

## BIOENSAIOS EM TOXICOGENÉTICA DO FUNGICIDA TEBUCONAZOLE

Igor Godinho Portis <sup>1</sup>, Alex Lucas Hanusch <sup>2</sup>, Rafael Velozo Pena <sup>2</sup>, Hécio Marques Júnior <sup>4</sup>, Cláudio Carlos da Silva <sup>3</sup>, Aparecido Divino da Cruz <sup>3</sup>

1. Aluno de doutorado da Universidade Federal de Goiás

2. Aluno de mestrado da Universidade Federal de Goiás

3. Professor do departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Núcleo de Pesquisas Replicon.

4. Professor do departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás e professor do departamento de Biologia da Faculdade Araguaia. e-mail: [igorportis@gmail.com](mailto:igorportis@gmail.com). Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Brasil.

Recebido em: 31/03/2015 – Aprovado em: 15/05/2015 – Publicado em: 01/06/2015

### RESUMO

O Tebuconazole é um fungicida sistêmico do grupo triazol, e é utilizado em cultura de soja, sendo utilizado como ação preventiva e curativa nos alvos biológicos. Este estudo tem como objetivo avaliar uma possível mutagenicidade do fungicida através dos testes de micronúcleo em linfócitos T humanos e *Allium cepa*. Realizado para as definições das concentrações a DL50, posteriormente foi realizado o teste de *Allium cepa* com bulbos de cebola e o teste do micronúcleo com células sanguíneas humanas com o gotejamento em lâmina. O Tebuconazole apresentou atividade mutagênica e citotóxica nos testes de *Allium cepa* e micronúcleo. Como conclusão um cuidado maior com a saúde humana e com o meio ambiente é necessário, tendo em vista o perigo apresentado por substâncias químicas composta nos agrotóxicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Agrotóxico; *Allium cepa*; Micronúcleo; Mutagênese; toxicologia.

### BIOASSAYS IN TOXICGENETICS OF TEBUCONAZOLE FUNGICIDAL

#### ABSTRACT

The Tebuconazole is a systemic fungicide of the triazole group, and is used in soybean, being used as a preventive and curative action on biological targets. This study aims to evaluate a possible mutagenicity of fungicide through the micronucleus tests in human T lymphocytes and *Allium cepa*. Performed for the definitions of the DL 50 concentrations, was later held the *Allium cepa* test strain with onion bulbs and the micronucleus test with human blood cells with the drip in blade. The Tebuconazole showed mutagenic and cytotoxic activities in *Allium cepa* and micronucleus tests. In conclusion a greater concern to human health and the environment is necessary, in view of the danger posed by chemicals made in pesticides.

**KEYWORDS:** Pesticides; *Allium cepa*; micronucleus; mutagenesis; toxicology.

## INTRODUÇÃO

O Tebuconazole é um fungicida sistêmico do grupo químico triazol, caracterizado pelo mecanismo de ação denominado IBE (inibidor da biossíntese do ergosterol). Apresenta ação preventiva e curativa nos alvos biológicos, os quais causam sérios danos à produção das culturas de alho, aveia, batata, cebola, cevada, soja e trigo (Registro: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) nº 02606). Foi objeto de advertência mundial em 2002 pela FAO (Organização de alimentos e agricultura), o uso de agrotóxicos, pelo Código Internacional de conduta sobre a distribuição e a utilização de agrotóxicos (FAO, 2002).

Um dos maiores desafios para a humanidade sem dúvida é a produção de alimentos para a população em plena expansão. Porém as áreas agricultáveis estão disputando espaço com as áreas urbanas e industriais, sendo necessário voltar a produção apenas para as áreas já destinadas a agricultura, áreas estas que podem estar desgastadas, assim se faz necessário a utilização de elevada quantidade de agrotóxicos, buscando maior produtividade (GRISOLIA, 2005).

Substâncias químicas estão presentes as vezes em altas quantidades na sociedade, isso pode ser observado no dia-a-dia, como nos medicamentos, alimentos, plásticos, detergentes, tintas, agrotóxicos, em ambientes industriais e rurais, além da poluição típica dos centros urbanos. Em pesquisa realizada na União Europeia, estima-se que dessa gama de produtos químicos apenas 7% possuem algum tipo de estudo toxicológico (GRISOLIA, 2005).

Uma infinidade de compostos com potencial mutagênico estão expostos a espécie humana, por meio da ingestão de bebidas e alimentos, que são constituintes naturais da alimentação. Entretanto mais recentemente por meio de inalações de fumaças, de atividades relacionadas profissionalmente e, hoje em dia, a substâncias químicas sintéticas em grande proporção, além das radiações (GRISOLIA, 2005).

A toxicologia ocupacional é a área da toxicologia que se ocupa do estudo de ações e efeitos danosos de substâncias químicas usadas no ambiente de trabalho sobre o organismo humano, (DELLA ROSA et al., 2003). O aumento no número de compostos químicos industriais, agrícolas e comerciais no ambiente aquático levam a vários efeitos deletérios nos organismos aquáticos (LIVINGSTONE, 2001).

Em baixas concentrações, estas substâncias podem não ter efeitos agudos detectáveis nos organismos, mas podem reduzir a sobrevivência ou prejudicar a saúde, via efeitos a longo prazo. Tais efeitos podem ser manifestados por um dano maior ou menor nas células somáticas ou germinativas, e através do desenvolvimento de desordens, como, por exemplo, o câncer, que requer períodos longos e latentes, antes de tornar-se clinicamente visível (WHITE & RASMUSSEN, 1998).

Teste do Micronúcleo (MN) - o teste de aberração cromossômica em linfócitos humanos e em linhagens celulares era o mais utilizado. Embora o teste do micronúcleo estivesse já padronizado para células de medula óssea de roedores *in vivo*, a aplicação em linfócitos humanos para monitoramento de populações apresentava dois problemas: a fragilidade das células na confecção das lâminas, que foi solucionado modificando a hipotonização e o processamento preservando o citoplasma e consequentemente a retenção do micronúcleo (MN) no interior da célula (ISKANDAR., 1979; HOGSTED, 1984). O segundo e principal motivo estava na variabilidade de respostas dos linfócitos aos estímulos mitogênicos e a presença de células na cultura que não passaram pela divisão celular, assim não originavam

micronúcleo, isso refletia na análise. O uso de marcadores radioativos foi uma das ferramentas utilizadas para identificar as células que passavam pela síntese de DNA. Porém foi a descoberta de CARTER (1967) que percebeu em camundongos, que as células tinham a citocinese interrompida pela citocalasina B, sem ter o bloqueio da mitose, passaram a utilizar esse composto para marcar células que passaram por esse ciclo de divisão, reduzindo assim a limitação do teste de MN (FENECH & MORLEY, 1985).

Micronúcleos consistem em pequenas quantidades de DNA que surgem no citoplasma quando alguns fragmentos de cromossomos, cromátides ou cromossomos inteiros não são incorporados dentro do núcleo da célula filha, isso ocorre na mitose (DIETZ, 2000). O Micronúcleo tem geralmente 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo, e geralmente há um micronúcleo por célula (DIETZ, 2000).

O teste de micronúcleo permite identificar um aumento na frequência de mutações em células, que são expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos (CARVALHO, et al., 2002). O teste do micronúcleo é considerado pelos laboratórios, um teste barato, rápido, não invasivo e pode ser repetido várias vezes (CARVALHO et al., 2002).

O teste do Micronúcleo (MN) é considerado, por muitos autores, como uma das mais promissoras técnicas de avaliação de efeitos mutagênicos induzidos por agentes químicos (MATSUMOTO et al., 2006). Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o DNA, alterando a estrutura ou função celular. Quando essas alterações se fixam e adquirem a capacidade de serem transmitidas, passam a ser denominadas de mutações (UMBUZEIRO et al., 2003).

O teste de micronúcleos e anomalias nucleares indicou provável presença de agentes que estão comprometendo a qualidade da água dos lagos testados, sugerindo que, exposições crônicas a essas águas podem afetar a biota presente nestes ecossistemas, bem como a saúde da população local (MIRANDA, 2009).

***Allium cepa*** - O método de *Allium cepa* é um teste eficaz para avaliar alterações cromossômicas, é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS-OMS) e o Programa Ambiental das nações Unidas (UNEP), como um bom teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA & RODRIGUEZ, 1999).

Para análise de várias substâncias das quais se deseja saber o potencial mutagênico é comumente utilizado o teste de *Allium cepa*, estimado pela frequência de aberrações e quebras cromossômicas indicando riscos de aneuploidia e fornecendo valiosas informações sobre a relação da avaliação de amostras ambientais (RANK & NIELSEN, 1993). O índice mitótico e índice de replicação são parâmetros utilizados na análise de proliferação adequadas da célula, o que pode ser medido através do sistema teste vegetal *Allium cepa* (GADANO et al., 2002).

A eficiência do sistema *Allium cepa* se deve as características cinéticas de proliferação, ao rápido crescimento de suas raízes, ao número de células em divisão, a alta tolerância a diferentes condições de cultivo, a disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ( $2n=16$ ) (FISKEJÓ, 1994).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o fungicida Tebuconazole e sua possível mutagenicidade em células meristemáticas de *Allium cepa* realizando o teste de micronúcleo com células sanguíneas periféricas humanas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Allium cepa*

As soluções teste foram obtidas a partir da determinação da  $CL_{50/48}$  para *Poecilia reticulata* ( $17,57\mu\text{L.L}^{-1}$ ) sendo realizadas diluições seriadas a fim de se obter as concentrações de  $13,18\mu\text{L.L}^{-1}$ ;  $8,79\mu\text{L.L}^{-1}$  e  $4,39\mu\text{L.L}^{-1}$ . Os bulbos de *A. cepa* foram submetidos a crescimento radicular nas soluções teste por três dias após o período de crescimento inicial em água destilada por três dias, sendo as amostras radiculares coletadas e fixadas em Carnoy. As lâminas do tecido meristemático foram obtidas pelo método de *squash* segundo o protocolo de FISKEJÓ (1985). Sendo assim as lâminas foram confeccionadas retirando a coifa da raiz colocando-a em um microtubo com HCl 1N de 10 a 15 minutos, sendo levado posteriormente para um microtubo com orceína acética por 10 minutos e posteriormente colocada a coifa sobre uma lâmina, gotejando uma gota de Ácido acético e realizado o esmagamento(Squash). Para análise das lâminas foi utilizada microscopia de luz branca com objetiva de 40x possibilitando a identificação de erros de migração (aderências, atrasos, adiantamentos e pontes cromossômicas) nas fases de metáfase e anáfase da divisão celular.

### Micronúcleo

Para o teste de micronúcleo foi retirado 10 mL de sangue humano (de uma pessoa saudável, não fumante, não etilista, que não esteja tomando medicamentos), e então posteriormente realizado a cultura sanguínea com 6 concentrações ( $10\mu\text{L.L}^{-1}$ ) 100%; ( $7,5\mu\text{L.L}^{-1}$ ) 75%; ( $5,0\mu\text{L.L}^{-1}$ ) 50%; ( $2,5\mu\text{L.L}^{-1}$ ) 25% ; diluições estas obtidas a partir da CI 50 de  $13,5\mu\text{L/mL}$ ; e o controle negativo somente a cultura e positivo com a adição de MMC (Metil metano sulfonato)  $10\mu\text{L}$  em concentração de  $5\mu\text{L/mL}$ . A cultura foi realizada em tubos com 4mL de RPMI, e acrescenta-se 1 mL de sangue, 1 de soro fetal bovino,  $100\mu\text{L}$  de fitohemaglutenina,  $100\mu\text{L}$  de cholsicina, a cultura é realizada inicialmente se o acréscimo das soluções testes e após 24h é colocado as concentrações da substância teste(Tebuconazole).E após 48h foi feita a interrupção e a limpeza da cultura com a solução Carnoy, e assim a realização das lâminas com a técnica de gotejamento sobre as lâminas, e coradas com corante panótico. Examinou-se 1000 células por lâmina. Só foram consideradas as células com a membrana citoplasmática intacta. Os micronúcleos não podem exceder mais do que 1/3 do tamanho do núcleo e nem menos que 1/30. Os MNs devem estar nitidamente separados, com bordas distinguíveis, não ligados ao núcleo principal, da mesma cor e refringência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos sobre a determinação da  $CI_{50}$  do fungicida Tebuconazole realizados em *Poecilia reticulata* por um período de 96 horas foi de  $17,57\mu\text{L/L}$ . Como o fungicida Tebuconazole pertence a classe dos agrotóxicos extremamente tóxicos, e sua  $CI_{50}$  foi de  $17,57\mu\text{L/L}$  em *Poecilia reticulata* para 96h. Comparado com o herbicida Roundup, e a outros organismos testes, em que foi realizado a  $CI_{50}$  de tilápias jovens (*Oreochromis niloticus*), que foi encontrado a  $CI_{50}$  de  $17,5\mu\text{L/L}$ , em períodos de 24h e 96h, e para tilápias adultas um foi encontrado um resultado de 46,9 e 36,8 em 24h e 96h (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002), mostrando semelhança com o Tebuconazole a  $CI$  das tilápias jovens.

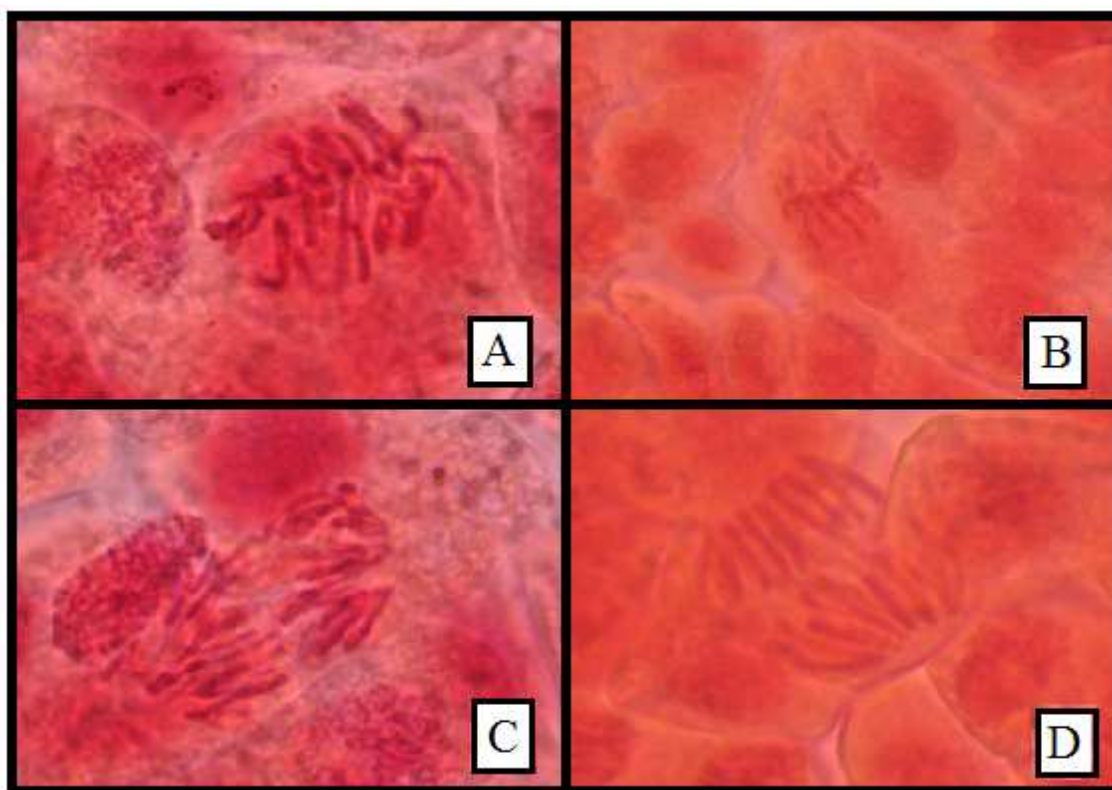
Em outro estudo realizando a  $CI_{50}$  do princípio ativo do Roundup, em carpas (*Cyprinus carpio*), foi encontrado o valor de  $620\text{ mg.L}^{-1}$  em um período de 96h,

porém os autores observaram que as concentrações subletais menores que 1% da CI 50, ocasionou danos nas brânquias das carpas (NESKOVIC et al. 1996).

Os testes de animal *in vitro* e o de *Allium cepa* *in vivo* para avaliar a citotoxicidade estão validados por vários pesquisadores, pois os resultados obtidos são bastante similares (VICENTINI et al., 2001; TEIXEIRA et. al., 2003).

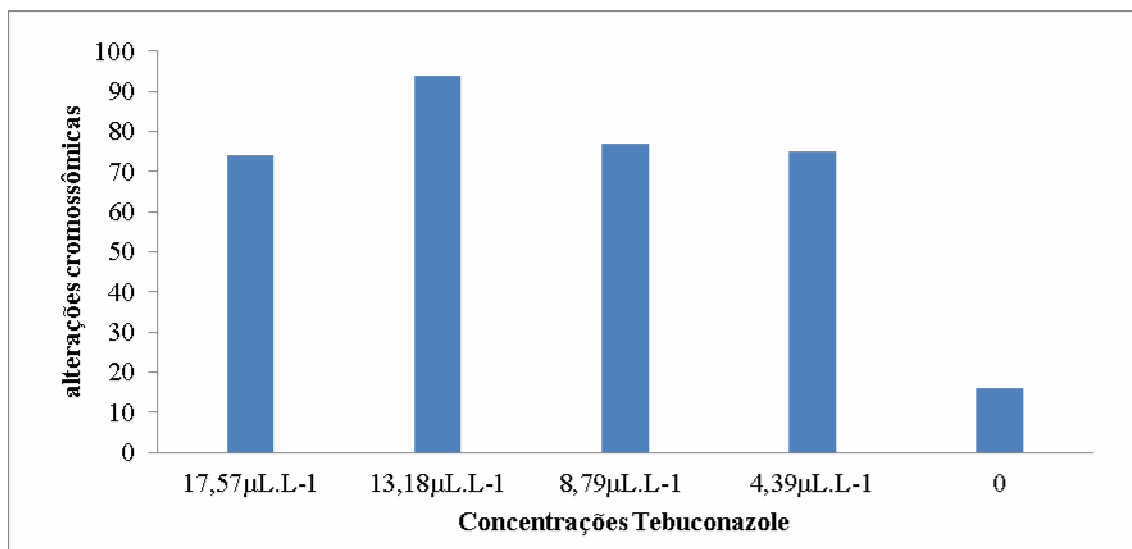
O metabolismo vegetal é diferente do metabolismo animal, porém o sistema teste vegetal *Allium cepa* é um ótimo parâmetro para análise citotóxica, e tem sido usado para a prevenção da saúde humana evitando o consumo de vários produtos, e isso através de observações de alterações cromossômicas no teste *Allium cepa* (FISKEJÓ., 1994).

No teste *Allium cepa* foram realizados a contagem de três lâminas por tratamento, um total de 9 lâminas por concentração, e cada lâmina contadas 100 anáfases e consideradas as normais e anormais, e 100 metáfases consideradas as normais e anormais.



**FIGURA 1** – A) Metáfase anormal; B) Metáfase normal; C) Anáfase anormal; D) Anáfase normal; com aumento de 100x. Fonte: Núcleo de Pesquisas Replicon – PUC GO.

No teste de *Allium cepa*, a maior média foi a da concentração de  $13,18 \mu\text{L}^{-1}$ , porém entre as médias das concentrações de  $17,57 \mu\text{L}^{-1}$ ,  $8,79 \mu\text{L}^{-1}$  e  $4,39 \mu\text{L}^{-1}$  quando comparado entre elas não houve correlação, assim não houve diferença significativa entre a comparação entre o grupo exposto, mas houve diferença significativa entre as médias do grupo exposto quando comparado com o controle negativo (Gráfico 1).



**GRÁFICO 1** – Média de alterações cromossômicas entre as concentrações do fungicida Tebuconazole no teste *Allium cepa*.

No sistema teste *Allium cepa* foi utilizado para a realização da estatística, os modelos de correlação linear, correlação de spearman, os testes de Tukey e Anova. O valor de p obtido foi de  $p=0,0000019$ , mostrando diferença significativa.

A concentração que apresentou a maior média a de  $13,18 \mu\text{L.L}^{-1}$ , não é a maior concentração, a concentração  $17,57 \mu\text{L.L}^{-1}$  (100%) foi a que apresentou média menor, mas como houve diferença significativa entre as concentrações do Tebuconazole e o controle negativo, este fato da concentração de 100% ser a menor média de alterações, pode ter ocorrido pela toxicidade do fungicida ter influenciado no ciclo de divisão celular, sendo um inibidor, ou por diferença de iluminação dos bulbos no crescimento radicular, entre outros motivos, porém não influenciando nos resultados do potencial mutagênico e citotóxico que o Tebuconazole apresentou no teste de *Allium cepa*. O fungicida Tebuconazole no sistema teste vegetal (*Allium cepa*), apresentou diferença significativa quando as médias do grupo exposto foram comparadas com o controle negativo, e observou-se que houve um maior número de alterações na concentração de 75%. Não houve correlação de dose-dependente, mas possivelmente se a concentração fosse maior haveria média maior de alterações.

No trabalho de DISNER et al., (2011), foi realizado um estudo do herbicida Roundup®, que através do teste de inibição do crescimento celular em *Allium cepa*, foi observado toxicidade do composto, sendo que quanto maior a concentração do composto em contato com os bulbos de cebola menor foi a divisão celular nas raízes. Sendo que até concentrações demasiadamente reduzidas podem acarretar algum grau de toxicidade ao organismo. Foi observado um aumento significativo de micronúcleos nas células das raízes de *Allium cepa* que estavam em contato com o glifosato.

No trabalho de VENTURA, et al., (2004), foi realizada a avaliação do herbicida Atrazina, através do teste de *Allium cepa* na análise de alterações cromossômicas, o teste foi realizado com a divisão de 48h de exposição e 20h, sendo realizado as diluições deste, observou-se que as concentrações do grupo exposto apresentaram diferença significativa quando comparada com o controle negativo, e houve

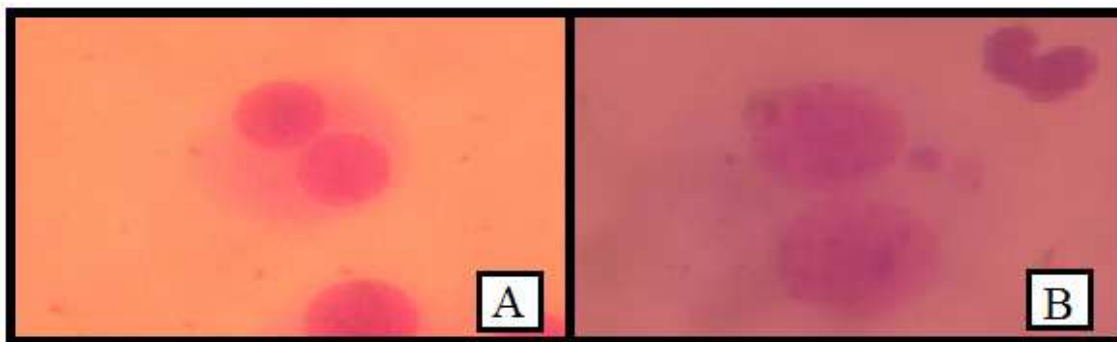
diferença significativa entre as concentrações, e isso para ambos os tratamentos. Pode-se observar que a maioria das alterações cromossômicas estão relacionadas a perda de material genético, e a frequência de aberrações na concentração de (75%) foi considerada significativa, a de (100%) induziu um número menor de aberrações cromossômicas o que pode ser explicado pela inibição do índice mitótico que essa concentração gerou. Neste trabalho foi realizado um período de recuperação das células das raízes com água milliQ, e foi observado posteriormente que ao final da recuperação houve diminuição das aberrações cromossômicas.

Ainda no trabalho de VENTURA, et al., (2004), foi realizado o teste de morte celular do meristema das raízes, e foi observado que o herbicida Atrazina, quanto maior a concentração deste maior foi a morte celular. Essa morte celular pôde ser observada para todas as concentrações, porém mais restritas ao procâmbio e com o aumento das concentrações foi observado que as regiões do meristema fundamental e da protoderme ficaram comprometidas. Houve assim um maior comprometimento celular para as concentrações mais altas.

Em um trabalho com o Herbicida Trifluralina, segundo FERNANDES, et al., (2005), realizaram testes de inibição do índice mitótico em células de *Allium cepa*, com o tratamento de 24h, após isso um período de recuperação nas células de 24h e posteriormente para a recuperação de 48h. No teste de inibição do índice mitótico para a exposição de 24h apresentou diferença significativa com o grupo controle, já que houve diminuição do índice mitótico nas concentrações de 50%, 75% e 100%. Na concentração de 25% não houve observação significativa em nenhum tratamento, mas ela e a de 50% tiveram um crescimento do índice mitótico quando ocorrem os períodos de recuperação, que ao contrario das outras concentrações, não houve aumento no índice mitótico. Neste mesmo trabalho foram realizadas as análises de alterações cromossômicas em *Allium cepa*, e foram observadas diferenças significativas das concentrações do herbicida Trifluralina com o controle negativo, sendo algumas alterações decorrentes de somatórias de efeitos ocorridos em diferentes fases do ciclo celular e/ou devido a persistência do herbicida em várias fases do ciclo celular o que pode potencializar o seu efeito.

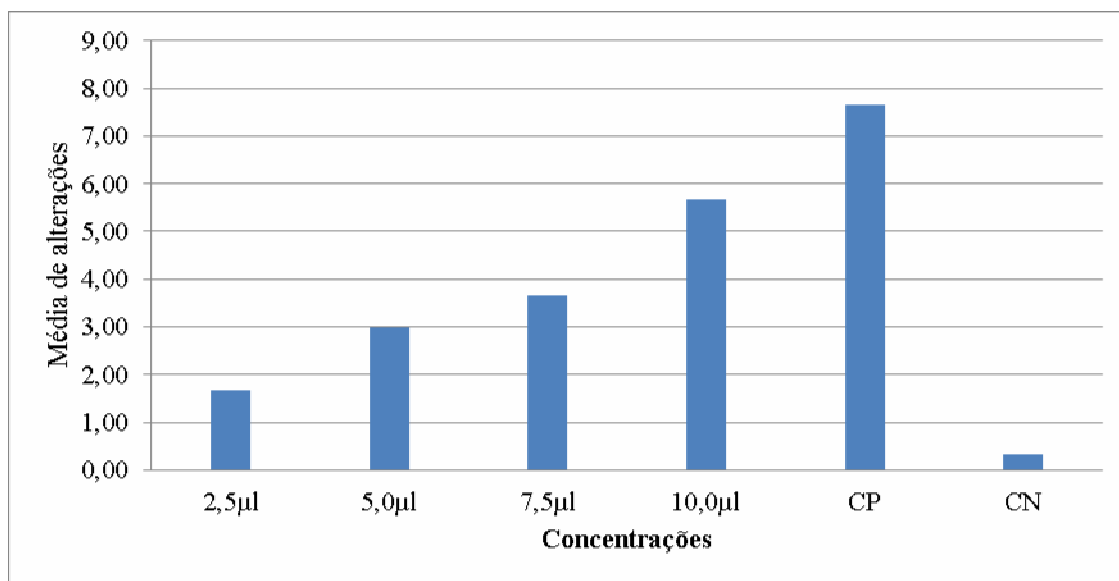
Foram analisadas diversas alterações em todas as concentrações e todos os tratamentos, tanto no de 24h quanto no de recuperação. Em outra análise foi observada presença de micronúcleos, exceto na concentração de 100%, maioria nas fases de interfase e de prófase. No teste de micronúcleo em linfócitos T humanos, a CI 50 utilizada foi a mesma da *Poecilia reticulata*, porém em diluição menor por se tratar de sistemas de testes diferentes em vários aspectos, utilizado assim para a diluição a dose de  $13,18 \mu\text{L}^{-1}$  como a CI 50 e posteriormente realizado as diluições do Tebuconazole.

No teste foram contabilizadas 1000 células binucleadas por lâmina, sendo três repetições em cada concentração, contadas 3000 células por tratamento, encontrados 66 micronúcleos (MN). Foram analisadas as células binucleadas normais e as células binucleadas com micronúcleo.



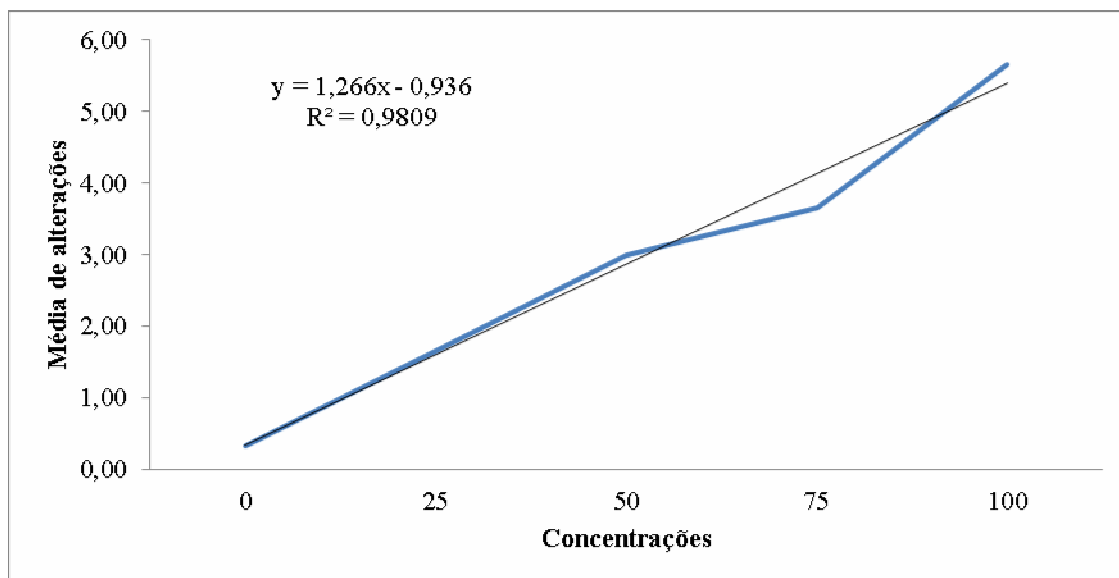
**FIGURA 2** – A) Célula binucleada; B) Célula binucleada com micronúcleo.  
Fonte: Núcleo de Pesquisas Replicon – PUC GO.

No teste de micronúcleo foi utilizada para a realização da estatística a correlação de Pearson, e os testes estatísticos de Tukey, Anova e Shapiro-wilk. Obtendo o valor de  $p$  igual a 0.0008, mostrando ser significativo. A maior concentração no caso de 10  $\mu\text{L/mL}$  apresentou a maior média de micronúcleos, quando comparado com as demais concentrações de 7,5  $\mu\text{L}$ ; 5,0  $\mu\text{L}$ ; 2,5  $\mu\text{L}$  e quando comparado com o controle negativo. As demais concentrações de 7,5  $\mu\text{L}$ ; 5,0  $\mu\text{L}$ ; 2,5  $\mu\text{L}$  também apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o controle negativo.



**GRÁFICO 2** – Diferenças nas médias de micronúcleo entre as concentrações de Tebuconazole e o controle negativo e positivo.

Houve uma relação de dose-dependente, pois quanto maior a dose de Tebuconazole, maior o número de micronúcleos encontrados.



**GRÁFICO 3** – Relação de aumento de micronúcleo conforme o aumento da concentração de Tebuconazole.

Houve correlação entre as médias das concentrações, pois entre as mesmas houveram diferenças significativas. Assim como as concentrações de 10µl; 7,5 µl ; 5,0 µl ; 2,5 µl, também apresentaram diferenças comparadas ao grupo controle. Em estudo realizado por NEVES, (2010) com trabalhadores expostos a diversos tipos de pesticidas verificou-se diferença significativa quando comparado ao grupo controle, sendo assim, as pessoas que trabalham diretamente com agrotóxico tiveram um número maior de micronúcleos do que as pessoas que foram utilizadas no grupo controle, que são pessoas que não estão diretamente envolvidos com os agrotóxicos. Tem-se uma divisão de categorias de micronúcleos, classificada com maior alteração. No grupo controle a maioria dos indivíduos se apresentam nas classes baixas, e conforme aumenta as classes diminui o número de indivíduos nela presente, até que na última classe há ausência dos indivíduos. Já no grupo exposto o número de indivíduos com maior frequência tende a aumentar conforme o aumento das classes, mas nas últimas classes ocorre um declínio.

De acordo com o trabalho de CHAVES, (2007), em estudo realizado com trabalhadores rurais de alguns municípios do estado do Piauí, estes eram expostos a agrotóxicos no cotidiano. Foi realizado o teste de micronúcleo com célula da mucosa oral. Foram coletadas amostras biológicas de trabalhadores expostos aos agrotóxicos e de pessoas que não tinham contato direto com estas substâncias para a definição do grupo controle negativo. O estudo observou indução no aumento dos micronúcleos significativa, mostrando assim um aumento nos níveis de genotoxicidade nos trabalhadores rurais.

No trabalho com o fungicida Tebuconazole, no teste de micronúcleo nos linfócitos T humano, o agrotóxico apresentou atividade mutagênica. Quando as médias das concentrações foi comparada ao grupo controle, houve diferença significativa, e indicou correlação entre as concentrações, mostrando dose-dependente, e de acordo com o aumento da concentração do fungicida aumenta a média de micronúcleos. A maior concentração de 100% (10µl) foi a que apresentou maior média de micronúcleos.

Corroborando com o trabalho de De OLIVEIRA & MEIRELES, (2011), foi realizado um estudo com trabalhadores agrícolas do município de Ponto Novo – BA. No trabalho não foi feita a classificação de agrotóxicos utilizados na região, foi realizado teste de micronúcleo da mucosa oral dos trabalhadores, de pessoas que moram em torno das regiões de irrigação das plantações e de pessoas não expostas. No estudo analisaram outras alterações genéticas como a presença de cariorréx, cariólise, picnose, cromatina condensada e broken-eggs.

A frequência de micronúcleo foi maior no grupo exposto (GE) do que no grupo controle (GC), e foi maior a frequência de cromatina condensada e cariorréx no GE que no GC, tendo diferença significativa. Quando comparado com a população residente no perímetro irrigado, não houve diferença significativa em relação a frequência de micronúcleos, mas em relação as outras alterações analisadas houve diferença significativa. Assim, o estudo obteve que em relação ao grupo controle para os trabalhadores agrícolas houve diferença significativa em relação a frequência de micronúcleos e em relação as outras alterações analisadas. Já comparando os trabalhadores agrícolas com os moradores do perímetro irrigado, houve maior frequência de micronúcleos mas não houve diferença significativa, mas em relação as outras alterações houve diferença significativa, o que pode indicar potencial tóxico dessas misturas de agrotóxicos.

Em um trabalho no povoado de Vila Bessa no município de Conceição do Jacuípe – Bahia (RAMOS, 2009), foi realizada análise nos indivíduos expostos ocupacionalmente a pesticidas e outros tipos de agrotóxicos. No estudo em questão foram realizados vários testes, mas no teste de micronúcleo realizado, no grupo exposto ocorreu maior frequência de micronúcleos do que no grupo controle, porém não houve diferença significativa entre eles. Em outros testes houve diferença significativa.

Corroborando com o trabalho de De OLIVEIRA, & FERREIRA, (2008), em estudo realizado no estado de Goiás, nos municípios de Portelândia e Palestina de Goiás, com indivíduos expostos a defensores agrícolas. Foi realizado o teste de micronúcleo através das células da mucosa oral, resultando em diferença significativa do grupo exposto para o grupo controle, notando-se maior frequência de micronúcleos no primeiro grupo.

No trabalho de VENTURA, et al., (2004) foram realizados testes de micronúcleo utilizando o sistema – teste *Oreochromis niloticus*, foram expostos as concentrações do herbicida Atrazina. O estudo obteve que o herbicida apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo, e as concentrações do Atrazina apresentou diferença entre as mesmas, sendo que quanto maior a concentração maior foi a frequência de micronúcleos e outras alterações.

Corroborando com o trabalho de GOLDONI & SILVA (2012) foi realizado um trabalho com o fungicida Mancozebe, com o sistema – teste *Astyanax jacuhiensis*, e foi realizado o teste de micronúcleo, através da coleta do sangue da veia caudal, houve maior frequência de micronúcleos no grupo exposto porém não houve diferença significativa quando comparado ao grupo controle.

No trabalho de SOUZA FILHO, (2011), foi testado o herbicida Roundup Transorb, em peixes Guppy (*Poecilia reticulata*), e avaliado as alterações nucleares e micronúcleos, observou-se que o grupo exposto apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle, e ainda alterações acordo com o aumento da concentração do herbicida.

## CONCLUSÃO

O presente estudo obteve resultados que demonstraram que o fungicida Tebuconazole, no teste de *Allium cepa* apresentou potencial mutagênico e citotóxico, porém a concentração de 100% foi a que apresentou menor média de alterações, podendo isso ser causado pelo potencial citotóxico do fungicida em que prejudicou a divisão celular, entre outras razões, mas na concentração de 75% foi a que obtivemos maior média de alterações, indicando que se as doses forem maiores, possivelmente teríamos maior média de alterações.

No teste de micronúcleo, o Tebuconazole apresentou potencial mutagênico e citotóxico, quando comparado ao grupo exposto ao grupo controle negativo, houve diferença significativa, neste teste também apresentando correlação de dose-dependente do fungicida, já que a medida em que aumentou-se a concentração, as médias de micronúcleo aumentaram.

Pode-se concluir a partir deste estudo, que o fungicida Tebuconazole apresenta um caráter mutagênico e citotóxico, podendo ser prejudicial a saúde de pessoas que trabalharam ou trabalham com este produto, ou tem algum contato com o agrotóxico, é prejudicial ao meio ambiente e a todos os seres vivos presentes no ecossistema que está sendo afetado pelo fungicida, buscando assim, saídas para amenizar os danos causados pelo Tebuconazole ao ser humano e ao meio ambiente, para os trabalhadores evitarem problemas de saúde é recomendável o uso de EPI (Equipamento de proteção individual), e maior cuidado na aplicação deste para evitar as contaminações do solo, da água, da vegetação, entre outros.

## REFERÊNCIAS

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

CARVALHO, M.B et. al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Revista Assoc Med Bras**. v. 48, n. 4, p. 317-322. 2002.

CHAVES, T.V.S. **Avaliação do impacto do uso de agrotóxicos nos trabalhadores rurais dos municípios de Ribeiro Gonçalves, Baixa Grande do Ribeiro e Uruçuí – Piauí**. Dissertação de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. 2007.

De OLIVEIRA, P.C.; MEIRELES, J.R.C. **Biomonitoramento citogenético de trabalhadores agrícolas do perímetro irrigado no município de Ponto Novo – BA**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual de Feira de Santana. 2011.

De OLIVEIRA, S.N.K; FERREIRA, L.G. **Análise citogenética em indivíduos ocupacionalmente expostos a defensivos agrícolas**. Resumo apresentado no evento de iniciação científica da Universidade Estadual de Goiás. 2008.

DELLA ROSA, HENRIQUE V; SIQUEIRA, MARIA E. P; COLACIOPPO, SERGIO.

Monitorização Ambiental e Biológica. In: OGA, Seizi. Fundamentos de Toxicologia. 2.Ed. São Paulo: Atheneu, p.145-161. 2003

DIETZ, J. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. **Rev Ass Med Brasil**. v.46, n.3, p. 207- 211. 2000.

DISNER, G.R. *et. al.* Avaliação da atividade mutagênica do Roundup® em *Astyanax altiparanae* (Chordata, Actinopterygii). **Evidência**, Joaçaba. v. 11, n. 1, p. 33-42, janeiro/junho 2011.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations. New Code Of Conduct on Pesticides adopted**. Rome, FAONEWSROOM, 4 nov. 2002.

FENECH, M; MORLEY A. A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. **Cytobios**, n. 43, p. 233- 246. 1985.

FERNANDES, T.C.C. *et al.* **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida Trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas** – testes.Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, para o curso de mestrado de Ciências Biológicas.2005.

FISKEJÓ, G. The *Allium* test as a standard in the environmental monitoring. **Hereditas**. v. 102, p. 99-112. 1985

FISKEJÓ, G. *Allium* Test II: Assesmente of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. *Environmental Toxicology and Water Quality*. v. 9, p. 235-24.1994.

GADANO, A; GURNI, A.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. Genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.v. 17, n.3. 2002.

GOLDONI, A.; SILVA, L. B. Potencial mutagênico do fungicida Mancozebe em *Astyanax jacuhiensis* (Teleostei: Characidae).Biosci J. v. 28, n.2, p. 297-301. 2012.

GRISOLIA, C.K. Agrotóxicos: **Mutações, câncer e reprodução**.Editora UNB.p. 63 – 75. 2005.

HOGSTEDT, B. Micronuclei in lymphocytes with preserve cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. **Mutation Res**, 130: p. 63-72. 1984.

ISKANDAR, O. An improved Method for the Detection of Micronucleus in Human Lymphocytes. **Stain Technol.**, 54, p. 221-223. 1979.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E. S.; KRUATRACHUE, M.; SAHAPHONG, S.; VICHASI-GRAMS, S. & POKETHITIYOOK, P. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science Asia**. v. 28, p. 121-127. 2002.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Bulletin of Marine Pollutants**. v. 42, p. 656 - 666. 2001.

MATSUMOTO, S.T. et al. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, 29: 148-158.2006.

MIRANDA, C.T. **Avaliação ecotoxicológica dos lagos da região de Goiânia**. Monografia apresentada no departamento de Biologia da Pontifícia Católica de Goiás. Goiânia-Goiás. 2009.

NESKOVIC, N.K.; POLEKSIC, V.; ELEZOVIC, I; KARAN, V.; BUDIMIR, M.. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp (*Cyprinus carpio*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.56, p. 295-302. 1996.

NEVES, J.T.. **Avaliação do dano genético em linfócitos de trabalhadores expostos a pesticidas através do teste de micronúcleos**. Dissertação de mestrado em Contaminação e Toxicologia ambientais; Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. 2010.

RAMOS, M.E.S.P. **Biomonitoramento genético de indivíduos expostos ocupacionalmente a pesticidas no povoado de Vila Bessa, município de Conceição de Jacuípe, Bahia**. Tese de doutorado apresentada à coordenação de Pós-graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. 2009.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**. v. 312, n. 1, p. 17 – 24. 1993.

REGISTRO: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) nº 02606.

SOUZA FILHO, J.. **Toxicidade e genotoxicidade do herbicida Roundup Transorb avaliado em Guppy (*Poecilia reticulata*, Cyprinodontiformes, Poeciliidae) em tratamento agudo**. 2011. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Goiás.

TEIXEIRA, R.O.; CAMPAROTO, M.L.; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E.P.. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in vivo assays. **Genet Mol Biol**. v. 26, p. 551-555. 2003.

UMBUZEIRO, G.A. et al . **Estudo da genotoxicidade de amostras da bacia do Ribeirão dos Cristais**. CETESB. São Paulo. 2003.

VENTURA, B.C et al. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida Atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis***

***niloticus* como sistema - teste.** Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” para o curso de mestrado de Ciências biológicas. 2004.

VENTURA, B.C et al..**Avaliação dos efeitos mutagênicos e genotóxicos do Herbicida Atrazina, por meio dos testes de micronúcleos e anormalidades nucleares, utilizando *Oreochromis niloticus* como sistema – teste.** Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” para o curso de mestrado de Ciências biológicas. 2004.

VICENTINI,V.E.P., CAMPAROTO, M.L.; TEIXEIRA, R.O. MANTOVANI, M.S.. Averrhoa carambola L., Syzygium cumini (L.) Skeels and Cissus sicyoides L.: medicinal herbal tea.**Toxicology in vitro.** v. 18, n. 5, p. 617 – 622. 2001.

WHITE, P.A. and RASSMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, 410: p. 223-236. 1998.