



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

Elisângela de Jesus Silva

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DE
AGROTÓXICOS: RISCO OCUPACIONAL E
ALIMENTAR**

Vitória de Santo Antão

2012

Elisângela de Jesus Silva

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DE
AGROTÓXICOS: RISCO OCUPACIONAL E
ALIMENTAR**

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

Área de Concentração: Saúde e Meio Ambiente.

Orientador: Prof^o. Dr. Cristiano Aparecido Chagas

Co-Orientador: Prof^a. Dra Erika Maria da Silva Freitas

Vitória de Santo Antão

2012

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV

S586a Silva, Elisângela de Jesus
Avaliação dos efeitos genotóxicos de agrotóxicos: risco ocupacional e alimentar/ Elisângela de Jesus Silva. Vitória de Santo Antão: O autor, 2012.
xxi, 53 folhas: fig.

Orientador: Cristiano Aparecido Chagas.
Co-orientador: Erika Maria da Silva Freitas.
Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco. CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2012.
Inclui anexos.

1. Agrotóxicos. 2. Saúde Pública. 3. Ação genotóxica. I. Chagas, Cristiano Aparecido. II. Freitas, Erika Maria da Silva. III. Título.

615.954 CDD (21.ed.)

BIBCAV/UFPE-05/2012



Dissertação de Mestrado apresentada por **Elisângela de Jesus Silva** à Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DE AGROTÓXICOS: RISCO OCUPACIONAL E ALIMENTAR" orientada pelo Prof. Cristiano Aparecido Chagas e aprovada pela Banca Examinadora composta pelos professores:



José Vassallo
Departamento de Anatomia Patológica – UNICAMP



Claudia Rohde
Módulo de Biologia – CTR/UFPE

Romero Marinho de Moura
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente – CAV/UFPE

Autor

Elisângela de Jesus Silva

À minha mãe Marlene, ao meu irmão Emerson e ao meu amado Erick

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr. Cristiano Chagas e à Prof^a Dra. Erika Freitas pela orientação no desenvolvimento desta dissertação. Os conhecimentos compartilhados, a atenção e disposição de ambos foram de extrema importância para consolidação da minha formação acadêmica.

À Prof^a Dra. Cláudia Rohde pela infra-estrutura disponibilizada e apoio nas análises em microscopia fluorescente.

Ao Prof^o Dr. André Santos pelos valiosos conselhos estatísticos.

A todos os membros do grupo de pesquisa GENOTOX, em especial ao Sídnei Dias pelo apoio durante os procedimentos experimentais.

Ao corpo docente PPGSHMA pela contribuição na minha formação científica.

Ao Sindicato dos Agricultores da Vitória de Santo Antão, por fazer uma ponte entre os agricultores e a universidade.

Ao Instituto de tecnologia de Pernambuco (ITEP) pelas análises químicas realizadas.

Ao CNPq e FACEPE pelo financiamento da pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1. Objetivo geral	3
1.2.2. Objetivo específico	3
1.3 Revisão da Literatura	4
1.3.1. Agrotóxicos	4
1.3.2. Classificação dos agrotóxicos	6
1.3.3. Genotoxicidade dos agrotóxicos e seus efeitos na saúde humana	7
1.3.3.1 Risco ocupacional	8
1.3.3.2 Risco alimentar	9
1.3.2. Avaliação de danos no DNA	10
1.3.2.1 Teste do Micronúcleo	11
1.3.2.2 Ensaio Cometa	13
CAPÍTULO 2	16
Assessment of genetic damage in rural workers exposed to pesticides and the influence of protective measures	
2.1 Abstract:	17
2.2 Introduction	18
2.3 Material and Methods	19
2.3.1 Study population	19
2.3.2 Micronucleus test in buccal cells	21
2.3.3 Comet assay	21
2.3.4 Statistical analysis	22
2.4 Results	22
2.5 Discussion	26
2.6 Conclusion	30
2.7 References	31
CAPÍTULO 3	34
Vegetables show DNA protector effect even contaminated with pesticides: a study by comet assay	
3.1 Abstract	35
3.2 Introduction	36

3.3 Material and methods	37
3.3.1 Vegetable extract	37
3.3.2 Animals and treatments	37
3.3.3 Pesticide residue analysis	38
3.3.4 Comet assay	38
3.3.5 Statistical analysis	39
3.4 Results	39
3.5 Discussion	41
3.6 Conclusion	43
3.7 References	444
CAPÍTULO 4	46
4.1 Discussão geral	46
4.2 Conclusões	47
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	xiii

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Imagens de células exfoliativas bucais humanas: micronucleada (esquerda) e normal (direita). Coloração de <i>Feulgen</i> , visualizadas em microscopia fluorescente (Aumento 1000x).	12
Figura 1.2	Classificação visual baseada no comprimento e quantidade de DNA na cauda dos cometas. Imagens de nucleóides gerados a partir de leucócitos, corados por GelRed™ em microscopia fluorescente.	14
Figura 2.1	Means of micronucleus in buccal cells (MNBC), binucleated cells (BNC), damage index (DI) and damage frequency (DF %) before and after 15 day use of PPE. * Significant at $P < 0.05$; t test for depend samples.	26
Figura 3.1	Means of damage index (DI) and damage frequency (DF %). * Significant at $p < 0.05$; 1 dose x control; <i>Kruskal Wallis</i> followed by multiple comparisons.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Pesticide commonly used by the exposed group.	20
Tabela 2.2	Demographic characteristics of the exposed and control groups.	23
Tabela 2.3	Effect of the factors of pesticide exposition, alcohol consumption, smoking and their interactions for each dependent variable.	24
Tabela 2.4	Coefficients of multiple linear regressions of age and exposure time for each of the parameters evaluated in the exposed group.	25
Tabela 3.1	Pesticide residues in the extracts of vegetables, Maximum Residue limit (MRL), Estimation of daily intake (EDI) and Acceptable daily intake (ADI) for the experimental treatments.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

2,3,4-T	Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacéticos
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacéticos
ADI	Ingestão Diária Aceitável (Do inglês “Acceptable daily intake”)
ANOVA	Análise de Variância (Do inglês “Analysis of Variance ”)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BNC	Células Binucleadas (Do inglês “Binucleated Cells”)
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DF	Frequência de Dano (Do inglês “Damage Frequency”)
DI	Índice de Dano (Do inglês “Damage Index”)
DL ⁵⁰	Dose letal
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Do inglês “Desoxyribonucleic Acid”)
EDI	Estimativa da Ingestão Diária (Do inglês “Estimation of daily intake”)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (Do inglês “Ethylenediamine tetra-acetic acid”)
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
GLM	Modelos lineares generalizados (Do inglês “General Linear Models”)
MN	Micronúcleo
MNBC	Células Bucais Micronucleadas (Do inglês “Micronucleated Buccal Cells”)
MRL	Limite Máximo de Resíduo (Do inglês “Maximum Residue Limit”)
NA	Não permitido (Do inglês “Not Allowed”)
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARA	Programa de Análise de Resíduos Agrotóxicos em Alimentos
PPE	Equipamentos de Proteção Pessoais (Do inglês “Personal Protective Equipments”)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (Do inglês “Reactive Oxygen Species”)
SD	Desvio padrão (Do inglês “Standard Desviation”)
SE	Erro Padrão (Do inglês “Standard Error”)
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas
TRIS	Tris-hidroximetil-amino-metano

RESUMO

Os agrotóxicos são largamente utilizados no mundo para proteção de lavouras contra pragas e doenças e na saúde pública no controle de agentes causadores de doenças. Contudo, a exposição a esses produtos pode representar um risco para saúde humana e ambiental. O uso inadequado dos agrotóxicos associado à falta de proteção individual tem resultado em exposição excessiva, principalmente em agricultores. Os potenciais riscos da exposição a resíduos múltiplos de pesticidas na alimentação humana também têm sido alvo de muitos estudos. Porém, o conhecimento acerca da ação genotóxica cumulativa desses resíduos ainda é limitado. Nesse contexto, foi realizado um biomonitoramento em agricultores a fim de avaliar danos genéticos associados à exposição ocupacional aos agrotóxicos. O teste do micronúcleo em células exfoliativas bucais e o ensaio cometa em leucócitos foram utilizados como biomarcadores de mutagenicidade e genotoxicidade, respectivamente. Os efeitos genotóxicos da ingestão de agrotóxicos foram avaliados em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). Os animais foram submetidos à dieta padrão e água *ad libitum*, sendo divididos em três grupos experimentais: o grupo 1 dose foi exposto diariamente, por meio de gavagem, a um extrato de vegetais (couve-flor, pimentão e tomate) contendo resíduos de agrotóxicos, por 30 dias. O grupo 2 doses recebeu o extrato duas vezes ao dia e o grupo controle recebeu água. O fator exposição ocupacional causou aumento do dano genético quando comparado ao grupo controle. Houve interação do tabagismo, ingestão de álcool e frequências de células micronucleadas. Não houve influência da idade e tempo de exposição, nos parâmetros analisados. O uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) durante as atividades rurais reduziu significativamente os danos genéticos. As baixas concentrações de resíduos de agrotóxicos detectados no extrato de vegetais não promoveram efeitos genotóxicos nos animais expostos. O grupo controle apresentou índices mais elevados de danos genéticos, seguido do grupo 2 doses e 1 dose. Em conclusão, a exposição ocupacional aos agrotóxicos causou aumento nos danos genéticos, sendo o uso de EPI eficiente na prevenção desses eventos. O extrato de vegetais promoveu efeito antígeno-tóxico, quando administrado em baixas concentrações. Sugerindo que, apesar da presença de resíduos de agrotóxicos, o consumo de vegetais é importante para manutenção da integridade genômica.

Palavras-Chave: pesticidas, ensaio cometa, micronúcleo

ABSTRACT

Pesticides are widely used to protect crops and to control public health diseases. However, these products represent a risk to human and environmental healthy. Improper use of pesticides, associated with the lack of personal protection, may result in excessive exposure, mainly in farmers occupationally exposed. There is an increasing need to assess the potential risks of exposure to multiple residues of pesticides in food. However, the knowledge about the cumulative genotoxicity of these residues is still limited. In this context, a biomonitoring in agriculture workers was conducted to assess the genetic damage associated with occupational exposure to pesticides. The micronucleus test in exfoliated buccal cells and the comet assay in leukocytes were used as biomarkers of genotoxicity and mutagenicity, respectively. The genotoxic effects due to pesticides intake were evaluated in rats Wistar (*Rattus norvegicus*). The animals were divided into three experimental groups: the 1 dose group was exposed daily, by gavage, to vegetable extract (cauliflower, green peppers and tomato) containing pesticide residues, for 30 days. The 2 doses group received the extract twice a day, and the control group received water. The occupational exposure factor increased the DNA damage when compared to controls. There was an interaction between smoking, alcoholism and micronucleated cells frequency. There was no influence of age and exposure time on the analyzed parameters. The use of personal protective equipments (PPE) during rural activities reduced significantly the genetic damages. The low concentrations of pesticide residues detected at vegetable extract did not promote genotoxic effects in exposed animals. The control group had higher rates of genetic damage, followed by 2 doses and 1 dose group. In conclusion, occupational exposure to pesticides caused an increase in genetic damage. The use of PPE was efficient in preventing these events. The vegetable extract promoted antigenotoxic effect, when administered at low concentrations, suggesting that, despite the presence of pesticide residues, vegetable consumption is important for maintaining genomic integrity.

Keywords: pesticides, comet assay, micronucleus

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Um grande desafio para a humanidade é a produção de alimentos para uma população em plena expansão. Dentro do modelo agrícola de produção, os agrotóxicos são considerados indispensáveis, pois tem contribuído significativamente para aumento da produtividade nas lavouras. Porém, seu uso incorreto tem resultado em efeitos adversos à saúde humana e ambiental, sendo considerado um dos principais poluentes químicos que se difundem pelo planeta.

O Brasil ocupa o primeiro lugar no *ranking*, dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo (ANVISA, 2011). Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas - SINDAG, em 2010 o país comercializou 790.790 toneladas de produtos, correspondendo a 342.593 toneladas de princípio ativo. A classe dos herbicidas é a que tem respondido pelo maior valor das vendas. No entanto, quando considerada a área de cultivo brasileira, o país tem um consumo relativo menor do que a maioria dos países desenvolvidos.

Os agrotóxicos constituem uma categoria heterogênea de substâncias químicas, especificamente desenhadas para o controle de fungos, ácaros, nematóides, bactéria, insetos e ervas daninhas (BOLOGNESI, 2003). Embora tenham sido produzidos para atuar em certos organismos sem afetar outros, sua seletividade é difícil de ser estabelecida e sua ação em humanos não está completamente elucidada. Dados experimentais revelaram que muitos agrotóxicos podem ocasionar efeitos nocivos ao material genético. A indução de genotoxicidade como lesões cromossômicas e no DNA pode levar a efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BERNSTEIN *et al.*, 2008; POIRIER, 2004).

Os agricultores constituem o grupo de maior risco aos efeitos adversos das misturas de agrotóxicos. A exposição ocorre por meio das vias oral, inalatória e dérmica, durante o preparo, aplicação e no manuseio da lavoura. Apesar do risco associado à exposição aos agrotóxicos, é comum que os trabalhadores, sobretudo os da agricultura familiar, não usem Equipamentos de Proteção Individual (EPI). Os efeitos nocivos à saúde dos trabalhadores do campo, expostos de maneira crônica às misturas de agrotóxicos, ainda são pouco

esclarecidos. O biomonitoramento genotoxicológico em populações humanas é uma ferramenta útil para estimar o risco genético frente a exposições de misturas complexas de substâncias químicas (BOLOGNESI, 2003).

Os resíduos de agrotóxicos em vegetais e em frutas sempre foram motivo de preocupação para as populações e órgãos públicos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pela condução do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Segundo o último levantamento, realizado em 2011, 37% das amostras não apresentaram resíduos de agrotóxicos, 35% estavam com níveis de resíduos abaixo do Limite Máximo de Resíduo (MRL) e 28% foram consideradas insatisfatórias pela presença de agrotóxicos não autorizados ou acima do MRL. Embora a exposição pela dieta seja em geral baixa ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ de alimento), grandes setores da população podem ser expostos por meio dessa via praticamente por toda vida (SOLOMON *et al.*, 2010).

A avaliação dos riscos de resíduos de agrotóxicos ingeridos na alimentação é fundamentada em dados de estudos sobre componentes isolados (BOOBIS *et al.*, 2008). Porém, os consumidores são expostos a misturas complexas de diferentes tipos de resíduos, os quais estão presentes nos mais variados alimentos, além de substâncias químicas com potencial mutagênico, naturais do próprio alimento (GRISOLIA, 2005). O conhecimento dos efeitos adversos para a saúde humana, após a exposição a uma combinação de agrotóxicos, ainda é limitada (REFFSTRUP, 2002).

Vale salientar que não existe consenso internacional acerca de uma metodologia mais eficiente para avaliação do risco do consumo humano de múltiplos resíduos de agrotóxicos na dieta (BOOBIS *et al.*, 2008). Nesse contexto, estudos sobre a genotoxicidade de agrotóxicos em animais revestem-se de grande importância, pois permitem determinar respostas de um dado organismo à contaminação.

Diversos métodos são usados para detectar efeitos biológicos precoces causados pela exposição a agentes que causam danos ao DNA (SIMONIELLO *et al.*, 2008). Muitos carcinógenos são genotóxicos e estão relacionados à indução de vários tipos de danos ao DNA. Desta forma, os biomarcadores de mutagenicidade e genotoxicidade têm sido utilizados em diversos estudos como preditores do risco associado ao câncer humano (VALVERDE & ROJAS, 2009). O teste do micronúcleo (MN) e o ensaio cometa têm sido amplamente utilizados como marcadores de danos genéticos, causados por diversos agentes mutagênicos e genotóxicos.

Embora a pesquisa brasileira a respeito do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana tenha crescido nos últimos anos, ainda é insuficiente para conhecer a

dimensão dos danos à saúde, causados pela exposição ocupacional e alimentar, decorrentes do uso intensivo de agrotóxicos (CASTRO, 2009).

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Avaliar os danos genéticos associados à exposição ocupacional aos agrotóxicos e a influência dos hábitos pessoais e medidas de proteção em agricultores do município de Vitória de Santo Antão. Bem como a possível ação genotoxicológica de vegetais contaminados com resíduos de agrotóxicos na alimentação, por meio de experimentação animal.

1.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos mutagênicos e defeitos na citocinese, por meio da análise da frequência de Células Bucais Micronucleadas (MNBC) e Binucleadas (BNC) da mucosa oral, em trabalhadores rurais e grupo controle.
- Avaliar os efeitos genotóxicos, através do Índice de Dano (DI) e Frequência de Dano (DF) gerados pelo ensaio cometa, em trabalhadores rurais e grupo controle.
- Analisar a influência dos fatores exposição aos agrotóxicos, ingestão de álcool e o hábito de fumar nos biomarcadores citogenéticos utilizados.
- Correlacionar os danos genéticos com a idade e o tempo de exposição aos agrotóxicos.
- Comparar as médias de MNBC, BNC, DI e DF antes e após quinze dias de uso de EPI durante atividades rurais, no grupo exposto.
- Avaliar a ação genotóxica de diferentes doses de um extrato de vegetais (tomate, pimentão e couve - flor) contaminados com resíduos de agrotóxicos, em células sanguíneas de ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*), após 30 dias de exposição oral.
- Comparar a média de DI e DF entre os grupos expostos e controle.
- Determinar as concentrações de resíduos de agrotóxicos encontradas nas amostras.
- Comparar a Estimativa de Ingestão Diária (EDI) de agrotóxico nos grupos expostos com a Ingestão Diária Aceitável (ADI) preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1. Agrotóxicos

A controvérsia sobre a utilização dos agrotóxicos é um dos principais debates desde meados do século XX. Adicionalmente, os prós e os contras para cada indicação de seu uso continuarão a ocupar as mentes de cientistas, oficiais do governo responsáveis pela regulamentação e do público em geral durante a maior parte do século XXI (SOLOMON *et al.*, 2010). Por agrotóxico, entende-se toda e qualquer substância capaz de matar ou inibir organismos nocivos ao homem, que possam causar-lhe malefícios físicos, transmitir-lhe doenças infecciosas ou prejuízos materiais (MOURA, 2007).

O emprego de compostos químicos no controle de pragas, não é uma nova incursão dos seres humanos. Seu uso já era prática comum há mais de 2.000 anos, quando romanos utilizavam resíduos de compostos inorgânicos na manutenção de suas estradas. Durante os anos 1800, vários herbicidas para controle de plantas daninhas foram desenvolvidos a partir de compostos inorgânicos (SOLOMON *et al.*, 2010).

O primeiro agrotóxico de largo uso no campo e utilizado mundialmente foi descoberto na França em 1885, por Pierre-Marie Alexis Millardet (1838–1902), fitopatologista e professor da Universidade de Bordeaux. Naquela época, as parreiras francesas estavam sendo acometidas por uma doença conhecida pelo nome popular de míldio, do inglês mildew (mofo), causada pelo fungo *Plasmopara viticola*. Essa doença provoca queima e queda das folhas e destruição dos frutos da videira e, rapidamente, chegou a níveis epidêmicos catastróficos, destruindo praticamente todos os parreirais daquele país (MOURA, 2007). Millardet descobriu a atividade fungicida do sulfato de cobre, que após ser neutralizado por cal hidratada, poderia ser pulverizado nos jovens parreirais no campo, inibindo o desenvolvimento da doença. A prática difundiu-se rapidamente pela França e, em pouco tempo, o país voltou à liderança do mercado internacional do vinho, graças a esse primeiro produto agrotóxico, que recebeu o nome de Bouillie Bordelaise (Mistura de Bordeaux), Bordeaux Mixture no inglês e no Brasil Calda Bordaleza (MOURA, 2007).

Em 1939, o químico suíço Paul Hermann Müller (1889–1965) descobriu as propriedades inseticidas do DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), o que originaria um novo grupo de inseticidas denominado organoclorados. Esse novo inseticida possuía duas características extraordinárias: alto poder inseticida e, sobretudo, alto poder residual, permanecendo no

substrato tratado por décadas. À época acreditava-se que, se usado corretamente, não causaria nenhum mal em humanos nem aos animais domésticos, pois não induzia nenhum sintoma que pudesse ser notado. Esse inseticida foi utilizado largamente na agricultura, nas residências e na saúde pública. Doenças do homem transmitidas por insetos, a exemplo da malária, tifo e peste-negra, foram erradicadas em muitas localidades no mundo, graças ao uso do DDT. O efeito era imediato e voltava-se a confirmar a crença de que o DDT não trazia nenhum problema para a saúde do homem e dos animais domésticos, pois não ocorria nenhum tipo de intoxicação aguda (MOURA, 2007).

A “era química” no controle de pragas teve início nos anos 1940 e 1950, com a descoberta e ampla utilização do inseticida sintético DDT, o herbicida 2,4-diclorofenoxiacéticos (2,4-D) e o fungicida captan. Durante essas décadas observou-se um aumento significativo na pesquisa voltada para o desenvolvimento de novas substâncias para controle de pragas e na prevenção de doenças humanas (SOLOMON *et al.*, 2010).

Durante os anos 1960 e 1970, tiveram início os debates sobre a utilização de agrotóxicos, que atraiu a atenção do público em geral, particularmente em países desenvolvidos. Nenhum indivíduo desempenhou papel tão importante nesse contexto do que Rachael Carson, autora do livro *Silent Spring* (Primavera Silenciosa), publicado em 1962. Naquela época, apesar do aparente e ilimitado otimismo sobre os agrotóxicos, Carson documentou corajosamente um grande número de problemas ambientais que emergiram do uso persistente de inseticidas e herbicidas, além dos problemas relacionados à saúde humana (SOLOMON *et al.*, 2010). Ela mostrou a real possibilidade de correlação entre resíduos de agrotóxicos em alimentos e muitas doenças crônicas da população, inclusive o câncer. Denunciou que a grande mortandade de pássaros e a destruição dos seus ovos, acompanhados pela morte de peixes e de animais silvestres, eram causados por agrotóxicos, especialmente pelos inseticidas (MOURA, 2008-2009).

O impacto gerado pela publicação do livro, que é considerado um dos maiores *bestsellers* de todos os tempos, e a pressão feita por Carson junto ao governo americano para que este exigisse avaliações rigorosas dos efeitos dos agrotóxicos na saúde humana e no meio ambiente, deu início a um debate contínuo sobre os prós e contras do uso de agrotóxicos. A criação da *Environmental Protection Agency* (Agência da Proteção do Meio Ambiente), uma das mais respeitadas instituições dos Estados Unidos, foi certamente um dos legados de Carson.

Os agrotóxicos começaram a serem utilizados no Brasil inicialmente para controlar doenças endêmicas, tal como a doença de Chagas, Malária e Febre Amarela. O uso de compostos organoclorados, entre eles o DDT, começou a ocorrer também neste mesmo

período visando o combate a doenças e pragas nas atividades agrícolas e pecuárias. Na década de 70, o uso de agrotóxicos foi intensificado devido à política brasileira de estímulo ao crédito agrícola, financiando agricultores e condicionando o empréstimo ao uso de insumos, entre eles os agrotóxicos. Ainda nesta década, começaram a surgir vários relatos de contaminação ambiental e problemas de saúde associados ao uso excessivo e desordenado dos agrotóxicos, principalmente intoxicações de trabalhadores rurais, contaminações de solos e águas, além da constatação de resíduo químico em alimentos cultivados com estes compostos (ALVES FILHO, 2002).

Na década de 80 várias discussões políticas foram feitas no Brasil. Foram elaborados novos instrumentos legais, entre os quais a nova Constituição Brasileira e a Lei 7.802, decretada em 11 de junho de 1989, que regulamenta o uso de agrotóxico no Brasil, definindo-os como: “produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas, e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.” A partir desta lei, a comercialização dos agrotóxicos passou a depender da obtenção de um registro, sendo avaliados os aspectos de impactos ao meio ambiente, à saúde humana e à eficácia agronômica do produto.

No Brasil, as denominações defensivo agrícola ou defensivo da lavoura já foram utilizados para designar produtos que erradicavam doenças e pragas. Contudo, após a aprovação da Lei dos Agrotóxicos, a nova denominação “agrotóxico” passou a prevalecer para essa classe de substâncias em relação às antigas denominações (SIQUEIRA, 2010). Nos Estados Unidos o termo *agrochemical* (agroquímico) tem sido usado atualmente para designar os agrotóxicos, contudo na literatura científica internacional é ainda comum o uso do termo *pesticide* (pesticida).

1.3.2. Classificação dos agrotóxicos

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com os alvos preferenciais sobre os quais atuam (inseticidas, acaricidas, larvicidas, nematocidas, moluscocidas, bacteriostáticos e bactericidas, fungicidas, herbicidas, pediculicidas e rodenticidas); ou de acordo com a classe química a que pertencem: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, triazinas e outros (GRISOLIA, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a classificação dos pesticidas em função do seu risco para a saúde, baseada no comportamento tóxico dessas substâncias, administradas por via oral ou dérmica em ratos e outros animais de laboratório, determinando a dose letal média (DL 50%) como aquela que produz 50% de morte nos animais expostos (OMS, 2009). A classificação toxicológica estabelecida pela Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), baseada na DL 50%, ordena os agrotóxicos em quatro categorias: classe I- extremamente tóxico; classe II- altamente tóxico; classe III- medianamente tóxico; e classe IV- pouco tóxico.

Do ponto de vista ambiental, o melhor sistema de classificação do agrotóxico é baseado no mecanismo de ação tóxica e na estrutura química. O conhecimento do mecanismo de ação bioquímico permitirá que a previsão dos prováveis organismos não-alvo seja mais apropriada. Solomon *et al.* (2010), sugere a seguinte classificação: agrotóxicos que afetam a fotossíntese, neurotóxicos, inibidores da mitose em plantas, miméticos hormonais e reguladores de crescimento que afetam membranas e, finalmente, agrotóxicos que afetam reações metabólicas. O conhecimento sobre os diferentes grupos de modo de ação dos agrotóxicos é importante para que os agricultores possam utilizar a rotação química a fim de evitar a seleção de plantas daninhas resistentes ou outras pragas (SOLOMON *et al.*, 2010).

Desta forma, estes produtos podem ser agrupados de diversas maneiras, porém, uma das mais utilizadas é a classificação segundo o grupo químico a que pertencem e o tipo de ação.

1.3.3. Genotoxicidade dos agrotóxicos e seus efeitos na saúde humana

Todas as pessoas são inevitavelmente expostas aos agrotóxicos através da contaminação ambiental ou ocupacional. A população em geral está exposta aos resíduos de pesticidas, incluindo os produtos de degradação físicos e biológicos no ar, água e alimentos (BOLOGNESI, 2003).

O amplo espectro de efeitos que os pesticidas causam à saúde, envolve danos agudos e persistentes sobre o sistema nervoso, sistema respiratório, órgãos reprodutivos, bem como disfunções imunológicas e endócrinas (MARTÍNEZ-VALENZUELA *et al.*, 2009). Outra causa de preocupação é a capacidade dos pesticidas em atuar como agentes genotóxicos e mutagênicos.

A genotoxicidade está entre os mais sérios dos danos causados pelos agrotóxicos. Os agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando adutos,

alterações oxidativas ou mesmo quebras da molécula do DNA. Na grande maioria dos casos o dano é reparado pelo próprio organismo ou então a célula é eliminada. Caso essa lesão seja fixada, provoca alterações hereditárias (mutações), que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, gerando efeito mutagênico (OBE *et al.*, 2004).

Muitos agrotóxicos têm sido classificados como potenciais mutagênicos. Exemplos, tem-se os inseticidas organofosforados. Esses produtos são muito tóxicos aos mamíferos, pois inibem a enzima acetilcolinesterase, provocando um acúmulo de acetilcolina nos tecidos nervosos, prejudicando a neurotransmissão. Esses compostos possuem centros eletrofílicos (fosforil) que reagem com moléculas de DNA, podendo gerar substituições de bases (GRISOLIA, 2005). Segundo dados da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) no ano de 2006 o organofosforado diclorvós foi considerado como possivelmente cancerígeno para o homem).

No grupo dos fungicidas pode-se destacar o maconzeb. Trata-se de um fungicida de amplo espectro, comercializado em grande escala e indicado para uma ampla variedade de culturas, que vão desde hortaliças até cereais. Em relação à carcinogênese, foi demonstrado que o maconzeb tem a propriedade de iniciar a formação de tumores de pele em camundongos (MEHROTRA *et al.*, 1987).

Entre os herbicidas os ácidos 2,4-D e 2,4,5-triclorofenoxiacéticos (2,3,4-T), derivados do ácido fenoxiacético, são muito usados como desfolhantes. O 2,4-D é um dos herbicidas mais utilizados no controle de plantas daninhas de folhas largas. Contudo, esses agrotóxicos contêm subprodutos de síntese, como as dioxinas, muito tóxicos e presente em muitas listas de produtos carcinogênicos (GRISOLIA, 2005).

1.3.3.1 Risco ocupacional

Os agricultores constituem o grupo de maior risco aos efeitos adversos das misturas de pesticidas. Esses trabalhadores são expostos a vários tipos de inseticidas, herbicidas e fungicidas simultaneamente. A exposição ocupacional aos agrotóxicos pode ocorrer de diversas formas: na manipulação direta (preparo das “caldas” e aplicação dos produtos), armazenamento inadequado, reaproveitamento das embalagens, contaminação da água, contato com roupas contaminadas e no manuseio da lavoura.

A ausência de uso de EPI durante as atividades laborais constitui um fator de risco adicional aos agricultores, pois aumenta a exposição. Essa situação é bastante comum, sobretudo em trabalhadores de agricultura familiar. Um recente estudo realizado em produtores de hortaliças de distritos agrícolas da cidade de Vitória de Santo Antão - PE, conduzido por Siqueira (2011), constatou que de 141 agricultores, 67,4% não usavam EPI e 9,2% desconheciam o equipamento. Esses dados refletem a realidade de muitas cidades brasileiras, onde as condições precárias de trabalho, associado à falta de informação potencializam a exposição aos agrotóxicos.

Muitos estudos demonstraram a associação entre exposição ocupacional aos pesticidas e diferentes tipos de câncer, como o de pulmão (BEANE FREEMAN *et al.*, 2005), bexiga (VIEL & CHALLIER *et al.*, 1995), pâncreas (ANDREOTTI *et al.*, 2009) e leucemias (BONNER *et al.*, 2010). Essas associações têm promovido aumento de pesquisas voltadas para detecção de danos citogenéticos causados por pesticidas. Trabalhos utilizando técnicas de micronúcleo e ensaio cometa para determinação de genotoxicidade têm mostrado resultados positivos (CASTILLO-CADENA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2006; ERGENE *et al.*, 2007) e outros trabalhos não demonstraram relação de genotoxicidade e pesticidas no trabalho no campo (IKEDA 1988; PASTOR *et al.*, 2001). No Brasil, verificando aberrações cromossômicas como marcadores de genotoxicidade, Antonucci e Stylos (2000) comprovaram positividade em agricultores do Paraná, e da Silva *et al.*, (2008) demonstraram relação positiva entre genotoxicidade e pesticidas em trabalhadores de vinícolas no Rio Grande do Sul. Essa grande divergência nos resultados dos estudos citogenéticos, reflete a heterogeneidade das populações expostas aos produtos químicos, bem como diferentes condições de trabalho nas lavouras (SIMONIELLO *et al.*, 2008).

1.3.3.2 Risco alimentar

Os alimentos são constituídos de uma grande variedade de substâncias químicas, desde as essenciais para a manutenção da saúde, a exemplo de vitaminas, minerais e proteínas até algumas potencialmente tóxicas, como micotoxinas, resíduos de pesticidas, aditivos e metais pesados. A falta de alguma nutriente ou a presença excessiva no alimento de substâncias tóxicas pode significar risco à saúde humana (JARDIM & CALDAS, 2009).

A ingestão de alimentos contaminados por resíduos de agrotóxicos é considerada uma rota primária de exposição para a maioria desses compostos (LU *et al.*, 2008). Vale salientar

que os alimentos podem ser contaminados por agrotóxicos não apenas na produção, mas também durante o transporte e armazenamento do alimento.

No Brasil, segundo dados do PARA realizado pela ANVISA, das 2.488 amostras de vegetais e frutas analisadas em 2011, 694 foram consideradas insatisfatórias, por apresentarem agrotóxicos não autorizados ou acima do MRL. Os organofosforados, inseticidas potencialmente genotóxicos, estavam em cerca de 60 % do total de amostras insatisfatória. Esses resultados mostraram que os consumidores são expostos simultaneamente a um grande número de agrotóxicos, sendo a concentração de muitos resíduos tóxica ao organismo. Evidências sugerem que esses resíduos podem ter ação cumulativa no organismo (BOOBIS *et al.*, 2008), podendo causar efeitos nocivos tardios.

Apesar de variáveis internacionais indicarem que a dieta é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de muitos tipos de câncer, tem sido difícil atribuir um papel claro da exposição a substâncias químicas específicas individuais ou de misturas de produtos químicos na causa do câncer (DYBING *et al.*, 2008). Por isso, cada vez mais existe a necessidade de se avaliar os riscos potenciais da exposição combinada de vários resíduos de pesticidas na dieta.

Várias abordagens têm sido propostas para avaliação do risco de exposição a misturas de produtos químicos (ATSDR, 2002; FERON *et al.*, 1998; GROTEN *et al.*, 2001; MUMTAZ, 1995; YANG *et al.*, 1995). Porém, não há atualmente nenhuma metodologia internacionalmente acordada para avaliar os riscos da exposição combinada aos resíduos de pesticidas na alimentação. A avaliação do risco de resíduos de pesticidas nos alimentos é realizada, principalmente, a partir de estudos com compostos isolados. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de mais trabalhos para que os potenciais riscos da ingestão de misturas de pesticidas sejam esclarecidos (BOOBIS *et al.*, 2008).

1.3.2. Avaliação de danos no DNA

Os métodos para avaliação da exposição a agentes mutagênicos e genotóxicos seguem duas categorias: a mensuração dos níveis de agentes químicos e seus metabólitos e/ou derivações em células, tecidos, fluidos corporais e na excreção; e a mensuração de respostas biológicas, como alterações genéticas avaliadas por metodologias citogenéticas em indivíduos expostos (GRISOLIA, 2005).

Os métodos citogenéticos estão entre os mais sensíveis e eficientes para detecção de efeitos genotóxicos, sendo utilizados *in vitro* e *in vivo* (BELPAEME *et al.*, 1996). Aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, micronúcleos (MNs) e, recentemente, o ensaio

cometa têm sido amplamente utilizados para a detecção precoce dos efeitos biológicos dos agentes prejudiciais ao DNA (PASTOR *et al.*, 2003).

Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intrinsecamente ligados. A mutação é uma consequência do dano e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (RIBEIRO *et al.*, 2003). Portanto, os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade podem ser utilizados na avaliação do risco de câncer para determinado agrotóxico ou mistura, mas não prever o seu potencial carcinogênico. Afinal, o câncer é uma doença multifatorial, existem outras variáveis determinantes para o seu desenvolvimento.

1.3.2.1. Teste do Micronúcleo

Nas técnicas citogenéticas clássicas, cromossomos são estudados diretamente pela observação e contagem de aberrações cromossômicas em metáfases. Esta abordagem prevê uma análise mais detalhada, mas a aplicação da técnica apresenta certa complexidade, sendo necessário pessoal altamente treinado e consumo de muito tempo para análises das metáfases. O teste do MN foi proposto por Schmid (1975) como uma alternativa mais simples para avaliar os danos cromossômicos.

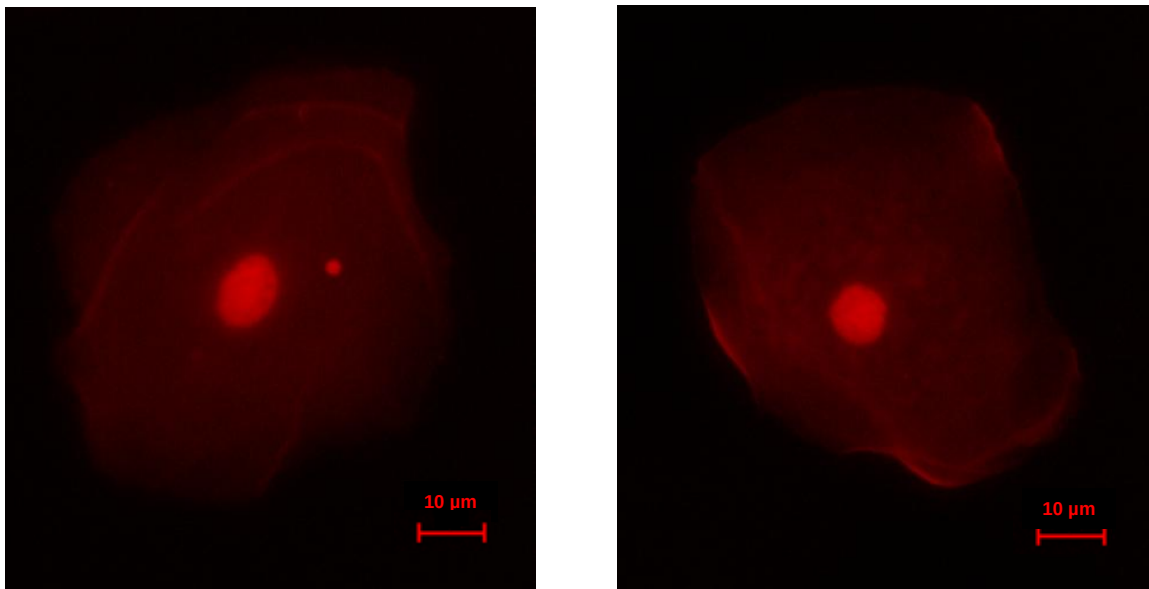
Os MNs são estruturas visualizadas ao microscópio como pequenos corpos nucleares que aparecem no citoplasma de células-filhas em decorrência de danos induzidos às células parentais. Revelam a ação de agentes clastogênicos, que quebram cromossomos, e aneugênicos, que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (RIBEIRO *et al.*, 2003). Os MNs são, portanto, utilizados como biomarcadores de mutagenicidade em indivíduos expostos a agentes genotóxicos (CAO, 2003), por ser considerado um procedimento rápido, simples, de alta sensibilidade, baixo custo e não-invasivo (LOHMANN, 1995; CARVALHO *et al.*, 2002).

O ensaio do MN em um tecido com rápida divisão, tal como o da mucosa bucal, permite a avaliação de danos no DNA sem a necessidade de uma etapa de replicação celular *ex- in vivo*. Outra vantagem desta abordagem, é que ela é minimamente invasiva, não sendo necessário estabelecer cultura de células, técnica normalmente usada nas análises clássicas de metáfases e também na análise de MN em linfócitos binucleados submetidos ao bloqueio da citocinese (BONASSI *et al.*, 2011).

A caracterização dos MNs deve preencher os seguintes critérios (TOLBERT *et al.*, 1992) (Figura 1.1):

- Estrutura da cromatina similar e intensidade de cor semelhante ou mais fraca do que a do núcleo principal.
- Borda evidente, sugerindo envoltório nuclear.
- Ter formato arredondado. Localização intracitoplasmática.
- Diâmetro menor do que 1/5 do núcleo principal.

Figura 1.1: Imagens de células exfoliativas bucais humanas: micronucleada (esquerda) e normal (direita). Coloração de *Feulgen*, visualizadas em microscopia fluorescente (Aumento 1000x).



O teste do MN em células é de extrema relevância para a toxicologia genética e ambiental, tendo em vista que detecta mutações cromossômicas, podendo ser considerado como marcador precoce para a carcinogênese (BONASSI *et al.*, 2007). Esse teste tem sido utilizado com sucesso em invertebrados, peixes e anfíbios, como biomonitores de áreas contaminadas (em ensaio *in situ*). Já em ratos e camundongos, a incidência de MN é utilizada na triagem de compostos para determinar genotoxicidade após a exposição direta ou indireta a diversos compostos (SASAKI *et al.*, 2002 ;JACOBSEN *et al.*, 2004).

A análise do MN em mamíferos *in vivo* foi recomendada pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH) como uma parte da bateria de testes de genotoxicidade necessários durante o desenvolvimento de novas drogas (MIERT *et al.*, 2008).

1.3.2.2. Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa, também conhecido por eletroforese de célula única, é um teste muito utilizado para avaliação de danos genotóxicos, bem como de reparo no DNA. (UMBUZEIRO & ROUBICEK *et al.*, 2006). Sendo usado em uma ampla variedade de aplicações incluindo biomonitoramentos humanos, monitoramento ecológico e como ferramenta de investigação de danos ao DNA e reparo em diferentes tipos celulares em resposta a uma série de agentes nocivos ao DNA (COLLINS *et al.*, 2008).

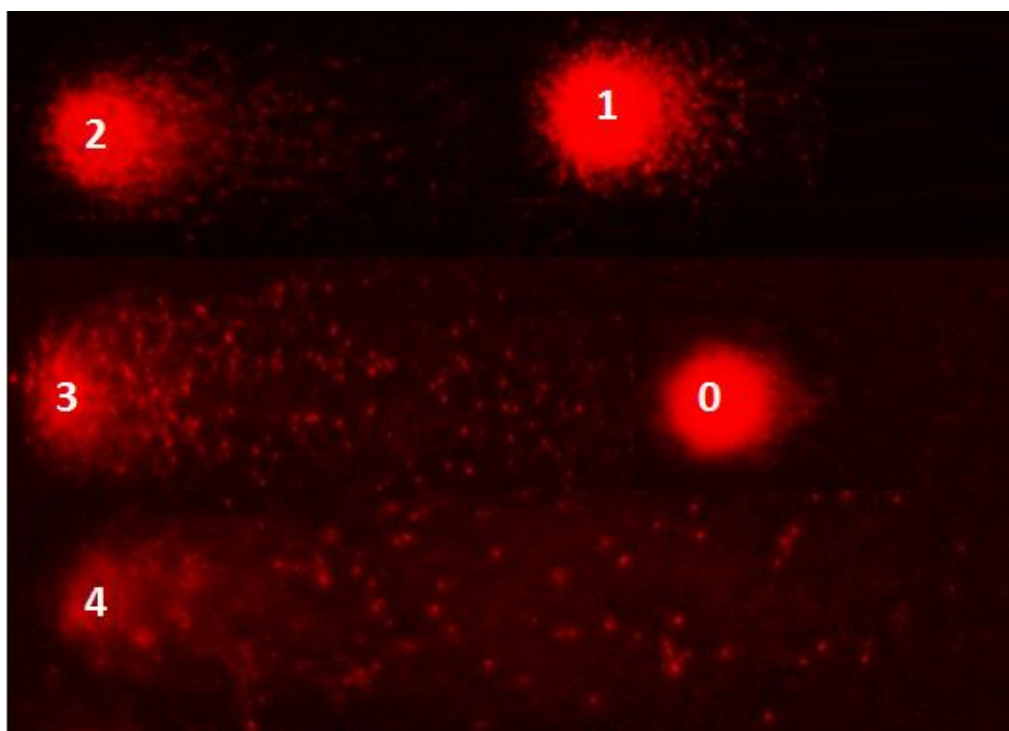
Este ensaio foi desenvolvido por Ostling e Johanson (1984) e posteriormente foi modificado por Singh *et al.*, (1988). Tais alterações na técnica permitiram uma avaliação de danos ao DNA em células únicas sob condições alcalinas. Esta abordagem aperfeiçoa a desnaturação do DNA e permite uma avaliação de quebras de fita-simples e locais álcil-lábeis (TICE *et al.*, 2000).

O princípio do teste consiste na detecção de lesões genômicas (como quebras simples, duplas, sítios lábeis alcalinos), que podem resultar em mutações, se o sistema de reparo não solucionar o problema. Neste ensaio as células são incorporadas em uma fina camada de agarose em uma lâmina de vidro, e lisadas em uma solução de lise contendo basicamente detergente e alta concentração de sais. Desta forma, as membranas e os constituintes celulares solúveis, bem como as histonas, são removidos, deixando o DNA ligado a matriz nuclear. O DNA ocupará o espaço em que anteriormente se encontrava a célula. Desta forma o material genético assume a forma de uma célula, denominado de “nucleóide” (UMBUZEIRO & ROUBICEK *et al.*, 2006). Posteriormente, o nucleóide é submetido à eletroforese alcalina, fazendo com que o DNA contendo quebras e/ou porções relaxadas se mova para o ânodo, formando uma “cauda de cometa” quando visualizado por microscopia de fluorescência com um corante adequado. As imagens lembram cometas e o conteúdo relativo de DNA na cauda indica a frequência de quebras e/ou porções relaxadas de DNA.

A análise dos resultados do ensaio cometa é bastante flexível, envolvendo a aplicação de técnicas de análise de imagens e uso de *softwares* específicos para o ensaio cometa, disponíveis comercialmente. Contudo, métodos que não são baseados em sistemas de

análise de imagem também são válidos. Uma outra abordagem classifica os cometas em várias categorias (geralmente quatro ou cinco), com base no comprimento de migração e / ou na proporção relativa percebida de DNA na cauda, atribuindo um valor numérico a cada classe de migração (Figura 2). Assim a extensão média de migração de DNA entre as células, pode ser calculada gerando um índice de dano (DI). Embora o parâmetro DI seja subjetivo, é altamente correlacionado com as análise de imagem geradas pelos *softwares*. Orientações e recomendações internacionais para o ensaio cometa, consideram a análise visual dos cometas um método de avaliação bem validado (TICE *et al.*, 2000).

Figura 1.2: Classificação visual de nucleóides baseada no comprimento e quantidade de DNA na cauda dos cometas. Imagens de nucleóides gerados a partir de leucócitos, corados por GelRed™ em microscopia fluorescente.



O ensaio cometa tem se mostrado um método muito sensível para a detecção de danos genéticos induzidos por diferentes agentes genotóxicos, tais como compostos de arsênio (GUILLAMET *et al.*, 2004), metais pesados (HARTMANNAND & SPEIT *et al.*, 1994), pesticidas (BHALLI *et al.*, 2009) radiação, (TICE *et al.*, 1990) e entre os trabalhadores da indústria de alumínio expostos a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (CREBELLI *et al.*, 2002). Além disso, este ensaio pode ser de grande valor ao beneficiar muitas áreas da

investigação clínica, fornecendo informações valiosas sobre as características intrínsecas do DNA de células individuais e suas respostas a vários fatores externos, tais como radiação, químicos e drogas. Estas informações seriam relevantes no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer (MCKENNA *et al.*, 2008).

CAPÍTULO 2

Assessment of genetic damage in rural workers exposed to pesticides and the influence of protective measures

Elisângela de Jesus Silva ^{a, b}, Erika Maria da Silva Freitas ^b, Mônica Lúcia Adam ^b
Cristiano Aparecido Chagas ^{a, b *}

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

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

* Corresponding author: Centro acadêmico de Vitória, Alto do Reservatório, S/N, Bairro Bela Vista, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brasil. Tel.: +55 81 35230670.
E-mail address: cristiano.chagas@ufpe.br (C. Chagas)

This paper will be submitted to **Mutation Research–Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**

2.1 Abstract

Pesticides are widely used to protect crops and to control of public health diseases. However, represents a potential risk to human and environmental healthy. Improper use of pesticides associated with the lack of personal protection has result in excessive exposure, mainly in farmers occupationally exposed. Biomonitoring provides a useful tool to estimate the genetic risk from exposure to a complex mixture of chemicals. In the present investigation 31 farmers occupationally exposed to pesticide and 23 control subjects were assessed for genetic damage by binucleated cells (BNC) and micronucleus in buccal exfoliated cells (MNBC) analyses, and by the comet assay through damage index (DI) and damage frequency (DF) parameters in blood leukocytes. The specific influence of personal protective equipments (PPE) on genotoxic biomarkers was evaluated in 16 farmers, through biological samples collected before and after a period of PPE usage. The exposed group revealed an increase of all biomarkers used at this study ($p < 0.05$) when compared to the control group. Only the MNBC frequencies were influenced by smoking and alcohol consumption. A significant interaction ($p < 0.05$) was revealed when these confounding factors were taken together and when associated with pesticide exposure factor. No correlation was found between genetic damage, age and time of exposure. It was noticed a significant reduction of genetic damage detect by comet assay and frequencies of BNC in the cells after the period of PPE usage ($p < 0.05$). Despite the decrease in frequency of micronucleated cells after PPE usage, this reduction was not statistically significant ($p > 0.05$). The results obtained demonstrated that the occupationally pesticide exposition, without protective measures, may originate DNA damage, which is the underlying potential cause of mutations leading to cancer.

Keywords: agrochemicals, comet assay, micronucleus

2.2 Introduction

The current model of agricultural production in the world depends on the use of pesticides on crops. Brazil places first in global pesticide consumption [1]. In 2010, a record amount of 790.790t was commercialized in the country [2]. Improper use of pesticides associated with the lack of personal protection has resulted in excessive exposure of farmers who spray pesticides and/or work in environments treated with such products. It should be noted that the use of mixture of three to five pesticides, sometimes is relatively common practice [3]. As a result, individuals occupationally exposed get into contact with a complex mixture of pesticides whose mechanism of action in the agronomic plan can be predicted, but its ecotoxicological effects, mutagenicity and carcinogenicity to humans are unknown, because of the wide variety of different interactions that can occur [4]. Occupational exposure to pesticides has been reported to be associated with an increase risk or incidence of variable types of cancer such as non-Hodgkin's lymphoma [5], leukemia [6], prostate cancer [7] and gastric cancer [8], among others. Data are accumulating that support the hypothesis that genotoxicity endpoints are predictors of human cancer risk. Most carcinogens are genotoxic and have been associated with various types of DNA damage [9]. In this context, several researchers have used cytogenetic assays to evaluate the potential genotoxicity of pesticide exposures in occupationally exposed populations from various countries [10].

Micronuclei are small extranuclear bodies formed by chromosome fragments or whole chromosomes lagging behind at anaphase during nuclear division. This damage may occur due to excessive exposure to chromosome-damaging agents, defects in mitosis and/or DNA misrepair [11]. The MN assay with exfoliated buccal cells (MNBC) is a cost effective, noninvasive method, in which the formation of MN is used as an endpoint to detect cytogenetic damage in exposed individuals [12]. Another approach used for the analysis of genotoxicity is the alkaline comet assay, which detects DNA damage mainly revealing single or double DNA strand breaks and alkali-labile sites and has been successfully used for biomonitoring in populations exposed to various xenobiotics [13]. Regarding pesticide exposure, studies has demonstrated both positive [14-16] and negative [17-19] results for cytogenetic endpoints. This fact reflects the heterogeneity of populations exposed to chemicals as well as different working conditions on farms [20].

Differences in the protective measures employed by the agricultural workers are an important approach at genotoxic biomonitoring. The use of some type of PPE reduces the

pesticide exposure, and consequently can interfere at results of biological markers. Results of literature suggested some degree of efficacy of the PPE at preventing exposure to pesticides [21]. Also, it was noted that the use (or not) of PPE was not well documented in human biomonitoring. Furthermore, there were no studies in which the effects of wearing PPE on the extent of genetic damage had been specifically investigated, based on obtained data.

Although several studies of biomonitoring in workers exposed to pesticides have been reported, information from developing countries, where pesticides are used on a large scale is still limited [12]. In Brazil one of these problems is the lack of information on the use of pesticides and insufficient data on poisoning by these products [22]. In addition, changes in the constitution of the formulations and new mixtures combined with new agricultural practices become necessary a constant reevaluation of the genotoxic effects of pesticides in occupationally exposed populations [4].

In the present study, was to evaluate the DNA damage associated with exposure to complex mixtures of pesticides in rural workers from Vitória de Santo Antão (Brazil). In order to assess if protective measures could lead to a decrease in genetic damage, subjects with no history of protective measures were evaluated before and after a period of PPE usage. The MNBC and Comet Assay in leukocytes were used as biomarkers of mutagenicity and genotoxicity respectively. Analysis of binucleations in buccal cells was also performed in conjunction with the MN assay to detect defects in cytokinesis.

2.3 Material and Methods

2.3.1 Study population

The data for this study were collected in Vitória de Santo Antão, State of Pernambuco, Brazil. This city stands out for the vegetables production support mainly by familiar agriculture. The investigation was carried out in 54 individuals, who were divided into two groups. The exposed group was composed of 31 agricultural workers (7 women and 24 men) directly involved in the preparation and application of pesticides mixture in vegetables fields, about two or three times per week, from January to March of 2010. Table 1 shows the most used pesticides by exposed group.

Table 1- Pesticide commonly used by the exposed group.

Pesticide	Compound	Chemical class	WHO ^a
Fungicide	Azoxystrobin	Methoxyacrylate	U
	Difenoconazole	Triazoles	II
	Mancozeb	Dithiocarbamate	U
	Metiram	Carbamate	U
	Tebuconazole	Triazoles	II
Insecticide	Cypermethrin	Pyrethroid	II
	Deltamethrin	Pyrethroid	II
	Methamidophos	Pyrethroid	Ib
	Methomyl	Organophosphate	Ib
	Profenofos	Organophosphate	II
Herbicide	Diuron	Urea	III
	Fluazifop-p-butyl	Alkanoic acid	III
	Glyphosate	Organophosphate	III
	Paraquat	Quarternary ammonium salt	II

^aWHO hazard classification (2009) [23]: Ib = Highly hazardous; II = Moderately hazardous; III = slightly hazardous; U = Unlikely to present acute hazard in normal use

Regarding the use of protective measures, none of rural workers was reported using PPE during or after spraying pesticides in the fields. To assess the effect of the use of PPE in the exposed group, following the first biological sampling, all volunteers received a Kit of PPEs (BASF®, yellow Costal AZ Brasil 4 Stars model) containing impermeable clothes, gloves, head and eye protection. The subjects were instructed to use them for 15 days during the manipulation of pesticide and handling of farming. After this interval, another sampling was performed. Only 16 rural workers reported using PPE during the specific period, characterizing the after PPE group.

The control group consisted of 23 subjects (5 women and 18 men) working mainly in the Federal University of Pernambuco with no history of occupational exposure to pesticides or to any particular genotoxic agent.

A questionnaire detailing age, gender, medicine consumption, smoking and drinking habits, years of exposure to pesticides and use of PPE was completed by each subject. Due to the fact that a quantitative estimation of pesticide exposure is difficult to handle, the duration of employment was used as a surrogate for exposure [14]. Regarding smoking and

drinking habits, subjects who had been smoking for last 5 years or who ingested alcohol twice a day or in excess once a week were considered as smokers and alcohol drinkers, in both experimental group. This study was approved by the Institutional Ethics Committee, and informed consent was obtained from each individual before the start of the study.

2.3.2 Micronucleus test in buccal cells

Before buccal cells collection, all individuals washed their mouth twice with 100 mL of water to remove excess debris. The cells were obtained by gently rubbing the inside of the cheeks with a cytobrush and placed in tubes containing 10 ml of saline solution (NaCl 9%). After three washes in the saline solution by centrifugation at 1500 rpm for 10 min, 50 µl of cell suspension was used to obtain the smears that were air dried and fixed in ethanol-acetic acid (3:1). The cells were stained with *Feulgen* and *Light Green* stain, following the protocol described by Thomas, *et al.* [24]. Two thousand exfoliated buccal cells were screened for each individual to determine the MNBC frequency, using fluorescence microscopy (Nikon, Eclipse 80i). In addition to DNA damaged, measured through micronuclei test, cytokinesis failures were assessed by BNC frequency. The criteria for estimating these anomalies were applied according to Thomas *et al.* [24]. Considering that it is often difficult to differentiate necrotic and apoptotic cells [25], cytotoxicity effects such as condensed chromatin, karyorrhexis, pyknotic and karyolytic cells, were not assessed. To avoid bias all the slides were coded before scoring.

2.3.3 Comet assay

Peripheral blood samples were obtained from exposed and control volunteers. The comet assay was conducted under alkaline condition as described by Singh *et al.* [26], and following Tice *et al.* [27] Guidelines with minor modifications. A volume of 15 µl of whole blood was suspended in 100 µl of 0.5% low melting agarose (37°C). Were prepared two slides per subject. Cells suspension was placed on 1.5% normal melting agarose embedded slides. They were covered with coverslips and were left at 4 °C for 10 min. The coverslips were removed. The slides were immersed in cold working pH 10 lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂ EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100 and DMSO 10%) and left at 4 °C overnight. The slides were then placed in an electrophoresis alkaline buffer (1M NaOH and 200 mM EDTA, pH 13) for 20 min to allow DNA unwinding and DNA breakage at alkali labile sites.

Electrophoresis was conducted in the same alkaline buffer for 20 min at 33 V (0.82 V/cm) and 300mA at 4 °C. Those procedures were carried out under yellow light to prevent additional DNA damage and on ice to prevent DNA repair. After electrophoresis, the slides were rinsed in the neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) for 15 min, dehydrated in absolute ethanol for 5 min and left at room temperature for drying.

Slides were stained with 70ul of GelRed™ and observed under a fluorescence microscope (Nikon, Eclipse 80i) with an excitation filter of 515–560 nm. A total of 100 nucleoids were screened per subjects (50 from each slide). Comets were scored visually. Two parameters were evaluated: damage index (DI), in which each comet was designated to one of five classes (from no damage = 0 to maximum damage = 4) according to tail length and intensity (see figures in Collins et al. [28]). The values obtained for each individuals could range from 0 (completely undamaged: 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells x 4). Damage frequency (DF %), was calculated as the percentage of damaged nucleoids. To ensure the ability of the comet assay to detect DNA damage, slides with blood sample from the controls were exposed to hydrogen peroxide (200 µM) for 5 min. The oxidative stress caused at DNA by this compound was used as positive control. All the slides were coded before scoring to avoid bias.

2.3.4 Statistical analysis

The normality of variables was evaluated by Kolmogorov–Smirnov test. Student's t-test and Chi-square were used to compare means and frequencies for demographic characteristic between groups. The Student's t-test for depend samples was used to compare the genetic damage before and after 15 day-use of PPE. Multiple linear regression analysis was used to determinate the influence of age and exposure time on biomarkers of genetic damage in pesticides workers. The interactions of smoking, alcohol consumption and pesticide exposure in relation to MNBC, BNC, DI and DF% were analyzed using a General Linear Model (GLM) (three-way 2x2x2 between groups Factorial ANOVA). The data were logarithmic transformed and an outlier of control group was excluded to achieve all the requirements of the method. All calculations were conducted using the software Statistica version 7.0. The level of significance established was $p \leq 0.05$ for all tests.

2.4 Results

The distribution of subjects with respect to age, gender, smoking, alcohol consumption, years of exposure and use of PPE is summarized in Table 2. The control and

exposed group had similar characteristics except for the years of occupational exposure (26.6 ± 14.9) and use of PPE. With regard to the use of protective measures, 100% of the exposed group, asserted not to use any kind of protection during the preparation or application of pesticides.

Table 2- Demographic characteristics of the exposed and control groups.

Characteristics	Exposed subjects (n = 31)	Control subjects (n=23)	p value
Age (years)	52.0 ± 13.8	51.1 ± 13.2	0.77 ^b
Exposure time (years)	26.6 ± 14.9	-	-
Smoking(n) (%)			
Yes	9 (29.1)	7 (30,4)	0.84 ^c
No	22 (70.9)	16 (69,5)	
Alcohol consumption (n) (%)			
Yes	15 (49,4)	9 (39,4)	0.68 ^c
No	16 (51,6)	14 (60,8)	
Gender (n) (%)			
Female	7 (22,6)	5 (21.7)	0.79 ^c
Male	24 (77,4)	18(78.3)	
Use of PPE ^a			
Yes	0 (0)	-	-
No	31 (100)	-	-
^a Personal protective equipments / ^b t test / ^c Chi-square PPE- personal protective equipment			

The interactions of factors such as pesticide exposure, smoking and alcohol consumption in relation to MNBC, BNC, DI and DF% were summarized in the Table 3. Factorial ANOVA analyses showed that the pesticide exposure factor had influence on MNBC frequency, the exposed group revealed an increase of MNBC when compared to the control group. With respect of smoking and alcohol consumption, these factors alone did not influence MNBC in the total sample, but when together, significant interaction was detected. There was also interaction of smoking and groups as well as alcohol consumption and groups for MNBC. There was no significant interaction between the factors exposure to pesticides, smoking and consumption of alcohol when taken together.

Table 3 - Effect of the factors of pesticide exposition, alcohol consumption, smoking and their interactions for each dependent variable. According to the GLM (three-way 2 x 2 x 2 between groups factorial ANOVA) analysis.

	SS	DF	MS	F	P
MNBC					
Intercept	43.37	1	43.37	311.44	0.00
Experimental Groups	12.85	1	12.85	92.28	0.00
Alcohol Intake	0.23	1	0.23	1.70	0.19
Smoking	0.03	1	0.03	0.23	0.62
Experimental Groups*Alcohol Intake	0.57	1	0.57	4.09	0.04
Experimental Groups*Smoking	0.71	1	0.71	5.09	0.02
Alcohol Intake*Smoking	0.79	1	0.79	5.68	0.02
Experimental Groups*Alcohol Intake*Smoking	0.02	1	0.02	0.17	0.67
Error	6.26	45	0.13	-	-
BNC					
Intercept	67.13	1	67.13	362.09	0.00
Experimental Groups	5.45	1	5.45	29.42	0.00
Alcohol Intake	0.48	1	0.48	2.60	0.11
Smoking	0.10	1	0.10	0.58	0.44
Experimental Groups*Alcohol Intake	0.01	1	0.01	0.07	0.78
Experimental Groups*Smoking	0.01	1	0.01	0.06	0.80
Alcohol Intake*Smoking	0.53	1	0.53	2.89	0.09
Experimental Groups*Alcohol Intake*Smoking	0.05	1	0.05	0.29	0.58
Error	8.34	45	0.18	-	-
DI					
Intercept	0.19	1	0.19	22.55	0.00
Experimental Groups	0.06	1	0.06	7.35	0.00
Alcohol Intake	0.00	1	0.00	0.00	0.98
Smoking	0.00	1	0.00	0.05	0.81
Experimental Groups*Alcohol Intake	0.00	1	0.00	0.01	0.91
Experimental Groups*Smoking	0.00	1	0.00	0.07	0.79
Alcohol Intake*Smoking	0.00	1	0.00	0.13	0.71
Experimental Groups*Alcohol Intake*Smoking	0.00	1	0.00	0.25	0.61
Error	0.38	45	0.00	-	-
DF%					
Intercept	71.04	1	71.04	107.29	0.00
Experimental Groups	10.41	1	10.41	15.72	0.00
Alcohol Intake	0.00	1	0.00	0.00	0.99
Smoking	0.00	1	0.00	0.01	0.91
Experimental Groups*Alcohol Intake	0.01	1	0.01	0.02	0.87
Experimental Groups*Smoking	0.21	1	0.21	0.31	0.57

Alcohol Intake*Smoking	0.09	1	0.09	0.14	0.70
Experimental Groups*Alcohol Intake*Smoking	0.82	1	0.82	1.25	0.26
Error	29.79	45	0.66	-	-
MNBC- Micronucleated Buccal Cell					
BNC-Binucleated Cell					
DI- Damage Index					
DF%- Damage Frequency					

Concerning the other biomarkers BNC, DI and DF%, except for the difference between exposed and control groups ($p < 0.001$), no other factor or interaction showed statistically significantly effect. Due to the small number of women in the sample, was not possible to analyze statistically differences in relation to gender in this study. No significant correlation was observed between age, time of exposure, genetic damage and cytokinesis failures in occupational workers using multiple linear regression analysis (Table 4).

All comparisons before and after PPE use can be visualized in Figure 1. There was a significant decrease in the mean value of DI (14.06 ± 8.66 versus 6.25 ± 6.26 , $p < 0.05$) and DF % (10.31 ± 6.69 versus 4.37 ± 4.25 , $p < 0.05$) when rural workers had used protective measures. There was also a decline in the presence of BNC (6.06 ± 3.29 versus 3.87 ± 2.50 , $p < 0.05$). Besides the reduction on MNBC after PPE use (6.31 ± 2.98 versus 4.00 ± 2.52 , $p > 0.05$), this difference was not statistically significant. Hydrogen peroxide (200 μ M), used as positive control to test comet assay sensitivity, caused an increase in DI (22.86-fold) and DF% (20.76-fold), when compared with the control population (data not shown).

Table 4- Coefficients of multiple linear regressions of age and exposure time for each of the parameters evaluated in the exposed group

Variables	$\beta \pm S.E$	t	p
MNBC			
Age	-0.217 ± 0.204	-1.061	0.297
Exposure time	0.014 ± 0.002	0.072	0.942
BNC			
Age	0.360 ± 0.197	1.826	0.078
Exposure time	-0.244 ± 0.197	-1.239	0.225
DI			
Age	-0.169 ± 0.206	-0.817	0.420
Exposure time	0.039 ± 0.206	0.191	0.849
DF%			
Age	-0.148 ± 0.207	-0.717	0.478
Exposure time	-0.006 ± 0.207	-0.030	0.975

S.E – standard error

MNBC- micronucleated buccal cell

BNC-binucleated cell

DI-damage index

DF%-damage frequency

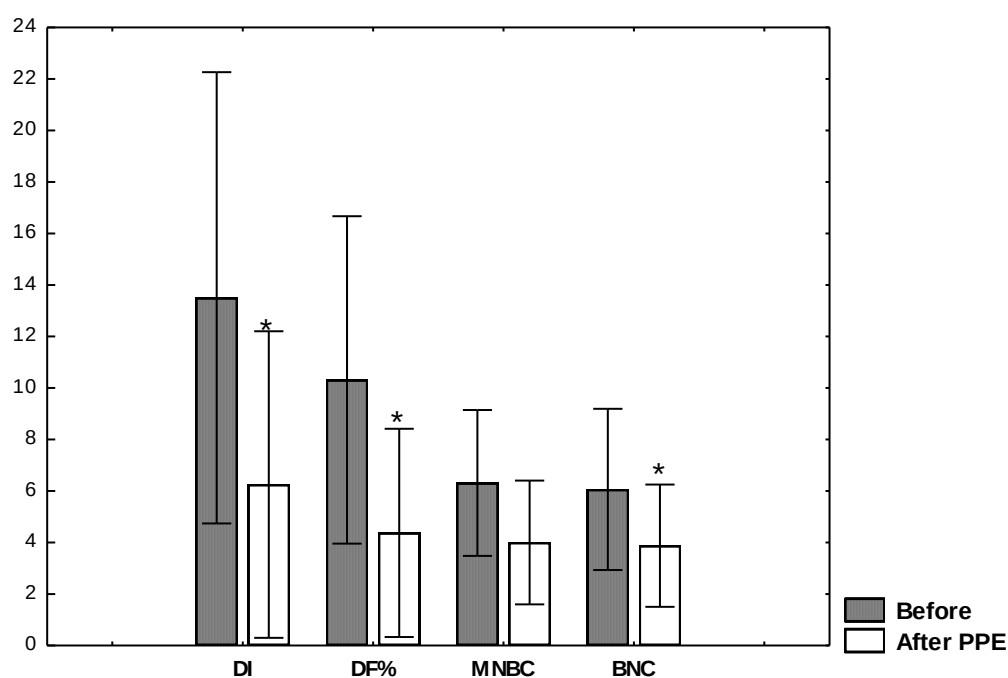


Figure 1- Means and standard deviations of micronucleus in buccal cells (MNBC), binucleated cells (BNC), damage index (DI) and damage frequency (DF %) before and after 15 day use of PPE. * Significant at $P<0.05$; t test for depend samples.

2.5 Discussion

The extensive use of pesticides in agricultural programs has caused severe environmental pollution and potential health hazards, particularly among those occupationally exposed. It is common the association of these events with the misuse of these compounds, although the existence of strict regulations for the manufacture, use and sale of pesticides in most countries.

Agricultural workers included in this study are exposed to mixture of pesticides that had different active ingredients, mainly organophosphorus and pyrethroids. Among the active ingredients, two compounds are classified as being highly hazardous (methamidophos and methomyl), and six that are moderately hazard (difenoconazole, cypermethrin, deltamethrin, profenofos and paraquat) by WHO (World Health Organization) [23]. Organophosphorus insecticides are very toxic to mammals as they inhibit the enzyme acetylcholinesterase, caused an accumulation of acetylcholine at nerve tissue [4]. According to Woode and Wright [29] most of these compounds have electrophilic centers that cause damage to the DNA molecule. In general, it appears that the risk of mutagenicity of pyrethroids is low [4], even though some studies have shown cytogenetic damage associated with this group of pesticides [30, 31]. The genotoxicological biomonitoring in human populations is a useful tool to estimate the genetic risk from an integrated exposure to complex mixtures of chemicals [10]. A wide range of methods is presently used for the detection of early biological effects of DNA- damaging agents in occupational settings [20].

The MN analysis in exfoliated buccal cells has been demonstrated to be a sensitive method for monitoring genetic damage in human populations [32]. The incidence of MNBC has been related to different occupational exposures to genotoxic agents, and also associated with cancer risk [33]. The relevance of this method is the specificity in detecting early genotoxic events as a result of potential carcinogens entering the body through ingestion or inhalation.

In the current study the MNBC was used to assess the possible DNA damage caused by exposure to mixture of pesticides as well as the influence of confounding factors. A significant increase in MNBC frequency was demonstrated in the exposed group when compared to control subjects. This result proves the mutagenic effect of pesticide in occupationally exposures. A positive association between MNBC and pesticide exposure was also demonstrated by other studies [12, 15, 34]. In contrast, negative results can also be found in literature [18, 35].

Despite the recognized mutagenic and carcinogenic risk from diverse components of the cigarette, and the establishment of smoking as a confounding factor that may influence the frequency of genetic damage [15], this factor did not influence the frequencies of MNBC in all sample analyzed in this study. In a recent review, Bonassi et al. [33] related that significantly increases in the MN frequency appear only in heavy (i.e., ≥ 40 cigarettes/day) smokers. Possibly the daily consumption of cigarette of smokers subject in this biomonitoring was lower than the previously data mentioned, justifying the absence of association. However, the complete lack of effects in subjects smoking fewer than 40 cigarettes per day is still

unexpected. Heterogeneity in the quality of exposure assessment may have introduced residual confounding or misclassification, both of which are likely to have reduced the strength of the association [33].

As in other studies, alcohol consumption failed to show a significant influence on the number of buccal cells with MN [12, 14, 35, 36]. Nevertheless, when the factor alcohol consumption and smoking were taken together, positive interaction was demonstrated in relation to MNBC frequencies. While cigarette smoke is rich in a wide variety of mutagenic carcinogens, the ethanol seems to have a weak mutagenic potential. However, when in contact with the epithelial cells that covers the mouth and throat, ethanol appears to induce cytotoxic effects, resulting in cell death [37]. The decrease in cell population makes stem cells increase the rate of cell division, and thus, the expansion of cells with already genetic damage induced by smoking, explaining the interaction of the factors alcohol consumption and smoking on MNBC frequencies in the present study. The cytotoxic action of ethanol associated with smoking habits was also associated at carcinogenesis of certain types of head and neck cancer, where the ethanol acts as tumor promoter [37].

Although, the smoking and alcohol consumption did not induce MNBC when evaluated separately in subjects of this study, statistical analysis showed an interaction between the factors smoking and exposure to pesticides, as well as between alcohol consumption and exposure to pesticides. Furthermore, no significant interaction was detected when the factors pesticide exposure, smoking and alcohol consumption were taken together. These results showed that the variation of MNBC between exposed and control groups can be influenced by factors of smoking and alcohol consumption, and therefore must be taken as confounding factors in genotoxicological biomonitoring.

The analysis of BNC was performed concurrently with the MNBC at this biomonitoring. Our results showed that pesticide exposure factor was responsible for the significant increase in BNC frequencies. Similarly, other studies reported high frequency of BNC in individuals occupationally exposed to several genotoxic agents such as antineoplastic drugs, solvents, polycyclic aromatic hydrocarbons, ionizing and non-ionizing radiation and pesticides [33]. It has been shown that the cell cycle blockage at the binucleated stage occurs as a consequence of chromosome malsegregation [38]. This suggests that the presence of BNC is indicative of cytokinesis failure or arrest due to aneuploidy [33], which, in turn, is associated with an increased risk of cancer and neurodegenerative disease [39].

Likewise, pesticide exposure also induced a highly significant increase in the level of DNA damage detected by comet assay parameters, in occupational workers in comparison to control subjects, which is consistent with other reports [16, 20, 40]. Occupational exposure to

pesticides may result in DNA-adduct and / or ROS production [41, 42], originating DNA damage which is the underlying cause of mutations leading to cancer [43].

The confounding factors smoking and alcohol consumption did not influence the BNC frequency as well as DI and DF% values. Some authors have affirmed that smoking or alcohol intake failed to show an increase of cytogenetic biomarkers [34, 40]. In contrast to the results of MNBC, when these factors were taken together, no interaction was detected in relation to BNC frequency and DI and DF% values. Perhaps the biological effects of chemicals present at cigarette and alcoholic drinking does not involve DNA breaks and cytokinesis failures, but other damages, such as induction of defects on spindle apparatus, which is one of the mechanisms of MN formation [32].

Damage to chromosomes appears to be cumulative when there is continuous exposure to mixtures of pesticides [44]. A positive correlation between time of exposure and genotoxic biomarkers was demonstrated in several studies [15, 34, 44]. On the other hand, negative correlation was found in the present study, this result is in agreement with other authors [12, 14, 40]. Among other variables that may influence the genetic damage, the age has been constantly evaluated. It is considered that the DNA damage increases with the age because of the continuous exposure to endogenous and environmental genotoxins lifelong. It must be noted that those who had worked the longest are also among the oldest subjects at this study. However, in the present study, all biomarkers were not affected by age. Similar results have been reported in the literature [14, 20]. The inconsistent responses among studies in relation to age and exposure time could reflect different exposure conditions, such as the specific genotoxic potential of the pesticides used and the use of protective measures [10]. Furthermore, the individual inheritances of variant polymorphic genes involved in the metabolism of chemical compounds and in DNA repair mechanisms [10] may influence the results.

The genetic damages observed in the rural workers of this investigation may be due to occupationally pesticide exposition, which was intensified by the absence of use of PPE. Since workers are frequently exposed to complex mixtures of pesticides, it is difficult to attribute the genetic damage to any particular chemical class or compound. The lack of protective measures in rural activities plays an important role on genotoxic effects. In a review, Bull et al. [21] related that in the four studies in which was reported the use of protective measures by the majority of workers (>60%), all concluded that the results were negative. In contrast, seven of the eight studies in which workers wore little or no protective clothing were reported significantly increased in cytogenetic damage. Nevertheless, Silva et al. [16] obtained a different result, despite most workers (70%) allegedly took all protective

measures, was noticed an increase in MN frequency, DI and DF among pesticide appliers, with no difference between those who used complete protective equipment and those who did not. These results demonstrate that the influence of PPE usage on biomarkers of genotoxicity in the literature are inconclusive.

The effect of PPE usage on the extent of genetic damage was specifically investigated at this study. The use of some items of PPE by a short time interval (15 days), during the pesticide and crops handling, was able to significantly reduce genetic damage detected by comet assay and frequencies of BNC. The lack of statistical significance with respect to decreased frequency of MNBC after the use of PPE may be related to statistical error of type II, since power analyses showed a reduction of test power (data not shown). The small size of the group (16 subjects) may have reduced the statistical power of the present study.

These results suggest a correlation between the use of protective clothing and effective reduction of genotoxic endpoints. The decrease of genetic damage after PPE usage may be attributed to the decrease of pesticide absorption. In a study of applicators in landscaped areas, Solomon et al.[45] showed that one of the reasons for no correlation between the volume of pesticide applied and absorbed dose of the herbicide 2, 4-D, measured by urinary excretion parameters, was due to the use of gloves during spraying. Furthermore, DNA repair mechanisms may have contributed to reducing the genetic damage in blood cells, since although the majority of these cells turned over rapidly, a subset of around 10% of all circulating lymphocytes may live for almost 9 months or more [46, 47], perhaps enzymes responsible for excision of DNA adducts or repair of DNA breaks may have worked in these cells, reducing the damage detected by comet assay. However, further studies are necessary to confirm this hypothesis, since the relationship between DNA damage, persistence and repair, and mutagenic endpoints is complex [9].

2.6 Conclusion

In conclusion, the results presented at this study pointed out the genetic damage associated to occupational pesticide exposition, which represents a potential risk for cancer development. Furthermore, the used of PPE proved to be efficient in preventing exposure, reducing the DNA damages. For this reason, the use of PPE should always be considered as a confounder factor in genotoxicological biomonitoring. These facts, emphasizes the necessity of educational programs for farmers in order to reduce the use of chemicals in agriculture and to implement protective measures.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This research was supported by the funds provided by Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) (APQ-0858-08, IBPG-0870-4.01/09). The authors express their gratitude to Dr. André Santos for your statistical advice in analysis of the data. This study was only possible with the help of the Sindicato dos Agricultores da Vitória de Santo Antão, PE, Brazil and all individuals who volunteered to participate in this study.

2.7 References

- [1] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Retrieved 20 dez 2012, from <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/251109>
- [2] Instituto de Economia Agrícola. Retrieved 20 dez 2012, from <http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=12192>
- [3] M. Mattos, J. Oliveira, F. Haji, M. Lima, N. Costa, Avaliação de estratégias com agroquímicos no controle de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Hemiptera: Aleyrodidae) em tomate, *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*. 12 (2002) 131-144.
- [4] C. K. Grisolia, *Agrotóxicos: mutações, câncer & reprodução*, first ed, UnB, Brasília, 2005.
- [5] K. A. Bertrand, D. Spiegelman, J.C. Aster, L. M. Altshul, S.A. Korrick, S.J Rodig, S.M. Zhang, T. Kurth, F. Laden, Plasma organochlorine levels and risk of non-Hodgkin lymphoma in a cohort of men. *Epidemiology* 21 (2010) 72–180.
- [6] M.R. Bonner, B.A. Williams, J.A. Rusiecki, A. Blair, L.E. Beane Freeman, J.A. Hoppin, M. Dosemeci, J. Lubin, D.P. Sandler, M.C. Alavanja, Occupational exposure to terbufos and the incidence of cancer in the Agricultural Health Study, *Cancer Causes Control* 21 (2010) 871–877.
- [7] S. Koutros, M.C. Alavanja, J.H. Lubin, D.P. Sandler, J.A. Hoppin, C.F. Lynch, An update of cancer incidence in the Agricultural Health Study, *J Occup Environ Med* 52 (2010), 1098–1105.
- [8] P.K. Mills, R.C. Yang, Agricultural exposures and gastric cancer risk in Hispanic farm workers in California, *Environ. Res.* 104 (2007) 282–289.
- [9] M. Valverde, E. Rojas, Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay, *Mutat. Res.* 681 (2009) 93–109.
- [10] C. Bolognesi, Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies, *Mutat. Res.* 543 (2003), 251-272.
- [11] N. Holland, C. Bolognesi, M. Kirsch-Volders, S. Bonassi, E. Zeiger, S. Knasmueller, M. Fenech, The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps, *Mutat. Res.* 659 (2008) 93–108.
- [12] G.M. Bortoli, M.B. Azevedo, L.B. Silva, Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers, *Mutat. Res.* 675 (2009) 1-4.

- [13] F. Faust, F. Kassie, S. Knasmüller.; S. Kevekordes, V. Merschmundermann, Use of primary blood cells for the assessment of exposure to occupational genotoxicants in human biomonitoring studies, *Toxicology*, 198 (2004) 341–350.
- [14] N. Sailaja, M. Chandrasekhar, P.V. Rekhadevi, M. Mahboob, M.F. Rahman, B. Saleha, K. Vuyyuri, S.A. Danadevi, P.G. Hussain, Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production, *Mutat. Res.* 609 (2006) 74–80.
- [15] C. Martínez-Valenzuela, S. Gómez-Arroyo, R. Villalobos-Pietrini, S. Waliszewski, M. E. Calderón-Segura, R. Félix-Gastéluma, A. Álvarez-Torres, Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico, *Environ. Int.* 35 (2009) 1155–1159.
- [16] J. Silva, C. R. Moraes, V.D. Heuser, V. M. Andrade, F.R. Silva, K. Kvitko, V. Emmel, P. Rohr, D. L. Bordin, A. C. Andreazza, M. Salvador, J.P. Henriques, B. Erdtmann, Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes, *Mutagenesis* 23 (2008) 415–422.
- [17] R. Scapato, L. Mighore, G. Angotzi, A. Fedi, L. Miligi, N. Loprieno, Cytogenetic monitoring of a group of Italian floriculturists: no evidence of DNA damage related to pesticide exposure, *Mutat. Res.* 367(1996) 73-82.
- [18] L. Lucero, L. Pastor, S. Suarez, R. Durbán, T. Gómez, C. Parrón, A. Creus, R. Marcos, Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells, *Mutat. Res.* 464 (2000) 255–262.
- [19] S. Pastor, S. Gutierrez, A. Creus, N. Xamena, S. Piperakis, R. Marcos, Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells, *Mutagenesis* 16 (2001) 539–545.
- [20] M. F. Simoniello, E. C. Kleinsorge, J. A. Scagnetti, R. A. Grigolato, G. L. Poletta, M. A. Carballo, DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures, *J. Appl. Toxicol.* 28 (2008) 957–965.
- [21] S. Bull, K. Fletcher, A. R. Boobis, J. M. Battershill, Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review, *Mutagenesis* 21(2006) 93–103.
- [22] V. L. S. S. Castro. Uso de Misturas de Agrotóxicos na Agricultura e Suas Implicações Toxicológicas na Saúde, *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 4 (2009) 87-94.
- [23] WHO (World Health Organization). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, Geneva: WHO; 2009
- [24] P. Thomas, N. Holland, C. Bolognesi, M. Kirsch-Volders, S. Bonassi, E. Zeiger, S. Knasmueller, M. Fenech, Buccal micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* 6 (2009) 825-37.
- [25] Robbins; V. Kumar, A. Abbas, N. Fausto, R.N. Mitchell, *Patologia Básica*, Elsevier. Seventh edition, 2006.
- [26] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [27] R. R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.-C. Ryu, and Y. F. Sasaki, Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206-221.
- [28] A. R. Collins, A. A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaiva, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C.C. Smith, R. Stetina, REVIEW The comet assay: topical issues *Mutagenesis* 23 (2008) 143–151.
- [29] M.F. Wooder, A.S. Wright, Alkylation of DNA by organophosphorus pesticide, *Acta Pharmacol toxicol.* 49 (1981) 51-55.
- [30] E. Nakano, Rabello-Gay, C.A Pereira, Evaluation of the genotoxic potencial of flumethrin in mouse bone marrow by chromosomal analysis and micronucleus test, *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 16 (1996) 37-48.

- [31] Y. Jin, S. Zheng, Y. Pu, L. Shu, L. Sun, W. Liu, Z. Fu, Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*), *Chemosphere* 82 (2011) 398–404.
- [32] B.J. Majer, B. Laky, S. Knasmüller, F. Kassie, Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials, *Mutat. Res.* 489 (2001) 147–72.
- [33] S. Bonassi, E. Coskun, M. Ceppi, C. Lando, C. Bolognesi, S. Burgaz, N. Holland, M. Kirsh-Volders, S. Knasmueller, E. Zeiger, D. Carnesoltas, D. Cavallo, J. Da Silva, V. M. de Andrade, G. C. Demircigil, A. D. Odiom, H. Donmez-Altuntas, G. Gattas, A. Giri, S. Giri, B. Gómez-Meda, S. Gómez-Arroyo, V. Hadjidekova, A. Haveric, M. Kamboj, K. Kurteshi, M. G. Martino-Roth, R. M. Montoya, A. Nersesyan, S. Pastor-Benito, D. M. F. Salvadori, A. Shaposhnikova, H. Stopper, P. Thomas, O. Torres-Bugarín, A.S. Yadav, Guillermo Zúñiga González, M. Fenech, The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol, *Mutat. Res.* 728 (2011) 88–97.
- [34] S. Gómez-Arroyo, Y. Diaz-Sanchez, M.A. Meneses-Perez, R. Villalobos-Pietrini, J. De León-Rodríguez, Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides, *Mutat. Res.* 466 (2000) 117–124.
- [35] S. Pastor, A. Creus, T. Parron, A. Cebulska-Wasilewska, C. Siffel, S. Piperakis, R. Marcos, Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers, *Mutagenesis* 18 (2003) 249–258.
- [36] M. Bloching, A. Hofmann, C. Lautenschlager, A. Berghaus, T. Grummt, Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay, *Oral Oncol.* 36 (2000) 550–555.
- [37] R. A. Weinberg, *A biologia do Câncer*, First ed., Artmed, Brazil, 2008
- [38] Q. Shi, R.W. King, Chromosome non-disjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines, *Nature* 437 (2005) 1038–1042.
- [39] P. Thomas, J. Hecker, J. Faunt, M. Fenech, Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease, *Mutagenesis* 22 (2007) 371–379.
- [40] S. Singha, V. Kumar, S. Thakura, B. D. Banerje, S. Chandna, R. S. Rautela, S.S. Grovera, D. S. Rawata, S.T. Pashaa, S. K. Jain, R. L. Ichhpujani, A. Rai, DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31 (2011) 278–285.
- [41] J. Gallois, D. Pottier, M. Houssina, J. Le Goff, V. André, DNA adduct variations in non-smoking crop farmers: Potential relationship with occupational exposure to pesticides? , *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32 (2011) 1–9.
- [42] H. Petrovská, M. Dusinska, Oxidative DNA damage in human cells induced by Paraquat, *ATLA* 27 (1999) 387–395.
- [43] Bernstein, Carol (2009, January 14). DNA Damage and Cancer. SciTopics. Retrieved January 9, 2012, from http://www.scitopics.com/DNA_Damage_and_Cancer.html
- [44] C. Bolognesi, E. Perrone, E. Landini, Micronucleus monitoring of floriculturist population from western Liguria, Italy, *Mutagenesis* 17 (2002) 391–397.
- [45] K.R. Solomon, D. Houghton, S.A. Harris, Nonagricultural and residential exposures to pesticides. *Scand. J. Work Environ. Health.* 31(2005) 74–81.
- [46] A. A. Freitas, B. Rocha, A. A. Coutinho, Lifespan of B lymphocytes: the experimental basis for conflicting results, *J. Immunol.* 136 (1986) 470–476.
- [47] D.D. Weisenburger, D.S. Harrington, J.O. Armitage, B-cell neoplasia: a conceptual understanding based on the normal humoral immune response, *Pathol. Annu.* 25 (1990) 99–115.

CAPÍTULO 3

Vegetables show DNA protector effect even contaminated with pesticides: a study by comet assay

Elisângela de Jesus Silva ^{a, b}, Sídnei de Andrade Dias ^b, Erika Maria da Silva Freitas ^b,
Mônica Lúcia Adam ^b, Cristiano Aparecido Chagas ^{a, b *}

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

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

* Corresponding author: Centro acadêmico de Vitória, Alto do reservatório, S/N, Bela Vista, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brasil. Tel.: +55 81 35230670.
E-mail address: cristiano.chagas@ufpe.br (C. Chagas)

This paper will be submitted to **Food Additives and Contaminants Part A**

3.1 Abstract

Food is a source of chemicals, most of them essential to the maintenance of health. The lack of any nutrient or the excessive presence of toxic substances in food can be considered a risk to human health. There is increasing need to assess the potential risks of exposure to multiple residues from pesticides in foods. In this study, we used the Comet Assay to assess the genotoxicity of vegetables contaminated with pesticides residues. Eighteen Wistar rats were kept under standard conditions, with water and food *ad libitum* and divided in three groups and were daily submitted to gavage. The control group received water, 1 dose group received one daily dose of a liquid vegetables extract containing 26% tomato, 26% green pepper and 48% cauliflower and 2 dose group received two daily doses of the same extract. These doses were established as 5.71 g per Kg / b.w., which is equivalent to the minimum vegetables daily ingestion - 400 g - recommended by WHO (World health organization). Pesticide multiresidue analyses were performed to identify what pesticides were present in these vegetables. After 30 days of treatment, blood was collected to carry out the Comet Assay. The pesticide residue analyses detected 18 different types of pesticides. About 4% of pesticide residues found in vegetables samples were above the Maximum Residue limit (MRL), 48% remained below the MRL and others 48% of pesticide residues found are not allowed in Brazil, for peppers or tomatoes crops, according to the Brazilian national Health Surveillance Agency (ANVISA). The estimation values of daily intake (EDI) for both exposed group were lower than acceptable daily intake (ADI), recommended by WHO. The control group had the highest mean of damage index (DI) and damage frequency (DF %), followed by 2 doses and 1 dose group. Only the difference between control group and 1 dose group was statically significant ($p < 0.05$). In general, the vegetable extract provided efficiency in protecting DNA damage caused by pesticide and endogenous mechanisms. Probably, substances naturally present in food promoted antigenotoxic effects at low doses. Suggesting that, consumption of vegetables is important for the maintenance of genomic integrity, despite the presence of residues of pesticides.

Keywords: agrochemical, genotoxicity, food

3.2 Introduction

There is an increasing need to assess the potential risks of exposures to multiple residues from pesticides in foods. Diet and dietary factors are believed to be responsible for a major number of cancers worldwide (Dybing et al. 2008). Food regulations in developed countries are excellent for providing wide margins of safety. MRLs and IDA levels are established for individual pesticides, according to a series of toxicological parameters. However, consumers are exposed to more than one pesticide residue at the same time, besides chemicals substances present naturally in vegetables and fruits. There is no currently internationally agreed methodology to assess risks from exposures to combined pesticides residues (Boobis et al. 2008). The knowledge about health effects, following exposure to combination of pesticides, is still limited (Reffstrup 2002).

When pesticides are together ingested, toxic effect may be observed, which differ quantitatively and/or qualitatively from those observed following exposure to a single pesticide (Jacobsen et al. 2004). The effects of two or more compounds can take one of three forms: independent, dose addition or interaction (Wilkinson et al. 2000; Feron and Groten 2002). Interactions can result in a stronger effect (synergism) or a weaker effect (antagonism, inhibition) (Groten et al. 2000). The wide range of action mechanisms becomes the risk assessment of pesticide mixture complex in animal systems.

A number of pesticides have been tested in a wide variety of mutagenic assays: testing for gene mutation, chromosomal aberration, and DNA damage (Bolognesi 2003). The comet assay is a versatile and sensitive method for measuring single and double-strand breaks in DNA (Collins et al. 2008). The advantages of the comet assay include a high sensitivity for detecting low levels of DNA damage, the requirement for small number of cells per sample, its flexibility, low cost and ease of application (Tice et al. 2000).

The mutagenic properties of pesticide has been implicated in causing genetic damage or in increasing incidence of cancer in individual occupationally exposed to pesticides (Silva et al 2008; Bonner et al. 2010). It was also reported a significant risk factor for pesticides residues in foods. Many studies showed that chronic exposure to low levels of pesticides in fruits and vegetables is associated with genetic toxicity (De Marco et al. 2000; Feretti et al. 2007). Nevertheless, the effects of pesticides on the general population, largely because of dietary exposure, are unclear (Oates and Cohen 2011). In this context, the objective of the present study was to evaluate a possible DNA damages, caused by vegetables

contaminated with pesticides residues, in rats submitted to oral chronic exposition, using the comet assay as genotoxicity biomarker.

3.3 Material and methods

3.3.1 Vegetable extract

The vegetables extracts were prepared from unwashed samples of cauliflower, peppers, and tomatoes, using a centrifuge juice extractor. The liquid extract was prepared weekly. It contained fixed mass proportion of each type of vegetable (26% of tomatoes, green peppers 26% and 48% of cauliflower). The vegetables choice was based on pesticide residue data obtained by the Technology Institute of Pernambuco (ITEP) and the intensive use of pesticides in these crops. We collected the vegetables samples in commercial establishments of Vitória de Santo Antão, State of Pernambuco, Brazil.

3.3.2 Animals and treatments

We obtained adult male Wistar rats (10 weeks, 200–300 g) from the nutrition department of the Federal University of Pernambuco (UFPE). The animals were maintained under proper environmental conditions, i.e., room temperature 22 ± 2 °C, humidity $55 \pm 10\%$, and 12 h light/dark cycle. They were housed in polycarbonate cages with steel wire tops (three animals per cage), with standard food and water *ad libitum*. The experimental protocols were approved by the institutional Ethics Committee for Animal Experimentation (CEEAA) of the UFPE.

The rats were divided into three groups comprising of six rats each. The animals received the vegetable extract (5.71g / kg b.w.) by gavage, once a day (1 dose group) and twice a day (2 doses group) for 30 days. The extract amount administered to the animals was calculated to simulate the average consumption for humans, 400g of vegetables per day, recommended by WHO, using an average weight of 70kg. The control group received 1.5 mL of filtered water daily for 30 days.

Twenty-four hours after last treatment, the animals were anesthetized with ketamine and xilazin (1:1) followed by cervical dislocation. Blood samples were collected from the caudal vein.

3.3.3 Pesticide residue analysis

Presence of pesticides residues were investigated in vegetables samples used for extracts preparation. Laboratory of Pesticide Residue Analysis and other Contaminants (LABTOX) at ITEP performed analysis using gas-chromatography coupled with mass spectrometry, following the multiresidue method described by Anastassiades *et al.* (2003).

The estimation of daily intake (EDI) (mg/kg. b.w.) of pesticide residue was calculated according to pesticide concentration detected in the sample (mg/kg), proportion of the vegetable mass (kg) presented at the extract, and body weight (kg). In the present study, 0.250 kg was taken as animal's average weight. The EDI was compared to the acceptable daily intake (ADI) established by the Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO) 2011.

3.3.4 Comet assay

We conducted the comet assay under alkaline condition as described by Singh *et al.* (1988), and following Tice *et al.* (2000) Guidelines with minor modifications. 15ul of whole blood was suspended in 100ul of 0.5% low melting agarose (37°C). Were prepared two slides per subject. Cells suspension was placed on 1.5% normal melting agarose embedded slides. They were covered with coverslips and left at 4 °C for 10min. The coverslips were removed. Slides were immersed in cold working pH 10 lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂ EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100 and DMSO 10%) and left at 4 °C overnight. Then, we placed the slides in an electrophoresis alkaline buffer (1M NaOH and 200 mM EDTA, pH 13) for 20 min, to allow DNA unwinding and DNA breakage at alkali labile sites. Electrophoresis was conducted in the same alkaline buffer for 20 min at 33 V (0.82 V/cm) and 300mA at 4 °C. Those procedures were carried out under yellow light to prevent additional DNA damage and on ice to prevent DNA repair. After electrophoresis, the slides were rinsed in the neutralization buffer (0.4 M TRIS-HCl, pH 7.5) for 15 min, dehydrated in absolute ethanol for 5 min and left at room temperature for drying.

Slides were stained with 70ul of GelRed™ and viewed under a fluorescence microscope (Nikon, Eclipse 80i) with an excitation filter of 515–560 nm. We screened 100 nucleoids per subjects (50 from each slide). Comets were scored visually. Two parameters were evaluated: damage index (DI), in which each comet was designated to one of five classes (from no damage = 0 to maximum damage = 4) according to tail length and intensity (see figures in Collins *et al.* 2008). The values obtained for each individuals could range from

0 (completely undamaged: 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells x 4). Damage frequency (DF %), was calculated as the percentage of damaged nucleoids. To ensure the ability of the comet assay to detect DNA damage, slides with blood sample from the controls were exposed to hydrogen peroxide (200 μ M) for 5 min. The oxidative stress caused at DNA by this compound was used as positive control. All slides were coded before scoring to avoid bias.

3.3.5 Statistical analysis

The genotoxic variables distributions departed significantly from normality ($p < 0.05$, Kolmogorov Smirnov). Therefore, we used a non-parametric test, the Kruskal-wallis, followed by multiple comparison test, applied across the treatment groups was performed for data analyses. We used the software Statistica (version 7.0) to conduct statistical analyses. Significance was based on P value < 0.05 .

3.4 Results

The pesticide residue analyses detected 18 different types of pesticides. Organophosphorates, pyrethroids and carbamates were the most frequently chemical groups detected. Four percent of the pesticide residues found in samples were above the MRL, 48% remained below the MRL and others 48% of pesticide residues are not allowed in Brazil for peppers or tomatoes crops, according to the ANVISA 2011. The EDI values for both exposed group were lower than the ADI, under the experimental conditions. These results are summarized in Table 1. Mean differences on comet parameters of exposed and controls groups can be visualized in Figure 1. The control group had the highest mean of DNA damage (87.0 ± 9.71 DI; 76.16 ± 6.33 DF %), followed by 2 dose group (43.20 ± 25.66 DI; 31.60 ± 25.21 DF %) and 1 dose group (21.33 ± 9.79 DI; 15.16 ± 10.45 DF %). The multiple comparisons analyses showed that only difference between control and 1 dose group was statistically significant ($p < 0.05$). Hydrogen peroxide (200 μ M), used as positive control to test comet assay sensitivity, caused an increase in DI (10.43-fold) and DF% (12.21-fold), when compared with the control group (data not shown).

Table 1- Pesticide residues in the extracts of vegetables, Maximum Residue limit (MRL), Estimation of daily intake (EDI) and Acceptable daily intake (ADI) for the experimental treatments

	Pesticide residue (mg kg ⁻¹)	MRL (mg kg ⁻¹)	EDI (µg kg ⁻¹ bw) ^c		ADI (µg kg ⁻¹ bw) ^d
			1 dose	2 doses	
Vegetables extract (1)					
Acephate ^b	0.04	0.50	0.059	0.118	0 - 30
Carbofuran ^a	0.07	NA	0.103	0.207	0 - 1
Deltamethrin ^a	0.03	0.01	0.044	0.088	0 -10
Dimethoate ^a	0.1	NA	0.148	0.296	0 - 2
Formetanate hydrochloride ^a	0.8	2.0	1.184	2.368	0 -25
Imidacloprid ^a	0.1	0.5	0.148	0.296	0 - 60
Methamidophos ^b	0.02	NA	0.029	0.059	0 - 4
Methomyl ^a	0.06	NA	0.088	0.177	0 - 20
Omethoate ^a	0.14	NA	0.207	0.414	0 - 2
Permethrin (<i>cis</i> and <i>trans</i>) ^b	0.08	0.30	0.118	0.236	0 - 20
Tebuconazole ^a	0.09	0.1	0.133	0.266	0 - 30
Trifloxystrobin ^a	0.04	NA	0.059	0.118	0 - 40
Vegetables extract (2)					
Carbendazim (Benomyl, Thiophanate methyl) ^{a,b}	0.03, 0.05	NA, 0.20	0.118	0.236	0 - 30
Chlorpyrifos ^{a,b}	0.3, 0.03	NA, NA	0.488	0.976	0 - 10
Cyromazine ^b	0.008	0.03	0.011	0.023	0 - 60
Etofenprox ^b	0.02	0.5	0.029	0.059	0 - 30
Methomyl ^a	0.02	NA	0.029	0.059	0 - 20
Profenofos ^b	0.03	1.00	0.044	0.088	0 - 30
Tebuconazole ^b	0.01	0.10	0.014	0.029	0 - 30
Thiofanate methyl ^a	0.01	0.02	0.014	0.029	0 - 80
Vegetables extract (3)					
Chlorpyrifos ^b	0.009	NA	0.013	0.026	0 - 10
Cyromazine ^b	0.01	0.03	0.014	0.029	0 - 60
Imidacloprid ^b	0.02	0.5	0.029	0.059	0 - 60
Vegetables extract (4)					
Methomyl ^a	0.05	NA	0.074	0.148	0 - 20
Profenofos ^a	0.02	NA	0.029	0.059	0 - 30
^a pepper / ^b tomato NA – Not allowed in Brazil (ANVISA, 2011) ^c Calculated as [(Pesticide concentration * 0.00037) / 0,250] *1000 ^d FAO/WHO (2011)					

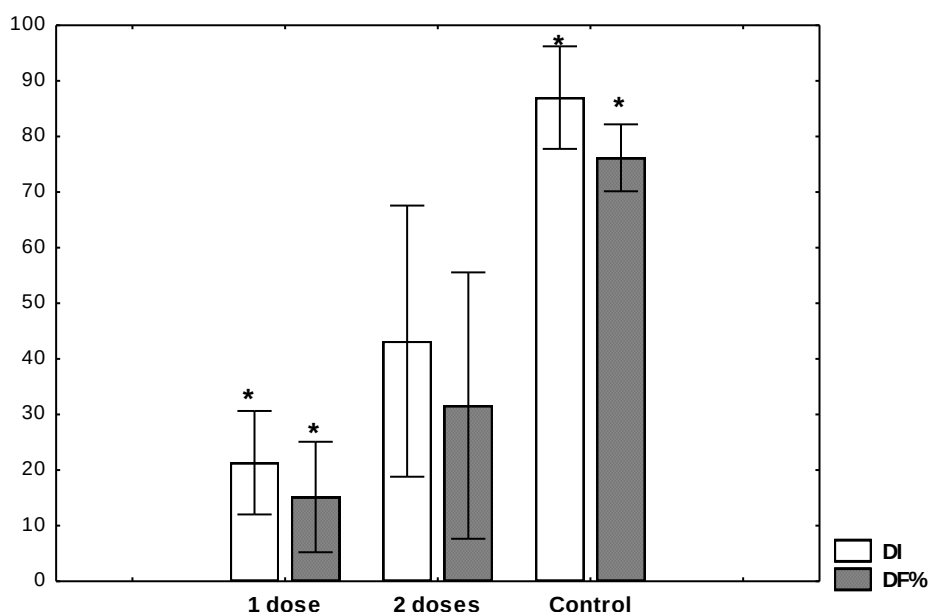


Figure 1- Means of damage index (DI) and damage frequency (DF %). * Significant at $p<0.05$; 1 dose x control ; Kruskal Wallis followed by multiple comparisons.

3.5 Discussion

Exposure to pesticides may be a significant risk factor for food consumers due to the frequent occurrence as residues in fruit and vegetables even at very low concentrations ($\mu\text{g/g}$ food) (Ojha et al. 2010). In the present study, about half of extract samples contained unauthorized pesticide residues and / or above the MRL. Organophosphorates, pyrethroids and carbamates were the most frequently chemical groups found. These pesticides have been reported to be positive genotoxic effects in experimental studies in biological systems (Ojha et al. 2010; Chakravarthi et al. 2007; Garrett et al. 1986). However, our results showed the pesticide residues in vegetables extract were not capable to induce DNA damage detected by comet assay parameters. Similar results were obtained by Isidori et al. (2009), where mutagenic and genotoxic effects were not found in vegetable extract (green peppers, aubergine and cherry tomato) contaminated with pesticides, using the Ames test and SOS Chromotest. It is noteworthy that the diary consuming of pesticide residue remained below of ADI recommended at present study. In another experiment, no carcinogenic effect was evidenced in mice exposed to a combination of 40 different pesticides, added at the proposed ADI concentrations (Nobuyuki et al. 1998).

Our results demonstrated that even contaminated with pesticide residues, the vegetable extract was able to reduce not just the genotoxic effects of pesticide, but also the endogenous genetic damage, under the experimental condition, since the control group showed a mean DI and DF% significantly higher than group 1 dose. The 2 doses group also showed lower damage when compared to control. However, this difference was not statistically significant. The lack of statistical significance can be attributed to type II statistical error. The death of an animal in group 2 doses during the experiment may have reduced the test power.

The antigenotoxic effects of vegetables extracts may be attributed to antioxidants substances naturally present in green peppers, tomatoes and cauliflower, such as vitamin C, flavonoids and carotenoids (USDA 2011). These substances are commonly associated to blocking, scavenging or neutralizing reactive oxygen species (ROS), protecting cellular macromolecules, including DNA, from oxidative damage induced by different agents (Anderson 1996; Noroozi et al. 1998; De Mascio et al. 1989). The genetic protection of antioxidants compounds during pesticide exposure was demonstrated in a study in which pesticides were pre-incubated with gallic acid or ascorbic acid and a mutagenic inhibitory effect was verified (Isidori et al. 2009).

Despite the absence of statistical significance in DI and DF% differences between exposed groups, it was observed that 2 doses group showed 2-fold more DNA damage than 1 dose group. Perhaps, the biological effects of chemicals naturally present at vegetable extract, including antioxidants, may have acted as genotoxic agents at high concentrations. The literature has been reported that even antimutagenic substances can act as mutagens at high concentrations. This type of event has been verified for curcumin (diferuloylmethane), a yellow-orange dye derived from the rhizomes of *Curcuma longa*, which is used as a spice and food-colouring. The results from in vivo and in vitro studies indicate curcumin possesses antioxidant and anticarcinogenic properties (Naik et al. 2004; Smerak et al. 2006). However, at high doses the same compound can also induce genetic damage (Cao et al. 2006, 2007). Experimental data indicated that high concentration of Vitamin C could induce clastogenic effects in human lymphocytes chromosome (Nefic 2008). The quercetin, group of flavonoids, caused mutagenicity generating micronuclei in human lymphocytes (Caria et al. 1995). However, it should be taken into account that in a complex biological system, besides the action of antioxidant found in foods, enzymatic mechanisms, such as the action of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, among other, also acts eliminating ROS (Cody et al. 1986). Thus, further studies are needed to confirm the hypothesis that high concentrations of vegetables on diet may cause genotoxic effects.

The constant usage of pesticides in crops, associated to the fact that some pesticides residues, such as liposoluble and systemic (translocated to plant), are slightly reduced by washing (Solomon et al. 2010), has made consumer concern over the conventional food quality and safety. Thus, the demand for organically grown food has intensified in recent years. However, recent research shows that these foods are not free of genotoxic agents, because they may contain pesticide residues due to contamination through soil or air. In addition, stress caused by pests, due to the absence of synthetic pesticides, promotes an increased toxins production to combat the pathogenic agent. These toxins have a high mutagenic power (Magkos et al. 2006). For these reasons, the exposition of organic vegetable was not used as negative control group in the present study.

3.6 Conclusion

In conclusion, the obtained results showed that pesticide residues found in the vegetable extract were not able to induce damage above the threshold of basal damages. Moreover, possibly substances naturally present in food promoted protection effects on DNA at low doses. Suggesting that despite the presence of pesticides residues, the consumption of vegetables is important for maintaining of genomic integrity.

Conflict of interest statement

There are no financial or personal interests that might pose a conflict.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Adelia Pessoa for her technical assistance. This study was funded by CNPq (Conselho Nacional para o Desenvolvimento da Ciência e Tecnologia) (482588/2009-8) and FACEPE (Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) (APQ-0858-08, IBPG-0870-4.01/09).

3.7 References

- Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/portioning and “Dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residue in produce. *Journal of AOAC international*.86:412-431.
- Anderson D. 1996. Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res.* 350:103-108.
- ANVISA (Brazilian Sanitary Surveillance Agency). 2011. Program analysis of pesticide residues in food. Available from: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/para/index.htm>
- Bolognesi C. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 543: 251-272.
- Bonner MR, Williams BA, Rusiecki JA, Blair A, Beane Freeman LE, Hoppin JA, Dosemeci M, Lubin J, Sandler DP, Alavanja MC. 2010. Occupational exposure to terbufos and the incidence of cancer in the Agricultural Health Study. *Cancer Causes Control.* 21: 871–877.
- Boobis R, Ossendorp BC, Banasiak U, Hamey PY, Sebestyen I, Moretto A. 2008. Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. *Toxicol Lett.* 180: 137–150.
- Cao J, Jia L, Zhou HM, Liu Y, Zhong LF. 2006. Mitochondrial and Nuclear DNA Damage Induced by Curcumin in Human Hepatoma G2 Cells. *Toxicol Sci.* 91(2): 476–483.
- Cao J, Jiang LP, Liu Y, Yang G, Yao XF, Zhong LF. 2007. Curcumin-induced genotoxicity and antigenotoxicity. *Toxicon* 49: 1219–1222.
- Caria H, Chaveca T, Laires A, Rueff J. 1995. Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line, and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res.* 343(2,3):85–94.
- Chakravarthi BK, Naravaneni R, Philip GH. 2007. Study of cypermethrin cytogenesis effects on Human lymphocytes using in-vitro techniques. *J Appl Sci Environ. Manage.* 11: 77–81. *Chem Toxicol.* 40: 825–839.
- Cody VJR, Middleton E, Harborne BJ. 1986. Biochemical, Pharmacological, and Structure-activity relationships. *Prog Clin Biol Res.* 213:113-124.
- Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaiva I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R. 2008. REVIEW The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* 23: 143–151.
- De Marco A, De Salvia R, Polani S, Ricordy R, Sorrenti F, Perticone P, Cozzi R, D'Ambrosio C, De Simone C, Guidotti M. 2000. Evaluation of genotoxic and cytotoxic properties of pesticides employed in Italian agricultural practices. *Environ Res.* 83:311-321.
- Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys.* 274 :532-538.
- Dybing E, O'Brien J, Renwick AG, Sanner T. 2008. Risk assessment of dietary exposures to compounds that are genotoxic and carcinogenic—An overview. *Toxicol Lett.* 180:110–117.
- Feretti D, Zerbini I, Zani C, Ceretti E, Moretti M, Monarca S. 2007. Allium cepa chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide treated vegetables and grapes. *Food Addit Contam.* 24:561-572.
- Feron VJ, Groten JP. 2002. Toxicological evaluation of chemical mixtures. Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 2011. Acceptable daily intakes, acute reference doses, short-term and long-term dietary intakes, recommended maximum residue limits and supervised trials median residue values. Summary Report of Joint FAO/WHO; 20-29 September 2011 ;Geneva.
- Garrett NE, Stack HF, Waters MD. 1986. Evaluation of the genetic activity profiles of 65 pesticides. *Mutat Res.* 168: 301–325.

- Groten JP, Butler W, Feron VJ, Kozianowski G, Renwick AG, Walker R. 2000. An analysis of the possibility for health implications of joint actions and interactions between food additives. *Regul Toxicol Pharmacol*. 31: 77–91.
- Isidori M, Caterino E, Criscuolo E, Fatigati V, Liguori G, Parrella A. 2009. Antimutagenic and antigenotoxic effects of vegetable matrices on the activity of pesticides. *Food Add Contam Part A* . 26:1049–1062.
- Jacobsen H, Østergaard, G, Lam HR, Poulsen ME, Frandsen, H, Ladefoged O, Meyer O. 2004. 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 Chem Toxicol* . 42: 1269–1277.
- Magkos F, Arvaniti F, Zampelas A. 2006. Organic Food: Buying More Safety or Just Peace of Mind? A Critical Review of the Literature. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 46(1):23-56.
- Naik RS, Mujumdar AM, Ghaskadbi S. 2004. Protection of liver cells from ethanol cytotoxicity by curcumin in liver slice culture in vitro. *J Ethnopharmacol*. 95: 31–37.
- Nefić H. 2008. The genotoxicity of vitamin C in vitro, *Bosnian journal of basic medical sciences* . 8 (2): 141-146.
- Nobuyuki I, Imaida K, Hagiwara A, Tamano S, Shirai T. 1998. Effects of ingesting a combination of 20 or 40 pesticide at ADI levels on carcinogenesis in rats. *Reviews in toxicology* 2:85-92.
- Noroozi. M, Angerson WJ, Lean ME. 1998. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Amer J Clin Nutr*. 67(6):1210–1218.
- Oates L, Cohen M. 2011. Assessing Diet as a Modifiable Risk Factor for Pesticide Exposure. *Int J Environ Res Public Health*. 8:1792-1804.
- Ojha A, Yaduvanshi SK, Pant SC, Lomash V, Srivastava N. 2010. Evaluation of DNA Damage and Cytotoxicity Induced by Three Commonly Used Organophosphate Pesticides Individually and in Mixture, in Rat Tissues. *Environmental Toxicology (online)*.
- Reffstrup TK. 2002. Combined actions of pesticides in food. Danish Veterinary and Food Administration (Danish Veterinary and Food Administration). *FødevareRapport*. 19:6–9.
- Silva J, Moraes CR, Heuser VD, Andrade VM, Silva FK, Emmel KV, Rohr P, Bordin DL, Andrezza AC, Salvador M, Henriques JP, Erdtmann B. 2008. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis* 23 :415–422.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 175 :184–191.
- Smerak P, Polivkova, Z, Sestakova H, Stetina R, Barta I, Langova M, Turek B, Bartova J. 2006. Antimutagenic effect of curcumin and its effect on the immune response in mice. *Czech J Food Sci*. 24: 72–83.
- Solomon KR, Stephenson GR, Corrêa CL, Zambrone FAD. 2010. *Praguicidas e o Meio Ambiente*. First edition. Brazil: ILSL.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen*. 35: 206-221.
- USDA – United States Department of Agriculture, National Agricultural Library. 2011. Nutrient Data Laboratory. Available from: http://fnic.nal.usda.gov/nal_display/index.php?info_center=4&tax_level=2&tax_subject=279&topic_id=1387
- Wilkinson CF, Christoph GR, Julien E, Kelley JM, Kronenberg J, McCarty J, Reiss R. 2000. Assessing the risk of exposures to multiple chemicals with a common mechanism of toxicity: how to cumulate?. *Regul Toxicol Pharmacol*. 31: 31– 43.

CAPÍTULO 4

4.1 Discussão geral

A avaliação dos danos genéticos associados à exposição ocupacional aos agrotóxicos, demonstrou que ocorreu um significativo aumento dos efeitos genotóxicos e mutagênicos no grupo dos trabalhadores rurais, quando comparado ao grupo controle. A capacidade de formação de adutos de DNA e espécies reativas de oxigênio (ROS) de muitos agrotóxicos devem ter sido responsáveis pela indução dos danos genéticos no grupo exposto (PETROVSKÁ & DUSINSKA, 1999; GALLOIS *et al.*, 2011). Além disso, a ausência de medidas de proteção durante as atividades laborais, intensificou a exposição e os danos genéticos causados pelos agrotóxicos. Na literatura científica existem controvérsias acerca da eficiência do uso de EPI na prevenção contra danos genéticos ocasionados pela exposição ocupacional aos agrotóxicos. O efeito protetor do uso de EPI foi especificamente avaliado nesse estudo. A comparação das médias de MNBC, BNC, DI e DF antes e após quinze dias de uso de EPI (durante as atividades laborais) demonstrou uma redução significativa dos efeitos genotóxicos e mutagênicos em indivíduos do grupo exposto.

Os fatores tabagismo e consumo de álcool, quando em associação, promoveram interação em relação à frequência de MNBC. O etanol pode ter potencializado a ação mutagênica do tabaco, devido a suas propriedades citotóxicas, induzindo a morte celular e consequente multiplicação de células basais portadoras de danos genéticos causados previamente pelo tabaco (WEINBERG, 2008). Evidências sugerem que os efeitos genotóxicos aumentam em função da idade, devido ao acúmulo de danos ocasionados por agentes endógenos e ambientais ao longo do tempo. Contudo, não houve correlação entre danos genéticos e idade no presente estudo. A falta de correlação também foi demonstrada para o fator tempo de exposição. A influência desses fatores em relação a danos genotóxicos não está bem esclarecida pela literatura (SAILAJA *et al.*, 2008). A divergência nos resultados pode ser justificada pelas diferenças na exposição, susceptibilidade genética a danos no DNA e/ou capacidade individual de reparação do material genético.

A avaliação do risco genotoxicológico associado à exposição alimentar de vegetais contaminados por resíduos de agrotóxicos realizado em ratos *Wistar* demonstrou que os

resíduos não foram capazes de induzir efeitos genotóxicos acima do limiar de danos basais. Várias amostras de vegetais foram consideradas insatisfatórias pela presença de resíduos acima do MRL ou pela presença de agrotóxicos não permitidos no Brasil. Contudo, os valores de EDI estiveram abaixo dos valores de ADI recomendados.

As médias do DI a DF no grupo exposto foram inferiores ao grupo controle. Possivelmente, substâncias naturalmente presentes no extrato tenham atuado como agentes antígenotóxicos. Os efeitos antioxidantes da vitamina C, flavonóides e carotenóides presentes nos vegetais (USDA, 2011) podem ter reduzido os danos genéticos causados por estresse oxidativo. Porém, quando administradas em altas concentrações essas substâncias podem ter atuado como genotoxinas, justificando o aumento nos danos genéticos no grupo 2 doses em relação ao grupo 1 dose. Os resultados sugerem que, apesar da presença de resíduos de agrotóxicos, o consumo de vegetais é importante para manutenção da integridade genômica.

4.2 Conclusões

- O fator exposição ocupacional aos agrotóxicos promoveu aumento significativo nos biomarcadores de mutagenicidade, genotoxicidade e defeitos na citocinese do grupo exposto quando comparado ao grupo controle.
- Quando associados, os fatores tabagismo e ingestão de álcool causaram uma interação na frequência de MNBC na amostra total.
- As variações das frequências de MNBC entre o grupo exposto e controle foram influenciados pelos fatores tabagismo e consumo de álcool.
- Não houve correlação entre idade, tempo de exposição e danos genéticos no grupo exposto aos agrotóxicos.
- O uso de EPI causou redução significativa dos danos genotóxicos ocasionados pela exposição ocupacional aos agrotóxicos, sendo eficientes na prevenção desses eventos.
- A ingestão do extrato de vegetais contaminados por resíduos de agrotóxicos não promoveu efeito genotóxico nos animais expostos quando comparado ao grupo controle.

- A análise de múltiplos resíduos de agrotóxicos nas amostras de vegetais, demonstraram que os animais foram expostos a concentrações de resíduos de agrotóxicos inferiores aos valores da ADI recomendados.
- O extrato de vegetais promoveu efeito antígenotóxico, quando administrado em baixas concentrações.
- Biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade foram úteis na avaliação dos danos genéticos oriundos da exposição ocupacional e alimentar aos agrotóxicos.

REFERÊNCIAS

- ANDREOTTI, G. et al. Agricultural pesticide use and pancreatic cancer risk in the Agricultural Health Study Cohort. **Int. J. Cancer**, v.124, p.2495–2500, 2009.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/251109>>. Acesso em: 24 de jan 2012.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (2011)**, Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/reblas/para/index.htm>>. Acesso em: 25 dez 2011.
- ALVES FILHO, J.P. **Uso de agrotóxicos no Brasil controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume, p. 188, 2002.
- ANTONUCCI, G.A.; STYLLOS COLUS, I.M. Chromosomal aberrations analysis in a Brazilian population exposed to pesticides. **Teratog. Carcinog. Mut.**, v. 20, p. 265–272, 2000.
- ATSDR , Guidance manual for the assessment of joint toxic Action of chemical mixtures. Department of Health and Human Services, Public Health Service of Toxic Substances and Disease Registry ,Division Of Toxicology, Atlanta, USA. Disponível para o publico em Fevereiro de 2002.
- BEANE FREEMAN, L.E. et al. Cancer incidence among male in the Agricultural Health Study cohort exposed to diazinon. **Am. J. Epidemiol.** v.162, n.11, p.1070–1079, 2005.
- BELPAEME, K.; DELBEKE, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS. M. Cytogenetic studies of PCB on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v.11, p.485-492, 1996.
- BERNSTEIN, C. et al. Field defects in progression to gastrointestinal tract cancers. **Cancer Letter**. Washington, 260, 1–10, 2008.
- BHALLI, J.A. et al. DNA damage in Pakistani agricultural workers exposed to mixture of pesticides. **Environ. Mol. Mutagen.** v.50, p.37–45, 2009.
- BOLOGNESI, C.; PARRINI, M.; MERLO, F.; BONASSI, S. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research** , 543: 251-272, 2003.
- BONASSI, S. et al. The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. **Mutation Research**, v.728,p.88-97, 2011.
- _____. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in human. **Carcinogenesis Advanced Access**, v.28, p.625-631, 2007.
- BONNER, M.R. et al. Occupational exposure to terbufos and the incidence of cancer in the Agricultural Health Study. **Cancer Causes Control**, v.21, p.871–877, 2010.

BOOBIS, A.R. et al. Framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. **Crit. Rev. Toxicol.** v.38, p.87–96, 2008.

Brasil. Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, 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 e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 jul.1989.

CAO, J. The Applications, Developments and Expectations of Micronucleus Test in China. **Yi Chuan**, v. 25, n.1, p.73-76, 2003.

CARVALHO, M.B.; RAMIREZ, A.; GATTÁS, G.J.F. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e de orofaringe. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.48, n.4, p.317-322, 2002.

CASTILLO-CADENA, J. et al. Determination of DNA damage in floriculturists exposed to mixtures of pesticides. **J. Biomed. Biothechnol**, v. 2006, p.1-12, 2006.

CASTRO, V. L. S. S. Uso de Misturas de Agrotóxicos na Agricultura e Suas Implicações Toxicológicas na Saúde. **Jornal Brasileiro da Sociedade de Ecotoxicologia**, v. 4, p. 87-94, 2009.

COLLINS, A. R. et al. REVIEW The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p.143–151, 2008.

COSTA, C. et al. Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. **Mutagenesis**, v. 21, p.343–350, 2006.

DYBING, E.; O'BRIENB, J.; RENWICKC, A.G.; SANNERD, T. Risk assessment of dietary exposures to compounds that are genotoxic and carcinogenic—An overview. **Toxicology Letters**, v.180, p.110–117, 2008.

CREBELLI, R. et al. A.Biomonitoring of primary aluminium industry workers :detection of Micronuclei and repairable DNA lesions by alkaline SCGE. **Mutat.Res.** v.516, p. 63–70, 2002.

ERGENE, S.; CELIK, A.; CAVAS, T.; KAYA, F. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. **Environmental International**, v.33, p. 877-885, 2007.

FERON, V.J.; GROTEN, J.P.; VAN BLADEREN, P.J. Exposure to humans to complex chemical mixtures: hazard identification and risk assessment. **Archives Toxicology**, v.20, p.363–373, 1998.

GALLOIS, J. et al. DNA adduct variations in non-smoking crop farmers: Potential relationship with occupational exposure to pesticides?. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v.32, p.1–9, 2011.

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: mutações, câncer & reprodução**. 1ª ed. Brasília: UnB, 2005.

GROTEN, J.P.; FERON, V.J.; SE UHNEL, J. Toxicology of simple and complex mixtures. **Trends Pharmacological Science**, v.22, p.316–321, 2001.

GUILLAMET, E. et al. In vitro DNA damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v.19, p.129–135, 2004.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. **Environ.Mol.Mutagen.**, v.23, p. 299–305, 1994.

IARC (International Agency for Research on Cancer), IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Preamble. International Agency on Research on cancer, Lyon. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/2006> >. Acesso em: 21 de Nov 2010.

IKEDA, M. Multiple exposure to chemicals. **Regul.Toxicol Pharmacol.**v. 8,p.414–42, 1988

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, p.1269–1277, 2004.

JARDIM, A.N.O.; CALDAS, E.D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química Nova**, v.32, n. 7, p.1898-1909, 2009.

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

LU, C. et al. Dietary intake and its contribution to longitudinal organophosphorus pesticide exposure in urban/suburban children. **Environmental Health Perspective**, v.116, p.537-542. 2008.

MARTÍNEZ-VALENZUELA, C. et al. Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. **Environmental International**, v. 35 , p. 1155–1159, 2009.

MCKENNA, D.J.; MCKEOWN, S.R.; MCKELVEY-MARTIN, V.J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p.183-190, 2008.

MEHROTRA, N.K.; KUMAR,S.; SHUKULA,Y. Tumor initiating activity of mancozeb-a carbamate fungicide im mouse skin. **Cancer letters**, v.36, p.283-287,1987.

MIERT, E. V. et al. Evaluation of the micronucleus assay in bone marrow and peripheral blood of rats for the determination of cigarette mainstream- smoke activity. **Mutation Research**, v. 65, p.131–138, 2008.

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

MOURA, R.M. Rachel Carson e os agrotóxicos, 45 anos após Primavera Silenciosa. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, vols 5 e 6, p.44-42, 2008-2009.

MUMTAZ, M.M. Risk assessment of chemical mixtures from a Public health perspective. **Toxicology Letters**, v. 82, p.527–532, 1995.

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

OSTLING, O. & JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.123,p. 291–298,1984.

PASTOR, S. et al. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. **Mutagenesis**, v.18, n.3, p.249–258, 2003.

PASTOR, S. et al. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. **Mutagenesis**, v.16,p. 539–545, 2001.

PETROVSKÁ, H.; DUSINSKA. M. Oxidative DNA damage in human cells induced by Paraquat, **ATLA** v.27, p. 387–395, 1999.

POIRIER, M.C. Chemical-induced DNA damage and humancancer risk. **Natural. Rev. Cancer** v.4, p.630–637, 2004.

REFFSTRUP, T.K., Combined actions of pesticides in food. Danish Veterinary and Food Administration (Danish Veterinary and Food Administration). **FødevarerRapport**,v.19, p.6–9, 2002.

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

SASAKI, Y.F. et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation Research**, v.519, p.103–119, 2002.

SAILAJA, N. et al. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. **Mutation Research**, v. 609,p. 74–80, 2006.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutation Research**, v.31, p.9-15, 1975.

SILVA, J. et al. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. **Mutagenesis**, v.23, p. 1–8, 2008.

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

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.;SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research** , v.175, p. 184-91, 1988.

SIQUEIRA, D.F. **Qualidade de vida de trabalhadores rurais de comunidades assistidas pelo instituto agrônomo de Pernambuco (IPA) no município de Vitória de Santo Antão-PE**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

SOLOMON, K.R; STEPHESON, G.R; CORRÊA, C.L; ZAMBRON, F.A.D. **Praguicidas e o Meio Ambiente**. 1. ed. São Paulo:ILSL, 2010.

SPONCHIADO, G. **Avaliação Ecotoxicológica de 17 β -estradiol por meio de parâmetros genéticos utilizando como modelo experimental *Oreochromis niloticus***. Dissertação de mestrado, Universidade Positivo. Curitiba, 2008

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen**, v.35, n.3, p.206-221, 2000.

_____ et al. The single cell gel assay: A sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. **Basic Life Sci.** v.53, p.291–301, 1990.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and Other Nuclear Anomalies in Buccal Smears: Methods Development. **Mutation Research**, v. 271, n.1, p. 69-77, 1992.

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

USDA – United States Department of Agriculture, National Agricultural Library. Nutrient Data Laboratory. Disponível em: <http://fnic.nal.usda.gov/nal_display/index.php?info_center=4&tax_level=2&tax_subject=279&topic_id=1387>. Acesso em: 15 de dez 2011.

VALVERDE, M.; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutation Research**, v. 681, p. 93–109, 2009.

VIEL, J.F.; CHALLIER, B.; Bladder cancer among French farmers: does exposure to pesticides in vineyards play a part? **Occup. Environ. Med.** v.52, p.587–592, 1995.

WEINBERG, R. A. **A biologia do Câncer**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WHO, World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em 31 dez 2011.

YANG, R.S.H. et al. The application of physiologically based pharmacokinetic/ pharmacodynamic (PBPK/PD) modeling for exploring risk assessment approaches of chemical mixtures. **Toxicology Letters**, v.79, p.193–200, 1995.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Nela consta o telefone e endereço do pesquisador principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Nome da pesquisa: Avaliação, por parâmetros de genotoxicidade, das condições ambientais laborais dos trabalhadores do cultivo de hortaliças expostos a pesticidas

Pesquisador responsável: Cristiano Aparecido Chagas

Endereço: Rua do Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista. Vitória de Santo Antão – PE CEP. 55 608-680.

Telefone: 081 3523 0670

Pesquisadores participantes: Erika Maria Silva Freitas

Assinatura do pesquisador: _____

OBJETIVO DA PESQUISA:

Os produtores de hortaliças estão sob constante pressão do mercado consumidor no sentido de oferecer grandes quantidades de produtos e com boa aparência. Para isso, utilizam pesticidas (agrotóxicos) em grande quantidade. Estes produtos podem estar relacionados a danos genéticos nos agricultores. Esses danos podem provocar o aparecimento de câncer, prejudicando a saúde do trabalhador rural. Em 2010 nosso grupo de pesquisa demonstrou que os agricultores dos distritos agrícolas de Natuba e Figueira, expostos aos pesticidas, apresentaram um dano estatisticamente significativo quando comparados ao grupo controle. Com o objetivo de avaliar a eficiência dos Equipamentos de Proteção Individuais (EPIs) na proteção contra os efeitos genotóxicos dos pesticidas, serão realizadas coletas de sangue e de células bucais de indivíduos expostos a pesticidas, sendo realizados os testes do micronúcleo e Ensaio Cometa. Cada sujeito da pesquisa receberá um kit com alguns EPIs, e após 30 dias será realizada uma nova coleta. Os resultados antes e após o uso dos EPIs serão comparados estatisticamente.

POSSÍVEIS DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS

Para realização da pesquisa será necessária a coleta de sangue, através de punção venosa do braço de cada participante, realizada por um profissional de capacitado com uso de material descartável, sem risco de contaminação. Um possível desconforto é uma leve sensação dolorosa no local da coleta. Poucos riscos estão associados ao procedimento. Podendo ocorrer a formação de um hematoma (acúmulo de sangue sob a pele); Flebite (irritação química ou mecânica). O segundo procedimento será coleta de células bucais, com o auxílio de uma escova descartável, sendo o procedimento indolor.

BENEFÍCIOS

O participante da pesquisa contribuirá para o conhecimento acerca do dano genético provocado em agricultores expostos a misturas de pesticidas, evidenciando a necessidade de

conscientização quanto ao uso de equipamentos individuais. Nos momentos de coleta os agricultores receberão um kit com alguns Equipamentos de Proteção Individual (EPI), de modo a minimizar os efeitos dos agentes nocivos tanto do ponto de vista genético quanto fisiológico influenciando na sua qualidade de vida.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA E ANÔNIMA

A participação na pesquisa é voluntária e anônima. Não será divulgada nenhuma informação sobre a identidade dos voluntários, não ocorrendo nenhuma publicação sem o consentimento do participante. O material biológico coletado será codificado e armazenado anonimamente. Em qualquer momento, o agricultor poderá solicitar sua exclusão na pesquisa, e não será penalizado.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO Nº _____

Eu, _____, concordo em participar da pesquisa: *Avaliação, por parâmetros de genotoxicidade, das condições ambientais laborais dos trabalhadores do cultivo de hortaliças expostos a pesticidas.* Fui devidamente informado e esclarecido sobre a pesquisa, os objetivos nela envolvidos, assim como os possíveis desconfortos e *riscos* decorrentes de minha participação. Todos os resultados obtidos nas pesquisas serão sigilosos, quanto a minha identidade, sendo possível o esclarecimento de dúvida em qualquer momento no decorrer da pesquisa, bem como posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade.

Vitória de Santo Antão, ____ de _____ de 2011

Nome do Voluntário: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: Cristiano Aparecido Chagas

Assinatura do pesquisador: _____

Testemunhas

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa**

Of. N.º 176/2009 - CEP/CCS

Recife, 30 de junho de 2009

Registro do SISNEP FR – 255465

CAAE – 0064.0.172.000-09

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 084/09

Título: "Avaliação, por parâmetros de genotoxicidade, das condições ambientais laborais dos trabalhadores do cultivo de hortaliças expostos e pesticidas"

Pesquisador Responsável: Cristiano Aparecido Chagas

Senhor Pesquisador:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 30 de junho de 2009.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar o relatório ao final da pesquisa.

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Ao
Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas
Centro Acadêmico de Vitória/ UFPE

Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 18 de maio de 2010

Ofício nº 271/2010

Da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Cristiano Aparecido Chagas**
Departamento Núcleo de Biologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076. 020461/2010-09

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"MISTURAS DE PESTICIDAS NA ALIMENTAÇÃO TÊM EFEITO GENOTÓXICO?"**

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Observação:

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição;
Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: Machos; Idade: 8
semanas; Número de animais previsto no projeto: 16 (dezesseis)
animais.

Atenciosamente,



Prof. Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver

MUTATION RESEARCH- GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL MUTAGENESIS

GUIDE FOR AUTHORS:

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Article structure

Subdivision - numbered sections : Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction : State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and method: Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results : Results should be clear and concise.

Discussion : This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature

Conclusions The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices : If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers** (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

Abstract :A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should be up to 300 words of size.

Highlights :Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords :Immediately after the abstract, provide between 3 to 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations

Math formulae :Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes :Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Tables :Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters.

Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text : Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references: As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue : Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style : *Text*: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '.... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

FOOD ADDITIVES & CONTAMINANTS, PART A

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS:

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the [guide for ScholarOne authors](#) before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

The instructions below are specifically directed at authors that wish to submit a manuscript to ***Food Additives & Contaminants, Part A***. For general information, please visit the [Author Services](#) section of our website.

Food Additives & Contaminants, Part A publishes original research papers and critical reviews covering analytical methodology, occurrence, persistence, safety evaluation, detoxification and regulatory control of natural and man-made additives and contaminants in the food and animal feed chain. Papers are published in the areas of pesticide and veterinary drug residues, environmental contaminants, natural toxicants, mycotoxins, trace elements, migration from food packaging, food processing contaminants, authenticity and allergenicity of foods. Papers are published on animal feeds where residues and contaminants can give rise to food safety concerns. Contributions cover chemistry, biochemistry and bioavailability of these substances, factors affecting levels during production, processing, packaging and storage; the development of novel foods and processes; exposure and risk assessment.

Food Additives & Contaminants, Part A considers all manuscripts on the strict condition that they have been submitted only to *Food Additives & Contaminants, Part A*, that they have not been published already, nor are they under consideration for publication or in press elsewhere. Authors who fail to adhere to this condition will be charged with all costs which *Food Additives & Contaminants, Part A* incurs and their papers will not be published. Contributions to *Food Additives & Contaminants, Part A* must be original research and will be subjected to peer-review by referees.

1. General guidelines

- Papers are accepted only in English.
- Manuscripts should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text; acknowledgments; appendices (as appropriate); references; table(s) with caption(s) (on individual pages); figure caption(s) (as a list). A word count should be included and authors should indicate if the paper is for a special issue.
- There is no maximum or minimum length for submissions but the average is around seven to ten printed pages.
- [Abstracts](#) are required for all papers submitted.
- Each paper should have two to twelve [keywords](#) taken only from designated listing available on Manuscript Central.
- Section headings should be concise.
- For all manuscripts non-discriminatory language is mandatory. Sexist or racist terms should not be used.
- Authors must adhere to [SI units](#). Units are not italicised.
- When using a word which is or is asserted to be a proprietary term or trade mark, authors must use the symbol ® or TM.

- Authors should NOT use ppb or ppm as units of concentration but should use ng g⁻¹ and mg kg⁻¹ respectively
- References are cited by author and year in the text and listed alphabetically - for a full description see Complete Style Guide.

2. Style guidelines

- [Description of the Journal's article style](#) Please note that **sections should not be numbered.**
- [Description of the Journal's reference style](#). Please note that references are cited by author and year in the text and listed alphabetically - for a full description see Complete Style Guide.
- [Guide to using mathematical symbols and equations](#)

[Word templates](#) are available for this journal. If you are not able to use the template via the links or if you have any other template queries, please contact authortemplate@tandf.co.uk (please mention the journal title in your email).

3. Figures

- It is in the author's interest to provide the highest quality figure format possible. Please be sure that all imported scanned material is scanned at the appropriate resolution: 1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour.
- Figures must be saved separate to text. Please do not embed figures in the paper file.
- Files should be saved as one of the following formats: TIFF (tagged image file format), PostScript or EPS (encapsulated PostScript), and should contain all the necessary font information and the source file of the application (e.g. CorelDraw/Mac, CorelDraw/PC).
- All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper (e.g. figure 1, figure 2). In multi-part figures, each part should be labelled (e.g. figure 1(a), figure 1(b)).
- Figure captions must be saved separately, as part of the file containing the complete text of the paper, and numbered correspondingly.
- Figures should be produced as near to the finished size as possible.

The filename for a graphic should be descriptive of the graphic, e.g. Figure1, Figure2a