

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS APÓS
EXPOSIÇÃO AGUDA E SUBAGUDA AO INSETICIDA
DIFLUBENZURON EM ROEDORES**

ALINE LIMA DE BARROS

**DOURADOS MS
2013**

ALINE LIMA DE BARROS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS APÓS
EXPOSIÇÃO AGUDA E SUBAGUDA AO INSETICIDA
DIFLUBENZURON EM ROEDORES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências da Saúde, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. ARIELLE CRISTINA ARENA.

Co-orientadora: Profa. Dra. CÂNDIDA APARECIDA LEITE KASSUYA.

**DOURADOS MS
2013**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

614.43
B277a Barros, Aline Lima de.
Avaliação dos efeitos toxicológicos após
exposição aguda e subaguda ao inseticida
diflubenzuron em roedores / Aline Lima de Barros –
Dourados-MS : UFGD, 2013.
75 f.

Orientadora: Profa. Dra. Arielle Cristina Arena.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)
Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Aedes aegypti – Controle. 2. Dengue. 3.
Diflubenzuron (inseticida). I. Título.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus, não somos o que éramos.”

Martín Luther King

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me dar forças e sempre estar comigo em momentos difíceis.

Ao meu namorado e melhor amigo Rodrigo... Por ser a pessoa que mais acreditou em mim, que mais me incentivou e sofreu junto comigo... Por ser meu porto seguro em momentos difíceis sempre me acalmando dizendo as seguintes palavras: “fica calma que tudo vai dar certo”... Por me escutar e me dar forças para que pudesse seguir em frente. Te amo muito.

Aos meus pais Maria José e Celso, pelo apoio, confiança e paciência. Muito obrigada por sempre estar ao meu lado. Amo muito vocês.

Ao meu avô Sebastião por estar ao meu lado, sempre se preocupando e me fazendo rir.

As minhas irmãs Magda e Adriana pelo incentivo.

A minha Orientadora Profa. Dra. Arielle Cristina Arena pela oportunidade e confiança concedida mesmo sem me conhecer. Obrigada por sua amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

A minha Co-orientadora Prfa. Dra. Candida Aparecida Leite Kassuya por me apoiar e confiar em meu trabalho, me ajudar quando precisava e pela amizade.

As minhas amigas Lorraine, Gariéla e Alexsandra pela amizade e ajuda mesmo em fins de semana e feriados ... por serem amigas em momentos felizes e tristes. Foi um prazer conhecê-las, todas terão um lugarzinho em meu coração. Adoro vocês.

As minhas amigas de laboratório e congressos, Thaisa, Juci, Kátia, Giseli, Edna, Vanessa e Isabela ... pela ajuda nos experimentos e divertimentos nos congressos ... Quando precisarem pode contar comigo.

Aos técnicos da Faculdade em Ciências da Saúde por me ajudar quando precisei.

Aos professores Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros e Profa. Dra. Silvia Pieta pelas contribuições no trabalho na banca de qualificação.

Aos meus amigos Adriana, Odirley, Marcia, Raphael, Aline e Leandro pelo incentivo e dias de distração e divertimento. Estes dias contribuíram muito para que eu tivesse força para estudar e trabalhar no outro dia. Muito obrigada pela amizade de todos.

Ao Hospital do Coração por ajudar nas análises bioquímicas;

Ao professor Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira da UFMS por ajudar nos experimentos de genotoxicidade;

A Capes pela bolsa concedida.

A empresa Champion Farmoquimico Ltda. pelo apoio a pesquisa através da doação do composto de estudo.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Maria José e Celso e ao meu namorado Rodrigo.

Sumário

Agradecimentos	iv
Dedicatória	vi
Resumo	ix
Abstract	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 AGROTÓXICOS.....	3
2.2 TOXICOLOGIA.....	4
2.2.1. Toxicologia Ambiental.....	4
2.2.2. Toxicidade dos Agrotóxicos.....	6
2.2.3 Toxicidade Reprodutiva.....	8
2.2.4 Genotoxicidade e Mutagênese.....	9
2.3 AGENTES QUÍMICOS UTILIZADOS NO CONTROLE DE <i>Aedes aegypti</i>	12
2.3.1 Diflubenzuron (DFB).....	13
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
ANEXOS A	36
Toxicidade do inseticida diflubenzuron após exposição subaguda em ratos machos adultos	37
RESUMO	38
ABSTRACT	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	41
1. Animais	41
2. Delineamento experimental	42
3. Análises bioquímicas e hematológicas	43
4. Análises histológicas	43

5. Produção espermática diária, número espermático e tempo de trânsito no epidídimo.....	44
6. Morfologia espermática.....	44
7. Análise estatística.....	45
RESULTADOS.....	45
DISCUSSÃO.....	46
AGRADECIMENTOS.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS.....	59
ANEXOS B.....	62
Efeitos genotóxicos e mutagênicos do inseticida Diflubenzuron em camundongos.....	63
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	65
INTRODUÇÃO.....	66
MATERIAL E MÉTODOS.....	67
1 Animais e tratamento.....	67
2 Ensaio Cometa	67
3 Teste do micronúcleo de sangue periférico.....	69
RESULTADOS.....	69
DISCUSSÃO.....	70
AGRADECIMENTOS.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXOS.....	75

Resumo

A dengue é, hoje, uma das principais doenças reemergentes e um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo. Com a ausência de uma vacina eficaz e dificuldades no tratamento, a única alternativa disponível na prevenção da dengue é o combate ao vetor, e, atualmente, a utilização de inseticidas tem sido a principal estratégia de controle das larvas e mosquito adulto do *Aedes aegypti*. Dentre os compostos utilizados para o combate as larvas de *Aedes aegypti* está o diflubenzuron (DFB), um inseticida e acaricida regulador do crescimento de insetos (IRC), da classe das benzoiluréias. Devido à escassez de estudos toxicológicos a respeito deste composto, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos toxicológicos após exposição subaguda ao inseticida DFB, em ratos machos adultos e a genotoxicidade *in vivo*. Para tanto a primeira etapa consistiu em avaliar a toxicidade subaguda e ratos machos adultos (90 dias de idade) receberam, durante 28 dias consecutivos por gavagem, 0; 2; 4 ou 8 mg/kg/dia de DFB (grau técnico; 98% de pureza). Após o tratamento, foram analisados os seguintes parâmetros: aspectos bioquímicos e hematológicos, histopatologia do fígado, rim, testículo e epidídimo, contagem e morfologia espermática. Para o estudo de genotoxicidade camundongos machos Swiss foram divididos em cinco grupos experimentais (n=10 animais/grupo). Um grupo foi tratado com ciclofosfamida por via intraperitoneal (50mg/kg) e o grupo controle recebeu o veículo (1,0 mL/kg de óleo de milho). Os outros três grupos foram tratados com as doses de 0,3, 1 e 3 mg/kg de peso corpóreo de DFB por via oral. O tratamento foi realizado uma única vez e o composto químico foi dissolvido em óleo de milho antes da administração. O ensaio cometa foi realizado coletando sangue da cauda de cada animal 24h após administração do DFB e o teste do micronúcleo após 24, 48 e 72 h do tratamento com o composto. No experimento de toxicidade subaguda nenhum sinal clínico de toxicidade foi observado nos animais dos grupos experimentais durante o tratamento com o DFB. No entanto, observou-se aumento nos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) no grupo que recebeu 8 mg/kg/DFB/dia e de uréia nas doses de 4 e 8 mg/kg/DFB/dia. Por outro lado, não houve alterações significativas nos níveis de aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (δ -GT), creatinina e nos parâmetros hematológicos avaliados. A exposição subaguda a menor dose (2mg/kg) do DFB provocou diminuição significativa no peso do testículo, na produção espermática diária e no número de espermatozoides no epidídimo em relação ao grupo controle. Entretanto, não foram

observadas alterações na histologia do testículo, epidídimo, fígado e rim e na morfologia espermática. No ensaio de genotoxicidade em todas as doses testadas houve aumento significativo de micronúcleos e cometas quando comparado com o grupo controle negativo. A dose de 3mg/kg/DFB foi a que apresentou uma incidência maior de micronúcleos e cometas. Conclui-se que o DFB foi tóxico para o sistema reprodutor masculino de ratos após exposição subaguda e potencialmente genotóxico nestas condições experimentais. Outros estudos devem ser conduzidos a fim de identificar seus possíveis mecanismos tóxicos.

Palavras chaves: Diflubenzuron, toxicidade subaguda, sistema reprodutor, genotoxicidade.

Abstract

Dengue is currently one of the main reemerging diseases and one of the most important public health problems in the world. Without an effective vaccine and difficulties in the treatment, the only available alternative in the prevention of Dengue is to combat the vector and recently the use of insecticides has been the principal strategy in the control of *Aedes aegypti* larvae and adult mosquitoes. Among the compounds used to combat *Aedes aegypti* larvae is diflubenzuron (DFB), an insecticide and acaricide insect growth regulator (IRC), in the benzoylureas class. Due to the lack of toxicological studies about this compound, the present study aimed to evaluate the toxicological effects after subacute exposure to the insecticide DFB, in adult male rats and genotoxicity *in vivo*. For this purpose, the first step was to evaluate the subacute toxicity and adult male rats (90 days old) received for 28 consecutive days by gavage, 0, 2, 4 or 8 mg/kg/day of DFB (technical grade, 98% purity). After the treatment, the following parameters were analyzed: biochemical and hematological aspects, histopathology of liver, kidney, testis and epididymis, sperm morphology and count. For the study of genotoxicity Swiss male mice were divided into five experimental groups (n = 10 animals/group). One group was treated with cyclophosphamide intraperitoneally (50mg/kg) and the control group received the vehicle (1.0 mL/kg of corn oil). The other three groups were treated with the doses of 0.3, 1 and 3 mg/kg of body weight of DFB orally. The treatment was performed only once and the chemical compound was dissolved in corn oil before the administration. The comet assay was performed by collecting blood from the tail of each animal 24 hours after administration of the DFB and the micronucleus test after 24, 48 and 72 h of the treatment with the compound. In subacute toxicity experiment no clinical signs of toxicity were observed in the animals of the experimental groups during treatment with the DFB. However, there was an increase in serum levels of alanine aminotransferase (ALT) in the group treated 8 mg/kg/DFB/day and of urea at doses of 4 and 8 mg/kg/DFB/day. On the other hand, no significant changes were observed in the levels of aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GT- δ), creatinine and hematological parameters evaluated. The subacute exposure to the low-dose (2mg/kg) of DFB caused significant decrease in testis weight, daily sperm production and the number of spermatozoa in the epididymis in the control group. However, no changes were observed in histology of the testis, epididymis, liver and kidney and sperm morphology. In

genotoxicity assay, at all doses tested, there was significant increase of micronucleus and comets when compared with the negative control group. The dose of 3mg/kg/DFB had the higher incidence of micronucleus and comets. It was concluded that the DFB was toxic to the male reproductive system of mice after subacute exposure and potentially genotoxic in these experimental conditions. Further studies should be conducted to identify their possible toxic mechanisms.

Key Words: Diflubenzuron, subacute toxicity, reproductive system, genotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

Diversas substâncias utilizadas na agricultura são agentes teratogênicos, mutagênicos e cancerígenos (Feber & Cabral, 1991; IARC, 1991). A exposição a essas substâncias, em especial aos praguicidas, ocorre não somente por trabalhadores rurais e agricultores que manipulam diretamente estes compostos (exposição ocupacional), mas também, pela população em geral, por meio da ingestão de água e alimentos contaminados (exposição acidental) (Morrison et al., 1992; Weisenburger, 1993).

Nos últimos anos, tem crescido o uso de agrotóxicos nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, e o Brasil assumiu, na última década, o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos (ANVISA & UFPR, 2012). A grande preocupação está na falta de um controle na comercialização e utilização destes compostos, ausência de utilização de equipamentos de proteção individual (EPI), falhas na fiscalização da exposição dos trabalhadores aos agrotóxicos no ambiente de trabalho, e ainda, problemas relacionados a contaminação, onde o diagnóstico e o tratamento não são eficazes (Delgado & Paumgarten, 2004; Londres, 2011). Estudos têm verificado que estes compostos podem ser tóxicos ao homem, podendo causar efeitos nocivos aos Sistemas Nervoso Central (SNC), Periférico (SNP) e Autônomo (SNA), apresentando também atividade imunodepressora, cancerígena, mutagênica, e podem alterar o sistema endócrino e genital (Ecobichon, 1993).

Além dos efeitos toxicológicos sistêmicos provocados pela exposição a químicos ambientais, têm sido observado que o sistema genital também é frequentemente afetado por estes compostos (Xiao et al., 2006). Neste contexto, em paralelo com o aumento do uso dessas substâncias, importantes alterações reprodutivas, entre elas, aumento na incidência de câncer testicular, criptorquidia, hipospádia e um declínio na quantidade e na qualidade espermática têm sido documentadas (Paumgarten, 2003). Vários autores já relataram inúmeras desordens reprodutivas (diminuição da produção espermática, alterações histopatológicas de órgãos reprodutores, redução do potencial de fertilidade) ocasionadas pela exposição a químicos ambientais no homem e em diversos animais (Tan et al., 2002; Fernandes et al., 2007; Arena et al., 2008; Fernandes et al., 2012).

A determinação do potencial genotóxico de poluentes ambientais objetiva determinar os riscos genéticos, não somente dos seres humanos expostos, mas também da

biota nativa de determinado local (Peirce et al., 1998). O “Guidelines for Carcinogen Risk Assessment”, publicada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, aponta as alterações na expressão gênica, reparo do DNA, controle do ciclo celular, instabilidade genômica e danos cromossômicos como as principais consequências da exposição aos agentes ambientais e eventos críticos envolvidos no processo de carcinogênese (Preston, 2007).

A dengue é hoje, uma das principais doenças reemergentes e um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (Teixeira et al., 2005). Com a ausência de uma vacina eficaz e dificuldades no tratamento, a única alternativa disponível na prevenção da dengue é o combate ao vetor, e atualmente, a utilização de inseticidas tem sido a principal estratégia de controle das larvas e mosquito adulto do *Aedes aegypti* (Schaefer et al., 1978; Mekuria et al., 1991; Failloux et al., 1994; Macoris et al., 1995; Guzmán & Kourí, 2002).

O diflubenzuron (DFB), 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea, é um inseticida e acaricida regulador do crescimento de insetos (IRC) que pertence a classe das benzoiluréias. Apresenta DL₅₀ (Dose letal) > 4640 mg/kg para ratos e camundongos por via oral (EHC 184, 1996) e classificação toxicológica de classe IV (pouco tóxico) (ANVISA, 1985) e é utilizado na agricultura, contra insetos predadores, no controle de ectoparasitas de peixes e em programas de saúde pública, no controle de insetos e vetores (Martins, 2004). As benzoiluréias, principais representantes dos IRC, atuam interferindo especificamente na deposição de quitina, um dos compostos da cutícula de insetos (Reynolds, 1987). O mecanismo de ação tóxica destes compostos é sobre formas imaturas (larvas), particularmente durante a ecdise, impedindo o inseto de liberar-se da exocutícula, por não conseguirem secretar endocutícula nova (Silva et al., 2003). Com a elevada utilização de agentes químicos no combate de vetores, vários organismos não-alvo podem ser expostos a estes compostos por meio de contato direto ou através do meio ambiente (Fountaine & Wade-Martins, 2007).

Devido à carência de estudos a respeito dos efeitos toxicológicos do DFB, é de extrema importância analisar sua possível toxicidade. Os resultados obtidos no presente estudo podem fornecer informações importantes para a implementação de políticas governamentais de saúde pública que regularizem sua utilização em níveis seguros para exposição humana. Assim, objetivou-se, no presente estudo, avaliar os efeitos toxicológicos da exposição subaguda ao inseticida DFB em ratos machos adultos e genotoxicidade *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGROTÓXICOS

Durante muito tempo, o controle de pragas da agricultura era feito a partir do uso de agentes químicos, sendo que os primeiros baseavam-se em formulações envolvendo os elementos cobre e arsênio (Veiga et al., 2006). Os agrotóxicos consistem em uma substância ou mistura de substâncias utilizadas com o objetivo de repelir, inibir, prevenir ou destruir qualquer tipo de peste, sendo classificados de acordo com seu mecanismo de ação em: acaricidas, bactericidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, moluscidas, nematocidas e rodenticidas. Estes produtos podem ser utilizados em casas, jardins e na saúde pública para controlar vetores e doenças transmissíveis (Matolcsy, 1988; Manahan, 1993; Baird, 1999).

O emprego dos agrotóxicos na agricultura iniciou-se na década de 20, mas a utilização em larga escala começou a partir da Segunda Guerra Mundial, nos quais eram utilizados como armas químicas (Souza et al., 1988). O Prêmio Nobel foi concedido a Paul Miller em 1940, pela descoberta de propriedades inseticidas do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). A partir deste momento houve um crescimento da manufatura e da utilização de compostos sintéticos para controlar pragas na agricultura (Turk, 1989).

No Brasil, a utilização em larga escala destes compostos iniciou-se a partir da década de 70, especialmente na região Sul, nas monoculturas de soja, trigo e arroz. Atualmente, estes pesticidas são empregados amplamente no controle de pragas e doenças em agriculturas convencionais. Com o passar do tempo, a agricultura mundial cresceu em produtividade e área cultivada, levando a um aumento do uso de agrotóxicos. Estes sofreram modificações em suas moléculas, com o intuito de melhorar as características físico-químicas, provocando também alterações nos perfis toxicológicos e ecotoxicológicos (Armas et al., 2005).

Em 2008, o Brasil assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos, e em 2011, teve uma movimentação de US\$ 8,5 bilhões no mercado nacional. Os herbicidas representaram 45% do total de agrotóxicos comercializados, já os fungicidas e inseticidas responderam por 14% e 12% do mercado nacional, respectivamente, e as demais categorias de agrotóxicos representaram 29% da comercialização (ANVISA & UFPR, 2012). O estado do Mato Grosso é o maior consumidor de agrotóxicos, representando 18,9%,

seguido de São Paulo (14,5%), Paraná (14,3%), Rio Grande do Sul (10,8%), Minas Gerais (9,0%), Goiás (8,8%), Bahia (6,5%), Mato Grosso do Sul (4,7%) e Santa Catarina (2,1%). Os demais estados consumiram 10,4% do total de agrotóxicos do Brasil (IBGE, 2006; SINDAG, 2011; Theisen, 2012).

O uso indiscriminado de agrotóxicos provoca uma série de danos ambientais. A saúde humana pode ser afetada por estes compostos diretamente (exposição ocupacional) ou indiretamente (ingestão de água e alimentos contaminados). A contaminação de áreas próximas a plantações agrícolas pode causar o desequilíbrio dos ecossistemas locais, trazendo uma série de problemas aos habitantes dessas regiões (Peres & Moreira, 2005). Os pesticidas podem apresentar persistência no meio ambiente e seus resíduos podem ser encontrados em águas pluviais, rios, lagos, mares, sedimentos, solos e alimentos, trazendo desta forma, sérios problemas a população e ao meio ambiente (Okumura, 2009).

Existem muitos agrotóxicos que são tóxicos a várias espécies animais, incluindo insetos, moluscos, peixes, aves, mamíferos e até ao homem. Nas últimas décadas, as intoxicações causadas pelos praguicidas tem sido uma preocupação para os países em desenvolvimento. Estima-se que 25 milhões de trabalhadores agrícolas são envenenados a cada ano (Wesseling et al., 2005). Por apresentarem um efeito acumulativo, a exposição direta ou indireta a estes praguicidas pode causar não só intoxicações, mas efeitos teratogênicos, carcinogênicos, genotoxicidade, alterações na fertilidade e distúrbios hormonais (Paige et al., 1999; Aiub et al., 2002; Dahlgren et al., 2004, Pelaez et al., 2004; Menegaux et al., 2006).

Muitos estudos realizados para avaliar os efeitos nocivos dos agrotóxicos têm detectado a presença destes compostos em amostras de sangue humano, leite materno e resíduos em alimentos (Peres et al., 2005). Além do governo brasileiro não dar atenção suficiente para este problema, ainda existe um incentivo para o aumento da produção agrícola, já que a exportação de produtos agropecuários é responsável por 37,86% da balança comercial brasileira (MAPA, 2012). Por este incentivo e pela falta de fiscalização, a exposição a estes compostos pode acarretar sérios problemas ao meio ambiente e a população.

2.2 TOXICOLOGIA

2.2.1. Toxicologia Ambiental

A toxicologia ambiental é uma área da toxicologia que estuda os efeitos adversos de substâncias químicas presentes no ambiente sobre os organismos vivos (Azevedo & Chasin, 2003). Segundo Truhaut (1977), a toxicologia ambiental avalia os efeitos nocivos causados pela interação de contaminantes químicos presentes no ambiente com organismos humanos e o termo ecotoxicologia, proposto primeiramente por René Truhaut, em 1969, é utilizado quando se relaciona os efeitos tóxicos causados por agentes químicos ou físicos sobre os organismos vivos.

Uma das principais formas de contaminação ambiental por agrotóxicos ocorre através do processo de lixiviação - processo pelo qual os contaminantes são transferidos a partir de uma matriz para o meio líquido estabilizado, tal como a água ou outras soluções (Zheng et al., 2012) - destes compostos nos solos, podendo causar contaminação dos lençóis freáticos. Algumas práticas agrícolas, como o uso excessivo e inadequado de agrotóxicos, a destruição da cobertura vegetal dos solos para plantio, a não preservação das matas ciliares e das vegetações protetoras nascentes, dentre outros fatores, são responsáveis por grande parte dos problemas com os recursos hídricos (Zambrone, 2002).

Os resíduos de agrotóxicos, quando presentes na água, dependendo de suas características físico-químicas, podem se ligar ao material particulado em suspensão, depositar-se no sedimento do fundo ou serem absorvidos por organismos, podendo desta maneira, ser detoxificados ou acumulados. O transporte destes resíduos ocorre através do sistema aquático, por difusão nas correntes de água ou nos corpos dos organismos aquáticos. Alguns praguicidas ou seus metabólitos podem também retornar a atmosfera por volatilização, tornando o ar à via de contaminação. A interação contínua dos agrotóxicos entre sedimento e água é influenciada pelo movimento da água, turbulência e temperatura (White & Rasmussen, 1998).

A contaminação de ambientes aquáticos por agrotóxicos ocorre através do escoamento superficial de áreas onde ocorreram aplicações intencionais (Zambrone, 2002). Quando presentes na água, os agrotóxicos podem penetrar nos organismos aquáticos de várias maneiras. O grau de acumulação depende da cadeia alimentar, disponibilidade e persistência do contaminante na água e ainda, de suas características físico-químicas. O acúmulo destes agentes em peixes e invertebrados pode ser maior que as concentrações encontradas nas águas em que vivem. Isto ocorre em devido da capacidade que

determinados compostos tem em se ligar ao material particulado em suspensão e pela ingestão destes compostos pelos organismos aquáticos (White & Rasmussen, 1998).

Para cada agrotóxico existe uma Ingestão Diária Aceitável (IDA), ou seja, quantidade de uma substância química que pode ser ingerida diariamente pelo homem durante toda vida, sem causar dano algum a sua saúde. Este parâmetro, expresso em mg/kg de massa corpórea, é estabelecido após uma longa avaliação toxicológica em animais experimentais (EHC 70, 1987).

A Comissão Codex Alimentarius (CODEX) estabelece os Limites Máximos de Resíduos (LMRs) de agrotóxicos e realiza padronização internacional aplicada aos alimentos negociados no mercado mundial. A presença de grande quantidade de resíduos, de acordo com o CODEX, indica dois aspectos: primeiramente, que houve aplicação inadequada de agrotóxicos na produção e processamento ou armazenagem incorreta do produto, e em segundo lugar, presença de um risco em potencial a saúde do consumidor. Parâmetros como IDA e os cálculos do LMR dos agrotóxicos são estabelecidos por órgãos subordinados às nações Unidas, como: Food and Agricultural Organization (FAO), World Health Organization (WHO) e o CODEX Alimentarius Mundial, através do seu Comitê de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (CCPR) (Vetorazzi & Radaeli-Benvenuti, 1982).

2.2.2. Toxicidade dos Agrotóxicos

A fim de avaliar o potencial toxicológico de substâncias, dentre elas os praguicidas, algumas organizações como Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelecem diretrizes para estudos toxicológicos. Estes guias são divididos de acordo com o tempo de exposição em: toxicidade aguda, subaguda e crônica (OECD, 1998; 2008; ANVISA, 2010). O estudo de toxicidade aguda tem por finalidade identificar efeitos gerados a partir de uma única exposição, como é o caso das intoxicações acidentais, e os testes subagudos e crônicos objetivam detectar efeitos qualitativos ou quantitativos produzidos em decorrência de uma exposição prolongada a uma substância e, também, medir a latência para instalação dos efeitos tóxicos e o acúmulo da substância no organismo (ANVISA, 2010).

A toxicidade dos agrotóxicos nos seres vivos esta diretamente relacionada à sua

estrutura química e concentração utilizada. No meio ambiente, estes compostos podem provocar várias alterações através da interação com organismos vivos, podendo causar desequilíbrios ecológicos, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição. Os impactos provocados pelos praguicidas são geralmente avaliados utilizando biomarcadores, que são divididos em duas abordagens: aquelas associadas aos níveis superiores de organização, como populações, comunidades e ecossistemas ou individualmente; e a que trata de alterações comportamentais, malformações, mudanças nas taxas de crescimento, reprodução, alimentação, alterações bioquímica e fisiológica, que inclui alterações na integridade da membrana celular, no transporte de íons, no metabolismo celular e em atividades enzimáticas (Younes, 2000).

Nos últimos anos, tem crescido o uso de agrotóxicos nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. A grande preocupação está na falta de um controle na comercialização e utilização destes compostos, ausência de utilização de equipamentos de proteção individual (EPI), falhas na fiscalização da exposição dos trabalhadores aos agrotóxicos no ambiente de trabalho e ainda, problemas relacionados a contaminação, onde o diagnóstico e o tratamento não é eficaz (Delgado & Paumgarten, 2004; Londres, 2011). Estudos relatam que estes compostos são tóxicos ao homem, podendo causar efeitos nocivos aos Sistemas Nervoso Central (SNC), Periférico (SNP), Autônomo (SNA) e Endócrino, e podem apresentar atividade imunodepressora, cancerígena, mutagênica, dentre outros efeitos (Ecobichon, 1993).

Os casos de intoxicações, na maioria das vezes, são de agentes de saúde que trabalham no controle de vetores causadores de endemias. Normalmente, estas pessoas não recebem treinamento adequado para manuseio destes compostos, e por falta de informação, acabam trabalhando sem EPI, ficando ainda mais expostos a estes compostos e aumentando os riscos de intoxicação (Cavaliere et al., 1996; Caldas, 2000).

Vários estudos tem avaliado a toxicidade de agrotóxicos em mamíferos. Diuron, um herbicida amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas no cultivo de soja, algodão, cana-de-açúcar, frutas cítricas, trigo e café, demonstrou ser cancerígeno em roedores expostos a 2.500 ppm, por via oral, durante tratamento prolongado. Em ratos Wistar, este composto induziu o desenvolvimento de papiloma urotelial e carcinomas, e fêmeas desenvolveram adenocarcinomas em glândulas mamárias (Iyer, 2002). Çağlar e Kolankaya (2008) avaliaram a toxicidade hepática do herbicida Roundup® (Glifosato, organofosforado), em ratos, nas doses de 56 e 560 mg/kg/dia, durante 5 e 13 semanas, e

observaram infiltração de células mononucleares, apoptose, necrose e edema de alguns hepatócitos indicando toxicidade hepática induzida por este praguicida.

O inseticida fipronil, um praguicida da classe fenilpirazol, amplamente utilizado em diversos cultivos, dentre eles, de cana-de-açúcar, induziu câncer de tireóide em ratos, conforme relatado por Hurley (1998). Em outro estudo, ratos expostos a 10 mg/kg de fipronil durante 28 dias apresentaram efeitos comportamentais relacionados a alterações de neurotransmissores e também hepatotoxicidade e tumefação celular dos hepatócitos (Silva, 2008). Além desses efeitos adversos, verificou-se também que, em doses elevadas (50 mg/kg), este composto pode ser genotóxico (De Oliveira et al. 2008). Esses estudos reforçam cada vez mais a necessidade de avaliação toxicológica dos praguicidas pelos quais os seres vivos estão expostos.

2.2.3 Toxicidade Reprodutiva

A compreensão de como o meio pode interferir de forma positiva ou deletéria na fertilidade torna-se essencial para a manutenção da capacidade reprodutiva. Assim, estudos de toxicidade reprodutiva, tanto em machos quanto em fêmeas, devem ser considerados como parte do processo de avaliação da segurança de compostos químicos, os quais complementam os estudos toxicológicos sistêmicos (Dalsenter et al., 2004).

Os dados resultantes de avaliações toxicológicas de agentes químicos são utilizados com a finalidade de classificá-los e também fornecer informações de seu uso seguro (Neubert & Chahoud, 1995). Como alguns fatores (tempo, espaço, custo e éticos) limitam estudos toxicológicos reprodutivos em humanos, os modelos animais são os mais utilizados para avaliar os efeitos tóxicos de substâncias sobre o sistema genital (Hayes, 1994).

A fertilidade masculina é suscetível à ação de substâncias capazes de reduzir o número de espermatozoides e a qualidade espermática. O homem produz um número limite de espermatozoides necessário para assegurar sua fertilidade (Zenick et al., 1994). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S.EPA, 1996), é considerada infertilidade masculina quando a concentração de espermatozoides estiver abaixo de 20×10^6 por mL de ejaculado.

Vários agentes químicos já demonstraram possuir toxicidade reprodutiva. Dentre estes, podemos citar: Bisfenol A (Yang et al., 2010), Fenvalerato (Arena et al., 2008; Nassr et al., 2010), Metomil (Shalaby et al., 2010), Diclovors (Diricana & Kalender, 2011), Dimetoato (Verma & Mohanty, 2009), Metilmercurio (Silva et al., 2011), Propetamfós (Ismail & AL-Taher, 2011), Glifosato (Romano et al., 2012), dentre outros.

O sistema reprodutor pode sofrer influência de substâncias exógenas, capazes de mimetizar a ação de um hormônio, as quais são denominadas de desreguladores endócrinos (DEs) (Kavlock et al., 1996; Cravedi et al., 2007). Em geral, estas substâncias podem atuar através da ligação a receptores hormonais, interação com enzimas que sintetizam ou metabolizam hormônios, interferir na liberação hipotalâmica-hipofisária de hormônios e/ou alterar a transdução de sinais. Como estes compostos estão presentes tanto na natureza quanto nos alimentos, a exposição humana a esses DEs pode ser por via oral, inalatória ou cutânea (Kavlock et al., 1996).

Diversos trabalhos relatam os efeitos relacionados à exposição aos DEs. Fernandez et al. (2002) observaram o desenvolvimento de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de moluscos, após exposição a compostos orgânicos contendo estanho, tributilestanho (TBT) e trife-nilestanho (TPT) no litoral do Brasil (Rio de Janeiro e Fortaleza). Koifman et al. (2002) realizaram um estudo epidemiológico relacionando a exposição a pesticidas (durante a década de 80) com distúrbios reprodutivos (câncer de mama, ovário e próstata e diminuição do número de espermatozoides no ejaculado) em alguns estados brasileiros. Os resultados destes estudos sugerem que a exposição da população aos pesticidas na década de 80 pode ter sido associada a distúrbios reprodutivos observados uma década depois.

2.2.4 Genotoxicidade e Mutagênese

Alterações no material genético causadas por erros durante a duplicação do DNA são denominadas de mutações (Ribeiro & Marques, 2003). Várias substâncias tem a capacidade de causar esse tipo de alteração. Os agentes mutagênicos podem ser classificados como: agentes de atuação direta, aqueles que possuem atuação diretamente sobre a molécula de DNA; agentes de ação indireta, pois necessitam ser metabolizados para que causem danos; agentes produtores de espécies reativas de oxigênio e agentes inibidores no reparo e na síntese de DNA (Lee & Steinert, 2003). Quando agentes interagem com o DNA ou com seus componentes celulares (fibras do fuso) e enzimas

(topoisomerasas), estes compostos são denominados de genotóxicos. Assim, a genotoxicidade refere-se a capacidade destas substâncias causarem lesões genômicas que são passíveis de correções por vias de reparo do DNA nas células. Diferente da mutagenicidade que causa alterações permanentes no conteúdo ou na estrutura do material genético de um organismo (Dearfield et al., 2002).

Os organismos vivos estão em constante interação com o meio ambiente. Desta forma, seu genoma fica exposto às interferências ambientais. Os compostos utilizados na agricultura para o controle de pragas podem possuir, em sua estrutura, moléculas com poder oxidante. Estas moléculas podem induzir a formação de radicais livres nos sistemas biológicos (Younes, 2000). Os radicais livres são moléculas instáveis que apresentam a capacidade de reagir com estruturas celulares, modificando a estrutura de lipídios e proteínas de membrana, alterando desta maneira, a permeabilidade celular (Andrade Jr., 2005). Quando estas alterações alcançam o núcleo celular e atinge a dupla fita de ácido desoxirribonucléico, pode ocorrer danos no DNA, os quais podem desencadear doenças graves e até o desenvolvimento de câncer (Ferreira, 1997).

A avaliação genotóxica de poluentes ambientais é de grande importância na determinação dos riscos genéticos, não somente dos seres humanos expostos, mas também da biota nativa de determinado local. O estudo das propriedades destes agentes permite avaliar possíveis efeitos hereditários deletérios e até mesmo letais para os organismos (Peirce et al., 1998). O grau de exposição, quantidade, propriedades químicas, possíveis combinações entre os pesticidas e condições ambientais estão diretamente relacionados com o dano citogenético. Desta forma, um nível elevado de exposição associa-se a resultados negativos em relação aos danos citogenéticos e níveis baixos de exposição das populações relacionam-se a resultados positivos. É importante ressaltar que a exposição por um período prolongado, em baixas doses, é cumulativa e também pode induzir tais danos (Bolognesi, 2003).

Atualmente, para determinar o potencial genotóxico de uma substância, são utilizadas metodologias bem definidas e internacionalmente reconhecidas pelas agências regulatórias, como parte de uma bateria de testes recomendada para o registro de novos produtos que entram no mercado mundial. O “Guidelines for Carcinogen Risk Assessment”, publicada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), aponta as alterações na expressão gênica, reparo do DNA, controle do ciclo celular, instabilidade genômica e danos cromossômicos, como as principais consequências da

exposição aos agentes ambientais e eventos críticos envolvidos no processo de carcinogênese (Preston, 2007). Para tais análises utiliza-se algumas metodologias, entre as quais destacam-se, o ensaio cometa *in vivo* e o teste do micronúcleo.

O ensaio cometa, conhecido também como eletroforese de célula única (“Single cell electrophoresis test”), foi descrito primeiramente por Ostling e Johanson, em 1984, a fim de avaliar danos no DNA em condições neutras. Posteriormente, Singh et al. (1988) introduziram uma versão alcalina do teste. Este ensaio ainda sofreu várias modificações e, atualmente, o procedimento mais utilizado é o proposto por Tice et al. (2000). O método em pH neutro detecta apenas quebras de cadeia dupla no DNA, desta forma, o ensaio limita-se somente a estudos que envolvem radiação e compostos químicos radiomiméticos. Assim, o ensaio em pH alcalino oferece maior sensibilidade, pois consegue detectar quebras de fitas simples de DNA em decorrência da abertura das fitas duplas neste pH (Tice, 1995).

Esta técnica é amplamente utilizada em genética toxicológica para detectar danos no DNA em células individuais. O princípio do teste baseia-se na avaliação da migração do DNA em um gel de agarose em condições de eletroforese que, quando observado em microscópio de fluorescência, a célula tem a aparência de um cometa, com a cabeça (região nuclear) e a cauda contendo as fitas ou fragmentos de DNA (Witte et al., 2007). Estas células em cometa podem ser coradas com qualquer corante DNA-específico, sendo os fluorescentes mais utilizados (Hartmann et al., 2001).

O teste do micronúcleo em células da medula óssea e sangue periférico de camundongos têm sido amplamente utilizado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica para avaliar a mutagenicidade dos compostos *in vivo* (Stopper & Muller, 1997; Mateuca et al., 2006). De acordo com Fenech (2000), a técnica do micronúcleo é uma das metodologias citogenéticas bem estabelecidas na área de genética toxicológica. A partir de ambas as técnicas, é possível detectar alterações no DNA e/ou danos no fuso mitótico.

O micronúcleo (MN) é uma pequena massa de cromatina que se encontra separada do núcleo principal, formado durante a telófase da mitose ou meiose, resultante da perda de fragmento (s) de cromossomos acêntricos, que podem ser originados de quebras cromáticas, ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal (Heddle et al., 1983; Fenech et al., 1999). Os micronúcleos podem ser originados espontaneamente, entretanto, existem dois mecanismos predominantes responsáveis pela

sua formação em uma célula mitótica: o primeiro é através de quebras cromossômicas e o segundo, decorrente de disfunção do aparelho mitótico resultante de exposição a agentes mutagênicos (Ford et al., 1988).

Em virtude do que foi exposto, estudos não clínicos de segurança devem ser conduzidos para avaliar a toxicidade dos compostos pelo qual o homem e outros animais possam estar expostos. Os estudos não clínicos de segurança propostos pela ANVISA e os estudos de doses repetidas têm como objetivo, caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração repetida. A partir deles é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, bioquímicas, anatomo e histopatológicas, além de informações sobre a indicação de NOEL (Nível de efeito não observado) e NOAEL (Nível de efeito adverso não observado) (ANVISA, 2010). Desta forma, torna-se de extrema importância realizar testes toxicológicos de substâncias utilizadas no controle de pragas e vetores.

2.3 AGENTES QUÍMICOS UTILIZADOS NO CONTROLE DE *Aedes aegypti*

A dengue é hoje uma das principais doenças reemergentes e um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (Teixeira et al., 2005). Com a ausência de uma vacina eficaz e dificuldades no tratamento, a única alternativa disponível na prevenção da dengue é o combate ao vetor, e, atualmente, a utilização de inseticidas tem sido a principal estratégia de controle das larvas e mosquito adulto do *Aedes aegypti* (Schaefer et al., 1978; Mekuria et al., 1991; Failloux et al., 1994; Macoris et al., 1995; Guzmán & Kourí, 2002).

No Brasil, desde a década de 80, o controle das larvas de *A. aegypti* é realizado utilizando-se o inseticida organofosforado temefós (Abate[®]). Em 1986, em decorrência das epidemias, a utilização deste composto foi intensificada, e em pouco tempo, surgiram casos de resistência das larvas ao temefós em diversas regiões do Brasil. Estes casos de resistência levaram a implantação de programas de monitoramento da suscetibilidade do mosquito aos inseticidas químicos (Andrade & Modolo, 1991; Campos & Andrade, 2001; Polanczyk et al., 2003; Braga et al., 2004; Carvalho et al., 2004; Luna et al., 2004). Nos casos em que é verificada resistência de larvas, este produto é substituído por produtos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) ou Reguladores de Crescimento de Insetos (IGRs), como metopreno e diflubenzuron (Chavasse & Yap, 1997; Campos & Andrade, 2001).

As formas adultas do mosquito são combatidas através da aplicação perifocal e espacial (nebulização), em Ultra Baixo Volume (UBV), de inseticidas organofosforados (malation, fenitroton) e piretróides (cipermetrina e deltametrina). Esta medida passou a ser empregada apenas nos períodos epidêmicos ou na iminência dos mesmos, com o objetivo de reduzir a transmissão viral, como recomendado pela OMS (2003). Entretanto, a redução da população de mosquitos através da utilização de adulticidas é insatisfatória em termos de controle (Chadee, 1990). O uso continuado destes praguicidas pode acelerar o aparecimento da resistência (Montella et al., 2007).

A resistência de alguns vetores a produtos químicos pode ser ocasionada por fatores genéticos e operacionais. Esta resistência genética é inserida em uma população em decorrência do uso elevado de agentes químicos, sendo que quanto mais estes compostos forem utilizados, mais rápido e maior será a seleção de insetos resistentes na população. Fatores operacionais desempenham também um importante papel na inserção da resistência, pois tais procedimentos estão relacionados ao uso de inseticidas (classe, formulação e concentração, método de aplicação, frequência de tratamentos etc.) e como os indivíduos responsáveis pelo manuseio destes produtos não recebem treinamento adequado, seu uso ocorre normalmente de forma indiscriminada (Andrade & Modolo, 1991; Marcoris et al., 1999; Carvalho et al., 2004).

2.3.1 Diflubenzuron (DFB)

Os reguladores de crescimento de insetos são um grupo de inseticidas de nova geração que atuam modificando a morfologia e fisiologia do inseto durante seu desenvolvimento. Esse grupo é mais conhecido pela sigla IGR (Insect Growth Regulator) (Kunz et al., 1977; Mulla et al., 1989; Graf, 1993; Fournet et al., 1997). Os compostos pertencentes a este grupo (IRC) surgiram na década de 70, uma nova geração de inseticidas com ação mais específica e com menor toxicidade aos mamíferos por atuarem seletivamente, impedindo o desenvolvimento e o crescimento do inseto ao invés de intoxicação direta (Silva & Mendes, 2002).

O DFB 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea (Figura 1) é um inseticida e acaricida regulador do crescimento de insetos (IRC), que pertence a classe das benzoiluréias, com classificação toxicológica IV (pouco tóxico) (ANVISA, 1985). As

benzoiluréias, principais representantes dos IRC, atuam interferindo especificamente na deposição de quitina, um dos compostos da cutícula de insetos (Reynolds, 1987). O mecanismo de ação tóxica destes compostos é sobre formas imaturas (larvas), particularmente durante a ecdise, impedindo o inseto de liberar-se da exocutícula, por não conseguir secretar endocutícula nova (Silva et al., 2003).

Análise ultraestrutural revelou deposição anormal de procutículas em insetos após exposição ao DFB (Gijwijt et al., 1979; Grosscurt, 1978; Lim & Lee, 1982; Mulder & Gijswijk, 1973; Verloop & Ferrell, 1977). Além disso, esse composto também evita a formação da matriz peritrófica (PM), a qual protege o epitélio do intestino médio de vários danos (Becker, 1978; Clarke et al., 1977; Soltani, 1984). O mecanismo de ação pelo qual o DFB exerce sua atividade inseticida tem sido alvo de várias investigações. Uma sugestão inicial foi que o DFB inibe a síntese de quitina, pela incorporação de precursores radioativos na cadeia de quitina em crescimento (Clarke & Jewess, 1990; Hajjar & Casida, 1978; Mayer et al., 1980; Post & Vincent, 1973). A quitina é um polímero de $\beta(1,4)$ N-acetilglucosamina, que é sintetizado a partir de precursores de UDP-N-acetilglucosamina pela quitina sintase (CHS), uma proteína integral de membrana pertencente à família das β -glicosil-transferases (Merzendorfer, 2006). Como o domínio catalítico da CHS está localizado na face citoplasmática, a cadeia nascente de quitina tem que ser translocada através da membrana plasmática antes que ela possa ser depositada dentro da cutícula ou PM. O DFB inibe a síntese de quitina apenas em sistemas celulares e teciduais intactos, mas não em frações de membranas solubilizadas (Cohen & Casida, 1980; Kitahara et al., 1983; Mayer et al., 1981; Zimoch et al., 2005). Ele também não bloqueia nenhuma das reações metabólicas que são necessárias para a produção de UDP-N-acetilglucosamina, nem afeta a síntese de quitina em fungos (Cohen, 1987; Verloop & Ferrell, 1977). Baseado nesses e em outros achados, foi sugerido que o DFB não atua diretamente no passo catalítico da síntese de quitina (Cohen, 2001).

Com o tempo, várias hipóteses para o modo de ação do DFB tem sido sugeridas, incluindo os efeitos direto ou indireto na atividade das quitinases, fenoloxidasas, enzimas glicolíticas, e oxidases microssomais, tão bem como nos processos controlados pelos hormônios da muda (DeLoach et al., 1981; Ishaaya & Ascher, 1977; Ishaaya & Cohen, 1974; Mitlin et al., 1977; Soltani et al., 1984). O DFB é estruturalmente similar as sulfoniluréias (SUs), que são usadas no tratamento do diabetes do tipo II em humanos. SUs são conhecidos por se ligarem a receptores de membrana sulfoniluréia (SURs), que atuam

como subunidades reguladoras de um tipo de canal de potássio voltagem-dependente (K_{ir} canal) (Ashcroft, 1988). Estudo mais recente sugeriu que o SUR pode ser alvo para o DFB em insetos (Abo-Elghar et al., 2004). Esta conclusão foi deduzida a partir de ensaios de ligação competitivos com glibenclamida radiomarcado, um composto SU e análogo estrutural do DFB, que foi deslocado do seu local de ligação pela adição de DFB não marcado. Como no caso dos vertebrados, a SUR de insetos pode agir como uma subunidade reguladora de canais de K^+ sensíveis ao ATP (Akasaka et al., 2006). A modulação da atividade de SUR/ K_{ir} pode afetar o potencial de membrana de um modo que a atividade de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes é afetada, alterando a homeostase de Ca^{2+} . Como resultado, a fusão de vesículas dependente de Ca^{2+} , que é necessária para a secreção de proteínas envolvidas na formação de cutícula e PM, pode estar bloqueada. Corroborando com esta hipótese, experimentos de captação de Ca^{2+} realizados com vesículas preparadas a partir de tegumento de *Blattella germanica* demonstrou que a captação de Ca^{2+} pelas vesículas cuticulares isoladas é inibida na presença de glibenclamida ou DFB (Abo-Elghar et al., 2004). Entretanto, o significado deste achado ainda não está claro.

O DFB é utilizado na agricultura (nome comercial Dimilim[®]), contra insetos predadores, no controle de ectoparasitas de peixes e em programas de saúde pública, no controle de insetos e vetores (Martins, 2004). Na agricultura, o DFB pode ser utilizado a partir da aplicação foliar nas culturas de algodão, arroz, citros, fumo, milho, soja, tomate e trigo (ANVISA, 1985).

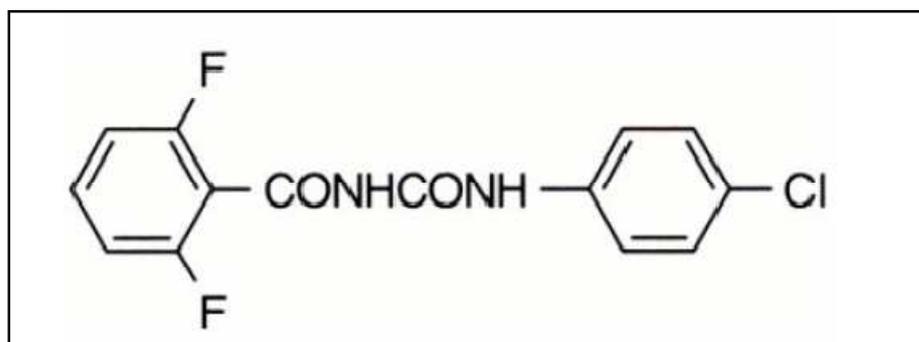


Figura 1 – Fórmula estrutural do DFB (ANVISA, 1985).

Segundo a ANVISA (1985), a Ingestão Diária Aceitável (IDA) deste produto é de 0,02 mg/kg/peso corpóreo, a NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) é de 2 mg/kg

de peso corpóreo e a DL_{50} é > 4640 mg/kg para ratos e camundongos por via oral. Com forma de cristais brancos inodoros, apresenta um ponto de fusão de 230-232 °C, massa molecular de 310,7, possui baixa solubilidade em água (0,2 mg/litro a 20 °C) e é praticamente não-volátil. É relativamente estável em meio ácido e neutro, mas em condições alcalinas, este composto sofre hidrólise. Sua adsorção no solo é rápida (EHC 184, 1996). Em ecossistemas aquáticos tropicais, a persistência do DFB ainda não é bem conhecida, sabe-se apenas que sua adsorção está relacionada com a quantidade de matéria orgânica, pH e temperatura (Fisher & Hall, 1992). Em animais experimentais, o DFB foi absorvido pelo trato digestivo e, em menor escala através da pele, e observou-se uma ampla distribuição nos tecidos, mas sem acumulação nos mesmos. Uma grande proporção do DFB administrado por via oral foi encontrado nas fezes, principal via de eliminação (eliminação acima de 70%, dependendo da dose e tempo de tratamento) (EHC 184, 1996).

A principal via de metabolização do DFB em mamíferos é através da hidroxilação, que pode ocorrer em qualquer uma das três ligações de carbono-nitrogênio. Os principais metabólitos formados em ovinos, suínos e aves são o 2,6-difluorobenzóico e 4-clorofenilureia. Em ratos e gados, 80% dos metabólitos são 6-difluoro-3-hydroxydiflubenzuron, 4-cloro-2-hidroxi-diflubenzuron e 4-cloro-3-hydroxydiflubenzuron. Outro metabólito do DFB é a 4-cloroanilina, entretanto, estudos indicam que pouco ou nenhum deste metabólito é formado em ratos e gados (EHC 184, 1996).

Os limites máximos de resíduos (LMR) do DFB em carnes, recomendados pelo Codex Alimentarius, são: 0,1 mg/kg para vísceras comestíveis e carnes de mamíferos e 0,05 mg/kg para carne de aves domésticas. Para derivados de pescado não há recomendação. Considerando os valores de LMR para o DFB, a quantidade de resíduos detectados nos filés de pacus submetidos aos tratamentos com o inseticida apresentou acima do limite máximo determinado pelo Codex (Winkaler, 2008).

Fisher & Hall (1992), observaram que o DFB apresenta uma baixa toxicidade em peixes. No entanto, outro estudo verificou uma redução no número de eritrócitos e no conteúdo de hemoglobina, diminuição da dor muscular (indicando que o DFB é um inibidor da Acetilcolinesterase - AchE), e alterações hepáticas em peixes (Maduenho & Martinez, 2008). Um dos metabólitos do DFB, 4-cloroanilina, apresenta uma maior toxicidade para peixes do que o produto original (Fisher & Hall, 1992) e foi classificado pelo EPA (Environmental Protection Agency) como um provável carcinógeno humano (U.S.EPA, 1997).

Em estudo realizado por Berczy et al. (1975), ratos foram expostos, diariamente, por 1 hora, ao pó do DFB técnico, nas concentrações de 0, 0,5, 5,0 e 50 mg/litro de ar. As exposições foram repetidas durante um período de 3 semanas por 5 dias/semana. Os níveis de metahemoglobina em ratos, nas duas concentrações mais baixas, foram significativamente superiores aos dos animais controles, mostrando que o DFB pode interferir na fisiologia de animais saudáveis.

Considerando que a dengue é um dos principais problemas de saúde pública, e pelo controle ser através da utilização de praguicidas muitas pessoas estão expostas a este composto de forma direta ou indireta. Como nos últimos anos tem sido verificado casos de resistência de larvas do *Aedes aegypti* ao temefós, o uso de outros inseticidas, como o DFB, tem se tornado alternativa de primeira escolha para o combate da dengue. Assim, em virtude da carência de estudos recentes a respeito dos efeitos toxicológicos do DFB, é de extrema importância analisar a toxicidade sistêmica, reprodutiva e genotóxica deste composto, em ratos machos adultos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos toxicológicos da exposição aguda e subaguda ao inseticida DFB em roedores.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade sistêmica provocada pela exposição subaguda ao DFB, através da análise de sinais clínicos de toxicidade; parâmetros bioquímicos e hematológicos; histopatológico do fígado e rim;
- Avaliar a toxicidade reprodutiva do DFB em ratos machos adultos, através da análise de pesos de órgãos reprodutores, contagem espermática, morfologia espermática e análise histopatológica do testículo e epidídimo;
- Avaliar a genotoxicidade “*in vivo*” do DFB em camundongos através do ensaio cometa e teste do micronúcleo.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abo-Elghar, G. E., Fujiyoshi, P., and Matsumura, F. 2004. Significance of the sulfonylurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis inhibition in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34:743-52.

Aiub, C. A., Coelho, E. C., Sodré, E., Pinto, L. F., and Felzenszwalb, L. 2002 Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genet. Mol. Res.* 1:159-66.

Akasaka, T., Klinedinst, S., Ocorr, K., Bustamante, E. L., Kim, S. K., and Bodmer, R. 2006. The ATP-sensitive potassium (KATP) channel-encoded dSUR gene is required for *Drosophila* heart function and is regulated by tinman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:11999-12004.

Andrade C. F. S., and Modolo, M. 1991. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control. *Rev. Saúde. Publica.* 25:184-87.

Andrade Jr, D. R., Souza, R. B., Santos, S. A., e Andrade, D. R. 2005. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J. Bras. Pneumol.* 31:60-8.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1985. Índice Monográfico. D17 Diflubenzuron. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/af1db28047458f8d98c8dc3fbc4c6735/d17_novo.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2010. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 1:37.

ANVISA and UFPR. 2012. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2012+noticias/seminario+volt>

a+a+discutir+mercado+de+agrotóxicos+em+2012.

Arena, A. C., Fernandez, C. D., Porto, E. M., Bissacot, D. Z., Pereira, O. C., and Kempinas, W. G. 2008. Fenvalerate, a pyrethroid insecticide, adversely affects sperm production and storage in male rats. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 71:1550-8.

Armas, E. D. D., Monteiro, R. T., Amâncio, A. V., Correa, R. M. L., and Guercio, M. A. 2005. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. *Quim. Nova*. 28:975-82.

Ashcroft, F. M. 1988. Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 11:97-118.

Azevedo, F. A., and Chasin, A. M. 2003. *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. São Carlos: Rima e São Paulo: Intertox.

Baird, C. 1999. *Química ambiental*. São Paulo: Bookman.

Becker, B. 1978. Effects of 20-hydroxy-ecdysone, juvenile hormone, Dimilin, and Captan on in vitro synthesis of peritrophic membranes in *Calliphora erythrocephala*. *J. Insect Physiol.* 24:529-33.

Berczy, Z. S., Cobb, L. M., Street, A. E., and Cherry, C. P. 1975. Subacute inhalation toxicity to the rat of DU 112307 insecticide powder. (Evaluation of methaemoglobinaemia). Huntingdon, England, Huntingdon Research Centre (Unpublished proprietary report No. PDR/197/ 741013, submitted to WHO by Solvay Duphar BV, Weesp, The Netherlands).

Bolognesi, C., Bonatti, S., Degan, P., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R., Roggieri, P., and Abbondandolo, A. 2003. Gentoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. *J. Agric. Food Chem.* 45:1957-62.

Braga, I. A., Lima, J. B. P., Soares, S. S., and Valle, D. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99:199-203.

Cağlar, S., and Kolankaya, D. 2008. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25:57-62.

Caldas, L. Q. A. 2000. Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bupiridílicos e piretróides. Centro de Controle de Intoxicações, Niterói, Rio de Janeiro.

Campos, J., and Andrade, C. F. S. 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Rev. Saúde. Publica.* 35:232-36.

Carvalho, M. S. L., Caldas, E. D., Degallier, N., Vilarinhos, P. T. R., Souza, L. C. K. R., Yoshizawa, M. A. C., Knox, M. B., and Oliveira, C. 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide Temephos in the Federal District, Brazil. *Rev. Saúde Pública.* 38:1-6.

Cavaliere, M. J., Calore, E. E., Perez, N. M., and Puga, F. R. 1996. Miotoxicidade por organofosforados. *Rev. Saúde Pública.* 30:267-72.

Chadee, D. D., and Cobert, P. S. 1990. Diel patterns of oviposition indoors of the mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in Trinidad, W.I.: a preliminary study. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 84:79-84.

Clarke, B. S., and Jewess, P. J., 1990. The inhibition of chitin synthesis in *Spodoptera littoralis* larvae by flufenoxuron, teflubenzuron and diflubenzuron. *Pestic. Sci.* 28:377-88.

Clarke, L., Temple, G. H., and Vincent, J. F. 1977. The effects of a chitin inhibitor-dimilin on the production of peritrophic membrane in the locust, *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 23:241-46.

Chavasse, D. C. and Yap, H. H. 1997. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: World Health Organization.

Cohen, E., and Casida, J. E. 1980. Inhibition of *Tribolium* gut chitin synthetase. *Pestic. Biochem. Physiol.* 13:129-36.

Cohen, E. 1987. Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. *Annu. Rev. Entomol.* 32:71-93.

Cohen, E. 2001. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag. Sci.* 57:946-50.

Cravedi, J. P., Zalko, D., Savouret, J. F., Menuet, A., and Jégou, B. 2007. The concept of endocrine disruption and human health. *Med. Sci.* 23:198-204.

Dahlgren, J. G., Takhar, H. S., Ruffalo, C. A., and Zwass, M. 2004. Health effects of diazinon on a family. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 42:579-91.

Dalsenter, P. R., Cavalcanti, A. M., Andrade, A. J., Araújo, S. L., and Marques, M. C. 2004. Reproductive evaluation of aqueous crude extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in Wistar rats. *Reprod. Toxicol.* 18:819-23.

De Oliveira, P. R., Bechara, G. H., and Camargo-Mathias, M. I. 2008. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. *Food Chem. Toxicol.* 46:2459-65.

Dearfield, K. L., Cimino, M. C., Mc Carroll, N. E., and Mauer, I., Valcovic, L. R. 2002. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutat. Res.* 521:121-35.

Delgado, I. F., and Paumgartten, F. J. R. 2004. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do município de Pati do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 20:180-6.

DeLoach, J. R., Meola, S. M., Mayer, R. T., and Thompson, J. M. 1981. Inhibition of DNA synthesis by diflubenzuron in pupae of the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 15:172-80.

Diricana, E. K., and Kalender, Y. 2011. Dichlorvos-induced testicular toxicity in male rats and the protective role of vitamins C and E. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64:821-30.

Ecobichon, D. J. 1993. Toxic effects of pesticides. In Casarett and Doull's *Toxicology - The basic science of poisons*, 4th Edition, M. O. Amdur, J. Doull, and C. D. Klaassen (eds.). McGraw-Hill, Inc, New York, New York.

EHC. Environmental Health Criteria 184. 1996 Diflubenzuron. United Nations Environment Programme International Labour Organisation. Geneva: World Health Organization.

EHC. Environmental Health Criteria 70. 1987. Principles for safety assessment of food additives and contaminants in food. Geneva: World Health Organization.

Failloux, A. B., Ung, A. Raymond, M., and Pasteur, N. 1994. Insecticide susceptibility in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from French Polynesia. *J. Med. Entomol.* 31:639-44.

Feber, A. and Cabral, R. 1991. Toxic epidemics caused by alimentary exposure to pesticides: a review. *Food Addit. Contam.* 8:755-76.

Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E., and Bonassi, S. 1999. The human micronucleus project an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 428:2712-83.

Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 455:81-95.

Fernandes, G. S. A., Arena, A. C., Fernandez, C. D., Mercadante, A., Barbisan, L. F., and Kempinas, W. G. 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod. Toxicol.* 23:106-12.

Fernandes, G. S. A., Favareto, A. P. F., Fernandez, C. D. B., Bellentani, F. F., Arena, A. C., Grassi, T. F., Kempinas, W. G., and Barbisan, L. F. 2012. Effects of diuron on male rat reproductive organs: a developmental and postnatal study. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 75:1059-69.

Fernandez, M. A., Limaverde, A. M., Castro, I. B., Almeida, A. C. M., and Wagener, A. L. R. 2002. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. *Cad. Saúde Pública*. 18:463-76.

Ferreira, A. L. A., and Matsubara, L. S. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Bras*. 4:61-8.

Fisher, S. A., and Hall, L. W. 1992. Environmental concentrations and aquatic toxicity data on diflubenzuron (Dimilin). *Crit. Rev. Toxicol*. 22:45-79.

Ford, J. H., Schultz, C. J., and Correll, A. T. 1988. Chromosome elimination in micronuclei: a common cause of hypoploidy. *Am. J. Hum. Genet*. 43:733-40.

Fountaine, T. M., and Wade-Martins, R. 2007. RNA interference-mediated knockdown of alpha-synuclein protects human dopaminergic neuroblastoma cells from MPP(+) toxicity and reduces dopamine transport. *J. Neurosci. Res*. 85:351-63.

Fournet, F., Sannier, C., and Monteny, N. 1997. Effects of two insect growth regulators on the susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to *Molinema dessetae* (Nematoda: Filarioidea). *J. Am. Mosq. Control Assoc*. 13:40-2.

Gijwijt, M. J., Deul, D. H., and DeJong, B. J. 1979. Inhibition of chitin synthesis by benzoylphenylurea insecticides. III. Similarity in action in *Pieris brassicae* (L.) with polyoxin-D. *Pestic. Biochem. Physiol*. 12:87-94.

Graf, J. F. 1993. The role of insect growth regulators in arthropod control. *Parasitol. Today*. 9:471-74.

Grosscurt, A. C. 1978. Effect of diflubenzuron on mechanical penetrability, chitin formation, and structure of the elytra of *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Insect Physiol.* 24: 827-31.

Guzmán, M. G., and Kourí, G. 2002. Dengue: an update. *Lancet. Infect. Dis.* 2:33-42.

Hajjar, N. P., and Casida, J. E. 1978. Insecticidal benzoylphenyl ureas: structure-activity relationships as chitin synthesis inhibitors. *Science*. 200:1499-500.

Hartmann, A., Kiskinis, E., Fjaellman, A., and Suter, W. 2001. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* 497:199-212.

Heddle, J.A., Hite, M., and Kirkhart, B. 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 123:61-118.

Hayes, A.W. 1994. *Principles and methods of toxicology*. New York: Raven Press.

Hurley, P. M. 1998. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ. Health Perspect.* 106:437-45.

IARC. International Agency for Research on Cancer. 1991. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Occupational Exposures in Insecticide Application, and Some Pesticides. 53:48.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2006. Censo agropecuário do Brasil, 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>.

Ismail, M., and AL-Taher, A. Y. 2011. Effect of propetamphos on the male rats reproductive system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31:333-8.

Ishaaya, I., and Ascher, K. 1977. Effect of diflubenzuron on growth and carbohydrate hydrolases of *Tribolium castaneum*. *Phytoparasitica.* 5:149-58.

Ishaaya, I., and Casida, J. E. 1974. Dietary TH-6040 alters cuticle composition and enzyme activity of housefly larval cuticle. *Pestic. Biochem. Physiol.* 4:484-90.

Iyer, P. 2002. Evidence on the developmental and reproductive toxicity of diuron draft. Reproductive and cancer hazard assessment section, 43. Sacramento: Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA), California Environmental Protection Agency.

Kavlock, R. J., Daston, G. P., De Rosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T., and Tilson, H. A. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104:715-740.

Kitahara, K., Nakagawa, Y., Nishioka, T., and Fujita, T. 1983. Cultured integument of *Chilo suppressalis* as a bioassay system of insect growth regulators. *Agric. Biol. Chem.* 47:1583-89.

Koifman, S., Koifman, R. J., Meyer, A. 2002. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Cad. Saúde Pública.* 18:435-45.

Kunz, S. E., Harris, R. L., Hogan, B. F., and Wright, J. E. 1977. Inhibition of development in a population of horn flies treated with diflubenzuron. *J. Econ. Entomol.* 70:298-301.

Lee, R.F., and Steinert, S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* 544:43-64.

Lim, S. J., and Lee, S.S. 1982. The toxicity of diflubenzuron on *Oxya japonica* (Willemse) and its effect on moulting. *Pestic. Sci.* 13:537-44.

Londres, F. 2011. *Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida*. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa.

Luna, J. E. D., Martins, M. F., Anjos, A. F., Kuwabara, E. F., and Navarro-Silva, M. A. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Rev. Saúde Pública.* 38:842-43.

Macoris, M. L. G., Camargo, M. F., Silva, I. G., Takaku, L., and Andrighetti, M. T. 1995. Modificação da suscetibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao temephos. *Rev. Patol. Trop.* 24:31-40.

Macoris, M. L. G., Andrighetti, M. T. M., Takaku, L., Glasser, C. M., Garbeloto, V. C., and Cirino, V. C. B. 1999. Alteração de resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública.* 33:521-22.

Maduenho, L. P., and Martinez, C. B. R. 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Com. Pharmacol. Toxicol.* 148:265-72.

Manahan, S. E. 1993. *Fundamentals of environmental chemistry*. Boca Raton: Lewis Publishers.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2012. Estatísticas e Dados Básicos de Economia Agrícola Janeiro/2012. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/Estatistica/Estat%C3%ADticas%20e%20Dados%20B%C3%AAsicos%20de%20Economia%20Agr%C3%ADcola/Pasta%20Janeiro-2012.pdf>.

Martins, M. L. 2004. Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aquicultura brasileira. In: Ranzani-Paiva, M. J. T., Takemoto, R. M., Lizama, M.A.P. (Eds.), *Sanidade de Organismos aquáticos*. São Paulo: Varela.

Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I., and Kirschvolders, M. 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*. 88: 1515-31.

Matolcsy, G. 1988. *Pesticide chemistry*. Amsterdam: Elsevier.

Mayer, R. T., Chen, A. C., and DeLoach, J. R. 1980. Characterization of a chitin synthase from the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (L.). *Insect Biochem*. 10:549-56.

Mayer, R. T., Meola, S. M., and DeLoach, J. R. 1981. Chitin synthesis inhibiting insect growth regulators do not inhibit chitin synthetase. *Experientia*. 37:337-38.

Mekuria, Y., Gwinn, T. A., Williams, D. C., and Tidwell, M. A. 1991. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* from Santo Domingo Dominican Republic. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 79:69-72.

Menegaux, F., Baruchel, A., Bertrand, Y., Lescoeur, B., Leverger, G., Nelken, B., Sommelet, D., Hémon, D., and Clavel, J. 2006. Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukaemia. *Occup. Environ. Med.* 63:131-4.

Merzendorfer, H. 2006. Insect chitin synthases: a review. *J. Comp. Physiol. B.* 176:1-15.

Mitlin, N., Wiygul, G., and Haynes, J. W., 1977. Inhibition of DNA synthesis in boll weevils (*Anthonomus grandis bohemian*) sterilized by dimilin. *Pestic. Biochem. Physiol.* 7:559-63.

Montella, I. R., Martins, A. J., Viana-Medeiros, P. F., Lima, J. B. P., Braga, I. A., and Valle, D. 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77:467-77.

Morrison, H. I., Wilkins, K., Semenow, R., Mao, Y., and Wigle, D. 1992. Herbicides and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 84:1866-74.

- Mulder, R., and Gijswijk, M. T. 1973. The laboratory evaluation of two promising new insecticides which interfere with cuticle formation. *Pestic. Sci.* 4:737-45.
- Mulla, M. S., Darwazeh, H. A., and Schreiber, E. T. 1989. Impact of new insect growth regulators and their formulations on mosquito larval development in impoundment and floodwater habitats. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5:15-20.
- Nassr, A. C., Arena, A. C., Toledo, F. C., Bissacot, D. Z., Fernandez, C. D., Spinardi-Barbisan, A. L., Pires, P. W., and Kempinas, W. G. 2010. Effects of gestational and lactational fenvalerate exposure on immune and reproductive systems of male rats. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 73: 952-64.
- Neubert, D., and Chahoud, I. 1995. Possible consequences of pre – or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. *Endocrinol. Chemical Environ.* 3:24-52.
- OECD. 1998. Organisation for Economic Co-operation and Development. In: *CHEMICALS, O. G. F. T. T. O. (Ed.). Guideline 408: Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents.* Paris: Head of Publications Service.
- OECD. 2008. Organisation for Economic Co-operation and Development. In: *CHEMICALS, O. G. F. T. T. O. (Ed.). Guideline 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents.* Paris: Head of Publications Service.
- OECD. 2008. Organisation for Economic Co-operation and Development In: *CHEMICALS, O. G. F. T. T. O. (Ed.). Guideline 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP)* Paris: Head of Publications Service.
- Okumura, F. 2009. Estudo voltamétrico e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para determinação do inseticida fipronil utilizando o eletrodo compósito de grafite-

poliuretana. Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos. 97 p.

OMS. 2003. Organização Mundial de Saúde. Guidelines for dengue surveillance and mosquito control. Geneva: Regional Office for the Western Pacific, OMS.

Ostling, O., and Johanson, K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res. Commun.* 123:291-98.

Paige, J. C., Tollefson, L., and Miller, M. A. 1999. Health implications of residues of veterinary drugs and chemicals in animal tissues. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 15:31-43.

Paumagartten, F. 2003. Adverse health consequences of environmental exposure to 'endocrine disruptors'. *ARBS Annu. Rev. Biomed. Sc.* 5:45-55.

Peirce, J. J., Weiner, R. F., and Vesilind, P. A. 1998. Meteorology and Air Pollution. In: *Environmental Pollution and Control*. Boston: Butterworth-Heinemann.

Pelaez, S., Hierro, I. Oña, S., Alonso, L., and Matilla, A. 2004. Relationship between pesticide exposure and low-grade superficial bladder urothelial carcinoma. *Med. Clin. (Barc)*. 123:571-4.

Peres F., and Moreira J. C. 2003. *É veneno ou é remédio?* Rio de Janeiro: Fiocruz.

Peres, F., Silva, J. J. O., Della-Rosa, H. V., and Lucca, S. R. 2005. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. *Ciênc. saúde coletiva.* 10:27-37.

Polanczyk, R., Garcia, M. O., and Alves, S. B. 2003. Potencial de *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Rev. Saúde Pública.* 37:813-16.

Post, L. C., and Vincent, W. R. 1973. A new insecticide inhibits chitin synthesis. *Naturwissenschaften*. 60:431-32.

Preston, R. J. 2007. Epigenetic processes and cancer risk assessment. *Mutat. Res.* 616:7-10.

Reynolds, S. E. 1987. The cuticle, growth regulators and moulting in insects: the essential background to the action of acylurea insecticides. *Pestic. Sci.* 20:131-46.

Ribeiro, L. R., and Marques, E. K. 2003. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F., and Marques, E. K. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra.

Romano, M. A., Romano, R. M., Santos, L. D., Wisniewski, P., Campos, D. A., Souza, P. B., Viau, P., Bernardi, M. M., Nunes, M. T., and Oliveira, C. A. 2012. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Arch. Toxicol.* 86:663-73.

Schaefer, C. H., Miura, T., Wilder, W. H., and Mulligan, F.S. 1978. New substituted benzamides with promising activity against mosquitoes. *J. Econ. Entomol.* 71: 427-30.

Shalaby M. A., El Zorba, H. Y., and Ziada, R. M. 2010. Reproductive toxicity of methomyl insecticide in male rats and protective effect of folic acid. *Food Chem. Toxicol.* 48:3221-6.

Silva, A. S. 2008. Efeitos neurocomportamentais da exposição prolongada de ratos ao fipronil. Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas Área de Toxicologia Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo. 108 p.

Silva, D. A. F., Teixeira, C. T., Scarano, W. R., Favareto, A. F., Fernandez, C. D., Grotto, D., Babosa, F., and Kempinas, W. G. 2011. Effects of methylmercury on male reproductive functions in Wistar rats. *Reprod. Toxicol.* 31:431-9.

Silva, J.J., and Mendes, J. 2002. Effect of diflubenzuron on stages of *Hematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gerais, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97:679-82.

Silva, M. T. B., Costa, E. C., and Boss, A. 2003. Control of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with insect growth regulators. Cienc. Rural. 33:601-05.

SINDAG. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. 2011. Vendas de defensivos agrícolas são recordes e vão a US\$ 8,5 bilhões em 2011. Disponível em: http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2256.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. 175:184-91.

Soltani, N., Besson, M. T., and Delachambre, J. 1984. Effects of diflubenzuron on the pupal-adult development of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae): growth and development, cuticle secretion, epidermal cell density, and DNA synthesis. Pest Biochem. Physiol. 21:256-64.

Soltani, N. 1984. Effects of ingested diflubenzuron on the longevity and the peritrophic membrane of adult mealworms (*Tenebrio molitor* L.). Pestic. Sci. 15:221-25.

Souza, N. E. D., Rubira, A. F., Matsushita, M., and Tanamati, A. 1988. Residues of organochloric pesticides in environmental samples (water and soils) in Maringá - PR Arq. biol. tecnol. 31:587-94.

Stopper, H., and Muller, S. O. 1997. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A mini review. Toxicol. In Vitro. 11:661-7.

Tan, L. F., Wang, S. L., Sun, X. Z., Li, Y. N., Wang, Q. L., Ji, J. M., Chen, L. S., and Wang, X. R. 2002. Effects of fenvalerate exposure on the semen quality of occupational workers. Zhonghua Nan Ke Xue. 8:273-6.

Teixeira, M. G., Costa, M. C. M., Barreto, M. L., Mota, E. 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences?. *Cad. Saúde Pública*. 21:1307-15.

Theisen, G. 2010. O mercado de agroquímicos. Disponível em: www.cpact.embrapa.br/eventos/2010/met/palestras/28/281010_Painel3_Giovani_THEISEN.pdf.

Tice, R. R. 1995. The single cell gel comet assay: a microgel electrophoretic technique for detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips DH, Venit S., editors. *Environmental Mutagenesis*: Oxford: Bios. Scientific Publishers.

Tice, R. R., Agurell, E.,; Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., and Sasaki, Y. F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen*. 35:206-21.

Truhaut, R. 1977. *Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1:151-173.

Turk, J. *Introduction to environmental studies*. 1989. Philadelphia: Saunders College.

U.S. EPA. Environmental Protection Agency. 1996. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. *Federal Register*. 61:56274-322.

U.S. EPA. Environmental Protection Agency. 1997. Reregistration Eligibility Decision - Diflubenzuron. Washington, DC: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, U.S. EPA.

Veiga, M. M., Silva, D. M., Veiga, L. B. E., and Mauro Velho de Castro Faria, M. V. C. 2006. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 22:2391-99.

Verloop, A., and Ferrell, C. D. 1977. Benzoylphenyl ureas - a new group of larvicides interfering with chitin deposition. In: Plimmer, J.R., (Ed.), *Pesticide Chemistry in the 20th Century*. ACS Symp. Ser. Am. Chem. Soc., Washington, DC, pp. 237-70.

Verma, M. R., and Mohanty, B. 2009. Early-life exposure to dimethoate-induced reproductive toxicity: evaluation of effects on pituitary-testicular axis of mice. *Toxicol. Sci.* 112:450-8.

Vettorazzi, G., and Radaelli-Benvenuti, B.M. 1982. *International regulatory aspects for pesticides chemicals*. Boca Raton: CRC Press.

Weisenburger, D. 1993. Human health effects of agrichemical use. *Hum. Pathol.* 24:571-6.

Wesseling, C., Corriols, M., and Bravo, V. 2005. Acute pesticide poisoning and pesticide registration in Central America. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207:697-705.

White, P. A., and Rasmussen, J. B. 1998. The Genotoxic Wastes in Surface Waters. *Mutat. Res.* 410: 223-36.

Winkaler, E. U. 2008. Aspectos ecotóxicológicos dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Programa de Pós-graduação em Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 67p.

Witte, I., Plappert, U., de Wall, H., and Hartmann, A. 2007. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part III: the comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity testes for early drug candidate selection. *Toxicol. Sci.* 97:21-6.

Xiao, H., Zhang, X. C., Zhang, L., Dai, X. Q., Gong, W., Cheng, J., Gao, R., and Wang, X. 2006. Fenvalerate modifies T-type Ca²⁺ channels in mouse spermatogenic cells. *Reprod. Toxicol.* 21:48-53.

Yang, Y., Lee, S., Kim, K., and Hong, Y. 2010. Acute testis toxicity of bisphenol A diglycidyl ether in sprague-dawley rats. *J. Prev. Med. Public Health.* 43:131-37.

Younes, M., and Galal-Gorchev, H. 2000. Pesticides in drinking water--a case study. *Food Chem. Toxicol.* 38:87-90.

Zambrone, F. A. D. 2002. SINTOX: Sistema de Informação Toxicológica. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002, p.243. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/cict.oque.estrut.dect/sintox.kitbrasil.html>>.

Zenick, H., Clegg, E. D., Perreault, S. D., Klinefelter, G. R., and Gray, L. E. 1994. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach, in *“Principles and methods of toxicology”*. New York: Raven.

Zheng, S. A., Zheng, X., and Chen, C. 2012. Leaching behavior of heavy metals and transformation of their speciation in polluted soil receiving simulated acid rain. *Plos One.* 7:49664.

Zimoch, L., Hogenkamp, D. G., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S., and Merzendorfer, H. 2005. Regulation of chitin synthesis in the larval midgut of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35:515-27.

ANEXOS A

Artigo 1 Este trabalho deu origem ao artigo “**Toxicidade do inseticida diflubenzuron após exposição subaguda em ratos machos adultos**” que, após versado para o inglês, será submetido para o periódico “Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A”.

**Toxicidade do inseticida diflubenzuron após exposição subaguda em
ratos machos adultos**

Aline Lima de Barros¹, Gabriela Finoto Cavalheiro¹, Cândida Aparecida Leite Kassuya¹,
Arielle Cristina Arena^{1,2*}.

¹Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)-
Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho (UNESP)- Botucatu, São Paulo, Brasil.

*** Autor de correspondência:**

Arielle Cristina Arena

Departamento de Morfologia- Instituto de Biociências de Botucatu

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Distrito de Rubião Junior, S/N

Caixa Postal – 510; CEP: 18618970; Botucatu - SP

Tel: + 55 14 38800495;

E-mail: ariellearena@ibb.unesp.br

Título reduzido: Efeitos tóxicos do diflubenzuron em ratos machos

RESUMO

No Brasil, o controle das larvas de *Aedes aegypti* é realizado utilizando-se alguns pesticidas, entre eles, o diflubenzuron (DFB), um inseticida e acaricida regulador do crescimento de insetos (IRC), da classe das benzoiluréias. Devido à carência de avaliações toxicológicas desse composto, objetivou-se, no presente estudo, avaliar os efeitos toxicológicos (sistêmicos e reprodutivos) da exposição subaguda ao inseticida DFB, em ratos machos adultos. Ratos machos adultos foram expostos, por via oral (gavage), a 0; 2; 4 ou 8 mg/kg de DFB, durante 28 dias. Nenhum sinal clínico de toxicidade foi observado nos animais dos grupos experimentais durante o tratamento com o DFB. No entanto, observou-se aumento nos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) no grupo que recebeu 8 mg/kg/DFB/dia e de uréia nas doses de 4 e 8 mg/kg/DFB/dia. Por outro lado, não houve alterações significativas nos níveis de aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (δ -GT), creatinina e nos parâmetros hematológicos avaliados. A exposição subaguda a menor dose (2mg/kg) do DFB provocou diminuição significativa no peso do testículo, na produção espermática diária e no número de espermatozoides no epidídimo em relação ao grupo controle. Entretanto, não foram observadas alterações na histologia do testículo, epidídimo, fígado e rim e na morfologia espermática. Conclui-se que o DFB apresenta toxicidade reprodutiva em ratos, após exposição subaguda. Outros estudos devem ser conduzidos a fim de identificar seus possíveis mecanismos tóxicos.

Palavras-chaves: Diflubenzuron, Toxicidade subaguda, Sistema genital masculino, Ratos

ABSTRACT

In Brazil, the control of *Aedes aegypti* larvae is performed using some pesticides, among them, the diflubenzuron (DFB), an insecticide and acaricide insect growth regulator (IRC), from the class of benzoylureas. Due to lack of toxicological assessments of this compound, the objective of the present study was to evaluate the toxicological effects (systemic and reproductive) of subacute exposure to the insecticide DFB, in adult male rats. Adult male rats were exposed, by oral route (gavage) at 0, 2, 4 or 8 mg/kg of DFB for 28 days. No clinical signs of toxicity were observed in the animals of the experimental groups during the treatment with DFB. However, there was an increase in serum levels of alanine aminotransferase (ALT) in the group that received 8 mg/kg/DFB/day and urea at doses of 4 and 8 mg/kg/DFB/day. On the other hand no significant changes in the levels of aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GT- δ), creatinine and hematological parameters evaluated. The subacute exposure to the lowest dose (2mg/kg) of DFB caused significant decrease in testis weight, daily sperm production and the number of spermatozoa in the epididymis in the control group. However, no alterations were observed in the testicular, epididymis, liver and kidney histology and spermatid morphology. In conclusion, the DFB presented reproductive toxicity in rats after the subacute exposure. Further studies should be conducted to identify its possible toxic mechanisms.

Keywords: Diflubenzuron, Sub acute toxicity, Male genital system, Rats

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as intoxicações causadas por praguicidas tem sido uma preocupação para os países em desenvolvimento. Estima-se que 25 milhões de trabalhadores agrícolas são envenenados a cada ano (Wesseling et al. 2005). A exposição direta ou indireta a essas substâncias pode causar não só intoxicações, mas efeitos teratogênicos e/ou carcinogênicos, genotóxicos, alterações na fertilidade e distúrbios hormonais (Paige et al. 1999; Aiub et al. 2002; Dahlgren et al. 2004; Pelaez et al. 2004; Menegaux et al. 2006).

Atualmente o uso de praguicidas não se restringe ao meio rural, mas também são utilizados nos centros urbanos para o controle de vetores, como o da dengue. A dengue é hoje uma das principais doenças reemergentes e um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (Teixeira et al. 2005). Com a ausência de uma vacina eficaz e dificuldades no tratamento, a única alternativa disponível na prevenção da dengue é o combate ao vetor, e, atualmente, a utilização de inseticidas tem sido a principal estratégia de controle de larvas e mosquitos adultos do *Aedes aegypti* (Schaefer et al. 1978; Mekuria et al. 1991; Failloux et al. 1994; Macoris et al. 1995; Tauil 2002; Guzmán and Kourí 2002).

No Brasil, o controle das larvas de *Aedes aegypti* é realizado utilizando-se alguns pesticidas, entre eles, o Diflubenzuron (DFB), 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea, um inseticida e acaricida regulador do crescimento de insetos (IRC), da classe das benzoiluréias, que atua interferindo na deposição de quitina, um dos compostos da cutícula de insetos (Reynolds 1987). O mecanismo de ação tóxica deste composto é sobre formas imaturas (larvas), particularmente durante a ecdise, impedindo o inseto de liberar-se da exocutícula, por não conseguir secretar endocutícula nova (Silva et al. 2003). Este

composto é utilizado na agricultura, contra insetos predadores, no controle de ectoparasitas de peixes e em programas de saúde pública, no controle de insetos e vetores (EHC 184 1996; Martins 2004).

Em contraste com sua ampla utilização, um dos metabólitos do DFB, a 4-chloroaniline foi classificada pela United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1997) como um provável carcinógeno humano, o que aponta para a necessidade de estudos toxicológicos. Estudos com diversas espécies de peixes indicam que o DFB apresenta baixa toxicidade (Fisher & Hall 1992), enquanto outros mostram efeitos adversos após exposição a esse pesticida (Maduenho & Martinez 2008). No entanto, poucos estudos toxicológicos foram realizados utilizando roedores como modelo experimental, e os que são encontrados são muito antigos. Em um dos estudos conduzidos, ratos expostos, por 3 semanas (1 hora/dia; 5 dias/semana) ao DFB técnico, nas concentrações de 0, 0,5, 5,0 ou 50 mg/litro/ar, apresentaram níveis de metahemoglobina, nas duas concentrações menores, significativamente superiores aos dos animais controles (Berczy et al. 1975). Esses resultados indicam que o DFB pode interferir com a homeostase dos organismos expostos, o que reforça a necessidade de mais avaliações toxicológicas desse composto. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos toxicológicos da exposição subaguda ao inseticida DFB em ratos machos adultos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Ratos machos adultos Wistar (n=32; 90 dias de idade, pesando aproximadamente 300 - 350g), provenientes do biotério da Universidade Federal da Grande Dourados

(UFGD), foram mantidos em gaiolas coletivas (4 animais/gaiola), sob condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (23°C), recebendo água e ração comercial à vontade. Os animais utilizados neste estudo foram mantidos de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal adotados pelo Colégio Brasileiro em Experimentação Animal e aprovado pela Comiê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Grande Dourados (Protocolo n. 001/2012, de 26/01/2012).

2. Delineamento experimental

Os estudos de toxicidade foram conduzidos de acordo com a Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) - Protocolo 407 e o guia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (OECD 2008; ANVISA 2010).

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais (n=8 animais/grupo). Três grupos foram tratados com Diflubenzuron 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea (Champion Farmoquímica Ltda, grau de pureza de 98%), nas doses de 2, 4 ou 8 mg/kg de peso corpóreo. O quarto grupo recebeu apenas o veículo (1,0 mL/kg de óleo de milho) e serviu como Controle. As doses selecionadas foram determinadas a partir da NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) do composto que é 2mg/kg de peso corpóreo por dia (EHC 184 1996). A partir desta dose, utilizou-se mais 2 doses, 4 mg/kg (NOAEL X 2) e 8 mg/Kg (NOAEL X 4). Os tratamentos foram realizados diariamente, por gavagem, durante 28 dias consecutivos. O composto químico foi dissolvido em óleo de milho antes da administração. Diariamente, durante todo o experimento, foram avaliados os possíveis sinais clínicos de toxicidade, através da avaliação do peso corporal, consumo de água e ração e presença de outras alterações como diarreia, piloereção, sangramentos e irritabilidade.

3. Análises bioquímicas e hematológicas

Após o tratamento, os animais dos grupos experimentais foram pesados e anestesiados (quetamina e xilasina, 25 e 10 mg/kg, respectivamente). Para a análise bioquímica, o sangue foi coletado da veia cava inferior em tubos sem anticoagulante e o soro foi obtido após centrifugação a 1200 rpm por 20 minutos. O soro obtido foi utilizado para dosagem de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (δ -GT), uréia e creatinina. Os parâmetros bioquímicos avaliados foram determinados através do equipamento semi-automático Bioplus Bio200, utilizando *kits* Gold Analise.

Para a análise hematológica, amostras de sangue foram coletadas em tubo com anticoagulante (Heparina sódica 5.000 UI/mL, Heparin[®] - Cristália) e os seguintes parâmetros hematológicos foram avaliados: número de eritrócitos, leucócitos e plaquetas (método manual), concentração de hemoglobina (método colorimétrico), hematócrito (método microhematócrito), cálculo dos índices eritrocitométricos (volume corpuscular médio - VCM, hemoglobina corpuscular média - HCM, concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM) e contagem diferencial de leucócitos (extensão sanguínea corada com May-Grünwald/Giemsa) (Paina et al. 2008).

4. Análises histológicas

Os animais foram submetidos à eutanásia e os órgãos reprodutores (testículo, epidídimo, ducto deferente direito, próstata e vesícula seminal) e vitais (fígado e rim direito) foram removidos e pesados (peso absoluto e relativo ao peso corporal). Amostras

desses órgãos foram fixadas em solução de formol a 10% tamponado (tampão fosfato 10 mM, pH 7,4) e processadas para estudo histopatológico em microscopia de luz. As peças foram incluídas em blocos de parafina, seccionadas à 5µm, coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e observadas em microscópio de luz para avaliação histopatológica geral.

5. Produção espermática diária, número espermático e tempo de trânsito no epidídimo

Espermátides resistentes a homogeneização (estágio 19 da espermiogênese) e espermatozoides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram contados, conforme descrito previamente por Robb et al. (1978), com adaptações adotadas por Fernandes et al. (2007). Resumidamente, cada testículo esquerdo, descapsulado e pesado logo após a coleta, foi homogenizado em 5 mL de NaCl 0,9% contendo Triton X-100 0,5%. Após diluição de 10 vezes a amostra foi transferida para câmaras de Neubauer (4 campos por animal), precedendo a contagem de espermátides maduras. Para o cálculo da produção diária de espermatozoides (PDE) o número de espermátides no estágio 19 foi dividido por 6,1, que é o número de dias do ciclo seminífero em que estas espermátides estão presentes no epitélio seminífero.

Da mesma forma, porções da cabeça/corpo e cauda epididimária foram cortadas em pequenos fragmentos com tesoura e homogenizadas, e procedeu-se a contagem de espermatozoides como descrito para o testículo. O tempo de trânsito de espermatozoides através do epidídimo foi determinado pela divisão do número de espermatozoides em cada porção pela PDE.

6. Morfologia espermática

O ducto deferente direito dos animais foi seccionado nas extremidades anterior e posterior, e lavado com o auxílio de uma agulha e seringa, com 1 mL de formol salina. Foram realizados esfregaços em lâminas histológicas, e 200 espermatozoides por animal foram avaliados em microscopia de luz (aumento 400 X). As anormalidades morfológicas encontradas nos espermatozoides foram classificadas em anormalidades de cabeça e anormalidades de cauda (Filler 1993).

7. Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para a comparação dos resultados entre os grupos experimentais foram utilizados os testes estatísticos de análise de variância – ANOVA seguidos do teste de Tukey-Kramer para avaliar possíveis diferenças entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Nenhuma mudança no consumo de água, ração ou comportamental (diarréia, piloereção, sangramento, tremores, convulsões, lacrimação) foi observada nos animais durante os 28 dias de tratamento com DFB (dados não mostrados). Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa no peso corporal ou peso absoluto e relativo de órgãos reprodutores e vitais dos animais tratados com DFB em nenhuma dose testada em relação ao grupo controle. No entanto, os animais tratados com 2 mg/kg/DFB/dia apresentaram diminuição significativa no peso absoluto e relativo do testículo (Tabela 1).

O tratamento dos animais com DFB levou a um aumento nos níveis de ALT apenas no grupo que recebeu 8 mg/kg de DFB, enquanto os níveis de uréia apresentaram-se elevados nos animais tratados com 4 e 8 mg/kg do praguicida. Os demais parâmetros avaliados (AST, creatinina e δ -GT) não diferiram entre os grupos (Tabela 2). Adicionalmente, o perfil hematológico (glóbulos vermelhos (RBC), contagem total e diferencial de leucócitos, volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM), hematócrito, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e plaquetas dos animais tratados com DFB mostraram-se similares ao grupo controle (Tabela 3).

Em relação aos parâmetros espermáticos, houve uma diminuição significativa na PDE e na Produção Diária Espermática Relativa (PDEr) nos animais que receberam a menor dose (2 mg/kg) de DFB (Tabela 4). Observou-se também, neste grupo, uma diminuição significativa no número relativo de espermátides no testículo e de espermatozóides na cauda do epidídimo (Tabela 4). Por outro lado, não observou-se diferenças significativas nos demais parâmetros avaliados entre os grupos experimentais.

A análise morfológica dos espermatozóides extraídos do ducto deferente mostrou que as porcentagens de formas normais (Controle = 89,5%; 2mg/kg = 86,5%; 4mg/kg = 85,5%; 8mg/kg = 82,5%, $n=8$) e anormais foram similares entre os grupos. Da mesma forma, as análises histopatológicas do testículo, epidídimo, fígado e rim não revelaram alterações morfológicas relacionadas ao tratamento (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

Tendo em vista que a dengue hoje é um dos principais problemas de saúde pública (Teixeira et al. 2005), e pela principal forma de controle ser através da utilização de

inseticidas (dentre eles, o DFB), muitas pessoas estão expostas a esses compostos, de forma direta ou indireta (Peres & Moreira 2003). Este estudo demonstra pela primeira vez que o pesticida DFB pode ser tóxico ao sistema reprodutor masculino após exposição subaguda.

A mortalidade é um sinal claro de toxicidade induzida por uma substância, mas além deste parâmetro, outras variáveis como, perda de massa corporal e a presença de sinais clínicos de toxicidade (diarréia, piloereção, variações no comportamento, sangramento) durante o tratamento podem ser observadas (OECD 1996). O tratamento subagudo indicou que o DFB, nas doses de 2, 4 e 8 mg/kg/dia, não acarretou morte de nenhum dos animais testados ou sinais clínicos de toxicidade. Da mesma forma, após o tratamento, não houve alteração no peso corporal ou peso de órgãos vitais dos animais tratados.

O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de compostos endógenos e exógenos, e, portanto, é também um dos primeiros órgãos-alvo de ação tóxica de xenobióticos ou de seus metabólitos reativos (Szachowicz-Petelska et al. 2012). Níveis séricos de AST, ALT, δ -GT, são alguns dos biomarcadores mais sensíveis para dano hepático, pois são liberados na circulação após dano intracelular (Ozer et al. 2008). Elevados níveis de AST e ALT tem sido relacionados a necrose hepática, hepatite e toxicidade hepática (Aguwa et al. 2004; Utoh-Nedosa et al. 2009). No presente estudo, a exposição subaguda ao DFB levou a um aumento significativo de ALT no grupo que recebeu a maior dose, sem afetar os níveis de AST e δ -GT. Entretanto, este aumento não apresenta significado clínico. De acordo com Giknis & Clifford (2006), o valor encontrado no presente trabalho está dentro da normalidade para ratos saudáveis com esta idade (os valores de ALT variam de 27.00 a 46.00 U/L). Além disso, a histologia do fígado não foi

afetada pelo tratamento e não houve alterações nos níveis de AST e δ -GT, sugerindo que o tratamento subagudo não provocou hepatotoxicidade.

Outro órgão sensível a ação de diversas substâncias é o rim. Sua função pode ser avaliada mediante a análise de uréia plasmática e níveis de creatinina (Stark 1980). Alterações na concentração de creatinina no soro refletem mudanças na taxa de filtração glomerular em relação a alterações na concentração de uréia (Griffin et al. 2008). Observou-se que os animais tratados com 4 e 8mg/kg de DFB apresentaram aumento significativo nos níveis de uréia, sem alterações nos níveis de creatinina. Entretanto como a histologia do rim não foi afetada, outros parâmetros (como dosagem de eletrólitos no soro - sódio, potássio e cloreto) devem ser analisados para melhor avaliar a toxicidade renal do DFB.

O sistema hematopoiético é um dos alvos mais sensíveis para substâncias tóxicas e a avaliação e seus parâmetros são de grande importância para determinar o “status” fisiológico e patológico em homens e animais (Li et al. 2010). Após as análises hematológicas, observou-se que os valores de hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de plaquetas, eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos nos animais tratados foram similares ao grupo controle, indicando que o DFB não proporcionou efeitos negativos nas células sanguíneas circulantes ou na sua produção.

Vários estudos têm sido realizados a fim de se avaliar a toxicidade reprodutiva de agrotóxicos em mamíferos. Dentre os praguicidas que induzem toxicidade reprodutiva estão: Dimetoato (Verma and Mohanty 2009), Fenvalerato (Arena et al. 2008; Nassr et al. 2010), Diclofóros (Diricana and Kalender 2011), Propetamfós (Ismail and AL-Taher 2011), Glifosato (Romano et al. 2012), dentre outros. Estudos de toxicidade reprodutiva devem ser conduzidos como parte do processo de avaliação da toxicidade de qualquer composto, o que complementa os testes de toxicidade sistêmica (Dalsenter et al. 2004). Um dos

protocolos da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) recomenda avaliações de toxicidade reprodutiva associada com a administração de doses repetidas (OECD 1996). Dessa forma, avaliaram-se neste estudo, alguns parâmetros bem validados em toxicologia reprodutiva.

Alterações no peso úmido de órgãos da reprodução (andrógeno-dependentes), tais como testículo, epidídimo, vesícula seminal e próstata são usadas como parâmetros para indicar mudanças nos níveis de hormônios sexuais (Zenick et al. 1994). Em machos adultos normais, o peso absoluto do testículo é preferencialmente escolhido, pois o peso deste órgão e o peso corporal são variáveis independentes. No presente estudo, verificou-se que animais expostos a menor dose de DFB apresentaram diminuição significativa no peso absoluto e relativo do testículo em relação ao grupo controle. Estes efeitos podem estar relacionados com a menor produção espermática do testículo discutida abaixo.

Neste estudo, apenas a menor dose de DFB provocou diminuição na produção espermática e no número de espermátides no testículo e de espermatozóides no epidídimo, importantes indicadores de fertilidade masculina (Ashby et al. 2003). Essa alteração foi consistente com a redução no peso do testículo observada neste grupo, indicando uma toxicidade testicular deste composto. No entanto, a morfologia espermática e a histologia do testículo e epidídimo não foram afetadas pelo tratamento.

É interessante notar que todas as alterações reprodutivas foram observadas nos animais que receberam a menor dose de DFB. Uma possível explicação para isto pode ser devido ao fato de que substâncias químicas denominadas de desreguladores endócrinos (DEs) podem ter efeitos em baixas doses, os quais não são preditos em doses altas. Isto pode ocorrer porque os efeitos de hormônios e DEs são dependentes da dose, e baixas doses (fisiológicas) podem ser mais efetivas em alterar alguns parâmetros comparado com altas doses (tóxicas) (Vandenberg et al. 2012). O efeito de baixas doses pode ser definido

como qualquer alteração biológica que ocorre em doses mais baixas do que aquelas normalmente utilizadas em protocolos de ensaios padronizados, isto é, inferiores às doses testadas em toxicologia tradicional.

Uma das explicações para que os hormônios endógenos apresentem seus efeitos em baixas doses pode estar na concentração hormonal que influencia na ocupação do receptor. As concentrações acima da constante de dissociação para o receptor-ligante e cinética de ligação, provoca primeiramente uma saturação da resposta e depois em concentrações mais elevadas, a saturação dos receptores é observado (Vandenberg et al. 2012). Neste sentido, já foram relatados que muitos compostos, tais como fenobarbital, bisfenol A e dietilestilbestrol podem induzir uma curva em U de dose-resposta (Calabrese & Baldwin 2003; Kinoshita et al. 2003). Dessa forma, com os dados do presente estudo, podemos sugerir que o DFB poderia induzir a curva U de dose-resposta, já que este inseticida apresentou efeitos tóxicos reprodutivos apenas na menor dose testada.

Pode-se concluir, que o DFB apresenta toxicidade reprodutiva subaguda, já que importantes parâmetros reprodutivos foram afetados. Entretanto, outros estudos devem ser conduzidos a fim de confirmar essa hipótese e poder identificar os possíveis mecanismos tóxicos desse composto. Os resultados desse estudo servem de incentivo para que pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos compostos de combate ao vetor sejam realizadas com a finalidade de buscar substâncias que possuam uma menor toxicidade e maior seletividade para o organismo alvo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, e a empresa Champion Farmoquímica LTDA pela disponibilização do inseticida DFB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguwa, C. N., and Aguiyi, J. C. Liver disease. 2004. In: Aguwa C. N. *Therapeutic basis of clinical pharmacy in the tropics*. Enugu, Nigeria: SNAAP Press Ltd.

ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. 1985. Índice Monográfico. D17 Diflubenzuron. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/af1db28047458f8d98c8dc3fbc4c6735/d17_novo.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0.

ANVISA. 2010. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 1:37.

Aiub, C. A., Coelho, E. C., Sodré, E., Pinto., L. F., and Felzenszwalb, L. 2002. Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genet. Mol. Res.* 1:159-66.

Arena, A. C., Fernandez, C. D., Porto, E. M., Bissacot, D. Z., Pereira, O. C., and Kempinas, W. G. 2008. Fenvalerate, a pyrethroid insecticide, adversely affects sperm production and storage in male rats. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 71:1550-8.

Ashby, J., Tinwell, H., Lefevre, P. A., Joiner, R., and Haseman, J. 2003. The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisphenol A between postnatal days 91-97. *Toxicol. Sci.* 74:129-38.

Berczy, Z. S., Cobb, L. M., Street, A. E., and Cherry, C. P. 1975. Subacute inhalation toxicity to the rat of DU 112307 insecticide powder. (Evaluation of methaemoglobinaemia). Huntingdon, England, Huntingdon Research Centre (Unpublished proprietary report No. PDR/197/ 741013, submitted to WHO by Solvay Duphar BV, Weesp, The Netherlands).

Calabrese, E. J., and Baldwin, L. A. 2000. Chemical hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis. *Hum. Exp. Toxicol.* 19:2-31.

Dahlgren, J. G., Takhar, H. S., Ruffalo, C. A., and Zwass, M. 2004. Health effects of diazinon on a family. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 42:579-91.

Dalsenter, P. R., Cavalcanti, A. M., Andrade, A. J., Araújo, S. L., and Marques, M. C. 2004. Reproductive evaluation of aqueous crude extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in Wistar rats. *Reprod. Toxicol.* 18:819-23.

Diricana, E. K., and Kalender, Y. 2011. Dichlorvos-induced testicular toxicity in male rats and the protective role of vitamins C and E. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64:821-30.

EHC. Environmental Health Criteria 184. 1996. Diflubenzuron. World Health Organization: Geneva.

Failloux, A. B., Ung, A., Raymond, M., and Pasteur, N. 1994. Insecticide susceptibility in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from French Polynesia. *J. Med. Entomol.* 31:639- 44.

Fernades, G. S., Arena, A. C., Fernandez, C. D., Mercadante, A., Barbisan, L. F., and Kempinas, W. G. 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod. Toxicol.* 23:106-12.

Filler, R. 1993. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In: Chapin, R.E., Heindel, J.J. *Methods in Toxicology: Male Reproductive Toxicology.* Academic Press, San Diego.

Fisher, S. A., and Hall, L. W. 1992. Environmental concentrations and aquatic toxicity data on diflubenzuron (Dimilin). *Crit. Rev. Toxicol.* 22:45-79.

Guzmán, M. G., and Kourí, G. 2002. Dengue: an update. *Lancet. Infect. Dis.* 2:33-42.

Griffin, K. A., Kramer, H., and Bidani, A. K. 2008. Adverse renal consequences of obesity. *AJP - Renal Physiol.* 294:685-96.

Ismail, M., and AL-Taher, A. Y. 2011. Effect of propetamphos on the male rats reproductive system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31:333-8.

Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Shen, J., Imaoka, S., Funae, Y., and Fukushima, S. 2003. Phenobarbital at low dose exerts hormesis in rat hepatocarcinogenesis by reducing oxidative DNA damage, altering cell proliferation, apoptosis and gene expression. *Carcinogenesis.* 24:1389-99.

Li, X., Luo, Y., Wang, L., Li, Y., Shi, Y., Cui, Y., and Xue, M. 2010. Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 131:110-5.

Macoris, M. L. G., Camargo, M. F., Silva, I. G., Takaku, L., and Andrighetti, M. T. 1995. Modificação da suscetibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao temephos. *Rev. Patol. Trop.* 24:31-40.

Maduenho, L. P., and Martinez, C. B. R. 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Com. Pharmacol. Toxicol.* 148:265-72.

Martins, M. L. 2004. Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aquicultura brasileira. In: Ranzani-Paiva, M. J. T., Takemoto, R. M., Lizama, M.A.P. (Eds.), *Sanidade de Organismos aquáticos*. São Paulo: Varela.

Mekuria, Y., Gwinn, T. A., Williams, D. C., and Tidwell, M. A. 1991. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* from Santo Domingo Dominican Republic. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 79:69-72.

Menegaux, F., Baruchel, A., Bertrand, Y., Lescoeur, B., Leverger, G., Nelken, B., Sommelet, D., Hémon, D., and Clavel, J. 2006. Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukaemia. *Occup. Environ. Med.* 63:131-4.

Nassr, A. C., Arena, A. C., Toledo, F. C., Bissacot, D. Z., Fernandez, C. D., Spinardi-

Barbisan, A. L., Pires, P. W., and Kempinas, W. G. 2010. Effects of gestational and lactational fenvalerate exposure on immune and reproductive systems of male rats. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 73:952-64.

OECD. 1996. Organisation for Economic Co-operation and Development. In: CHEMICALS, O. G. F. T. T. O. (Ed.). Guideline 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. Paris: Head of Publications Service.

OECD. 2008. Organisation for Economic Co-operation and Development. In: CHEMICALS, O. G. F. T. T. O. (Ed.). Guideline 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Paris: Head of Publications Service.

Ozer, J., Ratner, M., Shawc, M., Bailey, W., and Schomaker, S. 2008. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*. 245:194-205.

Paige, J. C., Tollefson, L., and Miller, M.A. 1999. Health implications of residues of veterinary drugs and chemicals in animal tissues. *Vet. Clin. North. Am. Food .Anim. Pract.* 15:31-3.

Pelaez, S., Hierro, I. Oña, S., Alonso, L., and Matilla, A. 2004. Relationship between pesticide exposure and low-grade superficial bladder urothelial carcinoma. *Med. Clin. (Barc)*. 123:571-4.

Peres F., and Moreira J. C. 2003. *É veneno ou é remédio?*. Fiocruz: Rio de Janeiro.

Reynolds, S. E. 1987. The cuticle, growth regulators and moulting in insects: the essential background to the action of acylurea insecticides. *Pestic. Sci.* 20:131-46.

Robb, G. W., Amman, R. P., and Killian, G. J. 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.* 54:103-07.

Romano, M. A., Romano, R. M., Santos, L. D., Wisniewski, P., Campos, D. A., Souza, P. B., Viau, P., Bernardi, M. M., Nunes, M. T., and Oliveira, C. A. 2012. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Arch. Toxicol.* 86:663-73.

Schaefer, C. H., Miura, T., Wilder, W. H., and Mulligan, F.S. 1978. New substituted benzamines with promising activity against mosquitoes. *J. Econ. Entomol.* 71:427-30.

Silva, M. T. B., Costa, E. C., and Boss, A. 2003. Control of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with insect growth regulators. *Cienc. Rural.* 33:601-05.

Stark, J. L. 1980. BUN/creatinine: your keys to kidney function. *Nursing.* 10:33-8.

Szachowicz-Petelska, B., Dobrzynska, I., Skrzydlewska, E., and Figaszewski, Z. 2012. Protective effect of blackcurrant on liver cell membrane of rats intoxicated with ethanol. *J. Membrane Biol.* 245:191-200.

Tauil, P. L. 2002. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 18:867-71.

Teixeira, M. G., Costa, M. C. M., Barreto, M. L., Mota, E. 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences?. *Cad. Saúde Pública*. 21:1307-15.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. 1997. Reregistration Eligibility Decision - Diflubenzuron. Washington, DC: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, U.S. EPA.

Utoh-Nedosa, A. U., Akah, P. A., Okoye, T. C., and Okoli, C. O. 2009. Evaluation of the toxic effects of dihydroartemisinin on the vital organs of Wister Albino rats. *Am. J. Pharm. Toxicol.* 4:169-73.

Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs Jr., D. R., Lee, D., Shioda, T., Soto, A. M., Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., and Myers, J. P. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev.* 33:378-455.

Verma, M. R., and Mohanty, B. 2009. Early-life exposure to dimethoate-induced reproductive toxicity: evaluation of effects on pituitary-testicular axis of mice. *Toxicol. Sci.* 112:450-8.

Wesseling, C., Corriols, M., and Bravo, V. 2005. Acute pesticide poisoning and pesticide registration in Central America. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207:697-705.

Zenick, H., Clegg, E. D., Perreault, S. D., Klinefelter, G. R., and Gray, L. E. 1994. "Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach", in "Principles and methods of toxicology", (W. Hayes, ed.) Raven: New York.

ANEXOS

Tabela 1 . Peso corporal final e pesos absoluto e relativo de órgãos vitais e da reprodução de ratos machos adultos dos grupos controle e expostos a 2, 4 e 8 mg/kg de DFB durante 28 dias.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle (n=8)	2mg/kg (n=8)	4mg/kg (n=8)	8mg/kg (n=8)
Peso Corporal (g)	333.88 ± 9.92	313 ± 10.75	309.75 ± 7.51	304.13 ± 8.60
Testículo (g)	1.48 ± 0.05	1.30 ± 0.03 *	1.43 ± 0.03	1.38 ± 0.03
Testículo (g/100g)	0.44 ± 0.01	0.39 ± 0.01*	0.43 ± 0.01	0.41 ± 0.01
Epidídimo (mg)	523.75 ± 14.38	547.5 ± 16.66	551.88 ± 15.63	539.88 ± 7.74
Epidídimo (mg/100g)	157.77 ± 5.96	164.79 ± 6.26	166 ± 6.37	163.38 ± 3.22
Ducto Deferente (mg)	102.50 ± 5.59	95.00 ± 7.31	92.50 ± 7.25	93.75 ± 5.32
Ducto Deferente (mg/100g)	32.16 ± 1.89	28.40 ± 2.48	31.34 ± 4.11	28.24 ± 1.84
Vesícula Seminal (g)	1.17 ± 0.10	1.23 ± 0.11	1.35 ± 0.08	1.02 ± 0.08
Vesícula Seminal (g/100g)	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.40 ± 0.03	0.34 ± 0.02
Próstata (mg)	367.17 ± 18.27	345.92 ± 19.57	359.50 ± 10.06	380.60 ± 22.41
Próstata (mg/100g)	110.91 ± 5.43	104.18 ± 5.30	104.65 ± 3.14	113.59 ± 10.13
Fígado (g)	9.91 ± 0.53	9.59 ± 0.39	10.68 ± 0.35	11.24 ± 0.34
Fígado (g/100g)	2.91 ± 0.10	2.98 ± 0.13	3.04 ± 0.07	3.20 ± 0.06
Rim (g)	1.04 ± 0.06	1.00 ± 0.02	1.15 ± 0.04	1.17 ± 0.02
Rim (g/100g)	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.004	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.008

Valores expressos como média±erro padrão da média. *p<0,05 indicam que os grupos diferem estatisticamente em relação ao grupo controle.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos avaliados após exposição subaguda ao DFB.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	2mg/kg	4mg/kg	8mg/kg
AST	68.33 ± 2.33	68.33 ± 1.58	68.66 ± 4.55	69.16 ± 4.39
ALT	22.83 ± 0.98	23.50 ± 0.95	27.00 ± 0.44	28.66 ± 1.80*
δ-GT	1.00 ± 0.00	0.16 ± 0.16	0.50 ± 0.22	0.33 ± 0.21
Uréia	21.83 ± 2.35	27.00 ± 3.55	35.83 ± 1.30*	32.83 ± 1.40*
Creatinina	0.48 ± 0.03	0.43 ± 0.04	0.58 ± 0.03	0.55 ± 0.02

Valores expressos como média±erro padrão da média, com n=6 animais em cada grupo.
*p<0,05 indicam que os grupos diferem estatisticamente em relação ao grupo controle.

Tabela 3. Parâmetros hematológicos avaliados após exposição subaguda ao DFB.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	2mg/kg	4mg/kg	8mg/kg
Hm (x10 ⁶)mm ³	5.08 ± 0.08	5.13 ± 0.07	4.98 ± 0.10	5.10 ± 0.13
Hb (g/dL)	15.26 ± 0.26	15.16 ± 0.47	14.66 ± 0.40	14.49 ± 0.49
Ht (%)	45.83 ± 0.83	45.50 ± 1.43	44.00 ± 1.21	43.50 ± 1.47
VCM	90.15 ± 0.15	87.87 ± 2.46	88.30 ± 1.59	85.34 ± 2.06
HCM	30.03 ± 0.03	29.42 ± 0.68	29.39 ± 0.55	28.38 ± 0.69
CHCM	33.28 ± 0.01	33.30 ± 0.00	33.25 ± 0.03	33.21 ± 0.03
Plaquetas (x10 ³ /μL)	140.00 ± 14.37	150.00 ± 14.83	161.67 ± 17.20	174.00 ± 21.11
Leucócitos totais	6.18 ± 0.44	5.78 ± 0.50	7.17 ± 1.17	5.93 ± 0.58
Linfócitos (%)	70.83 ± 1.07	76.50 ± 2.50	75.66 ± 2.59	68.50 ± 1.89
Eosinófilo (%)	0 ± 00,00	0 ± 00,00	0 ± 00,00	0 ± 00,00
Basófilo (%)	0 ± 00,00	0 ± 00,00	0 ± 00,00	0 ± 00,00
Monócito (%)	5.50 ± 0.22	3.66 ± 0.61	1.66 ± 0.66	1.80 ± 0.58
Neutrófilos (%)	23.83 ± 1.04	22.33 ± 1.35	24.83 ± 1.99	29.66 ± 1.78

Valores expressos como média±erro padrão da média, com n=6 animais em cada grupo.
*p<0,05 indicam que os grupos diferem estatisticamente em relação ao grupo controle.

Tabela 4. Parâmetros espermáticos avaliados em animais adultos dos grupos controle e expostos a 2, 4 e 8 mg/kg de DFB durante 28 dias.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	2mg/kg	4mg/kg	8mg/kg
Produção espermática diária (x 10 ⁶ /testículo/dia)	31.71 ± 1.28	22.98 ± 1.14***	27.20 ± 0.73	27.57 ± 1.62
Produção espermática diária (x 10 ⁶ /g/testículo/dia)	24.39 ± 1.21	19.49 ± 1.00 **	21.57 ± 0.69	24.16 ± 0.71
Número relativo de espermátides no testículo (x 10 ⁶)	146.73 ± 7.22	119.84 ± 6.39*	131.44 ± 4.25	142.94 ± 4.29
Número absoluto de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo (x 10 ⁶)	75.26 ± 4.56	67.62 ± 4.42	62.00 ± 3.49	62.34 ± 4.63
Número relativo de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo (x 10 ⁶)	292.14 ± 11.25	246.45 ± 12.84	258.09 ± 8.63	247.50 ± 17.21
Tempo de trânsito na cabeça/corpo do epidídimo (dias)	2.62 ± 0.32	3.00 ± 0.28	2.29 ± 0.12	2.37 ± 0.23
Número absoluto de espermatozoides na cauda do epidídimo (x 10 ⁶)	136.42 ± 8.38	111.22 ± 6.52	124.84 ± 13.10	133.70 ± 4.20
Número relativo de espermatozoides na cauda do epidídimo (x 10 ⁶)	715.00 ± 27.46	565.78 ± 18.19*	600.97 ± 57.58	666.07 ± 27.62
Tempo de trânsito na cauda do epidídimo (dias)	4.40 ± 0.26	4.94 ± 0.44	4.69 ± 0.59	5.01 ± 0.30

Valores expressos como média±erro padrão da média, com n=7 ou 8 animais em cada grupo. * p<0,05, **p<0,01 e *** p<0,001 indicam que os grupos diferem estatisticamente em relação ao grupo controle.

ANEXOS B

Artigo 2 Este trabalho deu origem ao artigo “**Efeitos genotóxicos e mutagênicos do inseticida Diflubenzuron em camundongos**” que após versado para o inglês, será submetido para o periódico Experimental and Toxicologic Pathology na forma short communications”.

Efeitos genotóxicos e mutagênicos do inseticida Diflubenzuron em camundongos

Aline Lima de Barros¹, Vanessa Vilamaior de Souza¹, Stephanie Dynczki Navarro³,
Rodrigo Juliano Oliveira⁴, Cândida Aparecida Leite Kassuya¹, Arielle Cristina Arena^{1,2*}.

¹Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)-
Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho (UNESP)- Botucatu, São Paulo, Brasil.

³Discente Programa de Mestrado em Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
(CCBS), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

⁴Docente da Universidade Federal de Mato grosso do Sul

*** Autor de correspondência:**

Arielle Cristina Arena

Departamento de Morfologia- Instituto de Biociências de Botucatu

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Distrito de Rubião Junior, S/N

Caixa Postal – 510; CEP: 18618970; Botucatu - SP

Tel: + 55 14 38800495;

E-mail: ariellearena@ibb.unesp.br

RESUMO

O diflubenzuron (DFB), inseticida e acaricida regulador do crescimento de insetos (IRC), é utilizado na agricultura, contra insetos predadores, no controle de ectoparasitas de peixes e em programas de saúde pública, no controle de insetos e vetores. Apesar de sua ampla utilização, pouco se sabe a respeito de seus aspectos toxicológicos. Dessa forma, objetivou-se, no presente estudo, avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos do inseticida DFB, em camundongos. Camundongos foram divididos em 5 grupos: Grupo 1: 0,3 mg/kg de DFB; Grupo 2: 1,0 mg/kg de DFB; Grupo 3: 3,0 mg/kg de DFB; Grupo 4: controle positivo (Ciclofosfamida) e Grupo 5: controle negativo (óleo de milho). O sangue periférico dos animais foi coletado para o ensaio cometa e para o teste de micronúcleo. O DFB aumentou a incidência de cometas em todas as doses testadas, indicando ação genotóxica. Após 24, 48 e 72 h do tratamento com DFB foi verificado aumento na incidência de micronúcleos no sangue periférico de camundongos em todas as doses testadas, sendo que a maior dose apresentou incidência de micronúcleos superior ao grupo controle positivo. Estes dados demonstram que o DFB apresenta efeitos genotóxicos e mutagênicos de uma maneira dose-dependente.

Palavras-chaves: Diflubenzuron; Ensaio cometa; Teste do micronúcleo; Camundongo

ABSTRACT

Diflubenzuron (DFB), an insecticide and acaricide insect growth regulator (IRC), é utilizado na agricultura, against insect predators in controlling ectoparasites of fish and in public health programs, in controlling insects and vectors. Despite its widespread use, little is known about its toxicological aspects. This study was aimed to evaluate the genotoxic and mutagenic effects of DFB in mice. Mice were divided into 5 groups: Group 1: 0.3 mg/kg of DFB; Group 2: 1.0 mg/kg of DFB; Group 3: 3.0 mg/kg de DFB; Group 4: positive control (Cyclophosphamide) and Group 5: negative control (corn oil). Peripheral blood of animals was collected for the comet assay and the micronucleus test. DFB increased incidence of comets at all doses tested, indicating genotoxic action. 24, 48 e 72 h after exposure was observed increase in the incidence of micronuclei in the peripheral blood of mice at all doses tested, with the largest dose reported incidence of micronuclei than the positive control group. These data demonstrate that the DFB has genotoxic and mutagenic effects of a dose-dependent manner.

Keywords: Diflubenzuron; Comet assay; Micronucleus test; Mice

INTRODUÇÃO

A exposição direta ou indireta a praguicidas pode causar não só intoxicações, mas efeitos teratogênicos, carcinogênicos, genotóxicos e alterações reprodutivas (Dahlgren et al., 2004, Pelaez et al., 2004; Menegaux et al., 2006). Diflubenzuron (DFB), 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea, inseticida e acaricida regulador do crescimento de insetos (IRC), pertencente a classe das benzoiluréias, pode ser utilizado na agricultura, contra insetos predadores, no controle de ectoparasitas de peixes e em programas de saúde pública, no controle de insetos e vetores, principalmente de larvas do *Aedes aegypti* (EHC 194, 1996; ANVISA, 1985). Esta classe de inseticidas atua interferindo na deposição de quitina, um dos compostos da cutícula de insetos (Reynolds, 1987). O mecanismo de ação tóxica destes compostos é sobre formas imaturas (larvas), particularmente durante a ecdise, impedindo o inseto de liberar-se da exocutícula (Silva et al., 2003).

A determinação do potencial genotóxico de poluentes ambientais objetiva determinar os riscos genéticos, não somente dos seres humanos expostos, mas também da biota nativa de determinado local (Pierce et al., 1998). O “Guidelines for Carcinogen Risk Assessment”, publicada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, aponta as alterações na expressão gênica, reparo do DNA, controle do ciclo celular, instabilidade genômica e danos cromossômicos como as principais conseqüências da exposição aos agentes ambientais e eventos críticos envolvidos no processo de carcinogênese (Preston, 2007).

Embora o DFB seja amplamente utilizado para o controle de pragas, poucas informações toxicológicas recentes estão disponíveis na literatura. Assim, o presente

estudo avaliou os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos do inseticida DFB em camundongos, através do ensaio cometa e do teste de micronúcleo.

MATERIAL E MÉTODOS

1 Animais e tratamento

Foram utilizados camundongos machos Swiss adultos (n= 50; pesando 30-40g e com aproximadamente 60 dias de idade), provenientes do biotério da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas sob condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (23°C), recebendo água e ração comercial à vontade. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal adotados pelo Colégio Brasileiro em Experimentação Animal e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESP (SP – Brasil) (protocolo n. 380/2012).

Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais (n=10 animais/grupo). Três grupos receberam diflubenzuron 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea (Champion Farmoquímica Ltda, grau de pureza de 98%), nas doses de 0,3, 1,0 ou 3,0 mg/kg de peso corpóreo, por via oral. Um grupo foi tratado com ciclofosfamida, na dose de 50 mg/kg, via intraperitoneal (controle positivo) (De Oliveira et al., 2010) e o outro grupo recebeu o veículo (1,0 mL/kg de óleo de milho por via oral) (controle negativo). O tratamento foi realizado uma única vez, sendo o DFB dissolvido em óleo de milho e a ciclofosfamida em solução salina antes da administração.

2 Ensaio Cometa

Após 24 h do tratamento com DFB, 40 μ L de sangue foram coletados da cauda de cada animal. O sangue foi homogeneizado com 120 μ L de agarose LMP (1,5%) a 37°C, e colocado em lâmina previamente preparada com agarose comum (5%). Em seguida, uma lamínula foi adicionada sobre a lâmina, onde ficaram sob refrigeração (20 min a 4°C). As lamínulas foram removidas e as lâminas imersas em solução de lise (89 mL de solução de lise estoque - 2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, pH 10 foi ajustado com NaOH + 89mL de água destilada + 1% de lauril sacocinato de sódio + 1mL de Triton X - 100 + 10 mL de DMSO), durante 1 h a 4°C. Posteriormente, a camara de eletroforese foi preenchida com tampão pH > 13 (300mM NaOH e 1mM EDTA, preparadas utilizando uma solução estoque de NaOH 10N e 200mM e EDTA, pH 10) e as lâminas foram colocadas cuidadosamente na camara de eletroforese onde permaneceram por 20 min a 4°C para desnaturação do DNA. A eletroforese ocorreu a 25V e 300mA (1.25V/cm) e em seguida, as lâminas foram neutralizadas com tampão de pH 7,5 (0,4 M Tris-HCl), secas ao ar e fixadas por 10 min em etanol a 100%.

Para realização das análises, as lâminas foram coradas com 100 μ L de brometo de etídio (0,002 mg/mL). O material foi analisado em um microscópio de fluorescência, aumento de 40x, em filtro de excitação 515-560 nm. A avaliação foi realizada em 100 cometas, classificando-os de 0 - 3, conforme o comprimento e intensidade da cauda: classe 0 – nenhum dano; classe 1 - cauda com até o diâmetro da cabeça do cometa; classe 2 - cauda de tratamento médio, com 2 vezes o diâmetro da cabeça; classe 3 - cauda longa, com comprimento superior a 2 vezes o diâmetro da cabeça. As células apoptóticas, ou seja, aquelas com fragmentação total do nucleóide não foram contabilizadas. Após a leitura, realizou-se *score* de cada tratamento, multiplicando-se o número de núcleos observados em cada classe pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3). Desta forma foi obtido o *score* total de cada

tratamento.

3 Teste do micronúcleo de sangue periférico

O teste do micronúcleo de sangue periférico foi conduzido conforme Hayashi et al. (1990). Para tanto, sangue da cauda de cada animal foi coletado em três tempos diferentes (24, 48 e 72 h após o tratamento). Em lâminas previamente preparadas com 20 µL de laranja de acridina (1 mg/mL), foi adicionado 20 µL de sangue. Posteriormente, estas lâminas foram armazenadas em congelador a -20°C. Para avaliação das lâminas, utilizou-se microscópio de fluorescência sob luz azul (488 nm) em um aumento de 100X. Realizou-se a contagem de duas mil células por animal e os micronúcleos foram analisados.

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média e para a comparação dos resultados entre os grupos experimentais foram utilizados os testes estatísticos de análise de variância – ANOVA seguidos do teste de Tukey-Kramer para avaliar possíveis diferenças entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Após a realização do ensaio cometa, o grupo controle negativo apresentou uma frequência média de $24,20 \pm 2,88$ de células lesionadas, sendo a maior parte classificada como células sem danos (classe 0). No grupo controle positivo (ciclofosfamida), a média de células com danos foi maior do que no grupo controle negativo ($88,40 \pm 1,71$), sendo classificados principalmente em classes 1 e 2 (Tabela 1).

No grupo 1 (0,3 mg/Kg de DFB) a frequência média de células com danos foi de $89,40 \pm 1,01$, com incidência maior de danos nas classes 1 e 2. Da mesma forma, os grupos 2 e 3 (1,0 e 3,0 mg/Kg de DFB, respectivamente) apresentaram média de células lesionadas superior ao grupo controle positivo, com um escore de $141,10 \pm 2,02$ para o grupo 2 e $152,20 \pm 2,17$ para o grupo 3. Os danos foram classificados principalmente nas classes 1 e 2 em ambos os grupos (Tabela 1).

Em relação ao teste do micronúcleo, após 24 h do tratamento com DFB, foi observada uma frequência média de células micronucleadas no grupo controle negativo e positivo de $1,50 \pm 0,65$ e $21,50 \pm 1,94$, respectivamente. Nos grupos tratados com DFB (0,3, 1 e 3 mg/kg) houve um aumento na frequência de micronúcleos com o aumento da dose (Tabela 2). Após 48 h do tratamento, observou-se que os grupos 1, 2 e 3 diferiram em relação ao grupo controle negativo. O grupo controle positivo apresentou frequência média de micronúcleos de $15,00 \pm 1,19$ e os grupos 1 e 2 não apresentaram diferenças quando comparados ao grupo controle positivo. O grupo 3 foi o que apresentou maior frequência de micronúcleos ($27,90 \pm 1,62$), superior ao grupo controle positivo (Tabela 2). 72 h após o tratamento, também verificou-se um aumento na frequência de micronúcleos em todas as doses testadas. A frequência de micronúcleos foi maior com o aumento da dose. O grupo 1 e 2 apresentou resultados semelhantes ao grupo controle positivo, com uma frequência de células com micronúcleos de $9,80 \pm 0,79$ para o grupo 1 e $12,40 \pm 0,96$ para o grupo 2. O grupo 3 apresentou maior incidência de micronúcleo (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que praguicidas podem ter efeitos genotóxicos após exposição direta ou indireta em organismos não-alvo (incluindo humanos) (Nehez et al.,

1988), o que reforça a necessidade de avaliações genotóxicas destes compostos. Este estudo demonstra pela primeira vez que o pesticida DFB pode induzir danos ao DNA em camundongos, nas doses testadas.

Vários pesticidas amplamente utilizados apresentaram resultados positivos para genotoxicidade. No presente estudo, os efeitos genotóxicos do DFB foram avaliados usando o ensaio cometa. Este é um ensaio amplamente utilizado em genética toxicológica e tem sido usado para detectar danos no DNA causados por agentes químicos e físicos (Gontijo & Tice, 2003). Através desta técnica, vários praguicidas já foram revelados genotóxicos. De Oliveira et al. (2010) e Moore et al. (2011), avaliaram o potencial genotóxico e mutagênico dos inseticidas fipronil e malation, respectivamente, e constataram que estes compostos foram capazes de induzir danos ao DNA na maior dose testada (50 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente).

No presente estudo, o DFB aumentou a incidência de cometas em todas as doses testadas, apresentando maior número de células lesionadas nas doses de 1 e 3 mg/kg de DFB, demonstrando um potencial genotóxico dose-dependente. Nota-se que a incidência de células lesionadas encontradas nos grupos tratados com DFB foi superior aquelas encontradas no grupo controle positivo, o qual recebeu ciclofosfamida. No presente estudo, a ciclofosfamida foi usada para induzir danos ao DNA, já que possui comprovada atividade genotóxica em células da medula óssea e no sangue periférico *in vivo* e *in vitro* (Snustad & Simmons, 2001).

Os efeitos mutagênicos do DFB foram examinados através do teste de micronúcleo do sangue periférico. A partir desta técnica, é possível detectar alterações no DNA e/ou danos no fuso mitótico (Fenech, 2000). Após 24, 48 e 72 h do tratamento com DFB foi verificado um aumento na incidência de micronúcleos no sangue periférico de camundongos em todas as doses testadas, sendo que a maior dose (3 mg/kg) apresentou

incidência de micronúcleos estatisticamente superior ao grupo controle positivo (ciclofosfamida). Estes dados demonstram que o DFB apresenta efeitos mutagênicos de uma maneira dose-dependente. Observa-se que a frequência de micronúcleos diminuem cronologicamente após o tratamento. Esta diminuição pode ser devido ao fato da metabolização do DFB reduzir sua capacidade de induzir danos ao DNA.

Corroborando com os achados do presente trabalho, um dos metabólitos do DFB, a 4-cloroanilina, foi classificada pelo EPA (Environmental Protection Agency) como um provável carcinogêno humano (USEPA, 1997), demonstrando a necessidade de mais estudos toxicológicos deste inseticida. Estes dados demonstram que o DFB apresenta efeitos genotóxicos e mutagênicos de uma maneira dose-dependente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, e a empresa Champion Farmoquímica LTDA pela disponibilização do inseticida DFB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1985. Índice Monográfico. D17 Diflubenzuron. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/af1db28047458f8d98c8dc3fbc4c6735/d17_novo.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0.

Dahlgren JG, Takhar HS, Ruffalo CA, Zwass M. Health effects of diazinon on a family. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology* 2004; 42:579-91.

De Oliveira PR, Bechara GH, Denardi SE, Oliveiraa RJ, Mathias MIC. Genotoxic and mutagenic effects of "pronil on mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2010; 64:569-7.

EHC. Environmental Health Criteria 184. Diflubenzuron. United Nations Environment Programme International Labour Organisation. Geneva: World Health Organization; 1996.

Fenech M. The in vitromicronucleus technique. *Mutation Research* 2000;455:81-95.

Gontijo AMMC, Tice R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro LR, Salvadori EK, Marques EK, editors. *Mutagênese ambiental*. Canoas: ULBRA; 2003. p. 247–75.

Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate Jr M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides.

Mutation Research 1990;245:245–9.

Menegaux F, Baruchel A, Bertrand Y, Lescoeur B, Leverger G, Nelken B, Sommelet D, Hémon D, Clavel J. Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukaemia. *Occupational and Environmental Medicine* 2006; 63:131-4.

Moore PD, Patlolla AK, Tchounwou PB. Cytogenetic evaluation of malathion-induced toxicity in Sprague-Dawley rats. *Mutation Research* 2011; 725:78-82.

Nehez M, Boros P, Ferke A, Mohos J, Patolas P, Vetro G, Zimanyi M, Desi I. Cytogenetic examination of people working with agrochemicals in the southern region of Hungary. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1988;8:37-44.

Pelaez S, Hierro I, Oña S, Alonso L, Matilla A. Relationship between pesticide exposure and low-grade superficial bladder urothelial carcinoma. *Medicina Clinica (Barc)* 2004; 123:571-4.

Peirce JJ, Weiner RF, Vesilind PA. 1998. *Meteorology and Air Pollution*. In: *Environmental Pollution and Control*. Boston: Butterworth-Heinemann.

Preston RJ. Epigenetic processes and cancer risk assessment. *Mutation Research* 2007;616:7-10.

Reynolds SE. The cuticle, growth regulators and moulting in insects: the essential background to the action of acylurea insecticides. *Pesticide Science* 1987;20:131-46.

Silva MTB, Costa EC, Boss A. Control of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with insect growth regulators. *Ciencia Rural* 2003; 33:601-05.

Snustad DP, Simmons MJ. *Fundamentos de genética*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. 1997. *Reregistration Eligibility Decision - Diflubenzuron*. Washington, DC: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, U.S. EPA.

ANEXOS

Tabela 1 - Valores médios \pm erro padrão da média da frequência relativa de células lesionadas, distribuição entre as classes de danos e escore referentes ao ensaio cometa.

Grupos Experimentais	Células Lesionadas	Classes de dano				Escore
		0	1	2	3	
Controle Negativo	24,20 \pm 2,88 ^a	75,80 \pm 2,88	20,80 \pm 2,52	3,20 \pm 0,55	0,20 \pm 1,33	27,80 \pm 3,34 ^a
Controle Positivo	88,40 \pm 1,71 ^b	11,30 \pm 1,80	61,10 \pm 2,81	21,50 \pm 2,19	5,80 \pm 0,78	121,50 \pm 4,34 ^b
DFB 0,3mg/kg	89,40 \pm 1,01 ^b	10,60 \pm 1,01	66,20 \pm 2,27	20,00 \pm 1,99	3,20 \pm 0,70	115,80 \pm 2,67 ^b
DFB 1,0 mg/kg	91,50 \pm 0,52 ^b	8,40 \pm 0,50	49,30 \pm 1,22	34,80 \pm 1,64	7,40 \pm 0,54	141,10 \pm 2,02 ^c
DFB 3,0 mg/kg	93,50 \pm 0,65 ^b	6,50 \pm 0,65	43,20 \pm 1,21	41,90 \pm 1,16	8,40 \pm 0,83	152,20 \pm 2,17 ^c

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. ANOVA/Tukey (p<0,05)

Tabela 2 -Valores médios \pm EPM, referentes ao ensaio de micronúcleo.

Grupos Experimentais	Média \pm EPM		
	24h	48h	72h
Controle Negativo	1,50 \pm 0,65 ^a	1,00 \pm 0,37 ^a	0,90 \pm 0,31 ^a
Controle Positivo	21,50 \pm 1,94 ^b	15,00 \pm 1,19 ^b	9,70 \pm 0,40 ^b
DFB 0,3mg/kg	16,80 \pm 1,58 ^b	11,40 \pm 1,16 ^b	9,80 \pm 0,79 ^b
DFB 1,0 mg/kg	17,60 \pm 1,66 ^b	16,30 \pm 1,42 ^b	12,40 \pm 0,96 ^b
DFB 3,0 mg/kg	34,10 \pm 2,16 ^c	27,90 \pm 1,62 ^c	18,90 \pm 1,33 ^c

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. ANOVA/Tukey (p<0,05)