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

**DETECÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE,
DO INSETICIDA FIPRONIL NO ORGANISMO TESTE *Allium cepa***

Janaína Pedro

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

Abril - 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**DETECÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE,
DO INSETICIDA FIPRONIL NO ORGANISMO TESTE *Allium cepa***

Janaína Pedro

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Aparecida Marin-Morales

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

628.52 Pedro, Janaína
P372d Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e
mutagenicidade do inseticida fipronil no organismo teste
Allium cepa / Janaína Pedro. – Rio Claro : [s.n.], 2008
104 f. : il., tabs, gráfs., figs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Aparecida Marin Morales

1. Pesticidas – Aspectos ambientais. 2. Mutagênese
ambiental. 3. Metabólitos de degradação. 4. Aberrações
cromossômicas. 5. Perigos à saúde humana. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Não adormeças pensando que uma coisa é difícil, pois correrás o risco de seres despertado pelo barulho de alguém que a executa.

Dedico essa tese aos meus pais Odair e Fátima por muitas vezes abdicarem de seus sonhos para realizar os meus, sempre com muito amor, as minhas irmãs Tatiane e Juliana que são verdadeiras amigas e companheiras, para todas as horas, ao meu namorado Rudy pelo companheirismo, compreensão e ajuda na realização desse trabalho.

Agradeço, primeiro a Deus, por ter me dado a vida, e a oportunidade de realizar mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS:

A CAPES, pela bolsa concedida e ao Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro, por me darem condições para realização desse trabalho concluído.

Agradeço a minha orientadora Marin não só pela orientação nessa nova caminhada, mas pela sua amizade, companheirismo, ensinamento e seu otimismo para encarar as coisas.

A professora Carmem pelas risadas, momentos de descontração e pelas dicas que ajudaram e muito na conclusão desse trabalho.

A professora Maria Isabel por contribuir com seus conhecimentos na realização desse trabalho.

Agradeço ao professor Odair por ter cedido o laboratório do CEIS para que pudesse desenvolver parte do meu trabalho.

Agradeço a professora Sanae pelas críticas construtivas quando corrigia os meus relatórios, e quero deixar bem claro que não fui eu que contribuí para sua fama de "mau".

A técnica Itamara por estar sempre pronta a me ajudar quando precisei.

Quero agradecer aos meus pais Odair e Fátima que são de fundamental importância a minha vida, por me darem suporte, incentivo e amor para que pudesse chegar até aqui e, por creditarem que eu seria capaz.

Agradeço as minhas irmãs Tatiane e Juliana por sempre estarem presentes nessa minha jornada, sempre me ajudando e se interessando pelo meu trabalho, vocês são muito especiais para mim.

É claro, que jamais me esqueceria de agradecer ao meu namorado Rudy por ser uma pessoa muito especial, um verdadeiro companheiro, sempre me incentivando a seguir em frente, me ajudando, especialmente, na realização desse trabalho, obrigado por ser quem é.

Aos amigos do laboratório de Mutagênese Thaís, Jaqueline, Daniela, Dânia, Livia, Nadia, Cristiane, Bárbara, Bruna, Márcia, Silvia, Renata, Eduardo, Matheus, Davi, Sandra, Cintya, Tatiana, José e Izabela, pela ajuda a este trabalho, pelas conversas descontraídas e também sérias e pelas muitas risadas.

Agradeço as amigas Thaís, por me ensinar a analisar lâminas, e a Jaqueline por me ensinar a fazer a primeira lâmina.

Aos amigos Reinaldo, Gal, Thiago, Bombeiro, Rogilene, Milena, Mariele, que apesar de não serem da mutagênese, estão sempre juntos nos momentos de descontração e inúmeras risadas, vocês são muito divertidos.

Não poderia deixar de agradecer a uma pessoa que muito me ajudou e torceu para que eu chegasse até aqui, a grande amiga e professora de Inglês Miriam, muito obrigado.

Aos professores que passaram ao longo da minha caminhada, muito obrigado, pois vocês também contribuíram com uma grande parcela de ensinados e conhecimentos, pare que pudesse chegar aonde cheguei.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, que dividiram comigo bons e maus momentos e, caso tenha me esquecido de alguém peço desculpas.

ÍNDICE:

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2.OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1. Agrotóxicos.....	6
3.2. Inseticida Fipronil.....	9
3.3. Mutagênese Ambiental.....	11
3.4. <i>Allium cepa</i> como organismo teste.....	13
3.4.1. Teste de Aberrações cromossômicas em <i>Allium cepa</i>	15
4. ARTIGO 1.....	18
Artigo de Revisão: Características, modos de ação e efeitos do inseticida fipronil sobre o ambiente e os organismos expostos.	
5.ARTIGO2.....	50
Avaliação dos efeitos tóxicos e genotóxicos do inseticida fipronil, sobre o sistema teste de <i>Allium cepa</i> .	
6. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	81
7.BIBLIOGRAFIA.....	89

Resumo

Os agrotóxicos constituem uma importante estratégia da agricultura, para a obtenção de uma produtividade economicamente viável, pois são substâncias utilizadas no combate de organismos indesejáveis. Os inseticidas são agentes que têm ação de combater insetos, tanto na fase adulta como larval. O fipronil é um composto do grupo fenil-pirazol, toxicologicamente classificado como altamente tóxico, amplamente utilizado em campos agrícolas do estado de São Paulo, bem como nas residências, para combater insetos pragas. A ação deste inseticida se dá pela sua ligação ao canal de cloro, promovendo o bloqueio da ativação da condução dos estímulos nervosos, pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), uma substância que controla o fluxo de íons cloro, através da membrana da célula nervosa. Em pequenas concentrações, apresenta uma eficiente ação nos organismos alvos. Esta característica também pode causar problemas ao meio ambiente, muitas vezes, longe até dos lugares onde foi aplicado. O fipronil, em temperaturas moderadas, é estável no ambiente por cerca de um ano. Estudos mostram que esse inseticida pode ser degradado em diversos metabólitos, que são ainda mais tóxicos que ele. Quanto a sua persistência no ambiente, o fipronil apresenta variações decorrentes da sua formulação, mas os seus metabólitos podem ser mais persistentes que o próprio inseticida. Resíduos de fipronil podem ser bioacumulados no tecido adiposo, indicando uma potencialidade de transferência via cadeia trófica. No presente trabalho, foram avaliadas as potencialidades tóxicas, citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas do inseticida fipronil, por meio de bioensaios com *Allium cepa*, cujas sementes foram expostas à germinação em fipronil. Os resultados indicam que o inseticida não apresentou efeito tóxico e citotóxico para a espécie *A. cepa*, quando se

comparou os dados dos testes realizados com o inseticida com os do controle negativo. O fipronil promoveu diversos tipos de aberrações cromossômicas, além da presença de células micronucleadas, comprovando a sua ação genotóxica e de mutagênica. Também observamos uma diferença de ação do inseticida, quanto aos tipos de exposição ao mesmo (presença ou ausência de luz), sugerindo a possível ação, nestes casos, do metabólito MB 46513, substância que aparece em decorrência da fotólise do fipronil.

Palavras-Chaves: Fipronil, metabólitos de degradação, vias de ação, *Allium cepa*, aberrações cromossômicas, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, perigos à saúde humana.

Abstract

The pesticides are an important strategy for agriculture, to obtain productivity economically viable, because they are substances used to eliminate pest organisms. Insecticides are agents which have action to combat insects, in both the adult and larval stage. The fipronil is a group composed of phenyl-pyrazole, toxicologically classified as highly toxic, and it is widely used in agricultural fields in Sao Paulo State, as well as in homes, to combat insect pests. This insecticide acts through its connection to the channel chlorine, promoting blockade in the activation of the conduct of nervous stimuli, the gamma-aminobutyric acid (GABA), a substance that controls the flow of chloride ions through the cell membrane of nerve. In small concentrations, presents an efficient action in the organism targets. This feature can also cause problems to the environment, often far to the places where it is applied. In moderate temperatures, the fipronil is stable in the environment for about a year. Studies show that this insecticide can be degraded in various metabolites, which are even more toxic than the fipronil. Relative to its persistence in the environment, the fipronil presents variations resulting from its formula, but their metabolites may be more persistent than the insecticide. Residues of fipronil can be bioaccumulated in adipose tissue, indicating a potential of transference by the food chain. In the present research, it had been evaluated the toxic, cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials of the fipronil insecticide through bioassays with *Allium cepa*, whose seeds were exposed to germination in this insecticide. The results indicate that the insecticide presented no toxic and cytotoxic effects for the *A. cepa* species, when we compared the data resulting from the tests performed with the insecticide and with the negative control. The fipronil promoted

several types of chromosome aberrations, and the presence of micronucleated cells, proving its genotoxic and mutagenic action. We also report a difference in action of the insecticide, as the types of exposure to it (presence or absence of light), suggesting a possible action, in both cases, of the metabolite MB 46513, that is a substance that appears due to the light degradation of the fipronil insecticide.

Keywords: Fipronil, metabolites of degradation, avenues of action, *Allium cepa*, chromosome aberrations, cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, human health hazards.

1. INTRODUÇÃO

Os seres vivos estão expostos às ações de numerosos agentes potencialmente tóxicos. Esses agentes podem ser físicos, químicos ou biológicos e podem provocar efeitos fisiológicos, bioquímicos, patológicos e, em alguns casos, genéticos (ARNAIZ, 1995). Uma grande variedade de substâncias químicas com potencial mutagênico, tanto naturais como sintéticos, tem sido pesquisada. Muitas destas substâncias, que são encontradas nos alimentos, em drogas farmacêuticas, nos complexos de efluentes domésticos e industriais e nos defensivos agrícolas, podem causar mudanças prejudiciais herdáveis, sem que se expressem de imediato (VOGEL, 1995).

O uso de agrotóxicos constitui, atualmente, a principal estratégia da agricultura para o combate e a prevenção de pragas agrícolas, garantindo alimento em quantidade suficiente e de qualidade para a população. Esses compostos, porém, podem apresentar certa toxicidade ao homem, induzindo efeitos adversos, como ação imunodepressora ou ainda carcinogênica, além de impactar o próprio ambiente físico (VOGEL, 1995).

Há muito tempo, muitos trabalhos têm revelado a presença de níveis alarmantes de agrotóxicos nos ecossistemas, com acúmulos significativos no solo, na água, no ar, nas plantas, nos animais e nos alimentos (PARSONS e WITT, 1989; BORTOLUZZ, 2006; POTTER et al., 2007) que, por meio desses últimos, podem chegar ao homem, ocasionando danos à sua saúde (EDWARDS, 1973, Usepa, 1996 *apud* TINGLE et al, 2003; LOURENCETTI et al., 2007).

O Brasil é o quarto maior mercado de agrotóxicos do mundo e o oitavo em uso por área cultivada. Dentre os produtos agrícolas aprovados para uso no país, estão os

herbicidas, os acaricidas, os reguladores de crescimento, os feromônios, os moluscicidas e os protetores de sementes (CALDAS e SOUZA, 2000).

Com este uso extensivo de produtos agrícolas, o impacto ambiental por esses químicos é crescente. A ação impactante de um produto químico está relacionada com a sua característica, por isso é dependente do potencial de dispersão do agente, da concentração encontrada no ambiente, além da própria toxicidade do produto. Entre os agrotóxicos, os mais perigosos são os herbicidas e os inseticidas, por causarem intoxicações graves, mas, segundo Zambrone (1986) e Tingle (2003), os inseticidas são, ainda, os mais detrimentais, por serem responsáveis pelo maior número de óbitos.

A avaliação dos níveis de contaminação terrestre pode ser feita pela utilização de várias espécies silvestres, tais como roedores, marsupiais, répteis, anfíbios, dentre outros, que são organismos considerados bioindicadores de poluição ambiental. Por esses animais, pode-se estudar as frequências de aberrações cromossômicas, lesões neurológicas, alterações na fertilidade, danos no DNA e a ocorrência de tumores, que, muitas vezes, podem estar relacionados com a detecção de altos índices de resíduos de contaminantes no sangue ou nos tecidos dos organismos (GRISOLIA, 2005).

A crescente introdução de agentes químicos no ambiente tem levado os pesquisadores a desenvolverem metodologias capazes de avaliar a potencialidade dessas substâncias em induzir alterações no material genético de organismos expostos (BRUSICK, 1987; ANTUNES e ARAÚJO, 2000).

Dentre as substâncias que causam danos nos organismos vivos, existem as substâncias mutagênicas que, segundo RIBEIRO (2003), são agentes capazes de induzir alterações na molécula de DNA, levando a uma alteração herdável da função gênica.

Pesquisas que investigam a ação de agentes mutagênicos ambientais têm recebido um importante destaque, pois, sabe-se que, embora ocorram mutações espontâneas, a maior parte delas é induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais o homem e os organismos possam estar expostos (VEIGA, 1995; MATSUMOTO et al., 2004, 2006; FERNANDES et al. 2007; VENTURA et al. , 2007, LEME E MARIN-MORALES, 2008).

Um agente mutagênico pode causar mutações por diversos modos de ação, assim como diferentes tipos de componentes estranhos podem ser considerados mutagênicos. Dentre os efeitos destes agentes, temos a reação direta com o DNA

nuclear, a incorporação no DNA durante a replicação celular, a interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, que decorre em divisão incorreta da célula, dentre outros (VEIGA, 1995; KIRSCH-VOLDERS et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2004, 2006).

Espécies do gênero *Allium* têm sido muito utilizadas para estudo de mecanismos básicos de determinação dos efeitos de alguns químicos. Entre as espécies de *Allium*, *A. cepa* é a mais indicada como material-teste padrão pela “Royal Swedish Academy of Science” (FISKESJÖ, 1985) e pelo “Gene-Tox Program” (GRANT, 1982; ATEEQ et al., 2002).

A espécie *A. cepa* tem sido, freqüentemente, utilizada para se determinar efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de várias substâncias (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985; MATSUMOTO, 2006), sendo considerada como um organismo padrão para testes rápidos (SMAKA-KINCL et al., 1997), por apresentar boa correlação com sistemas teste de mamífero (GRANT, 1982; CHAUHAHN et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2004, 2006; FERNANDES et al., 2007; LEME e MARIN-MORALES, 2008). Alterações cromossômicas em *A. cepa* podem ser observadas em qualquer fase da divisão celular e são consideradas evidências de efeitos mutagênicos promovidos por agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), ou aneugênicos (perda de cromossomos), classificados de acordo com o tipo de alteração induzida (VIDAKOVIĆ-CIFREK et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2004, 2006; FERNANDES et al., 2007; LEME e MARIN-MORALES, 2008).

O inseticida fipronil pode ser caracterizado como um composto de contato e ingestão, com conseqüências que variam de espécie para espécie. Em algumas espécies, o efeito de ingestão é o mais importante, enquanto que em outras, a ação de contato é a mais pronunciada. Vários estudos têm demonstrado que o inseticida se liga ao canal de cloro e bloqueia sua ativação pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), uma substância que controla o fluxo de íons cloro através da membrana da célula nervosa. A ausência da inibição sináptica causa uma hiperexcitação do Sistema Nervoso Central, o que leva o organismo à morte (BLOOMQUIST, 2005).

De acordo com as citações de Stevens et al. (1998, *apud* TINGLE et al., 2003), esse inseticida é largamente usado nas culturas de algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, cevada, feijão, milho, pastagens, soja e trigo, além de ser encontrado em

formulações utilizadas na veterinária, como, por exemplo, o produto comercial Frontline®.

Quanto à degradação do inseticida fipronil, ela é mais lenta em solos argilosos do que em areno-argilosos e arenosos. Na água e nos sedimentos, sob condições anaeróbicas, este agrotóxico tem degradação lenta. Neste caso, a meia vida é de 116 dias, quando o valor médio aceitável é de 123 dias (Usepa, 1996, *apud* TINGLE et al, 2003).

A degradação microbiana ocorre mais lentamente em solos descobertos do que em solos com cobertura vegetal. O metabolismo anaeróbico em solo arenoso e argiloso é de 122 a 128 dias (Mulrroney, 1998, *apud* TINGLE et al., 2003).

2. OBJETIVOS

Pelas propriedades tóxicas do inseticida fipronil, pelo seu amplo uso na agricultura e na veterinária, o presente trabalho teve como objetivo:

- Analisar a possível citotoxicidade do inseticida fipronil, pela avaliação das alterações dos índices mitóticos e índices de fase das células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição das radículas em diferentes concentrações do inseticida fipronil, antes e após períodos de recuperação;
- Determinar a potencialidade genotóxica do inseticida fipronil, por meio de ensaios de alterações cromossômicas em células de *A. cepa*, após tratamentos com baixas concentrações do inseticida, antes e após os períodos de recuperação;
- Determinar a potencialidade mutagênica do inseticida fipronil, por meio de ensaios de micronúcleos e das aberrações do tipo quebra cromossômicas em células de *A. cepa*, após tratamentos com baixas concentrações do inseticida, antes e após os períodos de recuperação;
- Analisar, identificar e quantificar os principais tipos de aberrações mitóticas induzidas pelo inseticida fipronil, sob o sistema teste de *A. cepa*;
- Contribuir com informações sobre os potenciais efeitos do inseticida fipronil sobre o meio ambiente e sobre organismos vegetais expostos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Agrotóxicos

O uso de substâncias químicas para controlar doenças, pragas e plantas daninhas na agricultura teve seu início no final do século XIX, mas, somente após a Segunda Guerra Mundial, essa prática seguiu critérios mais científicos (LORENZI, 1990).

Dentre as substâncias químicas utilizadas na agricultura, os agrotóxicos são os mais difundidos e merecedores de atenção de pesquisadores preocupados com os impactos que estes químicos podem causar no ambiente. Os agrotóxicos são biocidas por natureza, isto é, são venenos utilizados na agricultura para eliminar alguma forma de vida, aquelas consideradas pragas agrícolas. Todos os agrotóxicos têm como propriedade comum, bloquear o metabolismo de organismos indesejáveis, para os quais são tóxicos. Estes químicos podem agir eliminando ou controlando algum processo vital, como, por exemplo, os processos reprodutivos (BAIRD, 2002). Assim, pela própria característica química, não há agrotóxicos inofensivos e, nesse grupo muito diversificado de compostos químicos, estão inseridos os fungicidas, os inseticidas e os herbicidas, que são produtos considerados, extremamente, agressivos ao meio ambiente e à saúde humana (GRISOLA, 2005).

Inúmeros trabalhos têm revelado a presença de níveis alarmantes de agrotóxicos no ecossistema (PARSONS e WITT, 1998). Dentre os efeitos nocivos ao ambiente pode-se citar a presença de resíduos no solo, na água, no ar, nas plantas e animais.

O impacto que cada agrotóxico promove sobre a biota do solo varia de acordo com as características do produto, as características físicas do ambiente e o tipo de microflora associada. A meia-vida dos agrotóxicos no solo e o risco de contaminação

do lençol freático dependem, também, da interação desses diferentes fatores e das vias de degradação do agrotóxico. (GRISOLIA, 2005).

Em relação à água, embora a agricultura seja apenas uma das inúmeras fontes não-pontuais de poluição, ela geralmente é apontada como a maior contribuinte de todas as categorias de poluentes (EDWIN, 1996; BAKORE, et al., 2004; POTTER et al., 2007). Uma vez na água, dependendo das características físico-químicas, o resíduo do agrotóxico pode tanto se ligar ao material particulado em suspensão como se depositar no sedimento do fundo ou ainda ser absorvido pelos organismos. Quando absorvidos, poderão ser detoxificados ou acumulados e, neste último caso, entrar na cadeia alimentar, atingindo também o homem (EDWARDS, 1973; NIMMO, 1985; HAMILTON e CROSSLEY, 2004; ZHOU et al., 2006).

Os químicos usados na agricultura podem alcançar os ambientes aquáticos por diversas formas, tais como: aplicação intencional ou deriva e escoamento superficial, a partir de áreas onde ocorreram aplicações; pelas chuvas; por despejos industriais e urbanos e por assoreamento do solo (YAMAGISHI et al., 1981; OYHAMA et al., 1986; COLL et al., 2004). Para Edwards (1973), Nimmo (1985), Pessoa et al. (2003) e Armas (2005), os organismos expostos podem se contaminar com agrotóxicos por diferentes portas de entrada, tais como: via dérmica; via circulatória, pelo contato com brânquias ou por via gastrointestinal (Figura 1). Segundo Nimmo, 1985 e Sankar et al., 2006, os peixes podem acumular agrotóxicos em concentrações muito acima daquelas encontradas nas águas em que vivem, pois, além da exposição que sofrem, podem também ingerir esses químicos, quando eles estão agregados ao material particulado em suspensão.

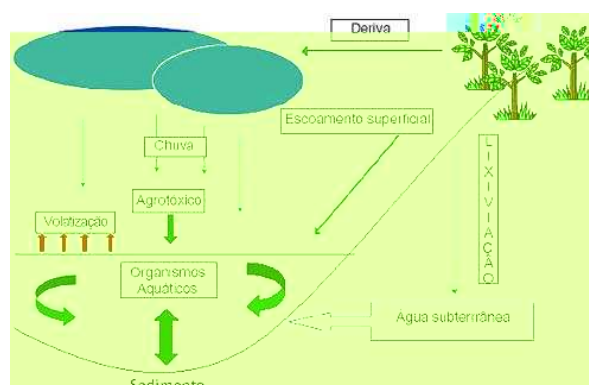


Figura1: Movimento dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos (NIMMO, 1985)

Certas práticas agrícolas, como o uso excessivo e inadequado de agrotóxicos, a destruição da cobertura vegetal para o plantio, a não-preservação das matas ciliares e das vegetações protetoras de nascentes, dentre outros fatores, são responsáveis por grande parte dos problemas atuais observados com os recursos hídricos.

Existem diversos estudos na literatura para se determinar a presença de agrotóxicos em águas superficiais e subterrâneas (MALLET e MALLET, 1989; DURAND e BARCELO, 1989; BARCELO, 1994; BARCELO et al., 1996; DEM, 2004; ZHOU et al., 2006), além de estudos sobre os efeitos provocados pelos herbicidas e inseticidas sobre organismos aquáticos expostos (Stevens et al. *Apud* TINGLE et al., 2003, 1998; TUNDISI, 1990; TINGLE et al., 2003; NAVARRO, 2007;).

Desde o início da sua utilização, os agrotóxicos vêm se caracterizando como um problema, em potencial, também para a saúde humana. O uso abusivo de agrotóxicos tem causado um grande número de acidentes, principalmente, entre os trabalhadores rurais. A manipulação caseira, na maioria das vezes, é inadequada, ocorrendo, periodicamente, situações de envenenamento e de contaminação ambiental (LANGENBACH, 1989). Quanto à ingestão de alimentos contaminados com esses produtos, sabe-se que, cerca da metade dos alimentos consumidos nos Estados Unidos contém níveis mensuráveis de, no mínimo, um agrotóxico. Por essa razão, muitos destes químicos já foram banidos ou tiveram seu uso limitado naquele país (BAIRD, 2002).

Por todas estas razões descritas acima, o uso inadequado de agrotóxicos foi objetivo de advertência mundial em 2002 pela FAO (Food an Agriculture Organization - FAO, 2007), que revisou o código internacional de conduta sobre a distribuição e a utilização de agrotóxicos.

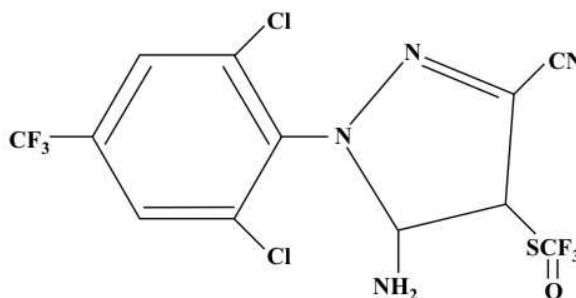
A Portaria Normativa nº 139, de 21 de dezembro de 1994, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), com base no Decreto nº 98.816/90, classificou os agrotóxicos quanto ao seu potencial de periculosidade ambiental (PPA), levando-se em consideração as seguintes variáveis: bioacumulação, persistência, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico. Os produtos foram subdivididos em classes I, II, III e IV, definidos como altamente perigoso, muito perigoso, perigoso, e pouco perigoso, respectivamente (COMPÊNDIO, 1996).

As diretrizes e orientações, referentes à autorização e renovação de registros e extensão de uso de agrotóxicos e afins no Brasil, estão disciplinadas pela portaria 03 de 16 de janeiro de 1992 (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 1991). Essa portaria classificou os agrotóxicos em função da sua utilização, modo de ação e potencial ecotoxicológico, tanto para o homem como para os demais organismos vivos, eventualmente, expostos a eles. Foram estabelecidas quatro classes de toxicidade: I, II, III, IV, que se referem à extremamente tóxico, altamente tóxico, medianamente tóxico e pouco tóxico, respectivamente (FERRO, 2006).

Os efeitos derivados da ação de agrotóxicos podem ser diversos, tais como reação direta com o DNA nuclear, incorporação no DNA durante a replicação celular, interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisões incorretas da célula (VEIGA, 1995 e FERNADES, 2005).

3.2 Inseticida fipronil

O inseticida fipronil, comercialmente registrado como Regente®, segundo a ANVISA (2005), tem nome químico 5 - amino - 1 - (2,6 - dicloro - α - α - α - trifluor - p - totil) 4 - trifluorometilsulfinil - pirazol - 3 carbonitrila, fórmula química $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ e fórmula estrutural:



O fipronil, inseticida pertencente ao grupo químico fenil-pirazol, classificação toxicológica de classe II (altamente tóxico), pode ser caracterizado como um composto de contato e ingestão, com conseqüências que variam de espécie para espécie. Em algumas espécies, o efeito de ingestão é o mais importante, enquanto em outras a ação de contato é a mais pronunciada.

Vários estudos têm demonstrado que o inseticida se liga ao canal de cloro e bloqueia sua ativação pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), uma substância que controla o fluxo de íons cloro, através da membrana da célula nervosa. Dessa forma, a

ausência da inibição sináptica causa uma hiperexcitação do Sistema Nervoso Central (SNC), o que leva o organismo à morte (BLOOMQUIST, 2.005). Segundo esse autor, os efeitos de envenenamento do SNC, que se dá pelo antagonista neurotransmissor inibitório GABA, acontecem quando o ácido é liberado nas terminações nervosas pré-sinápticas e se liga ao receptor da proteína pós-sináptico, pelo canal de cloro intrínscio. Quando o GABA se liga ao receptor, o canal é aberto e íons de Cloro (Cl^-) fluem para dentro do neurônio pós-sináptico. Esta permeabilidade ao cloro pode hiperpolarizar (tornar mais negativo) o potencial de membrana, pro

Embora o fipronil seja largamente usado em alguns países como o Brasil, este tem seu uso proibido nos países da Europa, por seu considerado de alto grau de toxicidade, comprovado pelos problemas sérios registrados em organismos expostos (Stevend et al., 1998, *apud* TINGLE et al., 2003).

3.3 Mutagênese Ambiental

Durante as últimas três décadas, a comunidade científica e as agências regulatórias têm tomado consciência sobre os impactos ambientais e a decorrente interferência na saúde humana e na sustentabilidade dos ecossistemas. No Brasil, os testes de ecogenotoxicidade têm sido empregados, desde a década de 80, visando uma melhor avaliação das condições ambientais (BUCKER, 2008).

Os seres vivos estão expostos à ação de numerosos agentes potencialmente tóxicos, os quais podem ser físicos, químicos e biológicos e causar efeitos tóxicos, bioquímicos, patológicos e, em alguns casos, genéticos (ARNAIZ, 1995).

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos das substâncias químicas sobre os sistemas vivos. É uma ciência multidisciplinar, que engloba conhecimentos de Farmacologia, Bioquímica, Química, Fisiologia, Genética e Patologia, entre outros (REMIÃO, 2008). Já a genética toxicológica, tem por finalidade identificar e analisar a ação desses compostos, quanto à sua capacidade de interagir com o material genético dos organismos e, assim, promover alterações significativas nos sistemas biológicos (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

As mutações ocorrem em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e a diversidade das espécies. Muitas alterações genéticas são decorrentes da ação dos chamados agentes mutagênicos, agentes estes capazes de alterar a sequência das bases do DNA. Muitas mutações não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas. Outras, podem determinar a morte celular e, conseqüentemente, também não são detectáveis. Assim, apenas, um pequeno número de mutações, que ocorrem em genes específicos, pode determinar vantagens para o organismo ou levar a um crescimento desordenado das células, alterações estas que podem ser transmitidas por diversas gerações (RIBEIRO et al., 2003).

Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intrinsecamente ligados. A mutação é uma consequência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor. A literatura tem mostrado que mutações em vários genes críticos têm sido encontradas nas neoplasias. Os primeiros genes identificados foram os protooncogenes, nos quais mutações ocorrendo em um ou poucos códons críticos, podem gerar um produto gênico ativado, que causa a transformação celular (BISHOP, 1991, *apud* RIBEIRO et al., 2003). Por outro lado, há os genes supressores de tumor que codificam proteínas essenciais para o controle do crescimento celular. Quando esses genes são inativados, por perda ou mutação, podem resultar em crescimento celular aberrante (RIBEIRO et al., 2003; BARROS, 2007).

Muitas técnicas estão sendo desenvolvidas para avaliar o potencial mutagênico e genotóxico de agentes poluidores, tais como: análise de aberrações cromossômicas, análise de DNA “fingerprinting”, análise de frequência de quebras na molécula de DNA; ensaio do cometa; quantificação dos adutos de DNA e teste do micronúcleo (FERNANDES, 2005; MATSUMOTO et al., 2004).

Um dos mais antigos testes realizado para avaliação de mutagênese, é de aberrações cromossômicas, o qual, segundo a citogenética clássica, é um dos poucos métodos diretos usados para mensurar mutações em sistemas expostos a mutágenos ou carcinógenos potenciais (RANK et al., 2002; FERNANDES 2005).

Os testes de Ames, realizado com *Salmonella thiphyrumu*, e a citogenética *in vitro*, realizada com células de mamíferos (aberração cromossômica e micronúcleo), são utilizados para detecção do potencial mutagênico de agentes químicos. O primeiro teste acima citado detecta vários tipos de mutações de ponto viáveis, que envolvem poucos pares de bases do DNA, em um genoma bacteriano simples. Os últimos detectam alterações cromossômicas estruturais e/ou numéricas, microscopicamente visíveis, mas de viabilidade desconhecida, que envolvem, no mínimo, 10 milhões de pares de bases (LIMA e RIBEIRO, 2003; HERINGA et al., 2007).

O ensaio do micronúcleo avalia, pela presença de porções de cromatina intracitoplasmática, a possibilidade de indução de quebras ou de perdas de cromossomos inteiros, caracterizando a potencialidade mutagênica do agente estudado. A técnica é aplicada, principalmente, em monitoramento da poluição ambiental e usa

diversos organismos testes (roedores, peixes, plantas, etc.) como bioindicadores (FERNANDES, 2005).

3.4 *Allium cepa* como organismo teste

Bioensaios com plantas têm sido considerados mais sensíveis e mais simples, quando comparados com bioensaios que utilizam animais. Desta forma, muitos vegetais superiores são, freqüentemente, utilizados para o monitoramento de poluentes ambientais. Segundo MA et al, (1995), os vegetais, por serem receptores biológicos diretos de poluentes, constituem um importante material para testes genéticos e de monitoramento ambiental.

Para a avaliação das atividades mutagênicas de químicos ambientais, diferentes sistemas vegetais são usados, tais como em *A. cepa*, *Arabidopsis thaliana* e *Hordeum vulgare*. Por meio desses sistemas vegetais podem ser realizados ensaios de aberrações cromossômicas e outros testes citogenéticos (CONTE et al., 1998; TIMBRELL, 1999; RANK et al., 2002; VENTURA, 2004; FERNANDES, 2005; MATUSUMOTO et al. 2006; LEME, 2007).

Dentre os vegetais superiores, espécies do gênero *Allium* têm sido bastante utilizadas para estudos dos mecanismos básicos e de determinação dos efeitos de alguns químicos. Entre as espécies desse gênero, *A. cepa* é a mais indicada como material-teste padrão pela “Royal Swewdish Academy of Science” (FISKEJÖ, 1985) e pelo “Gene-Tox Program” (GRANT, 1982). A espécie *A. cepa* também foi utilizada em estudos de colaboração internacional realizados entre o “United Nations Environmental Program” (UNEP), a “World Health Organization” (WHO) e a “US Environmental Protection Agency” (USEPA), que provaram a eficiência deste organismo para uso em monitoramento de mutagenicidade, decorrentes de ação de poluentes ambientais (GRANT, 1999; MENKE et al., 2001).

Ainda segundo Grant (1982), Fiskesjö (1985) e Matsumoto et al. (2006), a espécie *A. cepa* oferece bons resultados para avaliação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de várias substâncias, sendo considerada como um organismo padrão para testes rápidos (SMAKA-KINCL et al., 1997), por apresentar boa correlação com sistemas teste de mamífero (GRANT, 1982; CHAUHAHN et al., 1999). Alterações cromossômicas em *A. cepa* podem ser observadas em qualquer fase da

divisão celular e são consideradas evidências de efeitos mutagênicos promovidos por agentes clastogênicos (quebra de cromossomos) ou aneugênicos (perda de cromossomos), classificados de acordo com o tipo de alteração induzida (VIDAKOVIĆ-CIFREK et al., 2002; VENTURA, 2004; FERNANDES, 2005; MATSUMOTO, 2006). De acordo com Rank e Nielsen (1993), a sensibilidade do teste de mutagenicidade com *Allium* foi calculada como sendo superior em 82% aos resultados obtidos com roedores.

Segundo Kincl (1996), Matsumoto et al. (2006), Leme e Marin-Morales (2008), os testes feitos com *A. cepa*, para determinação de genotoxicidade e de citotoxicidade, são feitos em curtos períodos de tempo, podendo ser aplicados para avaliação de contaminação por poluentes lançados na água, tendo como parâmetros citológicos: aberrações cromossômicas, indução de micronúcleos e inibição de divisão celular. Assim, a espécie *A. cepa* tem sido um organismo muito utilizado para testes de detecção de substâncias genotóxicas presente no ambiente, sendo a metodologia de indução de aberrações cromossômicas (AC) a mais indicada para esse fim.

Os testes com *Allium* foram introduzidos por Levan em 1938 e, mais tarde, passou a ser um teste padrão para análises de monitoramento e controle toxicológico de resíduos químicos presentes em água de rio. Segundo Cotelle et al. (1999), testes de AC, realizados com *A. cepa*, mostraram maior eficiência que os testes de micronúcleos, realizados com *Tradescantia*, quando testaram solos contaminados.

Segundo Kurás et al., (2006) o organismo-teste *A. cepa* é de fácil preparação para análise, pois contém células meristemáticas homogêneas, tem cromossomos grandes e em número baixo (16 cromossomos), além de ser facilmente corados e observados.

O sistema *A. cepa* mostrou-se eficiente para ser utilizado em testes de citotoxicidade. Estudos realizados por Kurás et al. (2006), com extrato aquoso da planta *Uncaria tomentosa*, um fitoterápico usado em tratamentos alternativos de cânceres e outras doenças graves, mostraram que o sistema teste *A. cepa* é indicado para avaliação de citotoxicidade de células expostas a químicos. O extrato causou, em *A. cepa*, uma inibição da divisão celular meristemática, confirmando as propriedades antimitóticas já descritas para o produto pelos sistemas teste animal e humano.

Outra confirmação do sistema-teste *A. cepa*, para a avaliação de citotoxicidade, pode ser observado nos estudos de Riffat e Massod (2006), onde os autores

recomendam esta espécie para bioensaios de avaliação de toxicidade de vários poluentes aquáticos, quando realizam testes biondicadores EROD (7-ethoxy-resorufin-O-deethylase).

3.4.1. Teste de aberrações cromossômicas em *Allium cepa*

A avaliação de genotoxicidade de químicos perigosos/danosos tem sido feita, há muitos anos, por meio de testes com vegetais superiores (RANK, 2002). Durante a década de 30, Levan (1938) demonstrou que a colchicina poderia causar distúrbios no fuso mitótico, levando a uma poliploidização em células meristemáticas de raízes de *Allium*. Posteriormente, Levan (1945) demonstrou que várias soluções de sais inorgânicos induziam diferentes tipos de aberrações cromossômicas em células de meristemas radiculares de *A. cepa*. Desde então, muitos novos testes de mutagenicidade, utilizando microorganismos, linhagens celulares de mamíferos e outros sistemas biológicos, têm sido desenvolvidos, mas os testes com vegetais ainda são utilizados, rotineiramente, em laboratórios de todo o mundo, como indicadores do potencial mutagênico de diversos agentes. Além disso, ensaios com vegetais são úteis para se testar amostras ambientais complexas como esgoto (GROVER e KAUR, 1999, HOSHINA, 2002, 2005, MAZZEO, 2006), águas de rios (RANK e NIELSEN, 1998; HOSHINA, 2002, 2005; MATSUMOTO, 2006; MAZZEO, 2006; LEME e MARIN-MORALES, 2008) e solos contaminados (KOVALCHUCK et al., 1998; COTELLE et al., 1999; CARITÁ, 2008).

Comparações feitas com plantas e outros organismos mostraram que as plantas superiores têm grande sensibilidade a testes mutagênicos e genotóxicos, confirmando que elas constituem um valioso sistema de ensaio para monitoramento ambiental e são excelentes indicadores de efeitos de citotoxicidade e mutagenicidade, causados por químicos no ambiente. Outros ensaios ainda comprovaram que a espécie *A. cepa* é altamente adequada para testes de genotoxicidade (GRANT, 1994; MATSUMOTO, 2006; LEME e MARIN-MORALES, 2008).

Testes realizados com *A. cepa* têm recebido uma atenção especial, principalmente após ter sido adaptado para se avaliar efeitos de poluentes do solo e da água como, por exemplo, os ácidos clorofenoxiácéticos e clorofenóis (FISKEJÖ et al., 1981), o alumínio (BERGGREN e FISKEJÖ, 1987), os sinais de metais pesados

((FISKEJÖ, 1979, 1994; LIU et al., 1995; BARBOSA e DE LA TORRE, 1996; MATSUMOTO, 2004, 2006) e outras substâncias químicas derivadas de efluentes industriais (FISKEJÖ, 1985; VIDA KOVIC et al., 1993) e de atividade agrícola (FRANEKIC et al., 1994; GULATI et al., 1994; GROVER et al., 1997, VENTURA, 2004. FERNANDES et al., 2007).

Segundo Rank e Nielsen (1997), o gênero *Allium* foi um bom sistema para monitoramento de efeitos clastogênicos, causados por N-methyl-N-nitrosourea. Curiosamente, a eficiência do teste de micronúcleo, realizado com células de raízes de *A. cepa*, para se detectar a clatogenicidade do raio-X, foi superior à encontrada para o teste de *Vicia faba* (AL-SABATI e METCALFE, 1995; MA et. al., 1995).

Por meio de testes de aberrações cromossômicas, Kirkland (1998), observou que altas doses de um determinado químico induziram aberrações cromossômicas estruturais, como quebras e trocas cromossômicas ou cromatídicas, que poderiam levar a célula à morte. Porém, observaram também que doses baixas da mesma substância, geralmente, induziram pouca ou nenhuma toxicidade celular, com formação de células viáveis, embora com vários tipos de aberrações cromossômicas presentes.

Sistemas testes vegetais como *A. cepa*, também têm sido utilizados para outros estudos de mutagenicidade, como, por exemplo, os efeitos de extratos vegetais e de produtos naturais, visando à detecção da antigenotoxicidade ou antimutagenicidade (TEIXEIRA et al., 2003; ROBERTO, 2006; FACHINETTO et al., 2007). Outra aplicação do teste *A. cepa* foi dada para avaliações de plantas medicinais, mundialmente usadas em tratamento de doenças. Estudos desta natureza são insuficientemente estudados e requerem uma maior investigação (BAGATINI et al., 2007).

Segundo Rank e Nielsen (1998) o teste de *A. cepa* pode ser considerado um método mais sensível que outros até hoje utilizados, visto que esse teste pode ser usado como ferramenta para avaliação de contaminação por algumas substâncias carcinogênicas que são negativas para o teste de Ames.

Fiskejö (1993 e 1994) ainda ressalta a importância e a utilidade dos sistemas testes vegetais na avaliação de riscos de genotoxicidade de substâncias químicas sintéticas e naturais, enfatizando que, apesar das diferenças entre os metabolismos de plantas e animais, existem similaridades entre estes sistemas, que podem auxiliar na compreensão da ação dos agentes tóxicos. O autor af

mutagênicos, em plantas, pode caracterizar importantes informações de alerta, quanto ao consumo de alimentos contaminados que possam se transferir, via trófica, e que podem, eventualmente, apresentar uma potencialidade de promoção de mutações em humanos.

Artigo 1

Características, modos de ação e efeitos do inseticida fipronil sobre o ambiente e os organismos expostos – Uma nova revisão.

Janaína Pedro¹ e Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
(UNESP)

Av. 24-A, no. 1515, CP 199, CEP: 13.506-900, Rio Claro, SP, Brasil

Revisão a ser apresentada como compêndio ou monografia.

Resumo

Muitas substâncias químicas vêm sendo utilizadas para diversos fins, desde o final do século XIX. Dentre elas, destacam-se os agrotóxicos que são muito utilizados no combate de organismos indesejáveis da agricultura. Os agrotóxicos recebem denominações específicas, de acordo com os alvos contra os quais são destinados, como: inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, entre outros. Os inseticidas por sua vez, são agentes que têm ação de combater insetos, tanto na fase adulta como larval. O fipronil é um inseticida do grupo fenil-pirazol, toxicologicamente classificado como de classe II (altamente tóxico), muito utilizado na agricultura, especialmente na cana-de-açúcar, bem como nas residências, para combater tanto pragas de vegetais como de animais. A ação deste inseticida se dá pela sua ligação ao canal de cloro, promovendo o bloqueio da ativação da condução dos estímulos nervosos, pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), uma substância que controla o fluxo de íons cloro, através da membrana da célula nervosa. Em pequenas concentrações, apresenta uma eficiente ação nos organismos alvos. Esta característica também pode causar problemas ao meio ambiente, muitas vezes, longe até dos lugares onde foi aplicado. O fipronil, em temperaturas moderadas, é estável no ambiente, por cerca de um ano. Estudos mostram que esse inseticida pode ser degradado em diversos metabólitos, que são ainda mais tóxicos que ele. Quanto a sua persistência no ambiente, o fipronil apresenta variações decorrentes da sua formulação, sendo alguns de seus metabólitos mais persistentes que o próprio inseticida. Estudos sobre a adsorção e dessorção do fipronil, no solo, indicam que, tanto o fipronil como os seus metabólitos, têm uma baixa mobilidade neste ambiente. O fipronil não é acumulado no meio ambiente, mas algumas vezes tem sido registradas acúmulos de seus metabólito. Resíduos de fipronil ingeridos na pastagem foram encontrado no leite, na urina, nas fezes, além de ser bioacumulado no tecido adiposo, indicando uma potencialidade de transferência via cadeia trófica. Pelos efeitos registrados para o fipronil, em estudos realizados com vários organismos, fica claro que o produto pode comprometer os ecossistemas, pelos prejuízos que causa aos organismos expostos, além de apresentar um potencial de risco à saúde humana.

Palavras-Chaves: Fipronil, metabólitos de degradação, vias de ação, efeitos, impactos ambientais, perigos para a saúde humana.

1. Introdução

O uso de substâncias químicas para controlar doenças, pragas e plantas daninhas na agricultura teve seu início no final do século XIX, mas, somente após a Segunda Guerra Mundial, essa prática seguiu critérios mais científicos (LORENZI, 1990). De acordo com os alvos contra os quais são destinados, os produtos químicos usados na agricultura são denominados de inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, entre outros (KOTAKA e ZAMBRONE, 2001).

O conjunto de produtos químicos, acima referidos, recebe as denominações de defensivos agrícolas, praguicidas, produtos fitossanitários ou agrotóxicos (este último no Brasil, por força da Lei nº 7.802/89) (KOTAKA e ZAMBONE, 2001).

Segundo Machado (2001) e de acordo com a Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, art. 2º inciso I, agrotóxicos são:

- 1- “Produtos e ou agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e em outros ecossistemas, bem como em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja de alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”.
- 2- “Substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”. Todos os agrotóxicos têm a propriedade comum de bloquear um processo metabólico vital de organismos alvos, para os quais são tóxicos. Estes químicos agem, diretamente, em um organismo indesejável, eliminando-o ou controlando-o de alguma maneira, como, por exemplo, interferindo em seu processo reprodutivo.

Todos os agrotóxicos têm uma propriedade em comum, que é a de bloquear um processo metabólico vital de organismos alvos, para os quais são tóxicos. Estes químicos agem diretamente no organismo alvo, eliminando-o ou controlando-o de alguma maneira, como, por exemplo, interferindo em seu processo reprodutivo.

Desde a sua introdução, os agrotóxicos vêm se caracterizando como um problema, em potencial, para a saúde humana. Quanto à ingestão de alimentos contaminados com esses produtos, sabe-se que cerca da metade dos alimentos consumidos nos Estados Unidos contém níveis mensuráveis de, no mínimo, um

agrotóxico. Por essa razão, muitos destes químicos foram banidos ou tiveram seu uso limitado (BAIRD, 2002).

O uso de agrotóxicos tem causado um grande número de acidentes, principalmente, entre os trabalhadores rurais. A manipulação caseira, na maioria das vezes, é inadequada, ocorrendo, periodicamente, situações de envenenamento e de contaminação ambiental (LANGENBACH, 1989). Por todas estas razões, o uso inadequado de agrotóxicos foi objetivo de advertência mundial, em 2002, pela FAO (Food an Agriculture Organization – FAO, 2007), que revisou o código internacional de conduta sobre a distribuição e a utilização de agrotóxicos.

A Portaria Normativa nº 139, de 21 de dezembro de 1994, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), com base no Decreto nº 98.816/90, classificou os agrotóxicos quanto ao seu potencial de periculosidade ambiental (PPA), levando-se em consideração as seguintes variáveis: bioacumulação, persistência, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico. Os produtos foram subdivididos em classes I, II, III e IV, definidos como altamente perigoso, muito perigoso, perigoso, e pouco perigoso, respectivamente (COMPÊNDIO, 1996).

As diretrizes e orientações, referentes à autorização e renovação de registros e extensão de uso de agrotóxicos e afins no Brasil, estão disciplinadas pela portaria 03 de 16 de janeiro de 1992 (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 1991). Essa portaria classificou os agrotóxicos em função da sua utilização, modo de ação e potencial ecotoxicológico, tanto para o homem como para os demais organismos vivos presentes no ambiente. Foram estabelecidas quatro classes de toxicidade: I, II, III, IV, que se referem à extremamente tóxico, altamente tóxico, medianamente tóxico e pouco tóxico, respectivamente (FERRO, 2003).

O Brasil é o quarto maior consumidor mundial de substâncias químicas empregadas na agricultura. O consumo de agrotóxicos no nosso país é de, aproximadamente, 3,2 Kg de ingrediente ativo por hectare. Cerca de 88% do total dos agrotóxicos aqui comercializados vão para os estados de São Paulo (22%), Paraná (16%), Rio Grande do Sul (13%), Mato Grosso (12%), Minas Gerais (10%), Goiás (9%) e Mato Grosso do Sul (6%). As culturas de soja, milho, citros e cana-de-açúcar utilizam

cerca de 66% do total de agrotóxicos consumidos no Brasil (JOURNAL EXPRESS, 2004) e a soja, sozinha, utiliza cerca de 35% deste percentual (FERRO, 2003).

A preocupação com a contaminação por agrotóxicos no Brasil tem despertado o interesse de pesquisadores, quanto a sua potencialidade em contaminar o ambiente (RIBEIRO, 2006; RIEDER, 1996; DORES, 2000; GUIMARÃES, 2000; SCHIO, 2001) e os alimentos (PIZANO e BAPTISTE, 1998; VIEIRA, 1999), dentre estes o leite humano (MATUO et al., 1990; OLIVEIRA, 1997).

Dentre os agrotóxicos, o grupo dos inseticidas merece destaque, especialmente, pelo amplo uso em culturas que ocupam grandes extensões de terra, em especial, a cana-de-açúcar, amplamente difundida no estado de São Paulo. Esses químicos têm a função de controlar insetos pragas da agricultura, um dos fatores redutores de produtividade, sem injuriar as culturas agrícolas.

Os inseticidas possuem ação de combater insetos adultos e larvas, e podem ser classificados, quimicamente, segundo a CENEPI/FNS (2008), como:

1. Organofosforados: compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido diotiofosfórico. Ex: Folidol[®], Azodrin[®], Malation[®], Diazinon[®], Nuvacron[®], Tanarin[®], Rhodiatox[®].
2. Carbamatos: derivados do ácido carbônico. Ex: Carbanil[®], Temik[®], Zectram[®], Furadan[®].
3. Organoclorados: compostos à base de carbono, com radicais de cloro. São derivados do clorobenzeno, do ciclo-hexano ou do ciclodieno. Estes agrotóxicos foram muito utilizados na agricultura, porém seu uso tem sido, progressivamente, restringido ou mesmo pro5585(t)-2.16436(d3312(m)-2.45995(o)-.16436(o)-

5. Fenil-pirazol: compostos a base de fenil-pirasol, são muito utilizados na agricultura e nas residências, para combater insetos praga, tanto de vegetais como de animais. Ex: fipronil. Esse tipo de inseticida é largamente usado nas culturas de algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, cevada, feijão, milho, pastagens, soja e trigo. Nas residências, ele é utilizado no tratamento contra pulgas e carrapatos de cães e gatos (TINGLE et al., 2003; ANVISA, 2005).

2. Caracterização do inseticida fipronil

Os organofosforados vem sendo gradualmente substituído por outros inseticidas de classes consideradas menos tóxicas, na tentativa de minimizar o seu possível efeitos nocivo à saúde e a contaminação, pela sua alta persistência, nos alimentos. Um dos inseticidas mais usados em substituição aos organofosforados é fipronil, pertencente à classe dos fenil-pirazol. (COLLIOT et al., 1992; PEI et al., 2004).

O fipronil é um inseticida do grupo dos fenil-pirazol, descoberto pela Rhône-Poulenc Agro (TINGLE et al., 2003; ANVISA, 2005). Este inseticida é considerado de largo espectro, usado contra pragas sugadoras, de contato e mastigadoras. É amplamente usado para controle de insetos em várias culturas como de grãos, folhas e frutos (TINGLE et al., 2003; PEI et al., 2004).

O inseticida fipronil, tem nome químico 5-amino-1-(2,6 -dicloro- α - α - α - trifluor-p-totil) 4-trifluometilsulfinil-pirazol-3carbonitrila, fórmula química $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ e fórmula estrutural como representada na Figura 1:

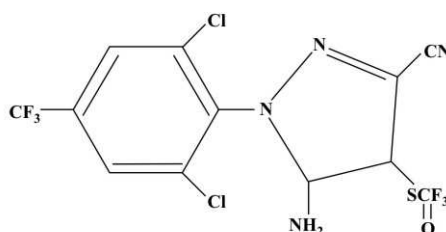


Figura 1: Fórmula estrutural do inseticida fipronil (TINGLE et al., 2003).

O fipronil é, toxicologicamente, classificado como de classe II, por ser considerado altamente tóxico. Como característica geral do produto, ele apresenta

coloração branca, odor moderado, ponto de fusão de 195,5°C - 203°C, densidade de 1,6262 g/mL para 20°C, pressão de vapor $2,8 \times 10^{-9}$ mmHg para 25°C e pH de 5,9 a 6,1 à 23°C (USEPA, 1996 *apud* TINGLE et al., 22003). Sua comercialização é feita sob diversas formas e denominações, tais como: Termidor (BASF), Regent[®] (BASF), Frontline[®] (Merial) e Adonis[®] (Rhone-Poulenc, and Aventis, France).

O inseticida fipronil desaparece, rapidamente, na superfície da água e alguns dados mostram uma toxicidade relativamente baixa para organismos aquáticos não alvos (TINGLE et al., 2003). Stevens et al. (1998) apontaram um baixo impacto ambiental, quando o fipronil foi aplicado para controle de insetos pragas nos Estados Unidos. Segundo este mesmo autor, o fipronil foi considerado moderadamente tóxico para pássaros galiformes e pouco tóxico para espécies não-galiformes (STEVENS et al., 1998).

O produto ativo do fipronil é encontrado em formulações utilizadas na veterinária como, por exemplo, o produto comercial Frontline[®]. Esse produto é aplicado nos pêlos de animais e tem sua ação prolongada pelo seu efeito reservatório nas glândulas sebáceas. O produto não é sistêmico, não sendo assim transportado pela corrente sanguínea. O Frontline[®] pode ser aplicado em filhotes de cães e gatos, com mais de oito semanas de vida, portadores de dermatite alérgica a picadas de pulgas.

Embora o fipronil seja largamente usado em alguns países como o Brasil, Stevens et al. (1998) relata que o produto tem seu uso proibido na Europa, pelo seu alto grau de toxicidade, comprovado pelos problemas sérios registrados em organismos expostos.

3. Modo de ação do inseticida fipronil

O fipronil pode ser caracterizado como um composto de contato e ingestão, com consequências que variam de espécie para espécie. Em algumas espécies, o efeito de ingestão é o mais importante, enquanto que em outras a ação de contato é a mais pronunciada. Vários estudos têm demonstrado que o inseticida se liga ao canal de cloro e bloqueia sua ativação pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), uma substância que controla o fluxo de íons cloro, através da membrana da célula nervosa. Dessa forma, a ausência da inibição sináptica causa uma hiperexcitação do sistema nervoso central (SNC), o que leva o organismo à morte (BLOOMQUIST, 2005). Segundo esse autor,

os efeitos de envenenamento do SNC, que se dá pelo antagonista neurotransmissor inibitório GABA, acontecem quando o ácido é liberado nas terminações nervosas pré-sinápticas e se liga ao receptor da proteína pós-sináptico, pelo canal de cloro intrínscio. Quando o GABA se liga ao receptor, o canal é aberto e íons Cloro (Cl^-) fluem para dentro do neurônio pós-sináptico. Esta permeabilidade ao cloro pode hiperpolarizar (tornar mais negativo) o potencial de membrana, promovendo uma diminuição do impulso nervoso estimulado. Esta mesma ação é observada nos insetos, pela neurotoxicidade conferida ao “cérebro” e aos gânglios ventrais, que caracteriza o centro nervoso do inseto.

O fipronil é usado para controlar insectos em geral como gafanhotos e cupim, tanto na fase larval como adulta, além de ser indicado contra insectos resistentes a os insecticidas piretróides, organofosforados e carbamatos (Bobé et al., 1997 *apud* TINGLE et al., 2003).

Estudos realizados em laboratórios indicam que o insecticida fipronil é 40 vezes mais ativo em invertebrados do que em vertebrados (BLOOMQUIST, 2005; RAVENTON et al., 2007). Casarin (2007), estudando efeitos do insecticida fipronil em cupins, observou uma altíssima toxicidade do produto, pela alta mortalidade que promoveu nestes insectos, mesmo quando aplicado em baixas concentrações. A autora afirma que a mortalidade observada foi provocada pela alta ação de contato do insecticida. Por esta característica, o insecticida fipronil não foi considerado indicado para a erradicação de colônias de cupim do solo, pois o insecto, após entrar em contato com o insecticida, morre. Assim, como o insecticida não é transferido entre indivíduos da colônia, ele só se apresentou indicado para uso como barreira química em solos infestados por estes organismos.

4. Processos de degradação e metabólitos formados

Como o fipronil tem um grande potencial de aplicação em campo e pela efetividade de sua ação, muitas pesquisas foram desenvolvidas com a intenção de buscar informações precisas dos reais efeitos deste insecticida sobre o ambiente. Com este propósito, pesquisas sobre a dinâmica da degradação do fipronil foram desenvolvidas por vários autores, como descrito por Tingle et al. (2003) e Pei et al., (2004) além das características de degradação do produto e os metabólitos derivados desta degradação.

O fipronil, na falta de metabólitos iônicos e em temperaturas moderadas, é estável no ambiente, por cerca de um ano. Em condições aeróbicas, associadas a temperaturas de 22° C a 25° C, o produto tem meia-vida de 18 a 308 dias, embora também possa apresentar variações decorrentes do tipo de solo, do pH e do conteúdo de matéria orgânica do solo onde foi aplicado (Belayneh, 1998, *apud* TINGLE et al., 2003).

No ambiente, o fipronil pode ser degradado em diversos metabólitos, dependendo das condições ambientais onde ele foi aplicado, tais como: MB 46513 (desulfinil-fipronil), MB 46136 (sulfone-fipronil), MB 45950 (sulfide-fipronil) e RPA 200766 (amido-fipronil), dentre outros (PEI et al., 2003) (Figura 2, Tabela 1).

4.1. Degradação do fipronil na água

O fipronil na água, quando expostos a luz artificial em laboratório, tem meia-vida de 3,63 horas. A maioria dos metabólitos encontrados, após a degradação na água, é o MB 46513 e o RPA 104615. (USEPA, 2008).

A ação de diferentes concentrações do fipronil, sob o sistema teste de *Allium cepa*, indicou que as concentrações mais baixas induzem a um maior efeito genotóxico e mutagênico em suas células meristemáticas. Esta resposta ficou mais evidente, quando os testes foram realizados na presença de luz, mostrando que a fotodegradação é uma das vias que proporciona um grande efeito tóxico do inseticida (PEDRO e MARIN-MORALES, dados não publicados).

4.2. Degradação do fipronil no solo

A degradação do fipronil no solo, pode se dar pela luz e por ação microbiana. Pela ação da luz, este inseticida tem a característica de ser lentamente degradado em solos argilosos, tendo uma meia-vida de 34 dias. Nestas condições, os produtos de degradação são o RPA 20766, o MB 46513 e o RPA 104615 (TINGLE et al., 2003; USEPA, 2008). Em solos descobertos, o inseticida é mais lentamente degradado, por processos bióticos, (1,1 a 1,5 meses) do que em solos com cobertura vegetal (0,4 a 0,5 meses) (TINGLE et al., 2003).

Estudos desenvolvidos na Europa e nos Estados Unidos revelaram que o fipronil tem uma meia vida de 3,0 a 7,3 meses, e que mais de 90% dos seus resíduos ficam

dispostos na camada mais superior do solo, isto é, acima dos 30 cm da superfície do solo. Quando usado em microgrânulos, em solos com cobertura vegetal, o inseticida apresentou uma meia vida de 0,4 a 1,5 meses (Rhonê-Poulenc, 1996, *apud* TINGLE et al, 2003).

Bloomquist et al. (2000) afirmam que, no campo, o fipronil apresenta baixa mobilidade no solo, ação esta associada ao fato deste inseticida não ser sistêmico, o que favorece a sua permanência no local onde foi aplicado, sugerindo que o mesmo é de baixo impacto ambiental. Raventon et al. (2007) também registraram baixa mobilidade do fipronil no solo. Porém, dados de Faouder et al. (2007) indicavam que a dissolução do produto em metabólitos parece ser uma importante via de dissipação do inseticida pelo solo, pelos dados de contaminação por fipronil registrados em culturas não tratadas, quando próximas a culturas tratadas com este inseticida.

O fipronil se degrada mais rapidamente em regiões tropicais do que em regiões temperadas. O metabólito mais encontrado em solos tropicais, decorrente da fotodegradação, foi o fipronil desulfinyl (MB 46513) (Belayneh, 1998 *apud* TINGLE et al., 2003), também conhecido como destrofipronil. (Figura 2, Tabela 1).

Em solos tropicais, o fipronil tem uma meia-vida de 36 horas, sendo encontrados os seus metabólitos na camada até 10 cm de profundidade do solo. A degradação é rápida, sendo degradado 75% do produto, após três dias da aplicação. Os metabólitos produzidos nesta degradação, segundo Bobé et al. (1998, *apud* TINGLE et al. 2003), foi o sulfido fipronil (MB 45956), amido fipronil (RPA 200766), desulfinyl fipronil (MB 46513) e sulfone fipronil (MB 46136) (Figura 2, Tabela 1).

A sorção e mobilidade do fipronil na superfície do solo são de moderada para baixa (MEDE, 1997; DPR 2001), o que resulta em um baixo potencial de contaminação de águas subterrâneas (USEPA 1996, *apud* TINGLE et al., 2003; BURR, 1997; CONNELLY, 2001).

Abaixo da superfície do solo, o fipronil tem uma tendência para dissipar pela associação entre as partículas, juntamente com a gradual desagregação microbiana (USEPA, 1996 *apud* TINGLE et al., 2003). Segundo Burr et al. (1997), o fipronil não se desloca para as camadas mais profundas do solo, não sendo, desta forma, esperada a contaminação pelo inseticida nestes ambientes.

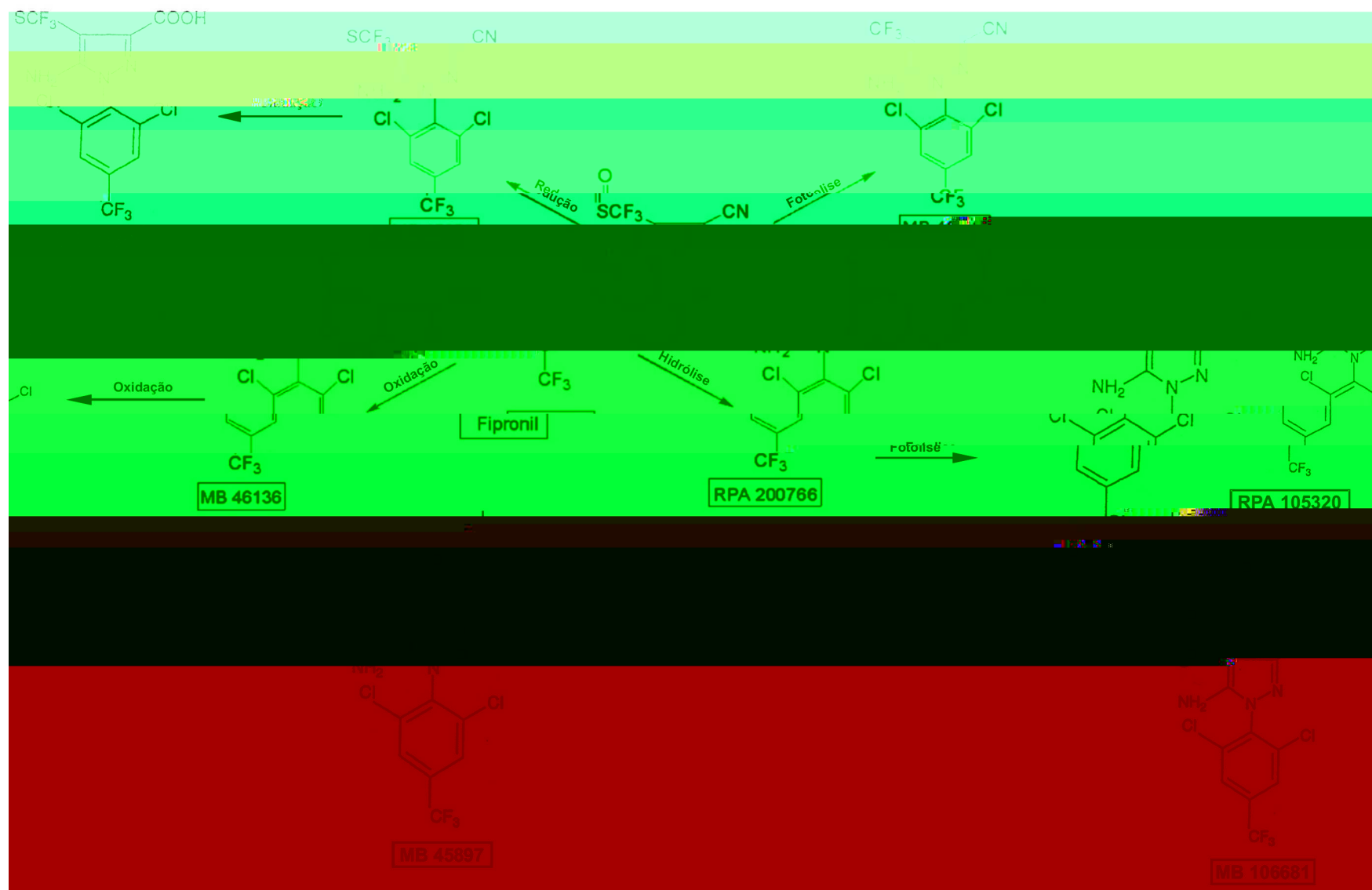


Figura 2: Esquema da degradação do fipronil, com formação de metabólitos, registrados para solo, proposto por Zheng et al. (2003) e por Tingle et al. (2003), com modificações.

Tabela 1: Códigos de identificação, nomes comuns e químicos da maioria dos produtos degradados do fipronil

Codigo	Nome comum	Nome químico	Fonte
MB 046030 RPA 095988	Fipronil	5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(1R,S)-2-cyano-3-phenylpyrazol-3-yl]pyrazole-3-carbonitrile	USEPA 1996
MB 046030 RPA 095988	sthiofipronil	5-amino-3-cyano-1-(2,6-dichloro-4-trifluoromethylphenyl)-pyrazole-4-sulfonic acid	Janet Bressant, USEPA RPA 1040

Fonte: TINGLE et al. (2003).

4.3. Degradação microbiana

O fipronil não é considerado facilmente biodegradável, pois a degradação biótica ocorre lentamente. Porém, a meia-vida do fipronil é relativamente mais longa em solos descobertos do que em solos com cobertura vegetal, o que sugere que a ação microbiana pode auxiliar na degradação do produto (CONNELLY, 2001; DPR 2001; TINGLE et al., 2003).

Em condição de baixa aerobiose, o inseticida fipronil é lentamente degradado pelos organismos do solo. A meia-vida do fipronil em solos argiloarenosos, que são mais ricos em nutrientes, é de 122 a 128 dias, enquanto que em solos arenoargilosos, mais pobres em nutrientes, é de 308 a 342 dias. A degradação do fipronil no solo leva a formação de vários metabólitos, dentre os quais incluem-se o RPA 200766 e o MB 46136 (USEPA, 1996, *apud* TINGLE et al., 2003; CONNELLY, 2001; TINGLE et al., 2003) (Figura 2 Tabela 1).

O fipronil é degradado, lentamente, em água e é sedimentado sob condições anaeróbicas baixas. A meia-vida, neste caso, é de 116 a 130 dias, com uma média de 123 dias. Os dois metabólitos mais encontrados, após a degradação, são o MB 45950 e o RPA 200766 (Figura 2, Tabela 1). O MB 45950 foi encontrado em extrato de solo e o RPA 200766 na água e no solo (CONNELLY, 2001).

4.4. Hidrólises

O fipronil é estável para hidrólise em águas com pH entre 5 a 7, quando em condições de ausência de luz. Em soluções aquosas, sem a presença de luz e em ambientes com temperaturas de 22°C, 80% do inseticida permanece inalterado por 100 dias. Porém, com o aumento do pH, a porcentagem de degradação aumenta. Em pH 9, o fipronil é degradado em 28 dias, tendo como produto metabólico de maior degradação o RPA 200766, produto este considerado menos tóxico dentre os metabólitos do inseticida (USEPA, 2008).

A degradação abiótica do fipronil, para soluções aquosas e para superfície de solos tropicais, mostrou diferentes valores de hidrólise para diferentes pH e temperaturas (BOBÉ et al., 1998). A persistência foi de baixa à moderada na água e no solo, com meia-vida de 10 a 30 h em água e de 45 a 530 h em solo. Os principais

produtos de degradação foram o desulfinyl para a água e o sulfide para o solo (CONNELLY, 2001; TINGLE et al., 2003).

Estudos laboratoriais mostram que a fotólise, volatilização, dissolução e hidrólise contribuem para a dissipação do fipronil em campo, mas não está esclarecido se as vias de dissipação fotolítica se dão de forma direta ou indireta (TINGLE et al., 2003).

5. Persistência e Mobilidade

5.1. Persistência

O fipronil, na presença de luz, tem uma persistência de baixa à moderada (CONNELLY, 2001). Porém esta persistência pode ser influenciada pela sua formulação, onde grânulos acabam sendo mais persistentes (meia-vida de 125 h para água e 430 h para solo) do que concentrações solúveis (meia-vida de 10,5 a 77,8 h para água e 45,5 a 95,5 para solo). As formulações secas são menos persistentes em água, mas mais persistentes em solos. Dentre os metabólitos do fipronil, o mais persistente foi o MB 46513 (meia-vida de no mínimo 420 h) (TINGLE et al., 2003).

O fipronil tem meia-vida de 3 a 7 meses em superfície de solos tratados, dependendo do substrato onde foi aplicado. Após aplicação do inseticida fipronil, são encontrados resíduos na vegetação tratada, por um período maior do que 3 semanas. A persistência é ainda maior na superfície de solos tratados com matéria orgânica, mas com ausência prolongada de microorganismos (BELAYNEH, 1998 *apud* TINGLE et al., 2003).

5.2. Mobilidade

5.2.1. Adsorção

Estudos sobre a adsorção e dessorção do fipronil no solo indicam que, tanto o fipronil como os seus metabólitos, têm uma baixa mobilidade neste ambiente (USEPA, 2008).

A adsorção do fipronil é diretamente proporcional à quantidade de carbono orgânico presente no solo (CONNELLY, 2001). Estudos realizados em solos do Reino Unido mostraram que a adsorção deste inseticida é constante, com um coeficiente de sorção (K_d) de 4,19, para solos argiloarenosos, e de 20,29 para solos argilosos. O

coeficiente de sorção, segundo Paraíba et al. (2004), seria um fenômeno físico-químico constituído por adsorção e absorção de moléculas do agrotóxico na matéria orgânica e nos espaços microscópicos do solo. Este coeficiente é dependente da área superficial, da concentração de substâncias neutras ou eletricamente carregadas, da matéria orgânica, da polaridade e dos materiais presentes neste solo.

Pela sua alta afinidade com partículas do solo, encontramos mais resíduos de fipronil na camada acima de 10 a 12 cm do solo, sendo inexistentes nos lixiviados subterrâneos (TINGLE et al., 2003). Estudos sobre persistência e degradação do fipronil na vegetação e no solo mostraram resultados similares (USEPA, 2008).

6. Bioacumulação

O fipronil não é acumulado no meio ambiente, mas algumas acumulações temporárias, em água, têm sido registradas para o metabólito MB 46513. Este inseticida exibiu, nestas condições, uma fotólise lenta e ausência de volatilidade (BELAYNEH, 1998 *apud* TINGLE et al., 2003).

Segundo Tingle et al. (2003), devido à persistência relativamente alta deste metabólito (MB 46513) no solo, ele, provavelmente, se acumula neste ambiente, quando são feitas repetidas aplicações, por vários anos, na mesma área agrícola. Foi observado que o mesmo metabólito também é acumulado em tecido gorduroso de gado, pois foi registrada a sua presença em carne gorda de gado da Austrália.

Em ratos, o fipronil é rapidamente metabolizado e os resíduos distribuídos, amplamente, nos tecidos, particularmente no tecido gorduroso, onde eles ficam em quantidades significativas por uma semana, após a administração. A longa meia-vida de fipronil no sangue (150 a 245 horas) pode ser devido à baixa liberação do resíduo presente na gordura, o que sugere a bioacumulação potencial dos metabólitos deste inseticida (FAO, 1998).

Em peixes, o fipronil aparece bioacumulado, quando expostos a uma concentração de 900 ng/L, por 35 dias. Estudos mostraram que peixes expostos, por este período, apresentaram um alto nível de acúmulo em tecidos não comestíveis (Tingle, 2003).

Estudos para avaliar a contaminação vegetal por fipronil mostram que culturas tratadas com este inseticida apresentam baixos níveis de resíduos, sendo estes sempre

em concentrações muito abaixo dos limites estabelecidos pelas agências normativas (BELAYNEH, 1998 *apud* TINGLE et al., 2003).

Testes de bioacumulação feitos com o inseticida fipronil, em larvas do mosquito *Aedes aegypti*, mostram que pode-se obter um controle desses organismos por via digestiva. A bioacumulação do fipronil nestas larvas ocorre, principalmente, pela via tegumentar nas larvas não tratadas com o produto, mas a acumulação em larvas expostas a água tratada com o inseticida se deu, principalmente, pela ingestão (CHATON, 2001)

7. Resíduos em alimentos

A preocupação com a presença de agrotóxicos nos alimentos é tão antiga quanto à utilização destes compostos químicos no controle de pragas e doenças que interferem na produção agrícola. Somente em anos mais recentes, com os avanços do conhecimento científico, aliados ao desenvolvimento tecnológico, vem sendo possível quantificar os resíduos de agrotóxicos presentes no alimento (ANVISA, 2006).

A exposição de pessoas aos agrotóxicos, além de acontecer pelo contato direto, dado pela manipulação e exposição ao produto, pode também se dar, por via indireta, através da alimentação (ANVISA, 2006).

Diverso16558(d)-4.3311-2.16436(a)3.74 4(t)-2.16558(r)2.805(a)3.74(v)-0.295585(é)3.74(s)-1.9

os resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos, um dos principais responsáveis (CALDAS E SOUZA, 2000).

Níveis Máximos de Resíduos (MMR) de fipronil tem sido estabelecido para alguns alimentos em inúmeros países, incluindo Brasil e França. No Brasil, o NMR é de 0,01 mg/Kg para cana-de-açúcar e, de 0,05 mg/Kg para batatas. Na França, o NMR é de 0,01 mg/Kg para arroz, girassol, açúcar de beterraba, banana e cereais em grãos. Nos Estados Unidos o NMR é de 0,01 mg/Kg para arroz e 0,02 mg/Kg para trigo. No Japão, o NMR é de 0,01 para arroz (BELAYNEH, 1998 *apud* TINGLE et al., 2003).

Estudos de avaliação do metabolismo em plantas, realizado por Belayneh (1998 *apud* TINGLE et al., 2003), indicam que, quando o fipronil é aplicado nas folhas, em doses recomendadas para uso em campo, ele sofre pouca ou nenhuma translocação para o solo. Quando o fipronil é lançado no solo, ele caminha até as raízes e é transportado para as folhas. Assim, com a translocação do inseticida do solo para as estruturas da planta, ele pode ser depositado no alimento a ser consumido (TINGLE et al., 2003).

Dados apresentados pela ANVISA (2006) mostram que em análises realizadas no Brasil, com 4 mil amostras de alimentos, foram observados problemas de contaminação por alguns agrotóxicos em 28% delas, sendo a maioria decorrentes do uso de produtos não autorizados para a determinada cultura, ou da quantidade excessiva utilizada, o que gerou contaminações com níveis de resíduos acima dos permitidos pela legislação.

Faouder et al. (2007) mostraram, em estudos feitos em vacas de leite alimentadas com silagem de milho tratadas com o inseticida fipronil, que metabólitos desse inseticida, como o sulfone fipronil, foi encontrado no leite desses animais. O fipronil ingerido na pastagem não foi somente excretado no leite, mas também na urina e nas fezes, além de ser bioacumulado no tecido adiposo.

Segundo a European Food Safety Authority - EFSA (2006), o risco do inseticida fipronil é baixo, quando pássaros e mamíferos ingerem sementes tratadas com este produto. Em minhocas e peixes o risco também pode ser considerado baixo, mas vale ressaltar que, segundo o mesmo autor, os metabólicos MB 46136, MB 45950 e RPA 200766 são bioacumulados em peixes.

8. Impactos nos organismos não alvos

8.1. Organismos aquáticos

Existem poucas informações sobre a toxicidade do fipronil para organismos aquáticos dispostos no ambiente natural. Os dados do potencial de contaminação do fipronil são obtidos, principalmente, por estudos realizados em campos agrícolas. O inseticida fipronil, em condições de laboratório, apresenta uma toxicidade variada de altamente tóxico para extremamente tóxico, para muitos organismos aquáticos, quando expostos às concentrações relativamente baixas (TINGLE et al., 2003).

Em fanerógamas aquáticas e algas, o fipronil é considerado não tóxico (USEPA, 1996, *apud* TINGLE et al., 2003). Esta conclusão foi obtida pelos estudos realizados com três espécies de algas de água doce (*Anabaena flosaquae*, *Navicula pelliculosa* e *Selenastrum xapricornutum*), cujos resultados não mostraram efeitos significativos sobre as alterações observadas para o crescimento destes organismos, após a exposição a 0,2 mg/L de fipronil. Porém, na alga unicelular *Scenedesmus subspicatus*, o fipronil promoveu inibição e redução do crescimento, além de outras anormalidades, para as doses de 0,08 e 0,16 mg/L.

A densidade celular registrada para a diatomacea marinha *Skeletonema costatum* não foi estatisticamente significativa, quando comparados aos testes controle feitos com fipronil (ACP, 1999, *apud* TINGLE et al., 2003).

Em animais invertebrados, baseado em estudos feitos com *Daphnia sp.*, o fipronil mostrou-se extremamente tóxico. (Everts, 1997, *apud* TINGLE et al., 2003). Foi observado que o fipronil afeta o comprimento do corpo de dafinídeos, quando em concentrações maiores do que 9,8 ppb. Os metabólitos MB 46136 e MB 45950 foram mais tóxicos para este invertebrado, do que para outros insetos de água doce.

O inseticida fipronil é altamente tóxico para a ostras *Cranostrea virginica* e extremamente tóxico, em testes agudos, para os camarões *Mysidopsis bahia* e *Streptocephalus sudanacius*.

Estudos feitos em peixes mostram que fipronil é extremamente tóxico para espécies de água doce, como, por exemplo, para o peixe sol (*Lepomis macrochirus*) e altamente tóxico para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (UESPA, 2008). Mas, segundo TINGLE et al (2003), o metabólito do fipronil, MB 46136, mostrou-se seis vezes mais tóxico para peixes de água doce do que o próprio inseticida.

Os metabólitos MB 46136, MB 45950 e RPA 200766, pelo representativo uso do fipronil nas sementes de milho e de girassol, podem ser considerados de baixo risco para invertebrados aquáticos, exceto quando disponível por um longo período (EFSA, 2006).

8.2. Organismos terrestres

Quando uma solução de 2000 mg/L de fipronil foi aplicada, continuamente, por 4 dias, em sementes de arroz, foi observado um prejuízo significativo na germinação. Quando as sementes foram expostas por 1 hora, 48 h após a germinação, o crescimento pós-germinação também foi diminuído (STEVENS et al., 1998).

Pelos testes feitos com o inseticida fipronil nos laboratórios do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro - SP, com a espécie *A. cepa*, foi observado que não houve alteração nos índices de germinação das sementes testadas, mas foram registradas aberrações cromossômicas nas células meristemáticas radiculares deste organismo. Esta ação foi interpretada como decorrente do efeito genotóxico e mutagênico do inseticida (PEDRO e MARIN-MORALES, 2007, dados não publicado).

O fipronil não é considerado tóxico para microorganismos do solo, mas, em laboratório se mostrou tóxico para *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, dois fungos usados no controle de insetos pragas (TINGLE et al., 2003).

Testes com o fipronil indicaram uma redução na longevidade e fecundidade da fêmea de braconídeos (espécies parasitas de pulgão). O inseticida também foi altamente tóxico para o ectoparasita *Catolacus grandis*, um inimigo natural do besouro do algodão (TINGLE et al., 2003).

O fipronil é tóxico para abelha, não devendo ser aplicado em vegetação usada no forrageamento (Rhonê-Poulenc, 1995, *apud* TINGLE et al., 2003). Estudos realizados com abelhas nativas da região árida do oeste dos Estados Unidos (abelhas de mel e abelhas da alfafa) mostraram que fipronil não é considerado perigoso, quando aplicado durante a noite na forma de spray, pois, segundo Mayer e Lundem (1999), após 24 horas de aplicação do inseticida, o índice de mortalidade das abelhas decresce. Também foi observado que as abelhas deixam de procurar as flores onde foi aplicado o inseticida, talvez pela alta sensibilidade que possuem em seus órgãos olfativos. Outra explicação que sugerimos é pelo próprio efeito inibidor do GABA que o inseticida

promove, que leva a um déficit nas funções cognitivas do inseto. Desta forma não há passagem de informação e nem aprendizagem do local onde o recurso alimentar está disponível.

O risco do fipronil para os macroorganismos no solo é considerado baixo para concentração de 0,785 mg/Kg. Para os microorganismos de solo, o risco também é baixo para a concentração de 0,667 mg/Kg de fipronil e de 0,60; 0,133; e 0,267 mg/Kg dos metabólitos por MB 46136, MB 45950 e RPA 200766, respectivamente (EFSA, 2006).

8.2.1. Alteração no Metabolismo

Quando o fipronil foi administrado por via gástrica em ratos, ele se mostrou tóxico, desencadeando sintomas como diminuição de apetite, anúria, aumento de excitabilidade, comprometimento fisiológico de diversos órgãos, principalmente, do fígado, rim e tireóide. Quando em contato com a pele de ratos, o inseticida causou uma leve irritação, mas uma irritação maior foi observada, quando lebres foram expostas, via dérmica, ao inseticida. Também foi observada uma leve irritação nos olhos destes últimos organismos (USEPA, 2008). Segundo Tingle et al. (2003), o fipronil também causa problemas adrenais e gastrointestinais em ratos. O autor relata que cerca de 45% a 75% do fipronil é eliminado, nestes organismos, pelas fezes e de 5% a 25% pela urina. Os metabólitos encontrados na urina foram o MB 45897 e mais dois produtos oxidados (MB 46136 e RPA 200766) (Figura 3 e Tabela 1), além do próprio fipronil.

8.2.2 Efeitos da toxicidade aguda

O fipronil apresenta uma toxicidade aguda para mamíferos por via oral e por inalação. Os sinais mais comuns de toxicidade são: ereções dos pêlos, postura arqueada, alteração no modo de andar e diarreia. O inseticida causa efeitos neurotóxicos agudos em ratos, levando a uma diminuição das pernas traseiras (atrofia) (TINGLE et al. 2003).

Segundo Nakagone et al. (2007), o inseticida fipronil, igualmente a outros inseticidas, apresenta uma leve toxicidade para *Daphnia magna*, se enquadrando na classificação de toxicidade mínima.

A toxicidade aguda do fipronil para ratos é moderada pelas vias orais e por inalação. Para a exposição pela derme, a absorção foi menor do que 1%, depois de 24 h

de exposição, sendo esta toxicidade considerada baixa. Em contraste, a toxicidade via derme, observada para coelhos, foi moderada (Pesticide Action Network – PAN - UK, 2006). Experimentos de toxicidade aguda mostram que a exposição dérmica em coelhos leva a uma diminuição do peso corpóreo e a uma maior inapetência.

8.2.3. Efeitos de Toxicidade crônica

Os efeitos crônicos observados em ratos expostos ao fipronil foram ataques epiléticos (que podem levar a morte), diminuição do peso, diminuição de apetite e deficiência de conversão do alimento, diminuição dos valores hematológicos, alteração clínica (no índice de colesterol e de proteínas), alteração nos hormônios da tireóide, alterações químicas da urina, aumento do fígado. Em cachorros, os sinais clínicos apresentados foram de neurotoxicidade e efeitos neurológicos anormais (TINGLE et al. 2003).

Dados da PAN–UK (2006) indicam que tem havido uma baixa incidência de reações graves na pele de cães e gatos, quando o produto é aplicado por pulverização. Algumas reações da pele e/ou queda de pelo no local da aplicação também são citados. Foi observado que os cães parecem ser mais sensíveis ao produto do que os gatos (USEPA, 1996, *apud* TINGLE et al., 2003).

8.2.4. Efeitos neurotóxicos

O potencial neurotóxico do fipronil, observado pelos ensaios desenvolvidos com mosca doméstica e camundongos, que é dado pela sua propriedade de bloquear os canais de cloro das células nervosas, é mantido ou até aumentado pela fotodegradação do inseticida. A fotodegradação resulta em maior produção do metabólito desulfunil do que do detrifluorometilsulfinil (HAINZL e CASIDA, 1996).

Estes autores acima citados também afirmam que se o fipronil e o desulfinylfipronil são equipotentes para o receptor GABA do inseto, enquanto que o metabólito desulfinyl é dez vezes mais potente que o fipronil para interagir com os canais de cloro de mamíferos, o que restringe a seletividade intrínseca entre insetos e mamíferos.

Os efeitos neurotóxicos subcrônicos registrados para ratos foram dentre outros a anúria e uma maior excitabilidade, tanto em machos como em fêmeas (TINGLE et al.

2003). Estudos realizados por Ohi et al. (2004) mostraram que, em ratos Wistars, o inseticida fipronil, além de agir no GABA, causou crises convulsivas, principalmente, quando aplicado em altas doses.

8.2.5. Efeitos Carcinogênicos

Estudos feitos com ratos mostraram que o fipronil é carcinogênico para a dose de 300 ppm, causando câncer de tireóide (PAN – UK, 2006). Porém, este inseticida foi considerado não carcinogênico para camundongos, para a dosagem de 30 ppm, mas desencadeou os sintomas de diminuição no ganho de peso e a diminuição na eficiência de conversão de alimentos em massa corpórea (machos), aumento do fígado e aumento do índice de mudanças histopatológico do fígado (TINGLE, 2003).

8.2.6. Efeitos Genotóxicos e Mutagênicos

No trabalho de Tingle et al. (2003) é apresentado que testes de mutação reversa com *Salmonella tyhimurim*, células S-9 com ensaio de gene de mutação reversa em microsomo de mamíferos (vesícula de membrana de Retículo Endoplasmático que pode ser isolado por centrifugação) com e sem ativação de S-9, ensaio citogenético em linfócitos humanos e ensaios de micronúcleo em ratos, realizados com o fipronil, mostraram que o inseticida não é genotóxico nem mutagênico.

Em testes feitos nos laboratórios do Instituto de Biociências de Rio Claro-UNESP, em 2007, foi observado que o inseticida fipronil causou alterações cromossômicas em *A. cepa*, sendo um possível indicador de genotoxicidade para este organismo (PEDRO e MARIN-MORALES, 2007 dados não publicados).

8.2.7. Efeitos na reprodução

Por meio de estudos feitos com ratos, foi observado que o inseticida fipronil é tóxico na dose de 26,03 mg/Kg para machos e 28,40 mg/Kg para fêmeas, causando diminuição na porcentagem de acasalamento, redução do índice de fertilidade e diminuição de sobrevivência da prole pós-nascimento (TINGLE et al., 2003).

Figura 3

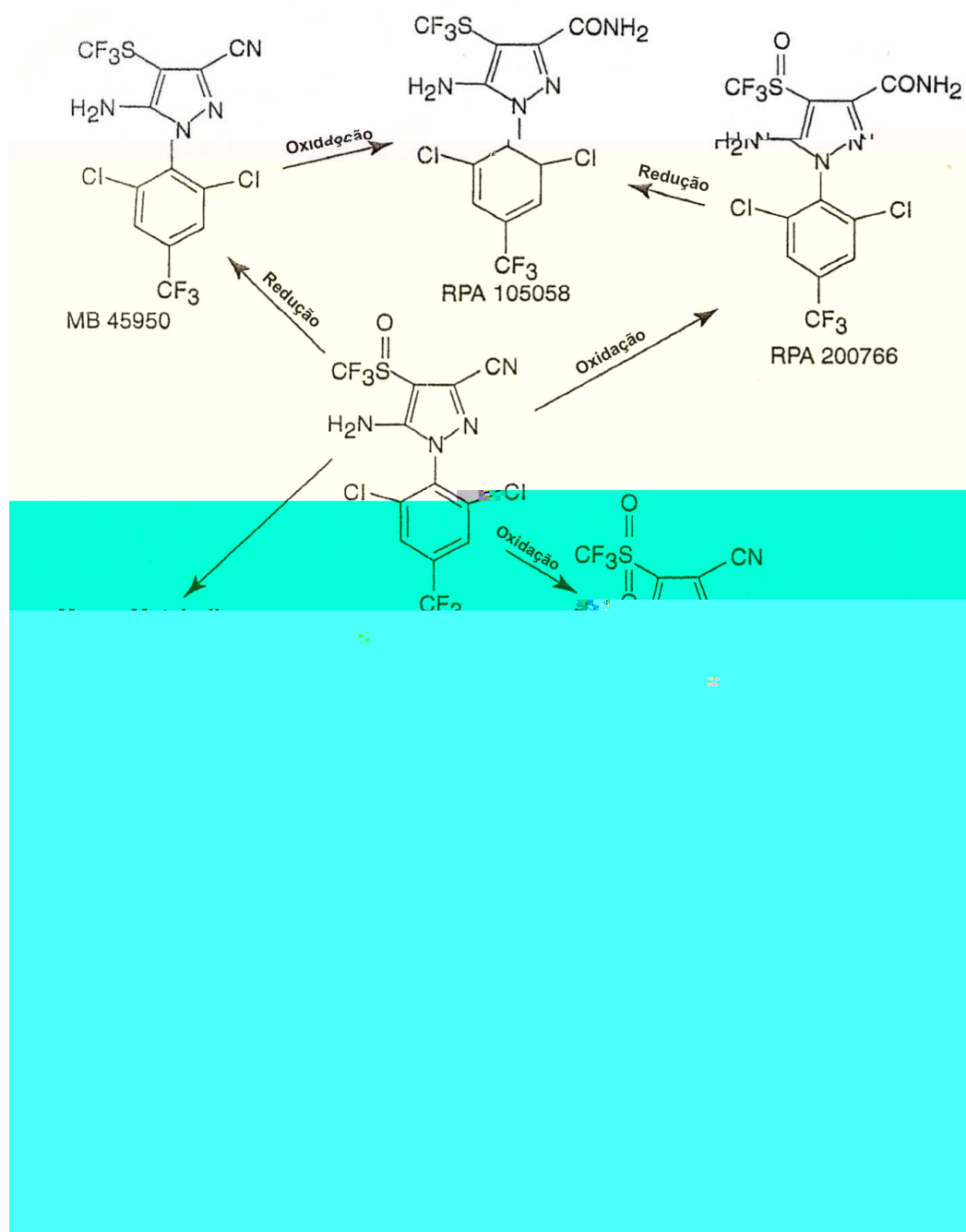


Figura 3: Esquema da biodegradação do fipronil, com formação de metabólitos, registrados em experimentos com ratos (TINGLE et al., 2003), com modificações.

Segundo a PAN-UK (2006), o fipronil mostrou alterações reprodutivas em ratos tratados continuamente com dieta a 300 ppm deste inseticida (grau de pureza de 95,4%). Estes efeitos observados foram baseados em alterações que caracterizaram sinais clínicos de toxicidade como: diminuição do peso corpóreo, diminuição da porcentagem de acasalamento, redução de fertilidade, redução da sobrevivência pós-natal da prole e atraso no desenvolvimento físico.

Estudos feitos por Ohi et al. (2004), indicaram que os agentes receptores do GABA podem agir como disruptores hormonais, tanto em machos como em fêmeas. Como o fipronil é um agente GABAnérgico, ele pode interferir no controle e no comportamento reprodutivo de fêmeas, via mecanismo desencadeado pelo sistema nervoso central. A oscilação hormonal, principalmente da progesterona, no SNC ou na circulação, é um fator decisivo para a manifestação do comportamento proceptivo e receptivo e, conseqüentemente, de fertilização-implantação, caso haja acasalamento. A manutenção do ciclo estral e diestral, independentemente da fase do ciclo no dia do tratamento com o fipronil e o retorno do procedimento estral para a fase proestral atípica, podem ser indicativos de que a droga interfere no processo de interação de FSH, LH, estrógeno e progesterona, hormônios responsáveis pelo controle do ciclo estral de fêmeas de ratos.

Embora os estudos ainda não sejam conclusivos, é sugerido que a interrupção do ciclo estral, na fase diestral, quando se tem altos níveis de progesterona e baixos níveis de estradiol no plasma, pode ser devido a ação GABAnérgica do fipronil sobre a hipófise, promovendo, assim, uma estimulação. Altos níveis de progesterona no plasma impedem a inibição do próximo estro, parando o ciclo estral na fase diestral (OHI et al., 2004).

A fertilização e a implantação dos conceitos de ratos no útero são eventos dependentes de altos níveis de progesterona e baixos de estradiol no plasma. Os níveis hormonais não balanceados podem atrasar o transporte de espermatozóides e o subsequente transporte do próprio ovo fertilizado dentro do útero. A redução do índice de prenhes em fêmeas tratadas com fipronil, no primeiro dia da gestação, pode ser atribuída às alterações hormonais, mas, novas investigações são necessárias para a comprovação desta hipótese (OHI et al., 2004).

9. Consequências da ação do fipronil sobre a saúde humana

Relativamente pouco é conhecido sobre a atividade do fipronil em vertebrados e, especialmente, em humanos. Estudos, *in vivo*, realizados com mamíferos indicam que a via metabólica primária do fipronil envolve formação de oxidativos do metabólito sulfone (HAINZL e CASIDA, 1996 e TANG et al., 2004). Os metabólitos do fipronil, tal como sulfone e o seu produto fotodegrado desulfinylfipronil, tem sido descrito como mais tóxico para diversos organismos do que o próprio fipronil (USEPA, 1996, *apud* TINGLE et al., 2003; HANZL e CASIDA, 1996).

Segundo Godoy (2006), o fipronil causa intoxicação em humanos, levando a complicações cardíacas e respiratórias, enfermidades da vista e da pele, disfunções digestivas e desmaios.

Recentes estudos com hepatócitos humanos e de ratos têm demonstrado que os inseticidas são capazes de interagir com muitas enzimas metabólicas nestas células (ROSE et al., 2005; LEDIRAC et al., 1997). Células de hepatócitos humanos, expostas ao fipronil, demonstraram que o inseticida e o seu subproduto fipronil sulfone são, significativamente, mais tóxicos que outros inseticidas da mesma classe toxicológica (DAS, 2006). O fipronil é um substrato do CYP3A4, que tem potencialidade em induzir, significativamente, os subprodutos CYP1A1 e CYP3A4, resultando no aumento do potencial de interação com uma ampla gama de substâncias químicas e hormônios endógenos. Nas células de hepatócitos humanos (HepG2), o inseticida causou citotoxicidade, por duas principais vias de indução de apoptose: a via mediada por receptores e a via de inibição mitocondrial, que envolve a liberação de proteínas mitocondriais (DAS, 2006).

Segundo a USEPA (2008), quanto ao índice de carcinogenicidade, o inseticida fipronil é considerado como do grupo C (possivelmente carcinogênico para humanos), devido ao aumento de células foliculares da tireóide, observado para ambos os sexos de ratos expostos ao fipronil.

Estudos com o inseticida fipronil, em microsossomos de fígado humano (HLM) e em microsossomo de fígado de rato (RLM), mostraram que a via metabólica predominante deste inseticida é a oxidação do grupo tioester, que gera o sulfone fipronil (TANG et al., 2004). Estes dados também são concordantes com as descrições de Hainzl e Casida (1996), para ensaios realizados com camundongos.

www.scielo.br/scieloOrg/php/articleXMLphpid=50.102-95X200700030001&lang=en.
Acesso em: 13/nov/2007.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. Porto Alegre: Boohman, 2002.

BLOOMQUIST, J. R.. Insecticides: chemistries and characteristics. Disponível em:
<[http:// www.ipmword.umn.edu/chapters/bloomq.htm](http://www.ipmword.umn.edu/chapters/bloomq.htm)>. Acesso em: 12/nov/2005.

BURR, C.M. 1997. [14C]- M&B 45950: Adsorption/ Desorption to and from Four Soils and One Sediment. **Data Package ID** No. 169043. DPR No. 52062-241.

CALDAS, E. D. e SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico na ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, nº 5, p. 259-37, 2000.

CASARIN, F. E. Seleção de ingredientes ativos para o controle do cupim subterrâneo *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae), 2007. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, SP, 163 f., 2007.

CENEPI/FNS – Centro Nacional de Epidemiologia / Fundação Nacional de Saúde, 2008. Disponível em: <<http://br.geosities.com/zuritageb/agrotoxico.htm>>. Acesso em: 15/nov/2007.

CHATON, P. F.; RAVANEL, P.; MEYRAN, J. C.; TISSUT, M.. The Toxicological Effects and Bioaccumulation of Fipronil in Larvae of the Mosquito *Aedes aegypti* in Aqueous Medium. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego. v. 69, p.183-188, 2001.

COLLIOT F.; KUKOROWSKI K. A.. Fipronil: a new soil and foliar broad spectrum insecticide. Brighton Crop Protection Conference, **Pests and Diseases**, v. 2-1, p. 29-34, 1992.

COMPÊNDIO de Defensivos Agrícolas. São Paulo: Andrei, 1996.

CONNELLY, P (2001). Environmental fate of fipronil. Environmental of Pesticide Regulation. Califórnia Environmental Protection Agency P.O. Box 4015. Sacramento,

CA 95812-40 15. Disponível em: <<http://www.world.umn.edu/chapters/ware.htm>. Acesso em: 06/maio/2008.

DAS, P. C.; CAO, Y.; CHERRINGTON, N.; HODGSON, E.; ROSE, L. R.. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemosphere**, Oxford, v. 164, p. 204-214, 2006.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO 13/12/91. Portaria nº 3, de 16 de janeiro de 1992. Termos das “Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins – nº 1, p. 153 – 177, de 9 de dezembro de 1991.

DORES, E. F. G. C.. Contaminação por pesticidas das águas usadas como consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso. 2000. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Mato Grosso, MT, 2000.

Department of Pesticide Regulation.- DPR. Pesticide Chemistry Database. Department of Pesticide Regulation, Sacramento, California, 2001.

European Food Safety Authority – EFSA. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance: fipronil, v.65,, p. 1-110, 2007. Disponível:http://www.efsa.eu.int/EFSA/PRAPER_Conclusion/preper_concl_sr65_fipronil_semamaru_rev/2pdf. Acesso em: 15/out/2007.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. New Code of Conduct on Pesticides adopted. Rome, FAONEUSROON, 4 nov, 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/english/newsroom/news/2002/10525-em.html>>. Acesso em: 21/maio/2007.

FAOUDER, J. Le; BICHON, E.; BRUNSCHWIG, P.; LANDELLE, R.; ANDRE, F.; BIZEC, B. Le.. Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. **Chemosphere**, Oxford, v.73, p. 710-717, 2007.

FERRO, F. D.. Agrotóxicos estão Matando Produtor Rural. Disponível em: <<http://www.preservacaolimeira.com.br/agrotoxicos/ferro2.htm>>. Acesso outubro de 2006.

GODOY, J.. Alarme por inseticidas assassinos de abelhas. Tierramérica, 2006. Disponível em: <http://www.tierraamerica.net/2004/0313/pacentos.htm>. Acesso em: 11/dez/2006.

GUIMARÃES, L. T.. Utilização do Sistema de Informação Geográfica (SIG) para identificação de áreas potenciais para disposição de resíduos na Bacia do Paquequer, município de Teresópolis – RJ, 2000. Dissertação (Mestrado). Universidade federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

HAINZL, D.; CASIDA, J E.. Fipronil insecticide: Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci, USA, v. 93, p. 12764-12767, 1996. Disponível em: <http://www.fgel.br/labogis/produção/publicação/lucy/index.htm>. Acesso em: 30/jun/2006.

JOURNAL EXPRESS. Consumo de pesticidas no Brasil. Disponível em: <<http://www.jornalexpress.com.br>>. Acesso em 02/jan/2006.

KENWORTHY, K. E.; CLARKE, S. E.; ANDREWS, J.; HOUSTON, J. B. Multisite Kinetic models for CYP3A4: simultaneous activation and inhibition of diazepam and testosterone metabolism, **Drug Discovery Today**, Kildlilton,. v.29, p. 1644-1651, 2001.

KOTACA, E. T.; ZAMBRONE, F. A. D. **Contribuições para a construção de diretrizes de avaliação do risco toxicológico de agrotóxicos.** Campinas, SP: ILSI Brasil, 2001.

LANGENBACH, T. Pesticidas: Tecnologia sofisticada em mãos desinformadas. **Ciência Hoje.** São Paulo. v. 10, p. 66-68, 1989.

LEDIRAC, N.; DELESCLUSE, C.; SOUZA, G.; PRALAVORIO, M.; LESCA, P.; AMICHOT, M.; BERGE, J. B.; RAHMANI, R. Carbaril induces CYP1A1 gene

expression in HepG2 and HaCaT cells but is not a ligand of the human hepatic a receptor, **Toxicology Applied Pharmacology**, San Diego, v.144, p. 177-182, 1997.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas**. Nova Odessa: Plantarum, 1990.

MACHADO, P.A.L. **Direito ambiental brasileiro**. São Paulo, Malheiros, 2001, 1031 p.

MATUO, Y. K.; LOPES, J.N.C.; MATUO, T.. Contaminação do leite humano por organoclorados – DDT, BHC e Ciclodienos. Jaboticabal: FUNEP, 1990.

MAYER, D. F. e LUNDEN, J. D. Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female bees of *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. **Journal of Apicultural Research**, London. v. 3, p.191-197, 1999.

NAKAGONE, F.; NOLDIN, J.; RESGALLA JR, C. Toxicidade aguda de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros de *Daphnia magna*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio ambiente**, Curitiba, v. 16, p. 93 – 100, 2006.

OHI, M.; DAINSETER, P. R.; ANDRADE, A. J. M.; NASCIMENTO, A. J. Reproductive adverse effects of fipronil in wistar rats. **Toxicology Letters**, Amsterdam. v. 146, n. 2, p. 121 – 127, 2004.

OLIVEIRA, M. A. G. Níveis de resíduos de praguicidas organoclorados no leite de mães de um a população de Cuiabá, Mato Grosso, 1997. Dissertação (Mestrado), ISC-UFMT, Mato Grosso, 1997.

Pesticide Action Network – PAN Disponível em:
<http://www.fluoridealert.org/pesticides/fipronil>. Acesso em: 25/jul/2006.

PARAÍBA, L. C.; LUÍZ, A. J. B.; PERY, D. V. Estimativa do Coeficiente de sorção no solo de pesticidas. **Artigo Instituto de Biologia**, São Paulo. v. 71 (supl.), p. 1-749, 2004.

PEDRO, J; MARIN-MORALES, M. A.. Detecção da citotoxicidade e mutagenicidade do inseticida Fipronil no organismo teste *A. cepa*. In: VIII Congresso de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, v. 8, 2007. Anais, Mangaratiba, RJ, 2007.

PEI, Z.; YITONG, L.; BAOFENG L.; GAN, J. J. Dynamics of fipronil residue in vegetable-field ecosystem. **Chemosphere**, Oxford,. v.57, p.1691-1696, 2004. Pesticide Action Network – Pan – UK, 2006. Disponível em: <<http://www.pan-uk.org/About/index.htmpan-uk.org/actines/fipronil.htm>>. Acesso em 21/jan/2008.

PIZANO, M. A.; BAPTISTA, G. C. Resíduos de fenitrothion em frutos e folhas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) estaqueado. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, nº 2, p. 203-209, 1998.

RAVENTON, M.; AAJOUD, A.; WILLISON, J.; CHERIFI, M.; TISSUT, M.; RAVANEL, P. Soil distribution of fipronil and its metabolites originating from a seed-coated formulation. **Chemosphere**, Oxford. v.69, p. 1124-1129, 2007.

RIBEIRO, M. de F. S.. Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental dos Produtos Químicos de uma Indústria Petroquímica. Teses/dis. – Saneamento Ambiental, 1999. Disponível:

[http://www.mackenzie.com.br/pos_graduacao/k6rS/A2.460590.1957442\(i\)-2.1655\(S\)-4.3301720T](http://www.mackenzie.com.br/pos_graduacao/k6rS/A2.460590.1957442(i)-2.1655(S)-4.3301720T)

STEVENS, M. M.; HELLIWELL, S.; WARREN, G. N.. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. **Field Crop Research**, v. 57, p.195-207, 1998.

TANG, K. J .; USIMANI, A.; HODGSON, E.; ROSE, L. R.. In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. **Chemosphere**. Oxford. v.147, p. 319-329, 2004.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, C. F.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J.. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology and Human Health Concerns, **Environmental Contamination and Toxicology**, New York. v. 176, p.1-66, 2003.

USEPA – United States Environmental Protection Agency, Fipronil Pesticide fact sheet. EPA 737-F-96-005. U.S. **Environmental Protection Agency**, Washington, USA. 7 pp. <<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/199ay-12/pr-736DIR/Factsheet.txt.html>>. Acesso em: 15/jan/2008.

VIEIRA, S. L. P.. Resíduos de pesticidas organoclorados e organofosforados em tomate (*Lyopersicum esculentum* P. Miller) comercializados em Cuiabá, Mato Grosso, 1999. Dissertação (Mestrado) – ISC-UFMT, Cuiabá, 1999.

ZAMBROME, F. A. D.. Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? Perigosa família. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 4, n. 22, p. 44-48, 1986.

Artigo 2

Avaliação dos efeitos tóxicos e genotóxicos do inseticida fipronil, sobre sistema teste de *Allium cepa*.

Janaína Pedro¹ e Maria Aparecida Marin-Morales¹

**¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
(UNESP)**

Av. 24-A, no. 1515, CP 199, CEP: 13.506-900, Rio Claro, SP, Brasil

Artigo a ser submetido à: Pesticide Biochemistry and Physiology

Resumo

Os agrotóxicos constituem uma importante estratégia da agricultura para a obtenção de uma produtividade economicamente viável, tanto do ponto de vista quantitativo quanto qualitativo. Esses compostos podem, muitas vezes, colocar em risco o meio ambiente e outros organismos não alvos, além do risco que podem causar à saúde humana. O fipronil é um inseticida do grupo fenil-pirazol, amplamente utilizado em campos agrícolas do estado de São Paulo-Brasil. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade e a mutagenicidade do inseticida fipronil, por meio de bioensaios com o sistema teste *A. cepa*. Sementes desta espécie foram submetidas à germinação em água ultra-pura por 5 dias. Após este período, as radículas foram expostas às concentrações de 1,25 g/L; 0,625 g/L; 0,312 g/L e 0,156 g/L do inseticida, por um período de 20 horas. Após esse tempo, foi feita a recuperação das raízes, transferindo os meristemas para placas com água ultra-pura, por 48, 54 e 72 horas. Para a verificação do potencial do inseticida fipronil alterar a germinação, induzir aberrações cromossômicas, micronúcleos e morte celular em *A. cepa*, foram confeccionadas lâminas com as regiões meristemáticas radiculares deste organismo teste. Nossos resultados apontam que o inseticida não apresentou efeito tóxico e citotóxico sob a espécie *A. cepa*, pois os índices de germinação e de morte celular não foram significativos, quando comparados aos resultados do controle negativo. Já quanto às alterações indicadoras de genotoxicidade (aberrações cromossômicas) e de mutagenicidade (presença de micronúcleos nas células), pudemos observar que o fipronil promoveu diversos tipos de aberrações cromossômicas como células portadoras de pontes, perdas, quebras e aderências cromossômicas, C-metáfases, células poliplóides e micronucleadas, confirmando, assim, o efeito genotóxico e mutagênico do produto. Pelos dados obtidos, observamos uma diferença de ação do inseticida para diferentes tipos de exposição, onde os testes com presença de luz mostraram maior potencialidade de indução de efeitos genotóxicos e mutagênicos do que os realizados com ausência de luz, sugerindo que, possivelmente, o metabólito decorrente da fotólise do fipronil potencializa a ação deste inseticida.

Palavras-chaves: Fipronil, *Allium cepa*, aberrações cromossômicas, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade.

1. Introdução

Os seres vivos estão expostos às ações de numerosos agentes potencialmente tóxicos, que podem provocar efeitos fisiológicos, bioquímicos, patológicos e, em alguns casos, genéticos (ARNAIZ, 1995). Uma grande variedade de substâncias químicas com potencial mutagênico, tanto naturais como sintéticos, tem sido pesquisada. Muitas destas substâncias são encontradas nos alimentos, em drogas farmacêuticas, nos complexos de efluentes domésticos e industriais e nos defensivos agrícolas. Segundo Vogel (1995), muitos destes compostos podem causar mudanças prejudiciais herdáveis no material genético, sem que se expressem de imediato.

O uso de agrotóxicos constitui, atualmente, a principal estratégia da agricultura para o combate e a prevenção de pragas agrícolas. Esses compostos podem apresentar certa toxicidade ao homem, induzindo a efeitos adversos como a ação imunodepressora ou ainda carcinogênica, além de impactar o próprio ambiente físico.

Muitos trabalhos têm revelado a presença de níveis alarmantes de agrotóxicos nos ecossistemas, com acúmulos significativos no solo, na água, no ar, nas plantas e nos animais. (PARSONS e WITT, 1989; POTTER et al., 2007). Além da contaminação do meio ambiente, esses resíduos podem chegar ao homem pela cadeia alimentar e ocasionar danos à sua saúde (EDWARDS, 1973; BOTOLUZZ, 2006; LOURENCETTI et al., 2007).

A avaliação dos níveis de contaminação terrestre pode ser feita pela utilização de espécies silvestres, como roedores, marsupiais, répteis e anfíbios, que são organismos considerados bioindicadores de poluição ambiental. Nesses animais, pode-se estudar as frequências de aberrações cromossômicas, lesões neurológicas, fertilidade e a ocorrência de tumores associados à detecção, por espectrofotometria ou cromatografia, de resíduos no sangue ou nos tecidos, além de detectar danos no DNA. (GRISOLIA, 2005).

Os impactos dos agrotóxicos sobre a biota do solo variam de acordo com as características do produto, as características físicas do ambiente e o tipo de microflora associada. A meia-vida dos agrotóxicos no solo e o risco de contaminação do lençol freático dependem, também, da interação desses diferentes fatores e das vias de degradação do agrotóxico. (GRISOLIA, 2005).

Em relação à água, embora a agricultura seja apenas uma das inúmeras fontes não-pontuais de poluição, ela geralmente é apontada como a maior contribuinte de todas as categorias de poluentes (EDWIN, 1996; BAKORE, et al., 2004; POTTER et al., 2007). Uma vez na água, dependendo das características físico-químicas, o resíduo do agrotóxico pode tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositar no sedimento do fundo ou ser ainda absorvido por organismos, sendo então detoxicado ou acumulado (NIMMO, 1985). Quando acumulados, pode entrar na cadeia alimentar, atingindo também ao homem (EDWARDS, 1973; NIMMO, 1985; HAMILTON e CROSSLEY, 2004; ZHOU et al., 2006). Existem diversos estudos na literatura para se determinar a presença de agrotóxicos em águas superficiais e subterrâneas (MALLET e MALLET, 1989; DURAND e BARCELO, 1989; BARCELO, 1994; BARCELO et al., 1996), além de estudos sobre os seus efeitos em organismos aquáticos (TUNDISI, 1990).

Os químicos utilizados na agricultura podem chegar aos rios carregados pelas chuvas, por despejos industriais e urbanos e por assoreamento do solo (YAMAGISHI et al., 1981; OYHAMA et al., 1986; COLL et al., 2004). Para Edwards (1973), Nimmo (1985), Pessoa et al. (2003) e Armas (2005), os organismos expostos podem se contaminar com agrotóxicos por diferentes portas de entrada, tais como: via dérmica; via circulatória, pelo contato com brânquias ou por via gastrintestinal, dada pela alimentação. Segundo Nimmo, 1985 e Sankar et al., 2006, os peixes podem acumular agrotóxicos em concentrações muito acima daquelas encontradas nas águas em que vivem, pois, além da exposição que sofrem, podem também ingerir esses químicos, quando eles estão agregados ao material particulado em suspensão.

A crescente introdução de agentes químicos no ambiente tem levado os pesquisadores a desenvolverem metodologias capazes de avaliar a potencialidade dessas substâncias em induzir alterações no material genético (ANTUNES e ARAÚJO, 2000).

Dentre as substâncias que causam danos nos organismos vivos, existem as substâncias mutagênicas que, segundo RIBEIRO (2003), são agentes capazes de induzir alterações na molécula de DNA, levando a uma alteração herdável da função gênica. Pesquisas que investigam a ação de agentes mutagênicos ambientais vêm tendo grande importância, pois sabe-se que, embora ocorram mutações espontâneas, a maior parte

delas é induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais o homem e os organismos possam estar expostos (VEIGA, 1995).

Os efeitos derivados da ação de agrotóxicos podem ser diversos, tais como reação direta com o DNA nuclear, incorporação no DNA durante a replicação celular, interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisões incorretas da célula (VEIGA, 1995 e FERNADES, 2005).

A espécie *A. cepa* tem sido, freqüentemente, utilizada para se determinar efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de várias substâncias (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985; MATSUMOTO, 2006), sendo considerada como um organismo padrão para testes rápidos (SMAKA-KINCL et al., 1997), por apresentar boa correlação com sistemas testes de mamífero (GRANT, 1982; CHAUAHN et al., 1999). Alterações cromossômicas em *A. cepa* podem ser observadas em qualquer fase da divisão celular e são consideradas evidências de efeitos mutagênicos promovidos por agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), ou aneugênicos (perda de cromossomos), classificados de acordo com o tipo de alteração induzida (VIDAKOVIÉ-CIFREK et al., 2002; FERNANDES, 2005; MATSUMOTO, 2006).

O inseticida fipronil, comercialmente registrado como Regente®, tem nome químico 5-amino-1-(2,6-dicloro- α - α - α -trifluor-p-totil) 4-trifluorometilsulfinil-pirazol-3 carbonitrila e fórmula química $C_{12}H_4C_{12}F_6N_4OS$. Este inseticida pertence ao grupo químico fenil-pirazol e tem a classificação toxicológica da classe II (altamente tóxico).

Vários estudos têm demonstrado que o inseticida se liga ao canal de cloro e bloqueia sua ativação pelo ácido gama-aminobutúrico (GABA), uma substância que controla o fluxo de íons cloro através da membrana da célula nervosa. Dessa forma, a ausência da inibição sináptica causa uma hiperexcitação do Sistema Nervoso Central, o que leva o organismo à morte (BLOOMQUIST, 2005).

Pesquisas feitas revelam que o inseticida fipronil desaparece rapidamente na superfície da água, embora alguns dados mostrem uma toxicidade relativamente baixa para organismos aquáticos não alvos (TINGLE et al., 2003).

De acordo com os mesmos autores citados acima, o princípio ativo do fipronil é encontrado em formulações utilizadas na veterinária como, por exemplo, o produto comercial Frontline®. Este produto é aplicado nos pêlos de animais e tem sua ação prolongada pelo seu efeito reservatório nas glândulas sebáceas. O Frontline® não é

sistêmico, não sendo assim transportado pela corrente sanguínea, podendo ser aplicado em filhotes de cães e gatos com mais de oito semanas de vida, para combate das dermatites alérgicas à picadas de pulgas.

Embora o fipronil seja largamente usado em alguns países como o Brasil, ele tem seu uso proibido nos países da Europa, devido a seu alto grau de toxicidade, comprovado pelos problemas sérios registrados em organismos expostos (STEVENSON et al., 1998, *apud* TINGLE et al, 2003).

2. Materiais e Métodos

O material biológico utilizado na avaliação da toxicidade e mutagenicidade do inseticida fipronil foi o sistema-teste de *A. cepa*. Para isso, sementes de *A. cepa* ($2n = 16$ cromossomos) de um mesmo lote (variedade Baia Periforme) foram submetidas à germinação em diferentes concentrações do inseticida fipronil.

Os testes com o inseticida fipronil foram desenvolvidos utilizando o produto comercial Regente® 800 WG (BASF).

2.1. Metodologia

Para a verificação da toxicidade e mutagenicidade do inseticida fipronil, foram testadas as seguintes concentrações do produto: 1,25 g/L (concentração de campo - C1); 0,625 g/L (C2); 0,312 g/L (C3) e 0,156 g/L (C4).

Todos os ensaios foram realizados em placas de Petri, contendo, aproximadamente, 50 sementes cada. O teste controle positivo foi feito com sementes submetidas à germinação no herbicida Trifluralina (concentração 0,019 mg/mL), pela sua comprovada ação mutagênica em sistema teste de *A. cepa* (FERNANDES et. al., 2007). O teste controle negativo foi feito com sementes submetidas à germinação somente em água ultra-pura.

A germinação inicial de todos os ensaios foi em água ultra-pura, durante, aproximadamente, 4 a 5 dias, até que as radículas alcançassem 1,5 cm de comprimento. Posteriormente, essas raízes foram transferidas da água ultra-pura para as concentrações do inseticida fipronil e para o herbicida Trifluralina (controle positivo), por um período de 20 horas. Após esse período, uma parte das raízes foi coletada e fixada e a outra parte foi transferida para novas placas de Petri, contendo água ultra-pura, por períodos de

recuperação de 48 horas (C1₄₈, C2₄₈, C3₄₈ e C4₄₈), 54 horas (C1₅₄, C2₅₄, C3₅₄ e C4₅₄) e 72 horas (C1₇₄, C2₇₄, C3₇₄ e C4₇₄), para todas concentrações. Ao final do período de recuperação, novas amostras foram coletadas e fixadas, para posterior análise.

A fixação das raízes foi feita em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para uma de ácido acético – v:v). O material fixado foi acondicionado em geladeira (4° C), até a sua utilização.

Para preparação das lâminas, as raízes foram coradas pelo método de Feulgen (MELO e VIDAL, 1978), cuja metodologia consiste de três banhos em água destilada, para a retirada do excesso de fixador. Após essa lavagem, as raízes foram hidrolizadas em HCl 1N, durante 8 minutos a temperatura de 60° C, sendo, posteriormente, lavadas por três vezes, em água destilada, e coradas em reativo de Schiff, por duas horas no escuro. Os meristemas radiculares foram seccionados em uma gota de carmim acético (2%), recobertos com lamínula e esmagados suavemente com o auxílio de estilete metálico. As lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e, após secagem, montadas com resina sintética, para posterior análise em microscopia de luz.

O mesmo procedimento citado acima foi realizado para avaliação do inseticida fipronil na ausência de luz, onde as placas de Petri foram envolvidas com papel alumínio. Esta metodologia foi desenvolvida, pois, segundo a literatura, o inseticida e fotodegrado.

2.2. Análises dos efeitos citotóxicos e mutagênicos

As análises referentes ao potencial citotóxico foram baseadas nos parâmetros: índice mitótico, índice interfásico (conforme abaixo), alterações celulares e morte celular (evidenciada pela presença de núcleo heteropícnótico, aumento do volume celular; e vacuolização do citoplasma). Os resultados foram obtidos com base na avaliação de cerca de 5000 células para cada amostra, contagens estas derivadas de 5 lâminas, nas quais se avaliou cerca de 1000 células cada.

$$\text{IM (índice mitótico)} = \frac{\text{número de células em divisão}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

$$\text{II (índice interfásico)} = \frac{\text{número de células em interfase}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

As análises dos potenciais genotóxico (aberrações cromossômicas) e mutagênico foram realizadas para as diversas concentrações do inseticida fipronil, além do controle negativo (água ultra-pura) e do controle positivo (Trifluralina).

Para a análise do potencial genotóxico, diferentes tipos de alterações foram consideradas (perdas, fragmentos, pontes, aderências cromossômicas, entre outros) nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase, telófase). A análise do potencial mutagênico foi realizada com base nas frequências de células portadoras de micronúcleos e de quebras cromossômicas, para todas as fases do ciclo celular (interfase, prófase, metáfase e telófase), de um total de 5000 células contadas para cada amostra.

As melhores figuras das anormalidades foram documentadas em fotomicroscópio de luz (LEICA DFC 280) e os resultados obtidos foram submetidos à análise de Mann-Whitney.

3. Resultados

3.1. Análise do Potencial Tóxico

Não foram observadas alterações nos índices de germinação das sementes expostas ao fipronil e à trifluralina, quando comparadas com as do controle negativo, não havendo, assim, indícios de potencial tóxico para as concentrações testadas, neste trabalho, para o inseticida fipronil.

3.2. Análise do Potencial Citotóxico

3.2.1. Análise do Índice Interfásico (I.I.) e Índice Mitótico (I.M.)

Os resultados dos I.I. e I.M., obtidos para os ensaios com água ultra-pura (CN) e com trifluralina (CP), a partir de contagens em cerca de 5000 células meristemáticas analisadas por tratamento, mostraram frequências de 13,3% e 11,26%, respectivamente,

Os meristemas radiculares submetidos às diversas concentrações do inseticida fipronil, na presença de luz, apresentaram valores significativos, em relação ao controle negativo, para as concentrações C3 e C4; C2₅₄; e C2₇₄ e C3₇₄. Já os meristemas

submetidos ao inseticida fipronil, na ausência de luz, apenas a C3 apresentou valores significativos (Figuras 2-5).

3.2.2. Índice de Morte Celular (I.M.C.)

As frequências registradas para morte celular no CN e no CP foram 0% e 0,7%, respectivamente.

Os resultados de morte celular, realizados para todas as concentrações do inseticida fipronil, tanto na presença como na ausência de luz, não foram significativos, quando comparados com o controle negativo (Figuras 6-9).

3.3. Análise do Potencial Genotóxico e Mutagênico

3.3.1. Análise das Aberrações Cromossômicas e de Micronúcleos

Os resultados obtidos com o CN e com o CP foram 0,9% e 2,84%, respectivamente.

Os resultados de AC obtidos nos ensaios com o inseticida fipronil, na presença de luz, mostraram-se significativos para as concentrações C3 e C4; C3₄₈ e C4₄₈; C1₅₄ e C3₅₄; e C1₇₄ e C4₇₄. Quando na ausência de luz, os resultados foram significativos para: C1 e C2, C2₄₈ e C4₄₈; C2₅₄; e C1₇₄ e C3₇₄ (Figuras 10-13).

A frequência de micronúcleos em células dos meristemas radiculares do CN e CP foi de 0,8% e 1,58%, respectivamente. As frequências de quebras cromossômicas observadas nas células meristemáticas do CN e CP foram de 0% e 0,06%, respectivamente.

Dentre os meristemas radiculares submetidos às concentrações do inseticida fipronil, na presença de luz, com relação aos micronúcleos, apenas as concentrações C3 e C4; e C2₄₈ e C3₄₈ apresentaram valores significativos, enquanto que, na ausência de luz, o resultado foi significativo apenas para a C2₄₈ (Figuras 14-17).

Em relação às quebras cromossômicas, os resultados obtidos não foram significativos, tanto para os testes feitos na presença como na ausência de luz (Figuras 18-21).

3.3.2. Tipos de Aberrações Cromossômicas

As análises realizadas com o CN registraram a presença de alguns tipos de alterações cromossômicas em baixa frequência, caracterizando os valores basais das anormalidades celulares da espécie. Já os resultados com o CP exibiram os mesmos tipos de alterações, porém com uma frequência muito mais elevada.

Os resultados obtidos para os testes realizados com os meristemas radiculares, submetidos às diferentes concentrações do inseticida fipronil, na presença de luz, foram:

- C3: prófases, prometáfases e metáfases com perdas cromossômicas, C-metáfases e anáfases com perdas e com pontes cromossômicas, anáfases multipolares, telófases com perdas e com pontes e células poliplóides.
- C4: prófases e metáfases com perdas cromossômicas, C-metáfases, metáfases com aderências cromossômicas, anáfases com perdas e com pontes cromossômicas, anáfases multipolares, telófases com perdas e com pontes cromossômicas.
- C3₄₈: anáfases com pontes cromossômicas e telófases com pontes cromossômicas.
- C4₄₈, C1₅₄, C3₅₄: anáfases com pontes cromossômicas.
- C1₇₄: aderências cromossômicas, C-metáfases, metáfases com quebras cromossômicas, anáfases com pontes e com perdas cromossômicas e telófases com pontes cromossômicas.
- C4₇₄: C-metáfases, anáfases com pontes cromossômicas e telófases com pontes cromossômicas.

Já para os meristemas radiculares submetidos às diferentes concentrações do inseticida fipronil, na ausência de luz, obteve-se:

- C1: aderências cromossômicas e anáfases com pontes.
- C2: aderências cromossômicas, anáfases com pontes e telófases com pontes.
- C2₄₈: aderências cromossômicas, anáfases com pontes e com perdas e telófases com pontes.
- C4₄₈: aderências cromossômicas, anáfases com pontes e telófases com pontes.
- C2₅₄: aderências cromossômicas, C-metáfases, metáfases com perdas, anáfases com pontes e com perdas e telófases com pontes.

- C1₇₄: aderências cromossômicas, C-metáfases, metáfases com perdas, anáfases com perdas e com pontes, telófases com pontes e células poliplóides.
- C2₇₄: aderências cromossômicas, C-metáfases, metáfases com perdas, anáfases com perdas e pontes, telófases com pontes e células poliplóides.

4. Discussão e Conclusão

O inseticida fipronil é muito eficaz no combate de insetos considerados pragas na agricultura e na veterinária, despertando, assim, o interesse de muito pesquisadores em buscar informações dos seus efeitos sobre o ambiente. Com este propósito, pesquisas sobre a dinâmica da degradação do fipronil foram desenvolvidas por vários autores (Ngin e Crosby *apud*, 2001; TINGLE et al. 2003; PEI et al, 2004) e, com elas, foram estimadas as características de degradação e os metabólitos derivados desta degradação.

Os estudos de Berlayneh (1998, *apud* TINGLE et al. (2003), comprovam que, quando o inseticida fipronil não se degrada em metabólitos iônicos, e está presente em ambientes com temperaturas moderadas, ele é estável, por cerca de um ano. Porém, no ambiente, o fipronil pode ser degradado em diversos metabólitos, dependendo das condições ambientais onde ele foi aplicado, tais como: o metabólito MB 46513 (desulfenil-fipronil), MB 46136 (sulfone-fipronil), MB 45950 (sulfide-fipronil) e RPA 200766 (amido-fipronil), dentre outros (Ngin e Crosby, 2001, *apud* TINGLE et al. 2003; PEI et al., 2003).

Quanto à persistência deste inseticida no ambiente, alguns autores afirmam que ele desaparece, rapidamente, na superfície da água e que este tem uma toxicidade relativamente baixa para organismos aquáticos não alvos. Outros autores também apontaram um baixo impacto ambiental, quando o fipronil foi aplicado para controle de insetos pragas nos Estados Unidos (TINGLE et al. 2003). Existem poucas informações sobre a toxicidade do fipronil para organismos aquáticos dispostos no ambiente natural. Os dados do potencial de contaminação do fipronil são obtidos, principalmente, por estudos realizados em campos agrícolas (TINGLE et al., 2003).

O fipronil é estável para hidrólise em águas com pH entre 5 a 7 (ligeiramente ácidas), quando em condições de ausência de luz. Em soluções aquosas, sem a presença

de luz e em ambientes com temperaturas de 22°C, 80% do inseticida permanece inalterado por 100 dias (USEPA, 2008).

O fipronil, quando na presença de luz, tem uma persistência de baixa à moderada. Sob efeito de luz artificial, é rapidamente degradado na água, tendo como principais metabólitos, decorrentes desta degradação, o MB 46513 e o RPA 104615 (USEPA, 2008), sendo o MB46513 o mais persistente no ambiente.

Segundo Tingle et al. (2003), o fipronil não é acumulado no meio ambiente, mas, o autor cita que algumas acumulações temporárias do metabólito MB 46513 têm sido registradas em água.

Em fanerógamas aquáticas e algas, o fipronil é considerado não tóxico (USEPA, 1996, *apud* TINGLE et al., 2003). Esta conclusão foi obtida pelos estudos realizados com três espécies de algas de água doce (*Anabaena flosaquae*, *Navicula pelliculosa* e *Selenastrum xapricornutum*), cujos resultados não mostraram efeitos significativos sobre as alterações observadas para o crescimento destes organismos, após a exposição a 0,2 mg/L de fipronil. Porém, na alga unicelular *Scenedesmus subspicatus*, o fipronil promoveu inibição e redução do crescimento, além de outras anormalidades, para as doses de 0,08 e 0,16 mg/L.

Quando uma solução de 2000 mg/L de fipronil foi aplicada, continuamente, por 4 dias, em sementes de arroz, foi observado um prejuízo significativo na germinação. Quando as sementes foram expostas por 1 hora, 48 h após a germinação, o crescimento pós-germinação também foi diminuído (Stenvens et al., 1998, *apud* TINGLE, et al. 2003).

Nossos resultados apontam para uma não toxicidade do fipronil, para o sistema *A. cepa*, pois, nas concentrações testadas para o inseticida, os resultados de toxicidade, estimados pela potencialidade de alteração da germinação de sementes expostas, não diferiram dos encontrados no controle negativo, para nenhum dos ensaios realizados.

A diferença encontrada entre os resultados observados por Stenvens et al., (1998, *apud* TINGLE et al., 2003) e os obtidos com *A. cepa* aqui reportados, podem ser explicados pela descrição feita por Tingle et al. (2003), onde os autores afirmam que a persistência, no solo, de um dos metabólitos mais perigosos do fipronil (o MB 46513) é relativamente alta, e que este metabólito, provavelmente, se acumula neste ambiente, após várias aplicações deste inseticida em uma mesma área agrícola. Como os ensaios

com *A. cepa* foram desenvolvidos em laboratório, em placas de germinação umedecida com solução aquosa do produto, a concentração usada foi constante, não sofrendo assim alterações crescentes na sua concentração, como o observado para solo. Desta forma, a toxicidade descrita para as sementes de arroz pode ser decorrente da exposição às concentrações superiores às testadas, decorrentes de acúmulos proporcionados pela persistência do metabólito MB 46513, após diversas aplicações consecutivas no solo. Porém, os resultados obtidos com *A. cepa* são discordantes de outra citação de Tingle et al. (2003), onde os autores afirmam que o inseticida fipronil, em condições de laboratório, apresentou uma toxicidade de alta a extremamente tóxica, para muitos organismos aquáticos testados, quando estes foram expostos a concentrações relativamente baixas do produto (TINGLE et al., 2003).

Frente aos resultados encontrados, podemos inferir que, como o fipronil não apresentou ação tóxica, pelos dados de índice de germinação, sobre o sistema teste de *A. cepa*, este organismo teste não se caracterizou em um bom indicador de toxicidade do produto, contrariando as citações de Grant (1982), que afirma que este sistema teste é indicado para testes de toxicidade, em geral, mas reforçando as descrições de Matsumoto et al. (2004 e 2006), Fernandes et al (2007) e Leme e Marin-Morales (2008), que afirmam que este parâmetro (IM) não confere um bom indicativo de citotoxicidade de agentes químicos.

As análises realizados com o inseticida fipronil, sob sistema teste de *A. cepa*, nas diversas concentrações, tempos e exposições, não mostraram efeitos citotóxicos sobre este sistema vegetal, pois não foram registrados índices significativos de morte celular, para nenhum dos ensaios. Os resultados aqui apresentados, sobre a citotoxicidade do fipronil, são inéditos, pois não há relatos destes testes com este inseticida, para nenhum outro sistema teste.

Nossos resultados, para citotoxicidade do fipronil, podem ser relacionados com as descrições acima citadas para a toxicidade do insetida. Como não encontramos células em processo de morte celular e nem alteração nos índices mitóticos, acreditamos que as divisões ocorreram normalmente, o que promoveu uma germinação normal das sementes expostas. Frente aos resultados obtidos, podemos afirmar que o agrotóxico fipronil não é citotóxico para *A. cepa*, o que nos indica que esta espécie não se

caracteriza em um bom organismo teste para ensaios de citotoxicidade com este inseticida.

Em relação às aberrações cromossômicas, é sabido que essas anormalidades podem levar a diversas alterações, que pode ter ou não ação mutagênica. Dentre as aberrações cromossômicas, as C-metáfases são alterações que evidenciam a ação aneugênica de uma dada substância, pela completa inativação do fuso mitótico das células (FISKEJÖ, 1985; FISKEJÖ, 1993). Neste caso, nenhuma placa equatorial é organizada, podendo acarretar em um impedimento da divisão dos centrômeros. Segundo Krisch-Volders (2002), a indução de C-metáfases pode levar a formação de núcleos poliplóides, embora possa resultar também na formação de uma grande quantidade de micronúcleos (FERNANDES et al., 2007).

Segundo Marcano e Del Campo (1995) e Marcano et al. (1998), um outro tipo de anormalidade, caracterizada como aberração cromossômica, são as aderências cromossômicas, que são sinais comuns da ação tóxica de um químico sobre o material genético. Esta aberração decorre, provavelmente, de efeitos irreversíveis para a célula, podendo levá-la à morte. Para Marcano et al. (2004), estas alterações originam pontes e, conseqüentemente, quebras cromossômicas, afirmação esta corroborada por Giacomelli (1999), que afirma que as pontes cromossômicas são decorrentes de aderências, acrescentando ainda que elas podem ser múltiplas e persistirem até a telófase.

De acordo com Rank e Nielsen (1998), as anáfases multipolares decorrem do mau funcionamento do fuso mitótico, o que leva a uma distribuição irregular dos cromossomos, encaminhando-os para mais de dois pólos nas células, contrariamente ao que ocorre em células de divisão normal.

Pela análise das células meristemáticas de *A. cepa*, submetidas à ação do inseticida Fipronil, pôde-se perceber que houve indução de alterações cromossômicas, para as diversas concentrações testadas do inseticida. Foram registradas alterações do tipo prófases, prometáfases e metáfases com perdas cromossômicas; C-metáfases; metáfases com aderências cromossômicas; anáfases com perdas, pontes e multipolares; telófases com perdas e com pontes e células poliplóides. Dentre todas as aberrações, as anáfases e telófases com pontes cromossômicas foram as irregularidades mais freqüentemente encontradas neste estudo. Desta forma podemos inferir que o inseticida fipronil tem ação no material genético, promovendo aderências cromossômicas, mas,

estas irregularidades, provavelmente, evoluem para pontes em anáfases e telófases, e não em morte celular.

Pelos resultados comparativos, obtidos entre os testes realizados na ausência de luz e na presença de luz, observamos que o produto tem uma maior ação genotóxica no segundo caso, isto é, na presença de luz, o que reforça a possível ação de um dos metabólitos do fipronil (o MB 46513 - decorrente da degradação por fotólise) ser o responsável pela indução das anormalidades cromossômicas acima descritas, confirmando as citações de Tingle et al. (2003), para a maior periculosidade do fipronil, após fotodegradação.

Os resultados de genotoxicidade obtidos com *A. cepa* são indicativos de que a espécie se caracteriza em um bom organismo teste para ensaios de genotoxicidade do fipronil, reforçando as descrições de outros autores que indicam esta espécie como bom indicador de ação genotóxica de químicos ambientais, tais como herbicidas (FERNANDES, et al. 2007; VENTURA e MARIN-MORALES, *in press*), hidrocarbonetos (LEME e MARIN-MORALES, 2008) e metais pesados (MATSUMOTO, 2005 e 2006).

Quanto à persistência da ação deste inseticida sobre sistemas biológicos, podemos sugerir, pelas nossas observações, obtidas nos testes de recuperação, que o fipronil continua agindo, mesmo quando se interrompe a exposição a ele, indicando assim um efeito persistente do produto. Esta persistência deve estar relacionada com os metabólitos formados pela sua degradação, principalmente as derivadas da fotólise.

Nossos resultados confirmaram também uma ação genotóxica mais evidente para as menores concentrações testadas do inseticida fipronil, indicando um potencial perigo para concentrações resíduas dispostas no ambiente. Por esta ação genotóxica mais pronunciada para as doses mais baixas, podemos sugerir que o inseticida fipronil apresenta uma maior permeabilidade celular quando em baixas concentrações, possivelmente, por não sinalizar a célula de sua toxicidade. Nas maiores concentrações, este potencial seria reconhecido, havendo, assim, um impedimento da entrada do produto na célula.

As irregularidades cromossômicas, citadas acima, podem decorrer em células alteradas, como as portadoras de núcleos irregulares ou múltiplos. Essas anormalidades,

assim como as quebras cromossômicas, são consideradas indicativas da ação mutagênica de um produto.

Segundo Ribeiro (2003), os micronúcleos são formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim, os micronúcleos representam perdas de cromatina, em consequência de danos cromossômicos estruturais ou danos no aparelho mitótico.

Uma substância capaz de induzir a formação de MN pode ser classificada como de ação clastogênica ou aneugênica. A ação clastogênica é comprovada pela presença de micronúcleos decorrentes de quebras cromossômicas, durante o processo de divisão celular, ao contrário da ação aneugênica, que acontece pela inativação do fuso mitótico, acarretando em perda de cromossomos inteiros, ficando os mesmos ausentes no núcleo principal da célula.

Yamamoto e Kikuchi (1980) demonstraram que, pelo tamanho dos micronúcleos, era possível determinar o tipo de ação do agente mutagênico: clastogênico ou aneugênico. Para estes autores, os agentes clastogênicos induziam MN de tamanhos pequenos, enquanto que os aneugênicos induziam MN maiores. No entanto, apesar do método ter sido satisfatório para um grande número de ensaios com MN, este não se mostrou confiável para muitos casos. Combes et al. (1995) concluíram que a análise do tamanho do micronúcleo não é parâmetro suficiente para a determinação do potencial clastogênico ou aneugênico de uma substância. Fenech (2000), baseado em estudos com células humanas e outros tipos celulares, afirma que o tamanho dos cromossomos, por ser heterogêneo, inviabiliza a correlação entre o tamanho do micronúcleo e o indicativo seguro de clastogenicidade ou aneugenicidade. Para este autor, um micronúcleo pequeno pode ser decorrente de um fragmento de um cromossomo grande, ou de um cromossomo inteiro de tamanho pequeno.

A mutagenicidade do inseticida foi estimada pelos registros de indução de MN e de quebras cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição em diversas concentrações do inseticida fipronil. Porém, os únicos resultados significativos para mutagenicidade do inseticida foram obtidos pelos índices aumentados de células micronucleadas.

Os parâmetros indicativos de mutagenicidade, observados pela ação do fipronil sob o sistema-teste de *A. cepa*, foram mais significativos para as concentrações mais baixas testadas e para os testes realizados na presença de luz, confirmando a possível ação do metabólito decorrente de fotodegradação (MN 46513), na indução das anormalidades encontradas. Para os testes realizados na ausência de luz, também obtivemos alguns resultados que confirmam a genotoxicidade, neste caso, para as concentrações mais altas do inseticida. Estes dados reforçam o maior efeito de ação do inseticida, quando em concentrações mais baixas e na presença de luz. Assim, temos um indicativo de que, possivelmente, o metabólito MB 46513, formado pela fotólise do produto, seja o principal composto indutor de danos do DNA de *A. cepa*.

Pelos nossos resultados, podemos inferir que os teste de MN, realizados em células meristemáticas de organismo-teste *Allim cepa*, constituiu um bom parâmetro para a detecção da ação mutagênica do inseticida fipronil.

Estes dados nos sugerem que resíduos de fipronil podem caracterizar-se em um perigo para espécies vegetais não alvo, principalmente, quando expostas às baixas concentrações, que podem ser decorrentes de aplicações em solos de cultura, que sofrem lixiviações. Porém, efeitos tóxicos e citotóxicos podem também ser possíveis, caso haja um progressivo acúmulo do produto, por estas intensivas aplicações. Estes dados reforçam a preocupação de diversas instituições ambientais e de pesquisadores, quanto à atual utilização indiscriminada do inseticida.

5. Referências:

Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria – ANVISA. Consultoria Pública de 11 de março de 2005. Disponível em: www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B9774-1-410%5D.PDF. Acesso em: 6/set/2005.

ANTUNES, L. M. G.; ARAUJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. *Revista Nutrição*, Campinas. v. 13, n. 2, 2002.

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; AMÂNCIO, A. V.; CORREA, R. M. L.; GUERCIO, M. A. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. *Química Nova*, São Paulo, v. 28, n. 6, 2005.

ARNAIZ, R. R. **Las Toxinas Ambientales y sus Efectos Genéticos** 2.ed. México: la ciencia/124, 95p., 1995.

BAKORE, N.; JOHN, P. J.; BHATNAGAR, P. Organochlorine pesticide residues in wheat and drinking water samples from Jaipur, Rajasthan, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht. v. 98, p. 181-189, 2004.

BARCELÓ, D. **Evaluación de la contaminación por plaguicidas en diversas zonas costeras de Europa** In: VALVERDE-GARCIA, A. & FERNANDÉZ-ALBA, A.B. (Eds.) SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS, 3 ed. p. 163-186., Almería, 1994.

BARCELÓ, D.; CHIRON, S.; FERNANDEZ-ALBA, A.; VALVERE, A.; ALPENDURA, M. F. Monitoring pesticides and metabolites in surface water and groundwater in Spain. U.S.A. **American Chemical Society**, Easton. p. 237-253, 1996.

BLOOMQUIST, J. R. Insecticides: chemistries and characteristics. Disponível em: <[http:// www.ipmword.umn.edu/chapters/bloomq.htm](http://www.ipmword.umn.edu/chapters/bloomq.htm)> Acesso em: 12 nov. 2005.

BORTOLLUZZ, E. D.; RHEINHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C. S., PELLEGRINI, J. B. R.; ZANELLA, R. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande. v. 10, n. 4, 2006.

CALDAS, E. D. C. e SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, volume 34, número 5. p. 529-537. 2000.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Oxford. 2008. No prelo.

CHAUHAN, L. K. SAVENA, P. M.; GUPTA, S. K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. **Environment and Experimental Botany**, [S.I.], v. 42p., 191-189, 1999.

COMBES, R.D.; STOPPER, H.; CASPARY, W.J. The use of the L5178Y mouse lymphoma cells to assess mutagenic, clastogenic and aneugenic activity of chemicals. **Mutagenesis**, v.10, p.403-408, 1995.

DURAND, G.; BARCELÓ, D. Liquid chromatographic analysis of chlorotriazine herbicides and its degradation products in water samples with photodiode array detection. I. Evaluation of two liquid-liquid extraction methods, **Toxicology and Environmental Chemistry**, New York, v. 25, p. 1-11, 1989.

EDWARDS, C. A. **Persistent pesticides in the environment**. 2. ed. U.S.A.: CRS Press, 170 p., 1973.

EDWIN, D. O. Control of water pollution from agriculture. **Irrigation and Drainage**, New York, v. 55, p. 1-101, 1996.

European Food Safety Authority – EFSA. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance. v.65, p.1-110, 2006.

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

FERNANDES, T. C. C.; VENTURA, B. C.; MARIN-MORALES; M. A. Estudo na Bacia do Médico Parapanema – SP: Avaliação dos efeitos de água coletada em diversos pontos as sub-bacia do Pari-Veado, na germinação de *A. cepa*. **Genetics and Molecular Biology: Supplement**, Águas de Lindóia, v. 23, p., 688, 2005.

FERNANDES, T. C. C, MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *A. cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego. v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

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

FISKESJÖ, G. The *A. cepa* in wastewater monitoring. Environmental toxicology and water quality: **An International Journal**. V. 8, p. 291 – 298, 1993

GIACOMELLI, F.R.B.. Avaliação do comportamento meiótico em variedades de Aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região Sul. Dissertação (mestrado). Universidade de Maringá – Pr., 1999.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 99, p. 273-291, 1982.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos; mutações, câncer e reprodução**. Brasília: ELBRA, 394p. 2005.

HAINZL, D.; CASIDA, J E.. Fipronil insecticide: Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington. v. 93, p. 12764-12767, 1996.

HAMILTON, D.; CROSSLEY, S. Pesticide residue in food and drinking water: Human exposure and Risks, 2004. Disponível em: <http://www.chipsbooks.com/pestfood.htm>. Acesso em: 25/nov/2007.

HAMILTON, D.; CROSSLEY, S. Pesticide residues in food and drinking water. Disponível em: <http://www.chipsbooks.com/pestfood.htm>. Acesso em: 11/mar/2008.

Jornal Ambiente Brasil. Agrotóxicos. Disponível em: <http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./agropecuario/index.html&conteudo=./agropecuario/artigos/agrotoxicos.html>. Acesso em: 23/mar/2008.

KRISCH-VOLDERS M.; VANHAUWAERT. A.; BOECK M. D., Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 504, 2002.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *A. cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. **Mutation Research**. Amsterdam. v. 650, p. 80-86, 2008. No prelo.

LORENCETTI, C.; FAVORETO, R.; MARCHI, M. R.; RIBEIRO, M. L. Residues of organochlorine pesticides and PCBs in some Brazilian municipal solid waste compost. **Journal of Environmental Science and Health**, New York. v. 42, n. 6, p. 697-705. 2007

MALLET, C.; MALLET, J. R. N. Conversion of a conventional packed-column gas chromatograph to accommodate megabore columns. Determination of organophosphorus pesticides in environmental waters. **Journal of Chromatography**. Amsterdam, v. 481, p. 37-44, 1989.

MARCANO, L.; DEL CAMPO, A. Estudio ultraestructural del nucléolo en poblaciones meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L. tratadas con inhibidores metabólicos. **Ciencia**, v.3, p.73-82, 1995.

MARCANO, L.; BRACHO, M.; MONTIEL, X.; CARRUYO, I.; ATENCIO, L. Efecto mutotóxico y genotóxico del cadmio en poblaciones meristemáticas de *Allium cepa* L. (cebolla). **Ciência**, v.6, p.93-99, 1998.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *A. cepa* L. **Environmental Research**, v.94, p.221-226, 2004.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A.. Mutagenic potential evolution of the water of river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* system. **Cytologia**, Tokyo. v. 69, n. 4, p. 399-408, 2004.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Toxic and genotoxic effects of trivalent and hexavalent Chromium – A review. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo. v. 18, n. 1, p. 77-85, 2005.

MATASUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronuclei test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips.. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto. v. 29, p. 148 – 158, 2006

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

NIMMO, D. R. Pesticides. In RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R.. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. **Chemosphere**, New York. p. 35-373, 1985.

OYAMA, T.; JIN, K. KATAH Y.; CHIPA. Y. INOVE. K. 1,3,5-trichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene (CNP) in water, sediments and shellfish of the Ishikari river. Bull. Environ. **Contam. Toxicol.**, New York, v.37, p. 344-349, 1986.

PARSON, B.; WITT, J. M.. Pesticides in groundwater in the USA. A report of a 1988 survey of US States. EM8406, Oregon State University Extension Service. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York. v. 18, p. 734-747, 1989.

PESSOA, M.C.P.Y.; GOMES, M.A.F.; NEVES, M.C.; CERDEIRA, A.L.; SOUZA, M.D. Identificação de áreas de exposição ao risco de contaminação de águas subterrâneas pelos herbicidas atrazina, diuron e tebutiurn. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba. v. 13, p.111-122, 2003.

POTTER, T. L.; MOHAMED, M. A.; ALI, H. Solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry analysis of pesticides in water: method performance and application in a reconnaissance survey of residues in drinking water in Greater Cairo, Egypt. **Journal Agriculture Chemistry**, Washington. v. 22, n. 2. p. 204-210, 2007.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v.418, p.113-119, 1998.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 355p., 2003.

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

SANKAR, T. V.; Zynudheen, A. A.; ANANDAN, R.; VISWANATHAN, N. Distribution of organochlorine pesticides and heavy metal residues in fish and shellfish from Calicut region, Kerala, India. **Chemosphere**, Oxford. v. 65, p. 583-590, 2006.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOUKAM, T. M. A. M.. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *A. cepa* test procedure. **Mutation Research: Genetic Toxicology**, Amsterdam, v. 38, c. 3-4, p. 171-191, 1997.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, C. F.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J.. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology and Human Health Concerns, **Environmental Contamination and Toxicology**, New York. v. 176, p.1-66, 2003.

TUNDISI, H. S. F. Estudo dos possíveis efeitos dos resíduos do herbicida Dual-720 Ce (Metolachlor) sobre a População de Copépodos Cladóides, no Açude do Sítio São José, Micípio Embu-Guaçu, Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado) – Depto de Ecologia Geral, Instituto de Biociências, Univ. São Paulo, São Paulo, 1990.

VEIGA, A. B. O uso do teste de *A. cepa* para detectar a toxicidade do inseticida Nuvacron. Monografia (Conclusão do curso de Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina,. 58 f, 1995.

VENTURA, B. C.; FERNANDES, T. C. C.; MATSUMOTO, S. T.; SPINOSA, W.; MARIN-MORALES, M. A.. O uso de *A. cepa* na investigação da mutagenicidade derivada de possíveis persistências de agrotóxicos na sub-bacia do Pari-Veado. **Genetics and Molecular Biology: Supplement**, v. 23, n. 3, p. 690, 2004.

VIDAKOVIĆ-CIFREK Z.; PAVLICA, M.; REGULA I.; PAERS, D. Cytogenetic damage in shallot (*A. cepa*) root meristems induced by industry “high-desinty brines”. **Journal Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 43, p. 284-291, 2002.

VOGEL, E. W.. Assessment the impact of pesticides on the environment. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, [S.I.], v. 60, p. 81-96, 1995.

YAMAGISHI, T.; MIYAZAKI, K.; AKIYAMA, K.; MORITA, M. NAKAGAWA, J.; HORI, S.; KANEKO, S. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in commercial diphenyl ether herbicides, and in freshwater fish collected from the application area. **Chemosphere**. Oxford, v.10, p. 1137-1144, 1981.

YAMAMOTO, K.I.; KIKUCHI, Y. A comparasion of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mutation Research**, v.71, p.127-131, 1980.

ZAMBROME, F. A. D.. Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? Perigosa família. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 4, n. 22, p. 44-48, 1986.

ZHOU, R.; ZHU, L.; YANG, K.; CHEN, Y. Distribution of organochlorine pesticides in surface water and sediments from Qiantang River, East China. **Journal Hazardous Materials**. Amsterdam. v. 137, p. 68-75, 2006.

Anexos

Figura 1

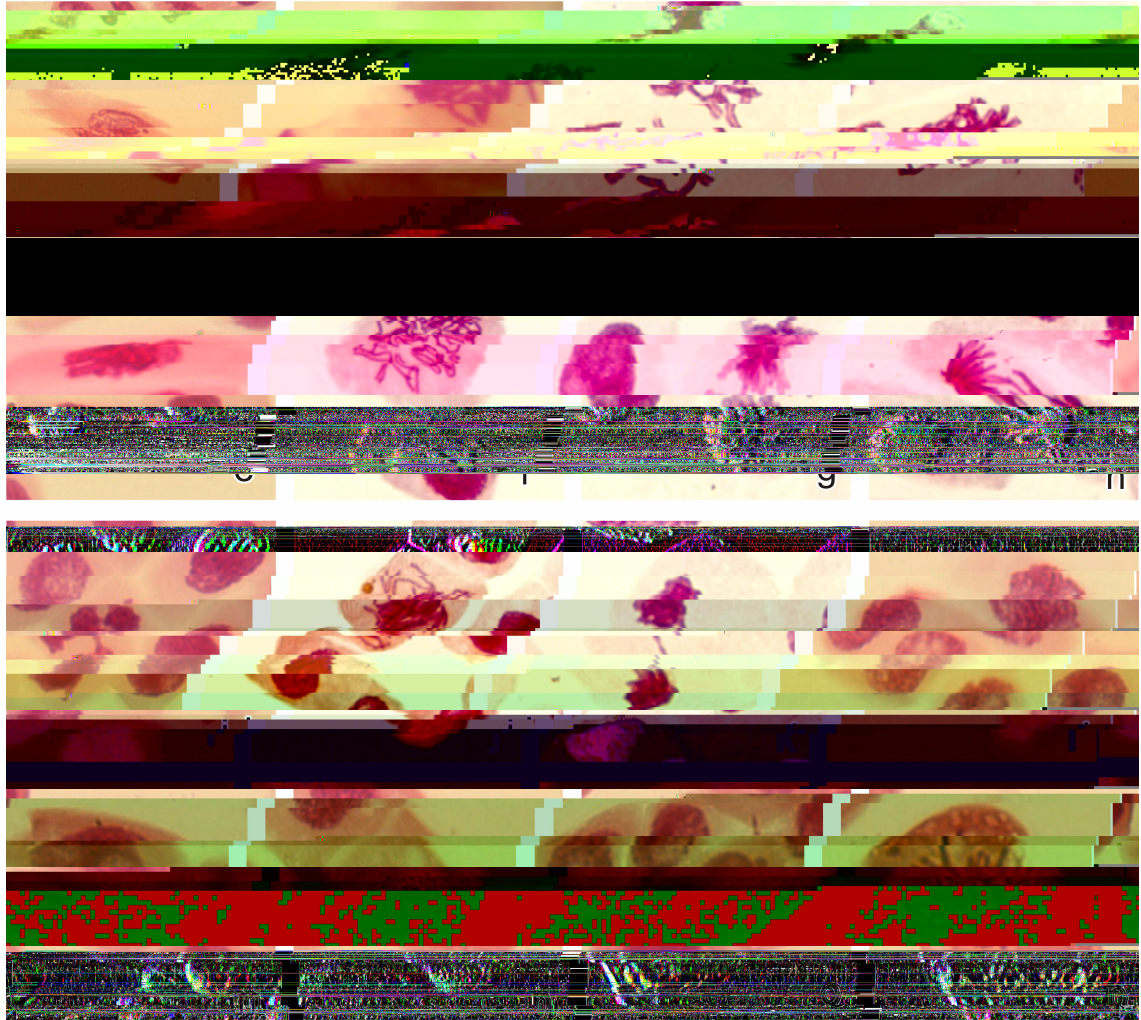


Figura 1: **a.** Prófase com micronúcleo; **b.** Prometáfase com quebra cromossômica; **c.** C-metáfase; **d.** Metáfase com perda cromossômica; **e.** Metáfase com aderência cromossômica; **f.** Metáfase poliplóide; **g.** Anáfase com ponte cromossômica; **h.** Anáfase com quebra cromossômica; **i.** Anáfase multipolar com ponte cromossômica; **j.** Anáfase com perda cromossômica; **k.** Telófase com ponte cromossômica; **l.** Célula binucleada; **m.** Célula com micronúcleo; **n.** Célula com Micronúcleo e *broto; **o.** Célula micronucleada em processo de morte celular; **p.** Célula em metáfase em processo de morte celular.

Figura 6: Distribuição dos valores de Morte Celular para as diferentes concentrações do inseticida fipronil, para o Controle Negativo e Controle Positivo.

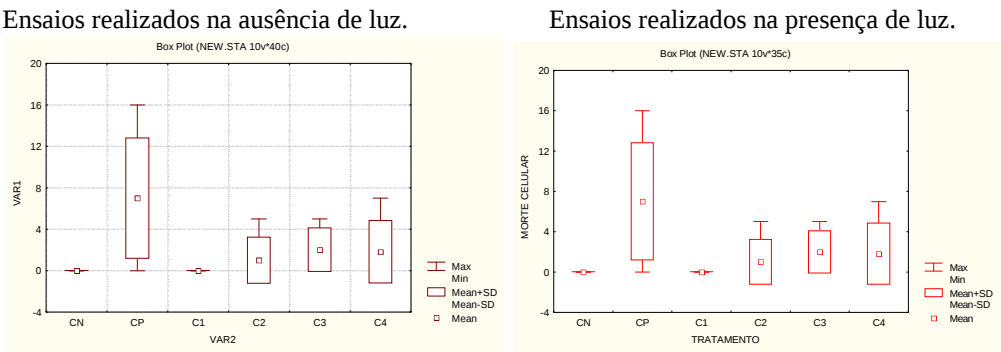


Figura 7: Distribuição dos valores de Morte Celular para as diferentes concentrações de Recuperação de 48 h, para o Controle Negativo e Controle Positivo.

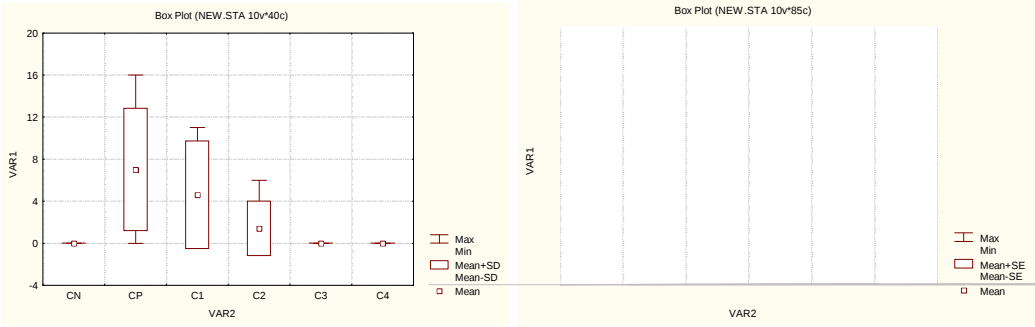


Figura 10: Distribuição dos valores de Aberrações Cromossômicas para as diferentes concentrações do inseticida fipronil, para o Controle Negativo e Controle Positivo.

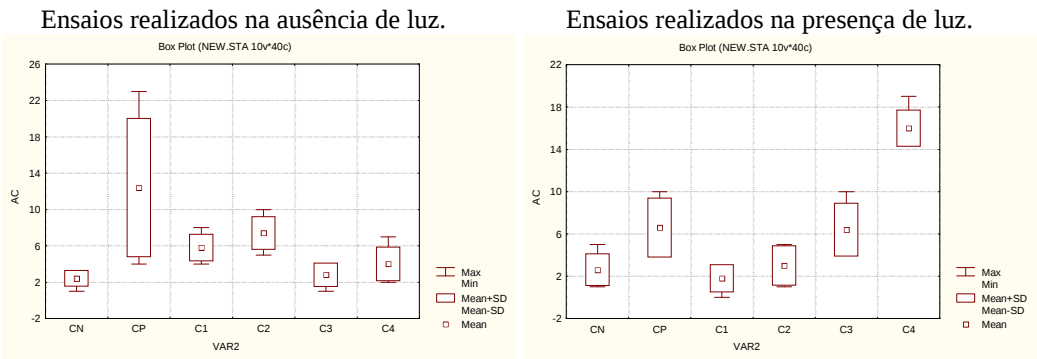


Figura 11: Distribuição dos valores de Aberrações Cromossômicas para as diferentes concentrações de Recuperação 48 h, para o Controle Negativo e Controle Positivo.

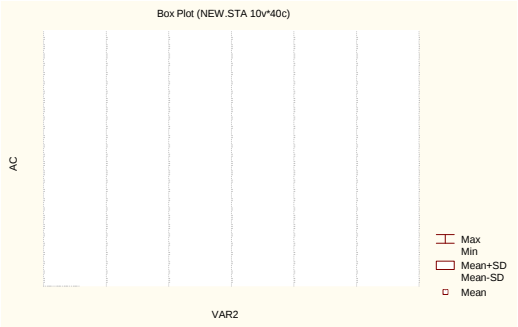
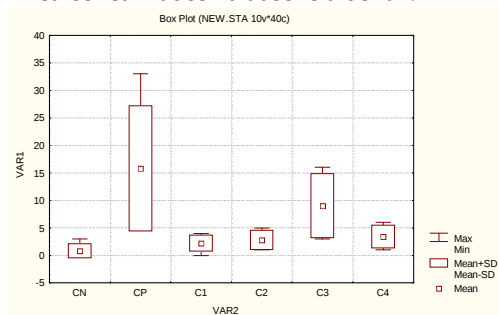


Figura 14: Distribuição dos valores de Micronúcleos para as diferentes concentrações do inseticida fipronil, para o Controle Negativo e Controle Positivo.

Ensaios realizados na ausência de luz.



Ensaios realizados na presença de luz.

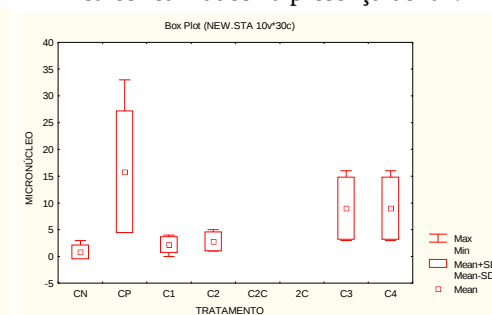


Figura 15: Distribuição dos valores de Micronúcleos para as diferentes concentrações de Recuperação de 48 h, para o Controle Negativo e Controle Positivo.

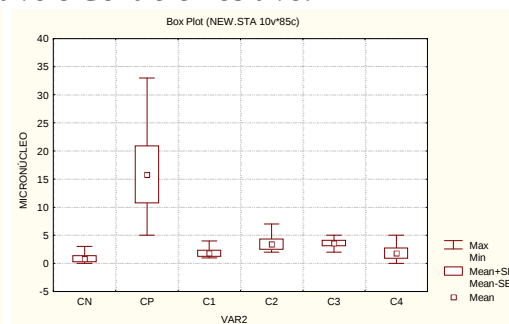
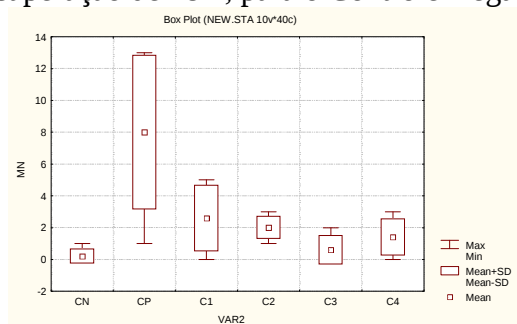


Figura 16: Distribuição dos valores de Micronúcleos para as diferentes concentrações de Recuperação de 54 h, para o Controle Negativo e Controle Positivo.

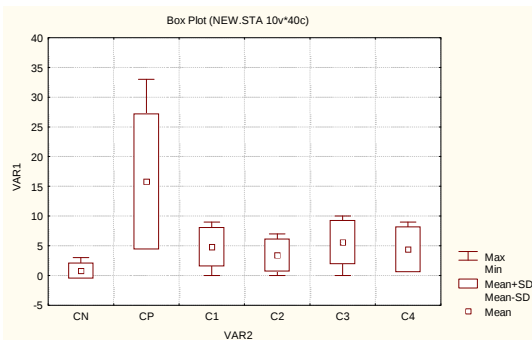
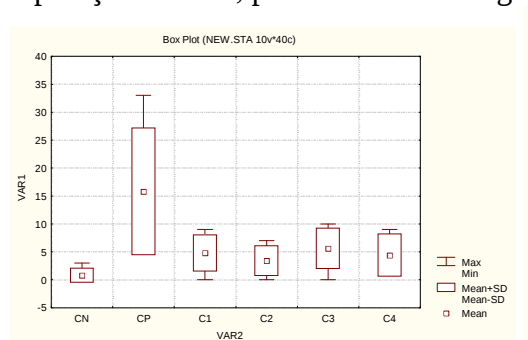


Figura 17: Distribuição dos valores de Micronúcleos para as diferentes concentrações de Recuperação de 74 h, para o Controle Negativo e Controle Positivo.

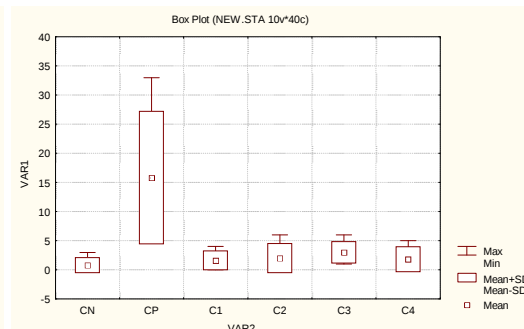
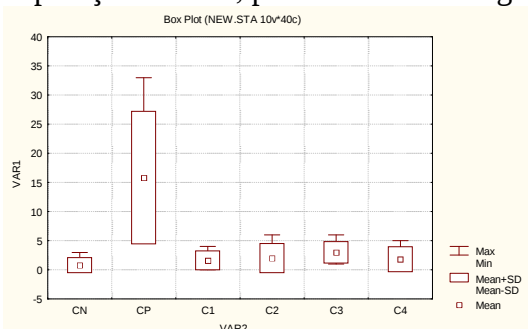
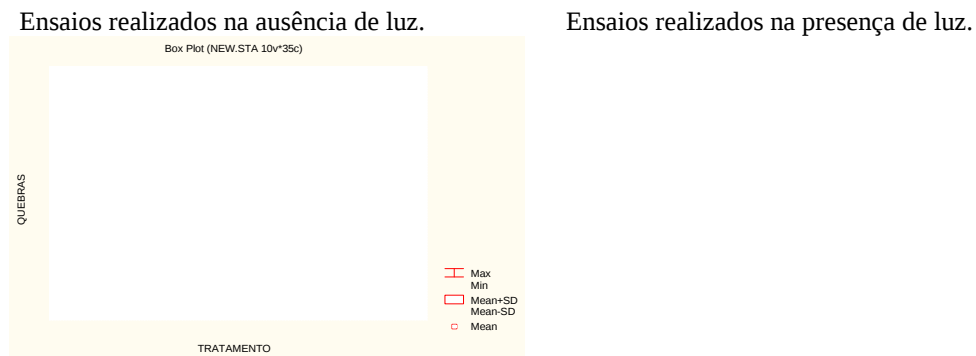


Figura 18: Distribuição dos valores de Quebras para as diferentes concentrações do inseticida fipronil, para o Controle Negativo e Controle Positivo.



4. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O uso de substâncias químicas para controlar doenças, pragas e plantas daninhas na agricultura, teve seu início no final do século XIX, mas, somente após a Segunda Guerra Mundial, essa prática seguiu critérios mais científicos (LORENZI, 1990). De acordo com os alvos contra os quais são destinados, os produtos químicos, também chamados de agrotóxicos, usados na agricultura são denominados de inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, entre outros (KOTAKA e ZAMBRONE, 2001).

Desde a sua introdução, os agrotóxicos vêm se caracterizando como um problema, em potencial, para a saúde humana. Quanto à ingestão de alimentos contaminados com esses produtos, sabe-se que cerca da metade dos alimentos consumidos nos Estados Unidos contém níveis mensuráveis de, no mínimo, um agrotóxico. Por essa razão, muitos destes químicos foram banidos ou tiveram seu uso limitado (BAIRD, 2002).

O Brasil é o quarto maior consumidor mundial de substâncias químicas empregadas na agricultura. O consumo de agrotóxicos no nosso país é de, aproximadamente, 3,2 Kg de ingrediente ativo por hectare (JOURNAL EXPRESS, 2004). Por este amplo uso, tem havido uma grande preocupação e interesse de pesquisadores com contaminações por agrotóxicos, quanto a sua potencialidade em contaminar o ambiente e os organismos (RIBEIRO, 2006; RIEDER, 1996; DORES, 2000; GUIMARÃES, 2000; SCHIO, 2001) e os alimentos (PIZANO e BAPTISTE, 1998; VIEIRA, 1999).

Dentre os agrotóxicos, um grupo de inseticidas que merece destaque, especialmente pelo amplo uso em culturas que ocupam grandes extensões de terra, em especial, a cana-de-açúcar, amplamente difundida no estado de São Paulo, é o grupo Fenil-pirazol. Esses agentes químicos são muito utilizados na agricultura e nas residências, para combater insetos praga, tanto de vegetais como de animais. Dentre os inseticidas do grupo Fenil-pirazol, temos o fipronil, que é largamente usado nas culturas de algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, cevada, feijão, milho, pastagens, soja e trigo. Nas residências, ele é utilizado no tratamento contra pulgas e carrapatos de cães e gatos (TINGLE et al., 2003; ANVISA, 2005).

O fipronil pode ser caracterizado como um composto de contato e ingestão, com consequências que variam de espécie para espécie. Em algumas espécies, o efeito de ingestão é o mais importante, enquanto que em outras a ação de contato é a mais pronunciada.

Vários estudos têm demonstrado que o inseticida se liga ao canal de cloro e bloqueia sua ativação pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), uma substância que controla o fluxo de íons cloro, através da membrana da célula nervosa. Dessa forma, a ausência da inibição sináptica causa uma hiperexcitação do sistema nervoso central (SNC), o que leva o organismo à morte (BLOOMQUIST, 2005). Esta mesma ação é observada nos insetos, pela neurotoxicidade conferida ao “cérebro” e aos gânglios ventrais, que caracteriza o centro nervoso do inseto.

Estudos realizados em laboratórios indicam que o inseticida fipronil é 40 vezes mais ativo em invertebrados do que em vertebrados (BLOOMQUIST, 2005; RAVENTON et al., 2007). Casarin (2007), estudando efeitos do inseticida fipronil em cupins, observou uma altíssima toxicidade do produto, pela alta mortalidade que promoveu nestes insetos, mesmo quando aplicado em baixas concentrações. A autora afirma que a mortalidade observada foi provocada pela alta ação de contato do inseticida.

Os estudos de Berlayneh (1998, *apud* TINGLE et al. (2003), comprovam que, quando o inseticida fipronil não se degrada em metabólitos iônicos, e está presente em ambientes com temperaturas moderadas, ele é estável, por cerca de um ano. Porém, no ambiente, o fipronil pode ser degradado em diversos metabólitos, dependendo das condições ambientais onde ele foi aplicado, tais como: o metabólito MB 46513

(desulfinil-fipronil), MB 46136 (sulfone-fipronil), MB 45950 (sulfide-fipronil) e RPA 200766 (amide-fipronil), dentre outros (Ngim e Crosby, 2001, apud TINGLE et al. 2003; PEI et al., 2003).

Quanto à persistência deste inseticida no ambiente, alguns autores afirmam que ele desaparece, rapidamente, na superfície da água e que este tem uma toxicidade relativamente baixa para organismos aquáticos não alvos. Outros autores também apontaram um baixo impacto ambiental, quando o fipronil é usado em culturas (TINGLE et al. 2003). O fipronil é estável para hidrólise em águas com pH entre 5 a 7 (ligeiramente ácidas), em condições de ausência de luz. Em soluções aquosas, sem a presença de luz e em ambientes com temperaturas de 22°C, 80% do inseticida permanece inalterado por 100 dias (USEPA, 2008).

O fipronil, quando na presença de luz, tem uma persistência de baixa à moderada. Sob efeito de luz artificial, é rapidamente degradado na água, tendo como principais metabólitos, decorrentes desta degradação, o MB 46513 e o RPA 104615 (USEPA, 2008), sendo o MB46513 o mais persistente no ambiente.

Segundo Tingle et al. (2003), o fipronil não é acumulado no meio ambiente, mas o autor cita que algumas acumulações temporárias do metabólito MB 46513 têm sido registradas em água.

Em fanerógamas aquáticas e algas, o fipronil é considerado não tóxico pela USEPA (1996, apud TINGLE et al., 2003). Esta afirmação decorre dos estudos realizados com as espécies de algas de água doce *Anabaena flosaquae*, *Navicula pelliculosa* e *Selenastrum xapricornutum* que não indicam efeitos significativos de toxicidade sobre as alterações observadas no crescimento destes organismos, após a exposição ao fipronil. Porém, estes resultados não foram confirmados pelos ensaios realizados com a alga *Scenedesmus subspicatus*, pois, neste caso, foi registrado que o fipronil promoveu inibição e redução do crescimento, além de outras anormalidades. Quando solução de fipronil foi aplicada, continuamente, por 4 dias, em sementes de arroz, foi observado um prejuízo significativo na germinação. Quando as sementes foram expostas por 1 hora, 48 h após a germinação, o crescimento pós-germinação também foi diminuído (Stenvens et al., 1998, apud TINGLE, et al. 2003).

Nossos resultados apontam para uma não toxicidade do fipronil, para o sistema *A. cepa*, pois, nas concentrações testadas para o inseticida, os resultados de toxicidade,

estimados pela potencialidade de alteração da germinação de sementes expostas, não diferiram dos encontrados no controle negativo, para nenhum dos ensaios realizados.

A diferença encontrada entre os resultados observados por Stenvens et al., (1998, *apud* TINGLE et al., 2003) e os obtidos com *A. cepa* aqui reportados, podem ser explicados pela descrição feita por Tingle et al. (2003), onde os autores afirmam que a persistência, no solo, de um dos metabólitos mais perigosos do fipronil (o MB 46513) é relativamente alta, e que este metabólito, provavelmente, se acumula neste ambiente, após várias aplicações deste inseticida em uma mesma área agrícola. Como os ensaios com *A. cepa* foram desenvolvidos em placas de germinação umedecida com solução aquosa do produto, a concentração usada foi constante, não sofrendo assim alterações crescentes na sua concentração. Desta forma, a toxicidade descrita para as sementes de arroz pode ser decorrente da exposição a concentrações superiores às testadas, decorrentes de acúmulos proporcionados pela persistência do metabólito MB 46.513, após diversas aplicações consecutivas no solo. Porém, os resultados obtidos com *A. cepa* são discordantes de outra citação de Tingle et al. (2003), onde os autores afirmam que o inseticida fipronil, em condições de laboratório, apresentou uma toxicidade de alta a extremamente tóxica, para muitos organismos aquáticos testados, quando estes foram expostos a concentrações relativamente baixas do produto (TINGLE et al., 2003). Assim, podemos inferir que, como o fipronil não apresentou ação tóxica (referente aos de germinação) sobre o sistema teste de *A. cepa*, este organismo teste não se caracterizou em um bom indicador de toxicidade do produto.

Os testes realizados com o inseticida fipronil, sob sistema teste de *A. cepa*, nas diversas concentrações, tempos e exposições testadas, não mostraram efeitos citotóxicos sobre este sistema vegetal, pois não foram registrados índices significativos de morte celular, para nenhum dos ensaios. Os dados aqui apresentados sobre a citotoxicidade do fipronil são inéditos, pois não há descrição de testes de citotoxicidade para nenhum outro sistema teste.

Os resultados obtidos com *A. cepa*, para a citotoxicidade do fipronil, podem ser relacionados com as descrições acima citadas para a toxicidade do insetida. Como não encontramos células em processo de morte celular e nem alteração nos índices mitóticos, acreditamos que as divisões ocorreram normalmente, o que promoveu uma germinação normal das sementes expostas. Assim, podemos afirmar que o agrotóxico

fipronil não é citotóxico para *A. cepa*, o que nos indica que esta espécie não se caracteriza em um bom organismo teste para ensaios de toxicidade com este inseticida, contrariando as citações de Grant (1982), que afirma que este sistema teste é indicado para testes de citotoxicidade, em geral.

As análises dos índices mitóticos, obtidas dos meristemas radiculares tratados com o inseticida fipronil, não mostraram resultados conclusivos, reforçando as descrições de Matsumoto et al. (2004 e 2006), Fernandes et al (2007) e Leme e Marin-Morales (2008), que afirmam que este parâmetro (IM) não confere um bom indicativo de citotoxicidade de agentes químicos.

Em relação às aberrações cromossômicas, é sabido que essas anormalidades podem levar a diversas alterações, que pode ter ou não ação mutagênica. Dentre as aberrações cromossômicas, as C-metáfases são alterações que evidenciam a ação aneugênica de uma dada substância, pela completa inativação do fuso mitótico das células (FISKEJÖ, 1985; FISKEJÖ, 1993). Neste caso, nenhuma placa equatorial é organizada, podendo acarretar em um impedimento da divisão dos centrômeros. Segundo Krisch-Volders (2002), a indução de C-metáfases pode levar a formação de núcleos poliplóides, embora possa resultar também na formação de uma grande quantidade de micronúcleos (FERNANDES et al., 2007).

Segundo Marcano e Del Campo (1995) e Marcano et al. (1998), um outro tipo de anormalidade, caracterizada como aberração cromossômica, são as aderências cromossômicas, que são sinais comuns da ação tóxica de um químico sobre o material genético. Esta aberração decorre, provavelmente, em um efeitos irreversíveis para a célula, podendo levá-la à morte. Para Marcano et al. (2004), estas alterações originam pontes e, conseqüentemente, quebras cromossômicas, afirmação esta corroborada por Giacomelli (1999), que afirma que as pontes cromossômicas são decorrentes de aderências, acrescentando ainda que elas podem ser múltiplas e persistirem até a telófase.

De acordo com Rank e Nielsen (1998), as anáfases multipolares decorrem do mau funcionamento do fuso mitótico, o que leva a uma distribuição irregular dos cromossomos, encaminhando-os para mais de dois pólos nas células, contrariamente ao que ocorre em células de divisão normal.

Pela análise das células meristemáticas de *A. cepa*, submetidas à ação do inseticida Fipronil, pôde-se perceber que houve indução de alterações cromossômicas, para as diversas concentrações testadas do inseticida. Foram registradas alterações do tipo prófases, prometáfases e metáfases com perdas cromossômicas; C-metáfases; metáfases com aderências cromossômicas; anáfases com perdas, pontes e multipolares; telófases com perdas e com pontes e células poliplóides. Dentre todas as aberrações, as anáfases e telófases com pontes cromossômicas foram as irregularidades mais freqüentemente encontradas neste estudo. Desta forma podemos inferir que o inseticida fipronil tem ação no material genético, promovendo aderências cromossômicas, mas, estas irregularidades, provavelmente, evoluem para pontes em anáfases e telófases, e não em morte celular.

Pelos resultados obtidos, observamos que os testes realizados na ausência de luz, comparados com os na presença de luz, mostraram que o produto tem uma maior ação genotóxica no segundo caso, isto é, na presença de luz, o que reforça a possível ação de um dos metabólitos do fipronil (o MB 46513 - decorrente da degradação por fotólise) ser o responsável pela indução das anormalidades cromossômicas acima descritas, confirmando as citações de Tingle et al. (2003), para a periculosidade deste agente.

Os resultados de genotoxicidade obtidos com *A. cepa* são indicativos de que a espécie *A. cepa* caracteriza-se em um bom organismo teste para ensaios de genotoxicidade do fipronil, reforçando as descrições de outros autores que indicam esta espécie como bom indicador de ação genotóxica de químicos ambientais, tais como herbicidas (FERNANDES, et al. 2007; VENTURA e MARIN-MORALES, 2008), hidrocarbonetos (LEME e MARIN-MORALES, 2008) e metais pesados (MATSUMOTO, 2005 e 2006).

Quanto à persistência da ação deste inseticida sobre sistemas biológicos, podemos sugerir, pelas nossas observações obtidas nos testes de recuperação, que o fipronil continua agindo, mesmo quando se interrompe a exposição a ele, indicando assim um efeito persistente do produto. Esta persistência deve estar relacionada com os metabólitos formados pela sua degradação, principalmente as derivadas da fotólise.

Nossos resultados confirmaram também uma ação genotóxica mais evidente para as menores concentrações testadas do inseticida fipronil, indicando um potencial

perigo para concentrações residuais dispostas no ambiente. Por esta ação genotóxica mais pronunciada para as doses mais baixas, podemos sugerir que o inseticida fipronil apresenta uma maior permeabilidade celular quando em baixas concentrações, possivelmente por não sinalizar a célula de sua toxicidade. Nas maiores concentrações, este potencial seria reconhecido, havendo assim um impedimento da entrada do produto na célula.

As irregularidades cromossômicas, citadas acima, podem decorrer em células alteradas, como as portadoras de núcleos irregulares ou múltiplos. Essas anormalidades, assim como as quebras cromossômicas, são consideradas indicativas da ação mutagênica de um produto.

Segundo Ribeiro (2003), os micronúcleos são formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim, os micronúcleos representam perdas da cromatina, em consequência de danos cromossômicos estruturais ou danos no aparelho mitótico.

Uma substância capaz de induzir a formação de MN pode ser classificada como de ação clastogênica ou aneugênica. A ação clastogênica é comprovada pela presença de micronúcleos decorrentes de quebras cromossômicas, durante o processo de divisão celular, ao contrário da ação aneugênica, que acontece pela inativação do fuso mitótico, acarretando em perda de cromossomos inteiros, ficando os mesmos ausentes no núcleo principal da célula.

Yamamoto e Kikuchi (1980) demonstraram que, pelo tamanho dos micronúcleos, era possível determinar o tipo de ação do agente mutagênico: clastogênico ou aneugênico. Para estes autores, os agentes clastogênicos induziam MN de tamanhos pequenos, enquanto que os aneugênicos induziam MN maiores. No entanto, apesar do método ter sido satisfatório para um grande número de ensaios com MN, este não se mostrou confiável para muitos casos. Combes et al. (1995) concluíram que a análise do tamanho do micronúcleo não é parâmetro suficiente para a determinação do potencial clastogênico ou aneugênico de uma substância. Fenech (2000), baseado em estudos com células humanas e outros tipos celulares, afirma que o tamanho dos cromossomos, por ser heterogêneo, inviabiliza a correlação entre o tamanho do micronúcleo e o indicativo

seguro de clastogenicidade ou aneugenicidade. Para este autor, um micronúcleo pequeno pode ser decorrente de um fragmento de um cromossomo grande, ou de um cromossomo inteiro de tamanho pequeno.

A mutagenicidade do inseticida foi estimada pelos registros de indução de MN e de quebras cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição em diversas concentrações do inseticida fipronil. Porém, os únicos resultados significativos para mutagenicidade do inseticida foram obtidos pelos índices aumentados de células micronucleadas.

Os parâmetros indicativos de mutagenicidade, observados pela ação do fipronil sob o sistema-teste de *A. cepa*, foram mais significativos para as concentrações mais baixas testadas e para os testes realizados na presença de luz, confirmando a ação do metabólito decorrente de fotodegradação (MN 46513), na indução das anormalidades encontradas. Para os testes realizados na ausência de luz, também obtivemos a confirmação dos resultados já descritos para genotoxicidade, onde as concentrações mais altas foram mais efetivas para a indução das irregularidades celulares. Estes dados reforçam o maior efeito de ação do inseticida, quando em concentrações mais baixas e na presença de luz. Assim, temos um indicativo de que, possivelmente, o metabólito MB 46513, formado pela fotólise do produto, seja o principal composto indutor de danos do DNA de *A. cepa*.

Pelos nossos resultados, podemos inferir que os teste de MN, realizados em células meristemáticas de organismo-teste *Allim cepa*, constituiu um bom parâmetro para a detecção da ação mutagênica do inseticida fipronil.

Estes dados nos sugerem que resíduos de fipronil podem caracterizar-se em um perigo para espécies vegetais não alvo, principalmente, quando expostas às baixas concentrações, que podem ser decorrentes de aplicações em solos de cultura, que sofrem lixiviações. Porém, efeitos tóxicos e citotóxicos possam também ser possíveis, caso haja um progressivo acúmulo do produto, por estas intensivas aplicações. Estes dados reforçam a preocupação de diversas instituições ambientais e de pesquisadores, quanto à atual utilização indiscriminada do inseticida.

5. REFERÊNCIAS

Agencia Nacional de Vigilância Sanitaria – ANVISA. Consultoria Pública de 11 de março de 2005. Disponível em: www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B9774-1-410%5D.PDF. Acesso em: 6/set/2005.

AL-SABTI ; METCALFE, C. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 343, p. 121-135, 1995.

ANTUNES, L. M. G.; ARAUJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista Nutrição**, Campinas. v. 13, n. 2, 2002.

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; AMÂNCIO, A. V.; CORREA, R. M. L.; GUERCIO, M. A. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, São Paulo. v. 28, n. 6, 2005.

ARNAIZ, R. R. **Las Toxinas Ambientales y sus Efectos Genéticos**. 2 ed. México: la ciencia/124. 95 p., 1995.

ATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, W. A.. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 518, p.135-144, 2002.

BAIRD, C.. **Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BAKORE, N.; JOHN, P. J.; BHATNAGAR, P. Organochlorine pesticide residues in wheat and drinking water samples from Jaipur, Rajasthan, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht. v. 98, p. 181-189, 2004.

BARBOSA, L.; DE LA TORRE, C.. The genotoxicity of Zn (II) and Cd (II) in *A. cepa* root meristematic cells. **New Phytology**. Cam-Bridge. v. 134, p. 481-486, 1996.

BARCELÓ, D. **Evaluación de la contaminación por plaguicidas en diversas zonas costeras de Europa** In: VALVERDE-GARCIA, A. & FERNANDÉZ-ALBA, A.B. (Eds.) SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS, 3 ed. p. 163-186., Almería, 1994.

BARCELÓ, D.; CHIRON, S.; FERNANDEZ-ALBA, A.; VALVERE, A.; ALPENDURA, M. F. Monitoring pesticides and metabolites in surface water and groundwater in Spain. U.S.A. **American Chemical Society**. Easton. p. 237-253, 1996.

BERGGREN, D.; FISKEJÖ, G.. aluminium toxicity and speciation in soil liquids-experiments with *A. cepa*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 6, p. 771-779, 1987.

BLOOMQUIST, J. R.. Insecticides: chemistries and characteristics. Disponível em: <[http:// www.ipmword.umn.edu/chapters/bloomq.htm](http://www.ipmword.umn.edu/chapters/bloomq.htm)>. Acesso em: 12/nov/2005.

BORTOLLUZZ, E. D.; RHEINHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C. S., PELLEGRINI, J. B. R.; ZANELLA, R. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande. v. 10, n. 4, 2006.

BUCKER, A.; CARVALHO W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagenicidade e genotoxicidade em *Engenmannia virescens*. Disponível em: www.scielo.br/pdf/aa/v36n3a11.pdf+mutag5C35AAne&h/_BR&ct=clnk&cd=14&/=br. Acesso em: 30/fev/2008.

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

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allim cepa* caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Oxford. 2008. No prelo.

CASARIN, F. E.. Seleção de ingredientes ativos para o controle do cupim subterrâneo *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae), Rio Claro – SP, p. 27-29, 2007. Tese de doutorado da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro – SP.

CHAUHAN, L. K.; SAVENA, P. M.; GUPTA, S. K.. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. **Environment and Experimente Botany**. Elmsford. v. 42p., 191-189, 1999.

COLL, M.; CORTÉS, J.; SAUMA, D. Physical-chemical features and determination of pesticides in the lagoon water in Gandoca, Limón, Costa Rica. **Revista de Biologia Tropical**, Sam Jose. v. 52, suppl2, p. 33-42, 2004.

COMBES, R.D.; STOPPER, H.; CASPARY, W.J. The use of the L5178Y mouse lymphoma cells to assess mutagenic, clastogenic and aneugenic activity of chemicals. **Mutagenesis**, v.10, p.403-408, 1995.

CÔMPENDIO de Defensivos Agrícolas. São Paulo: Andrei,1996.

CONTE, C.; MUTTI, I.; PUGLISI, P.; FERRARINE, A.; REGINA, G.; MAESTRI, e.; MARMIROLI, N.. DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of hearvy metals pollution.**Chemosphere**, Oxford. v. 37, p. 2739-2749, 1998.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J-F.; FÉRARD, J-F.. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with *Allilm/Vicia* – micronucleus and *Tradescantia* – micronucleus assays. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 426, p. 161-171. 1999.

DEM, S. B. Environmental Study of Pesticide Residues in Soil and Water from Cottom Growing Áreas in Mali. Disponível em: <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/edt-06102004-132810/>. Acesso em: 11/marc/2008.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO 13/12/91. Portaria nº 3, de 16 de janeiro de 1992. Termos das “Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins – nº 1, de 9 de dezembro de 1991.

DORES, E. F. G. C.. Contaminação por pesticidas das águas usadas como consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso. 2000. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Mato Grosso, MT, 2000.

DURAND, G.; BARCELÓ, D. Liquid chromatographic analysis of chlorotriazine herbicides and its degradation products in water samples with photodiode array detection. I. Evaluation of two liquid-liquid extraction methods, **Toxicology and Environmental Chemistry**, New York. v. 25, p. 1-11, 1989.

EDWARDS, C. A. **Persistent pesticides in the environment**. 2. ed. U.S.A.: CRS Press, 1973, 170 p.

EDWIN, D. O. Control of water pollution from agriculture. **Irrigation and Drainage**, New York. v. 55, p. 1-101, 1996.

FACHINETTO, J. M.; BAGATINI, M. D.; DURIGON, J.; SILVA A. C. F.; TERDESCO, S.B.. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *A. cepa*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, Rio de Janeiro. v. 17. p. 49-54, 2007.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. New Code of Conduct on Pesticides adopted. Rome, FAONEUSROON, 4 nov, 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/english/newsroom/news/2002/10525-em.html>>. Acesso em: 21/maio/2007.

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

FERNANDES, T. C. C. Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *A. cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste.

Tese (Mestrado). 2005, 212 f., Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2005.

FERNANDES, T. C. C, MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *A. cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego. v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FERRO, F. D.. Agrotóxicos estão matando produtor rural. Disponível em: <http://www.preservacaolimeira.com.br/agrotoxicos/ferro2.htm>. Acesso em outubro de 2006.

FISKEJÖ, G. Mercury and selenium in a modified *Allium* teste. **Hereditas**, Lundskrona. v. 64, p. 142-146, 1979.

FISKEJÖ, G. LASSEN, C.; RENBER, L.. Chlorophenoxiacetic acids and chlorophenols in the modifeid *Allium* test. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick. v. 34, p. 333-444, 1981.

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

FISKEJÖ, G. The *Allium* test an alternative in environmental studies: the ralative toxicty of metal ions. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 197, p. 243-260, 1988.

FISKESJÖ, G. The *A. cepa* in wastewater monitoring. Environmental toxicology and water quality: **An International Jounal**, New York. v. 8, p. 291 – 298, 1993.

FISKEJÖ, J. BRATULIC, N.; PAVLIKA, M.; PAPES, D. Genotoxicity of thiocarbamates and their metabolites. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 325, p. 65-74, 1994.

FRANEKIC, G.; BRATULIC, N.; PAVLIKA, N.; PAPES, D.. Genotoxicity of thiocarbanates and their metabolites. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 325, p. 65-74, 1994.

FREITAS, E. R. Agricultura ecológica: Conceituação. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=444>. Acesso em: 11/mar/2008.

GIACOMELLI, F.R.B.. Avaliação do comportamento meiótico em variedades de Aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região Sul. Dissertação (mestrado). Universidade de Maringá – Pr., 1999.

GRANT, W. F.. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 99, p. 273-291, 1982.

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

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos; mutações, câncer e reprodução**. Brasília: ELBRA, 2005, 394 p.

GROVER, I. S.; KAUR, S.. Genotoxicity of waste samples from sewage and industrial effluent detected by the *A. cepa* root anaphase aberration and micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 469, p. 183-188, 1997.

GROVER, R.; WOLT, J. D.; CESSM, A. J.; SCHIEFER, H. B.. Environmental fate of trifluralin. **Research Environmental Contamination Toxicology**, New York. v. 153, p. 1-64, 1997

GUIMARÃES, L. T.. Utilização do Sistema de Informação Geográfica (SIG) para identificação de áreas potenciais para disposição de resíduos na Bacia do Paquequer, município de Teresópolis – RJ, 2000. Dissertação (Mestrado). Universidade federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

GULATI A.; PRAKASH, S.; GUPTA, S. P.. Genotoxicity testing for relative efficiency of selected pesticides on *Allium cepa*. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow. v. 15, n. 2, p. 89-95, 1994.

GULATI, A.; PRAKASH, S.; GUPTA, S. P. Genotoxicity testing for relative efficiency of select pesticides on *Allium cepa*. **Journal of Environmental Biology**. Lucknow. v. 15, n. 2, p. 89-95, 1994.

HAINZL, D.; CASIDA, J E.. Fipronil insecticide: Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington. v. 93, p. 12764-12767, 1996.

HAMILTON, D.; CROSSLEY, S. Pesticide residue in food and drinking water: Human exposure and Risks, 2004. Disponível em: <http://www.chipsbooks.com/pestfood.htm>. Acesso em: 25/nov/2007.

HAMILTON, D.; CROSSLEY, S. Pesticide residues in food and drinking water. Disponível em: <http://www.chipsbooks.com/pestfood.htm>. Acesso em: 11/mar/2008.

HERINGA, M.; VOOST, S.; KOOL, P. Ames II for efficient screening of drinking water (sources) for mutagenic contaminants. **Toxicology Letters**, Amsterdam. v. 172, p. 169-170, 2007.

HOSHIMA, M. M. Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos de efluentes da refinaria de petróleo, por meio dos sistemas teste *A. cepa* e *Oreochromis niloticus*. Dissertação (Mestrado), 2005, 125 f. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2005.

HOSHINA, M. M. Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro – Município de Rio Claro, pertencente a bacia do rio Corumbataí por meio de testes de nutragenidade em *A. cepa*, 2002. Trabalho de conclusão de Curso. Ciência Biológicas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2002.

JOURNAL EXPRESS. Consumo de pesticidas no Brasil. Disponível em: <<http://www.jornalexpress.com.br>>. Acesso em 02/jan/2006.

KIRKLAND, D. Chromosome aberration testing in genetic toxicology – past, present and future. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 404, p. 173-185, 1998.

KOTACA, E. T.; ZAMBRONE, F. A. D. **Contribuições para a construção de diretrizes de avaliação do risco toxicológico de agrotóxicos**. Campinas, SP: ILSI Brasil, 2001.

KOVALCHUCK, O.; KOVALCHUCK, I.; ARKHIPOV, A.; TELYUK, P.; HOHN, B.. The *A. cepa* chromossome aberration test reliably measures genotoxicity of soil of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernovyl accident. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 415, n. 20, p. 47-57, 1998.

KRISCH-VOLDERS M.; VANHAUWAERT. A.; BOECK M. D., Importance of detecting numerical versus strutral chromonome aberrations. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 504, 2002.

KURÁS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; GULEWICZ, K.. Changes in chromossome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* Test induced by barck water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Chemosphere**, Oxford. v. 107, p. 211-221, 2006.

LANGENBACH, T.. Pesticidas: Tecnologia sofisticada em mãos desinformadas. **Ciência Hoje**, São Paulo. v. 10, p. 66-68, 1989.

LEME, D. M. Avaliação de potencial genotóxico e mutagênico de águas e sedimentos do rio Guaecá, São Sebastião – SP, após impacto de vazamento de oleoduto da região. Tese (Mestrado), 2007, 144 f. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Jr, Rio Claro, 2007.

LEME. D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromossome aberration and micronucleis frequencias in *A. cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. **Mutation Research**. Amsterdam. v. 650, p. 80-86, 2008. No prelo.

LEVAN, A. Chemically induced chromosome reactions in *A. cepa* and *Vicia Faba*. **Biollology**., London, v. 16, p. 233-243, 1951.

LEVAN, A. Cytological reactions induced by inorganic salt solutions, **Nature**, New York, v. 156 (2973): p. 751-752, 1945.

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

LIMA P.; RIBEIRO, L. R. **Mutagênese Ambiental**: Teste de Mutação gênica em células de mamíferos (mouse Lymphoma assay), capítulo 5 . Editora ULBRA, Canoas. 355 p., 2003.

LIU, D.; JIANG, W.; WANG, W.; ZHAI, L. Evalution of metal ion toxicity on root tip cells by the *A. cepa* test. **Israel Journal of Plant Science**, Northen Greece. v. 43, p. 125-133, 1995.

LORENCETTI, C.; FAVORETO, R.; MARCHI, M. R.; RIBEIRO, M. L. Residues of organochlorine pesticides and PCBs in some Brazilian municipal solid waste compost. **Journal of Environmental Science and Heath**, New York. v. 42, n. 6, p. 697-705. 2007.

LORENZI, H.. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas**. Nova Odessa: Plantarum, 1990.

MA, T.-H; XU, Z.; XU, C.; McCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, Amsterdam. v.334, p.185-195, 1995.

MALLET, C.; MALLET, J. R. N. Conversion of a conventional packed-column gas chromatograph to accommodate megabore columns. Determination of organophosphorus pesticides in environmental waters. **Journam of Chromatogr.** Amsterdam. v. 481, p. 37-44, 1989.

MARCANO, L.; BRACHO, M.; MONTIEL, X.; CARRUYO, I.; ATENCIO, L. Efecto mtotóxico y genotoxico del cadmio em poblaciones meristemáticas de *Allium cepa* L. (cebolla). **Ciência**, v.6, p.93-99, 1998.

MARCANO, L.; DEL CAMPO, A. Estudio ultraestructural del nucléolo en poblaciones meristemáticas de cebela *Allium cepa* L. tratadas com inhibidores metabólicos. **Ciencia**, v.3, p.73-82, 1995.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v.94, p.221-226, 2004.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A.. Mutagenic potencial evolution of the water of river that receis tannery effluent using the *Allium cepa* system. **Cytologia**, Tokyo. v. 69, n. 4, p. 399-408, 2004.

MATASUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Toxic and genotoxic effects of trivalente and hexavalent Chromium _ A review. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo. v. 18, n. 1, p. 77-85, 2005.

MATASUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronuclei test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations en onion root-tips.. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto. v. 29, p. 148 – 158, 2006

MAZZEO, D. E. C. O uso de técnicas de bandeamento cromossômico em *A. cepa* como metodologia de investigação de mutagenicidade, 2006. Trabalho de Conclusão de Curso. Ciências Biológicas. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2006.

MENKE, M.; CHEN, P.; ANGELIS. K. J.; SCHUBERTI, I. DNA damage and repair in *Arabodopsi thaliana* as measured by the comet assay after treatment with fifferent classes of genotoxis. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 493, p. 87-93, 20001.

MULROONEY, J. E.; WOLFENBARGER D. A.; HOWARD, K. D.. Efficacy of ultra low volume and high volume applications of fipronil against the boll weevil. **Journal of Cotton Science**, Lubbock. 2 n. 3, p.110-116, 1998.

NAVARRO, S.; PÉREZ, G.; NAVARRO, G.; MENA, L.; VELA, N. Variability in the fermentation rate and colour of young iager beer as influenced by insecticide abd herbicide residues. **Food Chemistry**, Londom. v. 105, n. 4, p. 1495-1503, 2007.

NIMMO, D. R. Pesticides. In RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R.. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. **Chemosphere**. New York. p. 35-373, 1985.

OYAMA, T.; JIN, K. KATAH Y.; CHIPA. Y. INOVE. K. 1,3,5-trichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene (CNP) in water, sediments and shellfish of the Ishikari river. Bull. Environ.

RANK, J.; NIELSEN, M. H.. *A. cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberrations assay on N-methyl-N-nitrosurea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 390, p. 121-127, 1997.

RANK, J; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *A. cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**. Amsterdam. v. 4148, n. 3. p. 113-119, 1998.

RANK, J.; LOPEZ, L. C.; NIELSEN, M. H.; MORETTON, J.. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *A. cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, Lund. v. 136, p. 13-18, 2002.

RAVENTON, M.; AAJOUR, A.; WILLISON, J.; CHERIFI, M.; TISSUT, M.; RAVANEL, P. Soil distribution of fipronil and its metabolites originating from a seed-coated formulation. **Chemosphere**, Oxford. v.69, p. 1124-1129, 2007.

REMIÃO, F. Todas as substâncias são venenos, não há nenhuma que não seja veneno. A dose correta distingue o remédio do veneno. Disponível em: www.ff.up.pt/toxicologia/Home.htm. Acesso em: 05/mar/2008.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. A. M. F.; MARQUES, E. D. **Mutagenese Ambiental**. ULBRA, Canoas. 355 p., 2003.

RIEDER, A. Indicadores de riscos de contaminação e de danos ao ambiente e a saúde humana por pesticidas às bordas do Alto Pantanal. Cuiabá, 1996. Tese (Doutorado) UFMT, Cuiabá, 1996.

RIFFAT, F. A. e MASSOD A.. *A. cepa* derived EROD as a potential biomarker for the presence of certain pesticides in water. **Chemosphere**, Oxford. v. 62, p. 527-537, 2006.

ROBERTO, M. M. Avaliação do Potencial Antimutagênico de extrato etanólico de própolis, por meio do sistema teste *A. cepa*, 2006. Trabalho de Conclusão de Curso. Ciência Biológicas. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2006.

SANKAR, T. V.; Zynudheen, A. A.; ANANDAN, R.; VISWANATHAN, N. Distribution of organochlorine pesticides and heavy metal residues in fish and shellfish from Calicut region, Kerala, India. **Chemosphere**, Oxford. v. 65, p. 583-590, 2006.

SCHIO, R. Caracterização de produtos domésticos que geram resíduos sólidos perigosos e sua destinação no município de Campo Grande, MS, 2001. Dissertação (Mestrado) SARH, PPG-TA-UFMS, Campo Grande, MS - 2001.

SILVEIRA, G.; MOLITERMO, E.; LUCHE, H. S.; RIBEIRO, G.; CARVALHO, F. I. F.; SILVA, J. A. G.; MAIA, M.; OLICEIRA, A. C. Utilização de agente físico como estratégia para obtenção de genótipos de aveia preta (*Avena strigosa* – Schred) com baixo nível de dormência nas sementes. Disponível em: http://www.ufpel.tche.br/cd/pdf/CA/CA_01447.pdf. Acesso em: 12/mar/2008.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA M.; TOMAN, M. J.. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 368, p. 171-179, 1996.

STEVENS, M. M., HELLIWELL, S.; WARREN, G. N.. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. **Field Crops Research**. v. 57, n. 2, p. 195-207, 1998.

SURE, F. B. Variability in pesticides residues – the US experience. **Food Additives and Contaminants**, London. v. 17, p. 497-501, 2000.

TEIXEIRA, R.O.; CAMPAROTO, M. L.; MAMTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P.. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto. v. 26, p. 551-555. 2003.

TINBRELL, J. A.. **Introduction to Toxicology**. 2. edição. Taylor & Francis Ed., 1999. 167 p.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, C. F.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J.. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology and Human Health Concerns, **Environmental Contamination and Toxicology**, New York. v. 176, p.1-66, 2003.

TUNDISI, H. S. F.. Estudo dos possíveis efeitos dos resíduos do herbicida Dual-720 Ce (Metolachlor) sobre a População de Copépodos Cliclopóides, no Açude do Sítio São José, Micípio Embu-Guaçu, Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado) – Depto de Ecologia Geral, Instituto de Biociências, Univ. São Paulo, São Paulo, 1990

TÜRKÖGLÜ, S.; Genotoxicity of live food preservatives tested on root tips of *A. cepa* L. **Mutation Research**, Amsterdam. v. xxx, p. xxx - xxx, 2006.

VEIGA, A. B. O uso do teste de *A. cepa* para detectar a toxicidade do inseticida Nuvacron. Monografia (Conclusão do curso de Ciências Biológicas), 1995. 58 f. – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1995.

VENTURA, B. C. Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida Atrazina, utilizando *A. cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste. Tese (Mestrado).2004, 124 f. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Jr, Rio Claro, 2004.

VENTURA, B. C.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A.; Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide by *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Achilidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. Pesticide **Biochemistry and Physiology**, San Diego. v. 90, p. 42-51, 2008.

VENTURA, B. C.; FERNANDES, T. C. C.; MATSUMOTO, S. T.; SPINOSA, W.; MARIN-MORALES, M. A.. O uso de *A. cepa* na investigação da mutagenicidade derivada de possíveis persistências de agrotóxicos na sub-bacia do Pari-Veado. **Genetics and Morales Biology: Supplement**, Ribeirão Preto. v. 23, n. 3, p. 690, 2004.

VIDAKOVIC, Z.; PAPES, D.; TOMIC, M.. Toxicity of waste drilling fluids in modified *Allium test*. **Water, Air and Soil Pollution**, Canada, v. 69, p. 413-423, 1993.

VIDAKOVIĆ-CIFREK Z.; PAVLICA, M.; REGULA I.; PAERS, D.. Cytogenetic damage in shallot (*A. cepa*) root meristems induced by industry “high-desinty brines”. **Journal Environmental Contamination and Toxicology**, New York. v. 43, p. 284-291, 2002.

VIEIRA, S. L. P.. Resíduos de pesticidas organoclorados e organofosforados em tomate (*Lyopersicum esculentum* P. Miller) comercializados em Cuiabá, Mato Grosso, 1999. Dissertação (Mestrado) – ISC-UFMT, Cuiabá, 1999.

VODERS, M. K.; VANHAUWAERT, M. B.; DECORDER. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 504, p. 137-148, 2002.

VOGEL, E. W. Assessment the impact of pesticides on the environment. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam v. 60, p. 81-96, 1995.

YAMAGISHI, T.; MIYAZAKI, K.; AKIYAMA, K.; MORITA, M. NAKAGAWA, J.; HORI, S.; KANEKO, S. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in commercial diphenyl ether herbicides, and in freshwater fish collected from the application area. **Chemosphere**. Oxford. v.10, p. 1137-1144, 1981.

ZAMBROME, F. A. D.. Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? Perigosa família. **Ciência Hoje**, São Paulo. v. 4, n. 22, p. 44-48, 1986.

ZHOU, R.; ZHU, L.; YANG, K.; CHEN, Y. Distribution of organochlorine pesticides in surface water and sediments from Qiantang River, East China. **Journal Hazardous Materials**. Amsterdam. v. 137, p. 68-75, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)