2007. ISSN 0308-8146.

YAMASHITA, M. G. N. Análise de rótulos e bulas de agrotóxicos segundo dados exigidos pela legislação federal de agrotóxicos e afins e de acordo com parâmetros de legibilidade tipográfica. 2008.

YOSHIDA, M.; INOUE, K.; TAKAHASHI, M. Predictive modes of action of pesticides in uterine adenocarcinoma development in rats. **Journal of toxicologic pathology**, v. 28, n. 4, p. 207, 2015.

ZAMBRONE, F. A. Perigosa família. **Ciência Hoje**, v. 4, n. 22, p. 44-47, 1986.