



**MARCUS VINÍCIUS CARDOSO TRENTO**

**TEBUCONAZOL E DIFENOCONAZOL:  
EFEITOS CITOGENOTÓXICOS E SOBRE A HEMOSTASIA  
HUMANA**

**LAVRAS - MG  
2017**

**MARCUS VINÍCIUS CARDOSO TRENTO**

**TEBUCONAZOL E DIFENOCONAZOL:  
EFEITOS CITOGENOTÓXICOS E SOBRE A HEMOSTASIA HUMANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química e Bioquímica de Produtos Naturais e Sintéticos, para a obtenção do título de Mestre.

**Prof. Dra. Silvana Marcussi  
Orientadora**

**Profa. Dra. Larissa Fonseca Andrade-Vieira  
Co-orientadora**

**LAVRAS - MG  
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Trento, Marcus Vinicius Cardoso.

Tebuconazol e difenoconazol: efeitos citogenotóxicos e sobre a  
hemostasia humana / Marcus Vinicius Cardoso Trento. - 2017.

44 p. : il.

Orientador(a): Silvana Marcussi.

Coorientador(a): Larrisa Fonseca Andrade Vieira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras,  
2017.

Bibliografia.

1. Tebuconazol. 2. Difenoconazol. 3. Toxicologia. I. Marcussi,  
Silvana. II. Vieira, Larrisa Fonseca Andrade. III. Título.

**MARCUS VINÍCIUS CARDOSO TRENTO**

**TEBUCONAZOL E DIFENOCONAZOL:  
EFEITOS CITOGENOTÓXICOS E SOBRE A HEMOSTASIA HUMANA**

**TEBUCONAZOLE AND DIFENOCONAZOLE:  
CYTOGENOTOXIC AND HUMAN HEMOSTASIS EFFECTS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química e Bioquímica de Produtos Naturais e Sintéticos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM 09/03/2017:

DR. ANDERSON ASSAID SIMÃO - UFLA

DRA. LARISSA FONSECA ANDRADE VIERIA - UFLA

DR. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO – UNESP-Araraquara

Prof. Dra. Silvana Marcussi  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2017**

Às minhas avós Hildete e Lourdes, por serem duas vezes mãe, duas vezes carinho, duas vezes amor, mas que merecem serem homenageadas mais do que duas vezes.

DEDICO!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer imensamente a minha família, sem eles não seria ninguém. Amor e apoio incondicional são duas coisas que recebo constantemente. À minha mãe, Núbia, exemplo de carinho e amor, de persistência, uma mulher batalhadora que nunca se deixa abalar, o pilar de toda a família. Ao meu pai, Marco, por ser exemplo de homem trabalhador, conquistador, sereno e sábio. À minha irmã, Ana Paula, minha pequena, meu neném, pessoa inteligente, divertida, amorosa e de uma simplicidade inigualável.

Aos meus familiares (Tio Celso, Tia Nádia, Tio Petrônio, Adriano, Daniela, Vô Zé, Tio Paulo, Ana Carolina, Vô Zé), que estão sempre engrandecendo meu aprendizado de vida dando conselhos, participando do meu crescimento pessoal e sempre proporcionando momentos felizes. Em especial Gabriel e André, mais que primos, meus irmãos!

Aos meus amigos de Betim, que mesmo depois de tantos anos "separados" pela distância, nada mudou! Aos Superficiais (Guilherme, André, Renato, Antônio, Victor M., Thamirys, Lorena, Mariana, Victor B. Anderson, Jessica, Mirella, Raphael, Eric), uma família formada por amigos. Ao Tapas e Todd, pelos "rolês" e histórias que serão passadas aos netos! À minha querida amiga Flavia Loli e ao meu amigo Márcio (Careca).

Aos meus amigos de Lavras, sempre presentes e nos mais diversificados ambientes! Ao Basquete UFLA e a todos que passaram por ele, principalmente aos meus amigos Raphael, Rabelo, Elson, Rennan, Fabrício, Lucas R., Caique, Lucas J., Fepa e Rafael, e aos treinadores (e também amigos) Odair e Walton. Ao Basquete Lavras, pelos inúmeros "raxinhas" pra relaxar, e aos amigos que fiz (em especial Thiago, Biskão, Bruno, Drop, Shogun). Ao NBA/GranPrix (Malu, Aline, Ângela, Laís, Bruno, Poliana, Val e etc.) pela grande parceria formada entre atletas. À Letícia, pessoa especial e carinhosa do seu próprio jeito. Ao Sérgio, o "narigudo" mais querido da rep. dos Anjos. Aos meus amigos Laís e ao Filipe.

Aos amigos que fiz no Canadá, que ainda são muito presentes na minha vida, mesmo que à distância. Ao cearense cabra macho, Pedro, pessoa de grande coração e bom humor. À Nathália, da risada mais fácil de se arrancar e de espírito cuidadoso. À Lorenza, minha lamp, sempre preocupada com o meu bem estar e dando sessenta e nove tipos diferentes de conselhos para meus problemas. À Olivia, carinhosa e alegre, sempre contagiando o ambiente. To Adally, my Canadian mother.

A todos os funcionários do DQI/UFLA e a todos os colegas de laboratório, pois muitos se tornaram amigos, em especial à Confraria (Pedro, Tatiane, Mariana, Gustavo, Amanda e etc.). Aos colegas de outros departamentos, que ajudaram durante o experimento, principalmente à minha amiga Tássia (DMV), e Lamartine (DBI). À minha co-orientadora Larissa, pelo suporte e atenção.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Química, pela oportunidade e à CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

E por último, mas não menos importante, à minha orientadora Silvana, que é exemplo de profissional. Sempre sorridente, apesar das inúmeras tarefas diárias, e sempre solícita. A você um obrigado especial, por estar sempre me fazendo crescer intelectualmente.

**MUITO OBRIGADO!**

“But you know, happiness can be found even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light.”

J. K. Rowling

## RESUMO

O Brasil é o terceiro maior consumidor de agrotóxicos do mundo e o primeiro na América Latina. Estas substâncias vêm ocasionando impactos no ecossistema, pois ao serem aplicadas nas áreas agrícolas, são lixiviadas podendo afetar lençóis freáticos e águas superficiais. Conseqüentemente, afetam a biota ao redor, ocasionando danos a organismos-alvo e diversos organismos não alvos, como por exemplo, organismos aquáticos, terrestres e até mesmo à saúde humana. Dentre as classes de agrotóxicos destacam-se os fungicidas. Neste grupo estão os princípios ativos tebuconazol (TBZ) e difenoconazol (DFZ), que foram encontrados em quantidades irregulares pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) em 2013. Ambos os compostos são classificados como tóxicos para os organismos vivos, além de apresentarem a capacidade de se acumular nos organismos e no ecossistema, sendo potencialmente mutagênicos, carcinogênicos ou teratogênicos. No presente trabalho, foi avaliado o potencial citogenotóxico e efeitos sobre a homeostasia induzidos pelos princípios ativos TBZ e DFZ, utilizando o teste do cometa em leucócitos humanos, as atividades coagulante/anticoagulante, proteolítica (substratos: fibrinogênio e caseína), trombolítica, fosfolipásica e hemolítica, além de avaliar a ação sobre a atividade mitocondrial por meio da atividade de succinato desidrogenase. Tanto o tebuconazol quanto o difenoconazol induziram alterações à homeostasia, alterando tempo de coagulação e a morfologia dos trombos, além de induzirem a degradação de fosfolipídios e da proteína caseína. No teste do cometa e hemolítico não foram observadas ações tóxicas nas condições em que os princípios ativos foram avaliados. Vale salientar, que as menores concentrações do tebuconazol foram mais efetivas nos testes avaliados, enquanto que para o difenoconazol a efetividade foi observada nas concentrações mais elevadas.

**Palavras-chave:** Fungicidas. Teste do cometa. Atividade proteolítica. Atividade trombolítica. Atividade coagulante. Atividade fosfolipásica.

## ABSTRACT

Brazil is the third largest consumer of pesticides in the world and the first in Latin America. These substances are causing impacts on the environment, because when applied in agricultural areas they are leached and affect superficial water and groundwater. Consequently, they affect its surrounding biota causing damages to targeted-organisms but also the non targeted ones, as for example, aquatic and terrestrial organisms, and also damages to the human health. Fungicides are highlighted among the pesticides. In this group there are the active ingredients tebuconazole (TBZ) and difenoconazole (DFZ), which were found in irregular quantities by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) in the Program of Analysis of Pesticides Residues in Food (PARA) in 2013. Both compounds are classified as toxic to living organisms besides their capacity to accumulate on organisms and in the environment, which can be potentially mutagenic, carcinogenic or teratogenic. In this present study, the cytogenotoxic potential and the effects on human hemostasis induced by the active principles TBZ and DFZ were evaluated using the following assays: comet assay in human leukocytes, the clotting and/or anti-clotting activities, the proteolytic activity (substrates: fibrinogen and casein), the thrombolytic activity, phospholipase activity, hemolytic activity, and the evaluation on the mitochondrial activity through the activity of succinate dehydrogenase. Both tebuconazole and difenoconazole induced disturbance in hemostasis, altering clotting time and thrombus morphology, and also induced the degradation of phospholipids and casein. In the comet and hemolytic assays no toxic actions were observed under the conditions in which the fungicides were evaluated. It is worth noting that the lower concentrations of tebuconazole were more effective in all assays evaluated, whereas for difenoconazole the effectiveness was observed at the highest concentrations.

**Keywords:** Fungicides. Comet assay. Proteolytic activity. Thrombolytic activity. Clotting activity. Phospholipase activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### PRIMEIRA PARTE

- Figura 1.** Esquema de possível contaminação dos agrotóxicos em organismos não alvos .... 17
- Figura 2.** Estrutura química do princípio ativo tebuconazol (ANVISA, 2016<sup>a</sup>) ..... 18
- Figura 3.** Estrutura química do princípio ativo difenoconazol (ANVISA, 2016<sup>b</sup>) ..... 19
- Figura 4.** Exemplificação simplificada do processo de coagulação sanguínea no organismo humano. Desenho adaptado de Tortora e Derrickson (2012) ..... 21

### SEGUNDA PARTE

- Figura 1.** Atividade caseinolítica para os princípios ativos tebuconazol e difenoconazol, apresentados pelas médias dos tamanhos dos halos, em milímetros. C+: peçonha de *Bothrops atrox*, 60 µg/mL. C-: PBS. Os dados representam médias de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. \*Difere estatisticamente do controle positivo ( $p < 0,05$ ) ..... 38
- Figura 2.** Atividade fosfolipásica para os princípios ativos tebuconazol e difenoconazol, apresentados pelas médias dos tamanhos dos halos, em milímetros. C+: peçonha de *Bothrops atrox*, 60µg/mL. C-: PBS. Os dados representam médias de resultados obtidos em 3 experimentos independentes ..... 39
- Figura 3.** Atividade da succinato desidrogenase extraída de fígado de frango na presença e ausência do difenoconazol. Os dados representam médias de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. C-: atividade da enzima sem tratamentos ..... 40
- Figura 4.** Atividade da succinato desidrogenase extraída de fígado de frango na presença e ausência do tebuconazol. Os dados representam médias de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. C-: atividade da enzima sem tratamentos ..... 41

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

- Tabela 1.** Caracterização dos princípios ativos tebuconazol e difenoconazol segundo dados da ANVISA ..... 29
- Tabela 2.** Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) avaliadas, relacionadas à recomendada pelo fabricante dos fungicidas para a cultura do tomate ..... 29
- Tabela 3.** Porcentagem de atividade hemolítica, avaliada em meio líquido, nos diferentes hematócritos (0,5% e 1%) avaliados. s.a (sem atividade). Controle positivo:  $\text{H}_2\text{O}$ . Os dados representam médias de resultados obtidos em 3 experimentos independentes ..... 36
- Tabela 4.** Atividade coagulante para os princípios ativos tebuconazol e difenoconazol, apresentados pelas médias dos tempos de coagulação, em segundos. C+:  $\text{CaCl}_2$  0,1M. Dados seguidos das mesmas letras dos respectivos controles possuem igualdade estatística em relação a eles ( $p < 0,05$ ). Os dados representam médias de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. \* Potencial pró-coagulante ..... 37
- Tabela 5.** Atividade trombolítica para os princípios ativos tebuconazol e difenoconazol, apresentados pelas médias dos volumes liberados, em microlitros. C+: peçonha de *Bothrops atrox*,  $60\mu\text{g/mL}$ . C-: PBS. Dados seguidos das mesmas letras dos controles possuem igualdade estatística em relação a cada um deles ( $p < 0,05$ ). Os dados representam médias de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. \*Potencial pró-trombótico ..... 38

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

COEP - Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DFZ - Difenconazol

DMSO - Dimetil Sulfóxido

FAO - Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDA - Ingestão Diária Aceitável

LSPA - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PBS - Phosphate Buffered Saline (salina tamponada em fosfato)

TBZ - Tebuconazol

WHO - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

## SUMÁRIO

### PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO	
2.1. Agrotóxicos .....	16
2.1.1. Tebuconazol .....	17
2.1.2. Difenconazol .....	19
2.2. Toxicologia .....	20
2.2.1. Citogenética Toxicológica .....	20
2.3. Hemostasia .....	20
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	22

### SEGUNDA PARTE

ARTIGO - TEBUCONAZOL E DIFENOCONAZOL: PROSPECÇÃO CITOGENOTÓXICA E SOBRE A HEMOSTASIA.....	25
--	----

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1. INTRODUÇÃO**

O Brasil é o terceiro maior consumidor de agrotóxicos do mundo e o primeiro na América Latina, e de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o principal motivo apontado para o aumento do uso destes compostos no país é a ampliação no cultivo de monoculturas, como por exemplo, o tomate, a soja, o trigo e a cevada. Estes compostos são utilizados com eficiência no controle organismos alvos, tais como pragas, doenças e plantas invasoras nas lavouras, garantindo maior produtividade e retorno econômico.

Contudo, o seu mal uso pode acarretar em efeitos adversos, tanto por contato direto quanto indireto, à organismos não alvos (inclusive os seres humanos). Um exemplo de como estes compostos químicos podem afetar a saúde humana pode ser dado a partir de estudos recentes divulgados pela ANVISA. Análises em amostras de 1.665 alimentos distribuídos no mercado consumidor nos 26 estados brasileiros mostraram que 29% das amostras apresentavam resíduos de produtos não autorizados ou autorizados acima do limite máximo do permitido para aquele composto (ANVISA, 2014).

Além disso, em um estudo associando a exposição a pesticidas e doenças neurodegenerativas, foi comprovado que em exposição a esses componentes a saúde humana pode ser afetada, elevando a incidência de doenças como Alzheimer e até mesmo tentativas de suicídios (PARRÓN et al., 2011; DEMUR et al., 2013). Outro estudo, realizado *in vitro* com células humanas testando o efeito de alguns agrotóxicos, comprovou o potencial efeito endócrino-disruptivo mediado por receptor de estrogênio, receptor de andrógeno e atividades da aromatase (KJELDSEN et al., 2013).

Dentre as classes de agrotóxicos destacam-se os fungicidas, que caracterizam uma das principais classes de defensivos utilizados na agricultura. Estes são utilizados para combater doenças causadas por fungos em plantas. Os fungicidas são classificados em sistêmicos e de contato, e também com relação ao seu grupo químico: ditiocarbamatos, benzimidazol, dicarboximidas e triazol.

Os triazóis são fungicidas de ação sistêmica, formados por compostos heterocíclicos constituídos por três átomos de nitrogênio no mesmo núcleo cíclico. São sintéticos e possuem atividade biológica, sendo divididos em três sais: 1,2,3-triazol monocíclico, benzotriazóis e 1,2,3-triazol. Neste último grupo estão os princípios ativos tebuconazol (TBZ) e

difenoconazol (DFZ), que foram encontrados em quantidades acima do permitido pela ANVISA no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) em 2013 (ANVISA, 2013). Assim, novos métodos de detecção têm sido desenvolvidos com o objetivo de aumentar a eficácia da detecção destes compostos em produtos destinados ao consumo humano (YANG et al., 2014).

Ambos os compostos são classificados como tóxicos para os organismos vivos, além de apresentarem a capacidade de se acumular nos organismos e no ecossistema, sendo potencialmente mutagênicos, carcinogênicos ou teratogênicos.

Frente a esse problema tem-se reconhecido a importância de elucidar os efeitos destes compostos nos organismos vivos e como eles interagem e contribuem para os mecanismos de toxicidade dos fungicidas. Para tanto, estudos e métodos quali-quantitativos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de avaliar a genotoxicidade e a mutagenicidade dessas substâncias. A área da ciência com tal objetivo é denominada toxicologia genética e/ou citogenética toxicológica, e seu objetivo é identificar e analisar a ação dos compostos sobre as células e a capacidade destes em interagir com material genético (RAND; PETROCELLI, 1985; AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Diversas metodologias estão disponíveis para acessar a ação de poluentes ambientais (resíduos industriais, metais pesados, agrotóxicos, entre outros) nos seres vivos. Estas são baseadas em ensaios biológicos com organismos modelos como sistemas bioindicadores (ex: *Danio rerio* e *Oncorhynchus mykiss*) de poluição e toxicidade. Esses testes são apontados como excelentes ferramentas para complementar os dados físico-químicos conhecidos dos compostos (BADERNA et al., 2011). Tem-se proposto estudos ecotoxicológicos e de mutagenicidade que envolvam a determinação da composição química do resíduo/composto estudado e a investigação da ação de seus componentes através de bioensaios de citogenotoxicidade que permitam avaliar a integridade do material genético estimando de forma funcional os riscos causados pelo composto ao ambiente e a diferentes organismos, incluindo animais, vegetais e microrganismos (LAH et al., 2008; MATEJCZYK et al., 2011).

O teste do cometa, que permite avaliar citogenotoxicidade em leucócitos humanos, é de grande valia para prospecção dos efeitos induzidos pelos fungicidas. De igual importância, destacam-se os testes de interação dos compostos químicos com células e moléculas chave no controle da homeostasia, permitindo assim inferir possíveis efeitos dos fungicidas sobre processos fisiológicos como coagulação sanguínea, geração ou dissolução de trombos, considerando que a hemodinâmica de um organismo animal tem papel primordial em

processos inflamatórios, resposta imune, nutrição, excreção, assim como em diversas patologias como diversos tipos de câncer, trombose, isquemias, entre outros.

Por fim, os estudos de prospecção de efeitos biológicos de compostos potencialmente tóxicos como os avaliados no presente estudo, são de grande relevância, pois: a) possibilitam dimensionar a periculosidade de diversos agentes tóxicos encontrados em nosso ambiente; b) permitem entender o mecanismo de ação dos mesmos; c) fornecem subsídio para discussão sobre aplicação em larga escala de compostos como os fungicidas e estabelecimento de medidas mitigadoras e busca por alternativas mais sustentáveis de combate a pragas agrícolas. d) permitem propor medidas para o uso consciente destes compostos químicos ou mesmo indicar a necessidade de sua total substituição.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial citogenotóxico e efeitos sobre a homeostasia, dos princípios ativos pertencentes ao grupo químico triazol (tebuconazol e difenoconazol), utilizando o teste de cometa em leucócitos humanos, as atividades coagulante/anticoagulante, proteolítica (substratos: fibrinogênio e caseína), trombolítica, fosfolipásica e hemolítica, além de avaliar a ação sobre a atividade mitocondrial por meio da atividade de succinato desidrogenase.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

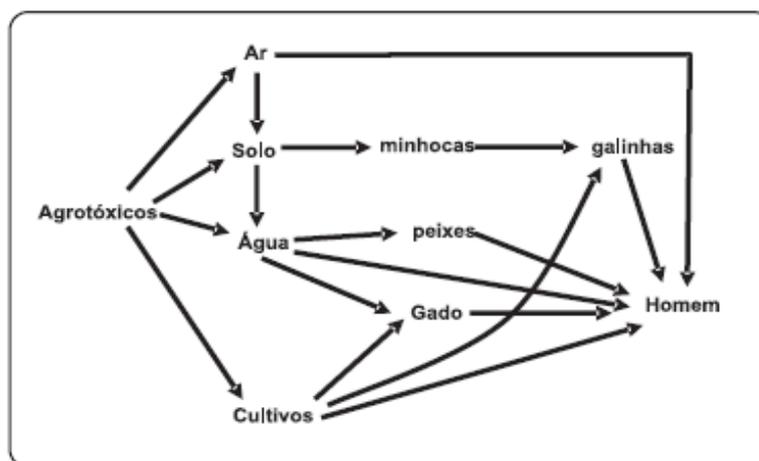
### **2.1. Agrotóxicos**

A ANVISA classifica os agrotóxicos dentro de quatro classes: Classe I - Extremamente Tóxico, Classe II - Altamente Tóxico, Classe III - Medianamente Tóxico e Classe IV - Pouco Tóxico. No Brasil, mais de 400 ingredientes ativos autorizados, sendo que aproximadamente 150 deles correspondem às classes I e II. Em diversos alimentos utilizados no dia-a-dia do brasileiro (arroz, feijão, milho, soja, batata e tomate, como exemplos) tem a autorização para a utilização de mais de 30 ingredientes ativos pertencentes à essas classes (ANVISA, 2014).

Os agrotóxicos podem ser separados em diversas classes, dependendo de seu método de ação e organismo alvo. Dentre essas estão os inseticidas (controle de pragas), herbicidas (controle de plantas invasoras), fungicidas e bactericidas (controle de patologias fúngicas e bacterianas, respectivamente). Dos ingredientes ativos permitidos no país, mais de 300 pertencem à essas classes (ANVISA, 2014).

Independente de suas classes toxicológicas, os agrotóxicos vêm ocasionando impactos no ecossistema, pois ao serem aplicados nas áreas agrícolas são lixiviados, podendo afetar lençóis freáticos e águas superficiais (KONWICK et al., 2006). Conseqüentemente, afetam a biota ao redor, ocasionando danos a organismos-alvo e diversos organismos não alvos, como por exemplo, organismos aquáticos, terrestres e até mesmo à saúde humana (Figura 1).

**Figura 1.** Esquema de possível contaminação dos agrotóxicos em organismos não alvos.

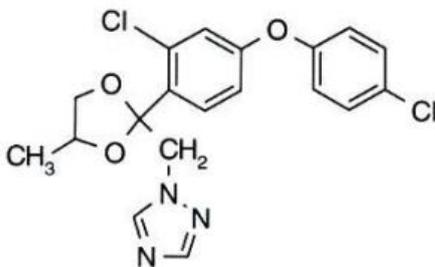


Fonte: Waichman, 2008

### 2.1.1. Tebuconazol

O tebuconazol ((RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-ol) (Figura 1) é um fungicida sistêmico do grupo dos triazóis que tem como função a interferência no metabolismo de fungos patogênicos, como por exemplo, a espécie *Fusarium culmorum*, que apresenta sua produção de toxinas reduzida na utilização de tal composto (KANG et al., 2001). Sua atuação se dá pela diminuição da síntese do ergosterol ao inibir enzimas do cit P450. Pode ser utilizado em grãos, frutas, vegetais, e plantas ornamentais; aplicado sob pulverização nas folhas, diretamente no solo ou sementes; e sua ingestão diária aceitável (IDA) foi determinada pelo FAO/WHO (FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations; WHO- World Health Organization; 1994) na quantidade de 0,02mg/kg.

**Figura 2.** Estrutura química do princípio ativo Tebuconazol.



Fonte: ANVISA, 2016<sup>a</sup>

Contudo, de acordo com a ANVISA, a IDA para esse princípio ativo foi estipulada a 0,6 mg/kg (ANVISA, 2016<sup>a</sup>). Apesar de ser considerado seguro para humanos dentro dessas condições de baixo consumo (MURI et al., 2009), tem-se uma preocupação quanto ao uso desse agrotóxico já que foi reportada a sua capacidade em causar malformações em células animais, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MENEGOLA et al., 2013).

Visto que os trabalhadores rurais estão em contínua exposição a agrotóxicos por aplicação dos mesmos, ou simplesmente por estarem em contato direto com as plantas na coleta de frutos, e outros, Mercadante et al. (2014) objetivaram em seu trabalho analisar e quantificar resíduos de TBZ na urina humana. Em seu experimento, foram analisados fazendeiros de vinícolas na faixa etária de 30 a 55 anos, todos saudáveis. Os autores identificaram a presença de TEB-OH e TEB-COOH como metabólitos primários, nas quantidades de 10 a 473 µg/L e 3 a 159 µg/L, respectivamente. Outro experimento nessa área demonstrou que os metabólitos TEB-OH e TEB-COOH, por se apresentarem excretados na urina, são bons biomarcadores de presença do TBZ no organismo humano (FUSTINONI et al., 2012).

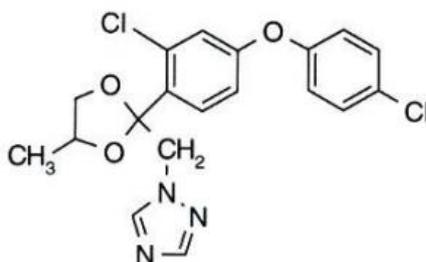
Martinez et al. (2014) realizaram experimentos para avaliar a genotoxicidade do TBZ em duas espécies de algas verdes (*Pseudokirchneriella subcapitata* e *Nannocloris oculata*), utilizando o teste do cometa como ferramenta de avaliação. Eles puderam observar que nas duas concentrações testadas, 3 e 6 mg/L o tebuconazol foi genotóxico para ambas as espécies.

Algumas substâncias, porém, já foram testadas com intuito de reduzir o efeito oxidativo causado pelo TBZ. Ferreira et al. (2012), testaram a utilização de mel, própolis e do pólen apícola para reverter o efeito da peroxidação lipídica induzida pelo TBZ numa determinada espécie de peixe, e comprovaram que dois desses compostos (mel e pólen) servem como substâncias protetoras, enquanto que a própolis demonstrou efeito pró-oxidante.

### 2.1.2. Difenoconazol

O difenoconazol ((cis,trans-3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-metil)-1,3-dioxolan-2-il] fenil-4-clorofenil éter) (Figura 2) é um princípio ativo da família dos triazóis, de ação rápida e proeminente atividade sistêmica (DONG et al., 2013) sendo utilizado em uma variedade de países por atuar no controle de uma ampla gama de doenças fúngicas. Seus mecanismos de ação (muito similar ao do tebuconazol) ou toxicidade se dão pela habilidade de interferir com o crescimento do fungo e inibir a germinação do esporo, além desses pode se ligar a proteínas por diversas maneiras (interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, por exemplo), o que leva a toxicidade em nível humano (LI et al., 2013). De acordo com a ANVISA, sua taxa de ingestão diária aceitável é de 0,03mg/kg (p. c) (ANVISA, 2016<sup>b</sup>).

**Figura 3.** Estrutura química do princípio ativo difenoconazol.



Fonte: ANVISA, 2016<sup>b</sup>

Assim como o TBZ, o DFZ já foi reportado por causar efeitos teratogênicos em experimentos feitos com peixes (MU et al., 2013) e toxicidade histopatológica - danos nas células da epiderme - em uma espécie de minhoca (GAO et al., 2013).

Esse princípio ativo, por dissipação e formação de resíduos, pode ser encontrado em solos cultivados (GUO et al., 2010; WANG et al., 2012). Sua meia-vida depende das condições do mesmo e do tipo de cultivo que faz uso do solo. Algumas vezes, por folhas que entram em contato com o solo, ou até mesmo devido a uma sobrecarga na aplicação, esses resíduos podem se aprofundar nos solos.

## **2.2. Toxicologia**

Toxicologia é o estudo dos efeitos de substâncias de origem química, sintética ou natural. Para uma substância ser considerada tóxica, e gerar um efeito nocivo em um organismo, depende da sua concentração usada (Smith, 2015), e desde Paracelso (1493-1541) que disse "...apenas a dosagem é razão para que uma coisa não seja um veneno", essa afirmação se faz verdadeira. Dentro da toxicologia, existem vários ramos de estudo: toxicologia aquática, química, ambiental, judicial, médica, genética, clínica, reguladora, ocupacional e ecotoxicologia.

### **2.2.1. Citogenética Toxicológica**

A chamada toxicologia genética visa avaliar os efeitos induzidos ao DNA por agentes químicos, físicos ou biológicos (YOUNG, 2002), utilizando ensaios como, por exemplo, o de AMES (*Salmonella*/microssomo), o micronúcleo e o teste do cometa. Tais efeitos podem causar genotoxicidade (indução de efeitos danosos sobre os genes, porém passíveis de serem corrigidos pelos sistemas de reparo celular), mutagenicidade (indução de efeitos danosos sobre os genes resultando em alterações não corrigidas que são transmitidas de uma geração celular para outra), carcinogenicidade (indução de alterações celulares que originam ou levam à formação de câncer) e teratogenicidade (indução de alterações celulares durante a formação do feto).

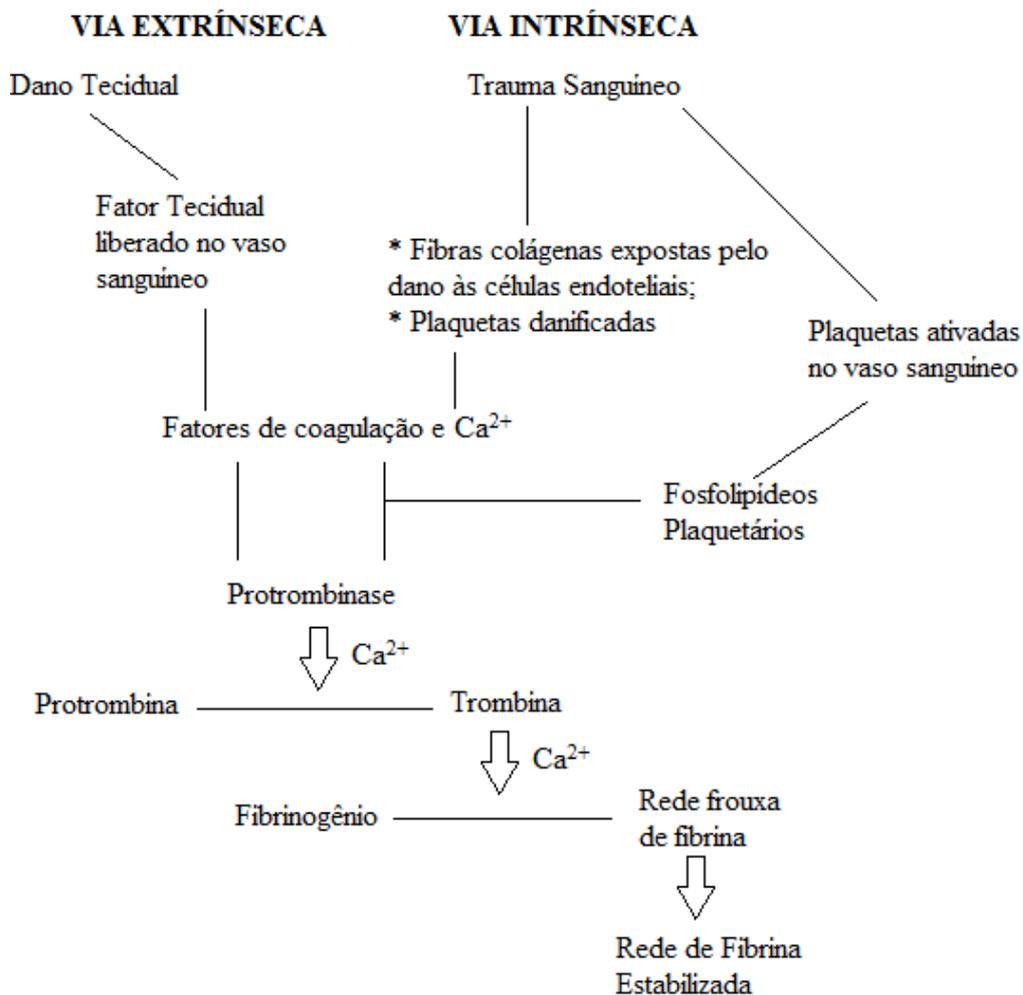
## **2.3. Hemostasia**

A hemostasia corresponde a uma sequência de processos que visa manter o sangue fluido e circulante, assim como dentro de vasos sanguíneos, quando danificados, impedindo a hemorragia (SILVERTHORN, 2010). Dentre esses processos, três se destacam: vasoconstrição, formação de um bloqueio temporário - tampão plaquetário - e a coagulação sanguínea. A vasoconstrição é a contração do vaso sanguíneo, diminuindo por alguns minutos ou horas o fluxo e a pressão sanguínea, evitando a perda excessiva de sangue; a formação do tampão plaquetário é o bloqueio mecânico através da adesão de plaquetas para preencher o dano na parede do vaso lesionado; e a coagulação é o processo em que o sangue deixa sua forma líquida e torna-se um coágulo gelatinoso (HALL; GUYTON, 2011).

O processo de coagulação pode-se iniciar por duas maneiras (TORTORA; DERRICKSON, 2012). Por uma via extrínseca, que ocorre de forma rápida e é ativada com o

dano tecidual. Tal dano libera no sangue a proteína conhecida como fator tecidual (FT) a partir do lado externo dos vasos sanguíneos, que passa por diversas outras reações até ser convertido em protrombinase, finalizando a via. A via intrínseca é mais complexa e se inicia internamente com algum trauma sanguíneo, mas também termina com a formação da protrombinase. Após a formação dessa proteína plasmática, o processo da coagulação continua através de uma via comum, onde há a conversão de protrombina em trombina que atua sobre moléculas de fibrinogênio gerando redes de fibrina (Figura 3).

**Figura 4.** Exemplificação simplificada do processo de coagulação no corpo humano.



Fonte: Adaptado de Tortora e Derrickson (2012).

### 3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Sabendo-se da problemática causada pelos agrotóxicos, e mais especificamente os fungicidas (onde se encontram os princípios ativos tebuconazol e difenoconazol), esse trabalho visou comprovar a toxicidade e as concentrações (partindo daquela recomendada pelo fabricante) que causam esses efeitos. Uma vez que os agricultores trabalham com múltiplas exposições aos agrotóxicos em suas plantações, e nem sempre fazem uso de EPIs, o acúmulo e a exposição aos efeitos desses fungicidas no organismo pode resultar em alterações na homeostasia humana e possuir efeitos citogenotóxicos, como será descrito no artigo a seguir.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Sabti, K.; Metcalfe, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, v. 343, p. 121-135. 1995.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). 2013.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Agrotóxicos. Critérios para a classificação toxicológica. 2014.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)<sup>a</sup>. Agrotóxicos. Monografias autorizadas. D-36 - Difenoconazol. 2016.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)<sup>b</sup>. Agrotóxicos. Monografias autorizadas. T-32 - Tebuconazol. 2016.

Baderna, D.; Maggioni, S.; Boriani E.; Gemma, S.; Molteni, M.; Lombardo, A.; Colombo, A.; Bordonali, S.; Rotella, G.; Lodi, M.; Benfenati, E. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: chemical analyses, risk assessment and *in vitro* assays. *Environmental Research*, v. 111, n. 4, p. 603-613. 2011.

Demur, C.; Métais, B.; Canlet, C.; Tremblay-Franco, M.; Gautier, R.; Blas-Y-Estrada, F.; Sommer, C.; Gamet-Payrastre, L. Dietary exposure to a low dose of pesticides alone or as a mixture: The biological metabolic fingerprint and impact on hematopoiesis. *Toxicology*, v. 308, n. 0, p. 74-87. 2013.

Dong, F.; Li, J.; Chankvetadze, B.; Cheng, Y.; Xu, J.; Liu X. Chiral triazole fungicide Difenoconazole: Absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil. *Environmental Science & Technology*, v. 47(7), p. 3386-3394. 2013.

FAO/WHO. Pesticide residues in food - 1993 evaluations. Part II - Toxicology. World Health Organization, WHO/PCS/94.4, p. 855-874. 1994.

Ferreira, D.; Unfer, T. C.; Rocha, H. C.; Kreutz, L. C.; Koakoski, G.; Barcellos, L. J. G. Antioxidant activity of bee products added to water in tebuconazole-exposed fish. *Neotropical Ichthyology*, v. 10(1), p. 215-220. 2012.

- Fustinoni, S.; Mercadante, R.; Polledri, E.; Rubino, F. M.; Mandic-Rajcevic, S.; Vianello, G.; Colosio, C.; Moretto, A. Biological monitoring of exposure to tebuconazole in winegrowers. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, v. 211, p. S51-S51. 2014.
- Gao, M.; Song, W.; Zhang, J.; Guo, J. Effect on enzymes and histopathology in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by triazole fungicides. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 35, n. 3, p. 427-433. 2013.
- Guo, C. Li, J. Z.; Guo, B. Y.; Wang, H. L. Determination and Safety Evaluation of Difenconazole Residues in Apples and Soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 85, n. 4, p. 427-431. 2010.
- Hall, J. E.; Guyton, A. C. Guyton and Hall: Textbook of medical physiology. 12th ed. Philadelphia, Pa. : Saunders/Elsevier. 2011
- Kang, Z.; Huang, L.; Buchenauer, H. Ultrastructural and cytochemical studies of effects of the fungicide metconazole on *Fusarium culmorum* *in vitro*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, v. 108, p. 419-432. 2001.
- Kjeldsen, L. S.; Ghisari, M.; Bonefeld-Jørgensen, E. C. Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 272, n. 2, p. 453-464. 2013.
- Konwick, B. J.; Garrison, A. W.; Avants, J. K.; Fisk, A. T. Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, v. 80, n. 4, p. 372-381. 2006.
- Lah, L.; Kraševac, N.; Trontelj, P.; Komel, R. High diversity and complex evolution of fungal cytochrome P450 reductase: cytochrome P450 systems. *Fungal Genetics and Biology*, v. 45, p. 446-458. 2008.
- Li, Y.; Ma, X.; Lu, G. Systematic investigation of the toxic mechanism of difenoconazole on protein by spectroscopic and molecular modeling. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 105, n. 3, p. 155-160. 2013.
- Martinez, R. S.; Di Marzio, W. D.; Sáenz, M. E. Genotoxic effects of commercial formulations of Chlorpyrifos and Tebuconazole on green algae. *Ecotoxicology*, v. 24, n. 1, p. 45-54. 2014.
- Matejczyk, M.; Plaza, G.A.; Naleca-Jawecki, G.; Ulfig, K.; Markowska-Szczupak, A. Estimation of environmental risk posed by landfills using chemical, microbiological and ecotoxicological testing of leachates. *Chemosphere*, v. 82, n. 7, p. 1017-1023. 2011.
- Menegola, E.; Di Renzo, F.; Metruccio, F.; Moretto, A.; Giavini, E. Effects of mixtures of azole fungicides in postimplantation rat whole-embryo cultures. *Archives of Toxicology*, v. 87, n. 11, p. 1989-1997. 2013.
- Mercadante, R. Polledri, E.; Scurati, S.; Moretto, A.; Fustionini, S. Identification and quantification of metabolites of the fungicide tebuconazole in human urine. *Chemical Research in Toxicology*, v. 27, n. 11, p. 1943-1949. 2014.
- Mu, X.; Pang, S.; Sun, X.; Gao, J.; Chen, J.; Chen, X.; Li, X.; Wang, C. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. *Environmental Pollution*, v. 175, p. 147-157. 2013.

Muri, S. D.; van der Voet, H.; Boon, P. E.; van Klaveren, J. D.; Bruschweiler, B. J. Comparison of human health risks resulting from exposure to fungicides and mycotoxins via food. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 12, p. 2963-2974. 2009.

Parrón, T.; Requena, M.; Hernandez, A. F.; Alarcón, R. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 256, n. 3, p. 379-385. 2011.

Rand, G. M.; Petrocelli, S. R. Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications. United States: Hemisphere Publishing Corporation, New York, NY. 1985.

Silverthorn, D. U. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. 5 ed. Porto Alegre: Artmed. 2010.

Smith, Y. What is Toxicology? *News Medical Life Science*. Disponível em: <http://www.news-medical.net/health/What-is-Toxicology.aspx>. Jun, 2015.

Tortora, G. J. Corpo Humano: fundamentos de anatomia e fisiologia. 8 ed. Porto Alegre: Artmed. 2012

Waichman, A. V. Uma proposta de avaliação integrada de risco do uso de agrotóxicos no estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 38, n.1, p. 45-50. 2008

Wang, K.; Wu, J. X.; Zhang, H. Y. Dissipation of difenoconazole in rice, paddy soil, and paddy water under field conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 86, n. 0, p. 111-115. 2012.

Yang, A. Abd El-Aty, A. M.; Park, J. H.; Goudah, A.; Rahman, M. M.; Do, J. A.; Choi, O. J.; Shim, J. H. Analysis of 10 systemic pesticide residues in various baby foods using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, v. 28, n. 6, p. 735-741. 2014.

Young, R. R. Genetic Toxicology: Web resources. *Toxicology*, v. 173, p. 103–121. 2002.

## SEGUNDA PARTE

### ARTIGO 1

#### TEBUCONAZOL E DIFENOCONAZOL: PROSPECÇÃO CITOGENOTÓXICA E SOBRE A HEMOSTASIA

Marcus Vinícius Cardoso Trento<sup>1</sup>, Pedro Henrique Souza Cesar<sup>1</sup>, Tatiane Silva de Abreu<sup>1</sup>, Gustavo Henrique Andrade Machado<sup>1</sup>, Lucilene F. Silva<sup>1</sup>, Larissa Fonseca Andrade-Vieira<sup>2</sup>, Silvana Marcussi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Chemistry Department, Biochemistry Laboratory, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus UFLA, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.

<sup>2</sup>Biology Department, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil

\*Author for corresponding: Dra. Silvana Marcussi, Biochemistry Laboratory, Department of Chemistry, Federal University of Lavras, University Campus, CP: 3037, Lavras 37200-000, Brazil (telefax number: +55(35)3829-1271, e-mail: [marcussi@dqi.ufla.br](mailto:marcussi@dqi.ufla.br)).

**Palavras-chave:** Fungicidas. Atividade trombolítica. Atividade coagulante. Atividade hemolítica. Atividade Caseinolítica. Atividade Fosfolipásica.

## RESUMO

Os princípios ativos tebuconazol e difenoconazol, classificados como tóxicos para os organismos vivos, sendo potencialmente mutagênicos, carcinogênicos ou teratogênicos, fazem parte da composição de fungicidas amplamente utilizados nas lavouras e foram encontrados pela ANVISA na Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) em 2013 em quantidades irregulares. No presente trabalho, dois fungicidas contendo estes princípios ativos foram avaliados em ensaios citogenotóxicos e de hemostasia. Não foi observada fragmentação de DNA induzida pelos fungicidas, no ensaio do cometa, nas condições avaliadas. Ambos os fungicidas alteraram o tempo de coagulação do plasma, sendo pró-coagulantes na maioria das doses avaliadas. Em adição, os fungicidas atuaram sobre trombos sanguíneos exercendo ação trombótica e confirmando o potencial pró-coagulante observado. Nos testes de proteólise os fungicidas foram capazes de degradar a caseína, mas, não alteraram a estrutura do fibrinogênio, nas condições avaliadas. Os fungicidas mostraram-se também citotóxicos sobre eritrócitos humanos assim como induziram a quebra de fosfolipídios, confirmando sua toxicidade sobre membranas. Contudo, nas condições avaliadas, os fungicidas não alteraram de forma significativa a atividade da succinato desidrogenase. Vale salientar, que as alterações em células e moléculas humanas podem ter efeito cumulativo ampliando o potencial tóxico dos fungicidas quando há exposição crônica a seus princípios ativos.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior consumidor de agrotóxicos do mundo e o primeiro na América Latina, e de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) isso ocorre devido ao amplo cultivo de monoculturas, como por exemplo, o tomate, a soja, o trigo e a cevada. Estes compostos são utilizados com eficiência no controle de pragas, doenças e plantas invasoras nas lavouras, garantindo maior produtividade e retorno econômico.

Os agrotóxicos ocasionam impactos no ecossistema, pois ao serem aplicados nas áreas agrícolas são lixiviados, podendo afetar lençóis freáticos e águas superficiais (KONWICK et al., 2006). Conseqüentemente, afetam a biota ao redor, ocasionando danos a organismos aquáticos, terrestres e até mesmo à saúde humana.

Em estudo feito associando a exposição a pesticidas e doenças neurodegenerativas, foi comprovado um aumento na incidência de doenças como Alzheimer e até mesmo tentativas de suicídios (PARRÓN et al., 2011; DEMUR et al., 2013). Outro estudo, realizado *in vitro* com células humanas, comprovou o potencial efeito endócrino-disruptivo de agrotóxicos mediado por receptor de estrogênio, receptor de andrógeno e atividades da aromatase (KJELDSEN et al., 2013).

Os fungicidas caracterizam uma das principais classes de defensivos utilizados na agricultura e podem ser classificados em sistêmicos e de contato, assim como em relação ao seu grupo químico: ditiocarbamatos, benzimidazol, dicarboximidas e triazol.

Os triazóis são fungicidas de ação sistêmica, formados por compostos heterocíclicos constituídos por três átomos de nitrogênio no mesmo núcleo cíclico. Neste grupo estão os princípios ativos tebuconazol e difenoconazol, que foram encontrados pela ANVISA na Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos em 2013 (ANVISA, 2013).

Ambos os compostos são classificados como tóxicos para os organismos vivos, além de apresentarem a capacidade de se acumular nos organismos e no ecossistema, sendo potencialmente mutagênicos, carcinogênicos ou teratogênicos.

O tebuconazol ((RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol)) é um fungicida sistêmico do grupo dos triazóis que tem como função a interferência no metabolismo de fungos patogênicos, como por exemplo, a espécie *Fusarium culmorum*, que apresenta sua produção de toxinas reduzida na utilização de tal composto (KANG et al., 2001). A atuação do fungicida se dá pela diminuição da síntese do ergosterol pelo fungo ao inibir enzimas do cit P450. A quantidade aceitável de ingestão deste fungicida é de 0,02 mg/kg, determinada pelo FAO/WHO (FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations; WHO- World Health Organization; 1994). Apesar de ser considerado seguro para humanos em condições de baixo consumo (MURI et al., 2009), tem-se uma preocupação quanto ao uso desse agrotóxico, considerando o acúmulo de seus efeitos e relatos sobre sua capacidade de causar malformações em animais, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MENEGOLA et al., 2013).

O difenoconazol ((cis,trans-3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-metil)-1,3-dioxolan-2-il]) fenil-4-clorofenil éter) também é um fungicida da família dos triazóis, de ação rápida e proeminente atividade sistêmica (DONG et al., 2013) sendo utilizado em uma variedade de países por atuar no controle de uma ampla gama de doenças fúngicas. Seus mecanismos de ação (muito similar ao do tebuconazol) ou toxicidade se dão pela habilidade

de interferir com o crescimento do fungo e inibir a germinação do esporo, além desses pode se ligar a proteínas por diversas maneiras (interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, por exemplo), o que leva a toxicidade em nível humano (LI et al., 2013). De acordo com a ANVISA, sua taxa de ingestão diária aceitável é de 0.03mg/kg (p. c) (ANVISA, 2016<sup>b</sup>).

Frente a esse problema tem-se reconhecido nos últimos anos a importância de elucidar os efeitos destes compostos nos organismos vivos e como eles interagem e contribuem para os mecanismos de toxicidade dos fungicidas.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial citogenotóxico e efeitos sobre a homeostasia, dos fungicidas pertencentes ao grupo químico triazol (tebuconazol e difenoconazol), utilizando o teste de cometa em leucócitos humanos, as atividades coagulante/anticoagulante, proteolítica (substratos: fibrinogênio e caseína), trombolítica, fosfolipásica e hemolítica, além de avaliar a ação sobre a atividade mitocondrial por meio da atividade de succinato desidrogenase.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Obtenção de material biológico humano (sangue e plasma)**

Os protocolos experimentais foram realizados conforme recomendações do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (COEP) da Universidade Federal de Lavras. As amostras de sangue para obtenção de leucócitos ou plasma foram obtidas dos próprios pesquisadores responsáveis pela pesquisa, dispensando assim a necessidade de aprovação do projeto pelo COEP.

## **2. Material**

### **2.1. Fungicidas**

Foram utilizados dois fungicidas com princípios ativos, grupos químicos, classe toxicológica e estrutura química apresentados na Tabela 1. Os fungicidas, adquiridos comercialmente, e seus respectivos princípios ativos (tebuconazol e difenoconazol) foram selecionados por serem muito utilizados em olerícolas importantes para o estado de Minas Gerais, principalmente na cultura do tomate, tendo em vista que o tomate mostra-se importante para a economia deste Estado que se destaca como segundo maior produtor da olerícola entre os estados brasileiros (IBGE/LSPA, 2015).

Além disso, segundo dados da pesquisa realizada pela ANVISA para o Relatório de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) em 2013, o grupo químico do fungicida selecionado - triazol - foi encontrado em quantidades irregulares em elevado número de amostras alimentares.

**Tabela 1.** Caracterização dos fungicidas tebuconazol e difenoconazol segundo dados da ANVISA

Nome comercial	Princípio ativo	Nome químico	Classe toxicológica	Fórmula Bruta
Rival	Tebuconazol <sup>a</sup>	(RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol	IV - Pouco Tóxico	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O
Score (Sistêmico)	Difenoconazol <sup>b</sup>	cis-trans-3-chloro-4-[4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-2-yl]phenyl 4-chlorophenyl ether	I - Extremamente tóxico	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> C <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>

Referências segundo dados da ANVISA de <sup>a</sup>2016, <sup>b</sup>2016

## 2.2. Soluções Teste

Para realização dos ensaios foram utilizadas cinco concentrações de cada princípio ativo. As soluções foram preparadas diluindo os princípios ativos em água conforme instruções encontradas na bula do produto comercial. As concentrações testadas estão identificadas na Tabela 2 e foram baseadas naquela recomendada para a cultura do tomate.

Como controles foram utilizadas diferentes substâncias ou soluções, de acordo com cada teste realizado.

**Tabela 2.** Concentrações (µg/mL) avaliadas, relacionadas à recomendada pelo fabricante dos princípios ativos dos fungicidas tebuconazol e difenoconazol para a cultura do tomate.

Concentração	Relação com o recomendado	Princípios Ativos [µg/mL]	
		(nome comercial)	
		Difenoconazol (Score)	Tebuconazol (Rival)
1/4x	¼ do recomendado	31.25	25
1/2x	½ do recomendado	62.5	50
R	Recomendado	125	100
2x	2x o recomendado	250	200
4x	4x o recomendado	500	400

### **3. Metodologia**

#### **3.1. Atividade genotóxica sobre leucócitos humanos - Teste do cometa**

Para o teste do cometa foi utilizada a metodologia de Singh et al. (1988), adaptada seguindo protocolo descrito por Olive e Banáth (2006). Os testes foram realizados a partir de sangue total com posterior análise apenas dos leucócitos isolados durante o tratamento das lâminas. Foram coletadas alíquotas de 10 mL de sangue de cada voluntário e todos os ensaios realizados ocorreram *in vitro*. As células (500 µL de sangue) permaneceram na presença dos tratamentos (difenoconazol e tebuconazol, em diferentes concentrações) por período de 4 horas em câmara de cultivo celular a 37°C. As luzes do laboratório permaneceram apagadas durante os passos seguintes, em que 15 µL de cada solução de incubação foram misturados a 100 µL de agarose LMP (low melting point) e pipetados sobre a lâmina (previamente coberta com agarose NMP 1%; normal melting point) e coberta com lamínula. Em seguida, as lamínulas foram retiradas, e as lâminas mergulhadas em solução de lise (NaCl 0,25 M; EDTA 100 mM; Tris 10 mM; pH 10 ajustado com NaOH 10 M; 1% Triton X-100; 10% DMSO) onde permaneceram por 12 horas. O controle positivo (C+) foi realizado com doxorubicina (50 µg mL<sup>-1</sup>) e o controle negativo (C-) com PBS. As lâminas foram então transferidas para solução de eletroforese (EDTA 1 mM; NaOH 300 mM; pH 13) onde permaneceram por 25 min a 4 °C antes de serem submetidas a corrida eletroforética (30 min a 25V). Após a corrida, as lâminas foram colocadas em uma solução de neutralização (Tris-HCl 0,4 M; pH 7,4) por 30 min. O DNA contido nas lâminas foi precipitado com etanol absoluto e seco à temperatura ambiente.

A coloração foi realizada com iodeto de propídio a 2 µg mL<sup>-1</sup>. Os padrões do cometa foram analisados por escores visuais em microscópio de fluorescência (Olympus BX51), de acordo com Collins et al. (1997), onde os nucleóides analisados foram classificados quanto à extensão da lesão no DNA.

#### **3.2. Atividade coagulante e/ou anticoagulante**

A atividade coagulante foi realizada de acordo com metodologia descrita por Mourão et al. (1996) utilizando plasma humano citratado (200 µL), estabilizado à temperatura de 37°C, procedendo com a adição dos tratamentos, em diferentes concentrações, e contagem do tempo de coagulação com leve agitação e observação constante até a formação de um coágulo rígido. O potencial dos compostos em inibir a coagulação foi avaliado com adição dos tratamentos ao plasma citratado, incubação entre 5 a 10 minutos e posterior adição de 50 µL

de solução de cloreto de cálcio a 100 mM, com contagem do tempo. O tempo necessário para a formação do coágulo foi medido em segundos, sendo que a inibição (atividade anticoagulante) foi observada de acordo com o aumento médio do tempo da coagulação em relação ao controle contendo apenas  $\text{CaCl}_2$ .

### **3.3. Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio**

Para a avaliação de possíveis interações dos fungicidas com moléculas de fibrinogênio foi utilizada a metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras, descrita por Edgar e Prentice (1973). Os compostos foram incubados com as moléculas proteicas em diferentes proporções, por 2h a 37°C, seguindo com a parada das reações com adição de  $\beta$ -mercaptoetanol e permanência das amostras em banho de ebulição por 5 minutos. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida a 12% (m/v), possibilitando a observação das cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  do fibrinogênio controle, assim como a presença de fibrinopeptídios nas amostras em que houver proteólise. Como controle positivo, foi utilizado um indutor de quebra do fibrinogênio conhecido (peçonha de *Bothrops atrox* a 60  $\mu\text{g/mL}$ , cuja composição apresenta fibrinogenases).

### **3.4. Atividade Trombolítica**

A atividade trombolítica foi avaliada sobre coágulos sanguíneos formados *in vitro* conforme metodologia descrita por Cintra et al. (2012). Cada trombo foi obtido distribuindo 100  $\mu\text{L}$  de sangue fresco em cada poço de placas de microtitulação e deixando os mesmos coagular por 15 minutos em temperatura ambiente. Após esse período os coágulos foram incubados por 24 horas a 37°C com diferentes concentrações dos compostos, utilizando um agente trombolítico (peçonha de *Bothrops atrox* 60  $\mu\text{g/mL}$ ) e PBS (30  $\mu\text{L}$ ) como controles positivo e negativo, respectivamente. Após incubação, a atividade trombolítica foi estimada baseando-se no tamanho do coágulo remanescente, medindo os volumes de líquido liberados dos trombos.

### **3.5. Atividade Fosfolipásica**

A atividade fosfolipásica foi realizada conforme metodologia descrita por Gutierrez et al. (1988), com adaptações. Um gel foi elaborado com  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ , gema de ovo (como fonte de lecitinas) e azida de sódio 0,005% (para inibir o crescimento de micro-organismos no meio) e ágar bacteriológico 1% em substituição à agarose, dissolvido em PBS

(pH 7,2). O meio foi vertido em placas de petri e após sua solidificação, foram feitos orifícios de tamanho uniforme (~ 0,5 cm de diâmetro) onde foram aplicados os tratamentos. Os halos translúcidos, resultantes da atividade fosfolipásica (expressos em milímetros), foram avaliados após 18 horas de permanência das placas em câmara de cultura celular a 37°C.

### **3.6. Atividade Caseinolítica**

Utilizando como base a metodologia descrita por Gutiérrez et al. (1988), procedeu-se a substituição das lecitinas de gema de ovo pelo substrato caseína, sendo este solubilizado e incorporado ao meio em concentração equivalente à descrita por Hebert, Raya e Giori (2000) para avaliação em meio líquido. A concentração final de caseína na placa foi de 0,027%, baseando-se no volume de meio. Assim, os géis foram elaborados e após sua solidificação em placas de petri, foram feitos orifícios de tamanho uniforme (~ 0,5 cm de diâmetro) onde os tratamentos foram aplicados. A coloração do gel se deu com Amido Black (0,0025%) por 5 minutos, e o descoramento foi feito utilizando ácido acético 20% por aproximadamente 6 horas. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel caracteriza a atividade caseinolítica, sendo esta representada pela medida do diâmetro do halo, expressa em milímetros.

### **3.7. Atividade hemolítica em meio sólido**

Esta atividade foi avaliada pelo uso de meio sólido conforme descrito por Gutiérrez et al. (1988), sendo realizada a substituição da fonte de lecitinas (gema de ovo) por um concentrado de eritrócitos humanos. Desta forma, foi elaborado um gel ( $\text{CaCl}_2$  0,01 mol L<sup>-1</sup>; eritrócitos lavados em PBS 1:3 v v<sup>-1</sup> PBS; azida de sódio 0,005%) com ágar bacteriológico 1% dissolvido em PBS, pH 7,2. O meio foi vertido e após sua solidificação em placas de petri, foram feitos orifícios de tamanho uniforme (~ 0,5 cm de diâmetro) onde foram aplicados os tratamentos. Os efeitos dos tratamentos e PBS (negativo) foram avaliados após 18 horas de permanência das placas em câmara de cultura celular a 37°C. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel caracteriza a atividade hemolítica, sendo esta representada pela medida do diâmetro do halo, expressa em milímetros.

O sangue, após a coleta em tubos contendo heparina, foi imediatamente centrifugado, descartando-se o sobrenadante e suspendendo as células em tampão PBS, que a seguir foram lavadas 2 vezes com centrifugações de 1200 g por 10 minutos, usando volumes aproximados

de 10 mL de mesmo tampão. Após as centrifugações, foi obtido um concentrado de eritrócitos que foi utilizado na composição do gel.

### **3.8. Atividade hemolítica em meio líquido**

Para a obtenção dos eritrócitos utilizados nesta atividade, foram coletados 6mL de sangue em vacutainers contendo heparina e o volume completado para 12mL com PBS ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3 mM; NaCl 154 mM; pH 7,4) e centrifugado por 5 minutos a 700 g (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) por 3 vezes, substituindo o sobrenadante por PBS a cada repetição. Os eritrócitos foram diluídos para a obtenção dos hematócitos de 0,5 e 1%. Os controles foram realizados com PBS (controle de hemólise mecânica) e água destilada (controle de hemólise total).

Os eritrócitos, juntamente com as amostras dos fungicidas (tebuconazol e difenoconazol) e os controles, foram adicionados a microtubos e incubados a 37 °C por 1h (homogeneizados de 10 em 10 minutos). Decorrido o período de incubação, foi realizada centrifugação por 5 minutos a 1500 g e realizadas leituras em espectrofotômetro a 412 nm conforme metodologia descrita por Rangel et al. (1997), com pequenas modificações.

A porcentagem de hemólise foi calculada com base na concentração de hemoglobina presente no sobrenadante dos incubados, de acordo com a equação a seguir:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{A_{\text{am}} - A_{\text{PBS}}}{A_{\text{H}_2\text{O}} - A_{\text{PBS}}} \times 100$$

em que  $A_{\text{am}}$ ,  $A_{\text{PBS}}$  e  $A_{\text{H}_2\text{O}}$  são respectivamente as absorbâncias da amostra teste, do controle em PBS e do controle em água, aferidas em 412 nm.

### **3.9. Atividade Mitocondrial**

Nesse experimento tem-se como objetivo avaliar a possível ação inibidora dos fungicidas sobre a atividade da enzima Succinato Desidrogenase (atuante em ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons).

#### **3.9.1. Obtenção do extrato mitocondrial**

Fígado de frango fresco foi homogeneizado (30 segundos a 4°C) em liquidificador utilizando 100 mL de sacarose 0,25M em tampão fosfato 0,05M pH 7,4. Em seguida o material foi filtrado em gaze e centrifugado 3300 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi

descartado e o sedimento enriquecido com mitocôndrias foi utilizado como fonte da enzima succinato desidrogenase.

### **3.9.2. Avaliação do efeito inibidor dos fungicidas sobre a atividade da enzima**

As mitocôndrias foram incubadas (30 minutos a 37°C) com amostras dos fungicidas em diferentes proporções. Após incubação foi adicionada a solução de substrato acrescida de 0,5 mL KCN 0,05M preparado em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 e 2,0 mL de DCP 0,0004M preparado em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4) seguindo com incubação por mais 30 minutos. Em seguida, em banho de gelo, foram adicionados em todos os tubos 0,2mL de ácido malônico 0,3M pH 7,4 para interromper a reação da succinato desidrogenase. Foram realizadas leituras em 630 nm. Para calcular a porcentagem de succinato desidrogenase inibida pelos fungicidas, considerar-se-á como 100% de atividade o controle contendo apenas a enzima sem tratamentos.

#### **- Solução de Substrato**

- a) 8,5 mL de água
- b) 5,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4
- c) 1,0 mL succinato de sódio 0,1M preparado em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4
- d) 0,5 mL KCN 0,05M preparado em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4
- e) 2,0 mL de DCPI 0,0004M preparado em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4

### **3.10. Análises estatísticas**

Os dados obtidos, que foram passíveis de análise estatística, foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk ao nível de 5% para a verificação de normalidade dos dados. Os que foram constatados a distribuição normal, o teste de Dunnet foi realizado. Os dados que não apresentaram distribuição normal, uma tentativa de normalização pelo procedimento PROC RANK foi realizada, e os dados não normalizados foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5%. O programa estatístico utilizado foi o SAS (9.0).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ambos fungicidas já tiveram sua toxicidade estudada por diversos autores, contudo poucos são os trabalhos em que o objetivo de estudo configura danos causados em seres humanos. A maioria dos organismos em que ambos, tebuconazol e difenoconazol, foram testados, são aquáticos.

No teste do cometa, nas concentrações em que os fungicidas foram avaliados, não foram encontrados danos nos nucleóides obtidos dos leucócitos tratados. Tais concentrações podem ter tido efeito drástico sobre as células, fazendo-as entrar em modo de defesa absoluta, impedindo a penetração dos compostos. Assim, sugere-se que o experimento seja futuramente conduzido com menores concentrações dos fungicidas, para melhor avaliação dos efeitos. Em estudo, conduzido em Zebrafish (*Danio rerio*), utilizando o teste do cometa, foi observada ação genotóxica, após tratamento com o tebuconazol nas concentrações de 100, 200 e 300 µg/L (CASTRO, 2016). A analogia entre as células, humana e de peixe, permite a comparação dos estudos, e considerando o maior tempo de exposição (24, 48 e 72 horas), das células de peixes, sugere-se a necessidade de reavaliar a ação dos fungicidas sobre células humanas, reduzindo as concentrações avaliadas e aumentando o tempo de exposição. Em conformidade a essa sugestão, Martinez et al. (2015) utilizou o ensaio cometa para avaliar a ação do tebuconazol sobre células de duas espécies de algas verdes (*Pseudokirchneriella subcapitata* e *Nannocloris oculata*), expostas por 24 horas. Quando testado nas concentrações de 3 e 6 mg/L, o fungicida foi genotóxico. Confirmando a genotoxicidade observada para o tebuconazol, Sivikova et al. (2013) avaliaram o fungicida nas concentrações de 3, 6, 15, 30 e 60 µg/mL utilizando os testes de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, micronúcleo e índice mitótico.

Ambos os fungicidas não apresentaram ação proteolítica sobre moléculas de fibrinogênio, nas condições avaliadas.

Doses elevadas dos fungicidas não induziu hemólise em meio sólido, embora a atividade citotóxica tenha sido observada em meio líquido.

Para o tebuconazol, pode-se observar, na atividade hemolítica em meio sólido, a formação de halos nas concentrações 100x (12,5 mg/mL) e 1000x (125 mg/mL) superiores a recomendada, sendo obtidos diâmetros de 7mm e 10mm, respectivamente, enquanto que para o difenoconazol foi observado halo hemolítico apenas na concentração de 1000x (100 mg/mL) - 9.3mm.

Na avaliação de hemólise em meio líquido (Tabela 3), foram observadas porcentagens estatisticamente significantes de lise dos eritrócitos, quando tratados com difenoconazol nas concentrações de 12.500 e 125.000 µg/mL e com tebuconazol na concentração de 100.000 µg/mL, para ambos os hematócritos avaliados. Embora a porcentagem de lise celular seja baixa, não se pode descartar o fato de que há hemólise, durante a manipulação das células, resultante de ação mecânica, sendo necessário avaliar o PBS como controle negativo. O controle positivo (H<sub>2</sub>O) foi responsável por 100% de hemólise. Assim como o teste de hemólise líquido, as concentrações de 100x e 1000x foram realizadas, como pode ser observado na tabela abaixo.

**Tabela 3.** Porcentagem de atividade hemolítica, avaliada em meio líquido, nos diferentes hematócitos (0,5% e 1%) avaliados. s.a (sem atividade). Controle positivo: H<sub>2</sub>O. Os dados representam médias de resultados obtidos em 3 experimentos independentes.

<b>DIFENOCONAZOL</b>			<b>TEBUCONAZOL</b>			<b>Controle +</b>
[µg/mL]	<b>0,50%</b>	<b>1%</b>	[µg/mL]	<b>0,50%</b>	<b>1%</b>	
31,25	s.a	s.a	25	s.a	s.a	<b>100%</b>
62,5	s.a	s.a	50	s.a	s.a	
125	s.a	s.a	100	s.a	s.a	
250	5,22%	0,83%	200	s.a	s.a	
500	2,33%	2,35%	400	s.a	s.a	
12.500	60,86%	100%	10.000	s.a	s.a	
125.000	100%	100%	100.000	77%	38%	

Na atividade coagulante (Tabela 4), observa-se uma diminuição do tempo de coagulação em relação ao controle positivo, nas amostras de plasma tratadas com ambos os fungicidas. Contudo, isso ocorre em proporções diferentes para os fungicidas avaliados, uma vez que o difenoconazol reduziu o tempo de coagulação em maior grau na concentração de 500 µg/mL, enquanto que o tebuconazol induziu maior efeito pró-coagulante nas concentrações de 25 e 50 µg/mL. Apesar dos resultados encontrados na estatística, não se pode descartar o fato de que outras concentrações também são pró-coagulantes. Devido às condições experimentais e das implicações que alguns segundos fazem na coagulação, considerou-se também com efeitos as concentrações de 31,25, 125 e 250 µg/mL para o difenoconazol, e 200 e 400 µg/mL para o tebuconazol. Isso foi avaliado dando-se 25 segundos de diferença entre o controle e os tratamentos, uma vez que esse tempo é o suficiente para

desencadear alguns processos da cascata de coagulação, como por exemplo, a ativação da protrombina (normalmente entre 10 a 14 segundos) e a ativação parcial da tromboplastina (normalmente entre 24 a 40 segundos), de acordo com um coagulograma.

Em estudo feito por Baurand et al. (2015), onde os autores avaliaram a genotoxicidade de certos agrotóxicos, incluindo o tebuconazol, foram notadas alterações significativas apenas nas concentrações inferiores àquelas recomendadas pelo fabricante, corroborando assim o resultado encontrado no presente trabalho. Ao reduzirem os tempos de coagulação, tanto o difenoconazol quanto o tebuconazol podem ser considerados como substâncias pró-coagulantes. Levando em consideração a presença desses compostos dentro do corpo humano é possível sugerir sua atuação na formação de coágulos/trombos dentro da corrente sanguínea, gerando quadros patológicos.

**Tabela 4.** Resultados da atividade coagulante para ambos os fungicidas, apresentados pelas médias dos tempos de coagulação, em segundos. C+: CaCl<sub>2</sub> 0,1M. Dados seguidos das mesmas letras dos respectivos controles possuem igualdade estatística em relação a eles (p<0,05). Os dados representam médias de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. \* Potencial pró-coagulante.

	DIFENOCONAZOL		TEBUCONAZOL		
	[µg/mL]	Tempo (seg)	[µg/mL]	Tempo (seg)	
<b>C +</b>	31,25	98,33 a	25	88,67* b	<b>C +</b>
126 a	62,5	151,33 a	50	76,33* b	120 a
	125	100,33 a	100	138,33 a	
	250	99,67 a	200	108 a	
	500	86* b	400	129,3 a	

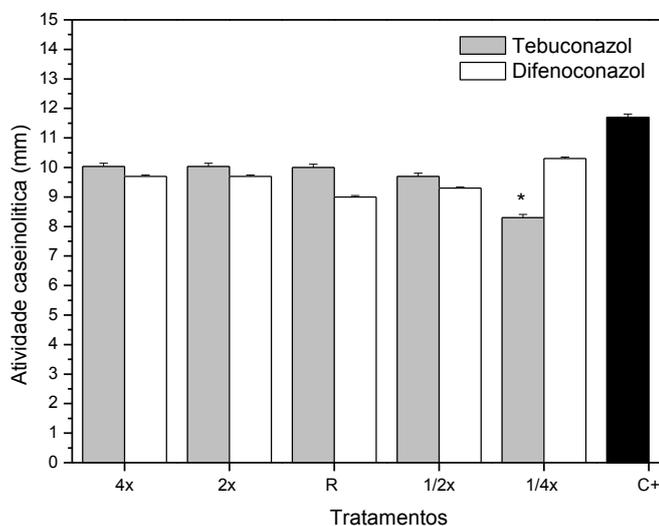
Os resultados encontrados no teste da atividade trombolítica (Tabela 5) demonstram uma menor dissolução dos trombos nos tratamentos com os fungicidas do que a observada para o controle positivo (peçonha de *Bothrops atrox* 60 µg/mL; cuja composição apresenta proteases hemorrágicas, PLA<sub>2</sub>s com ação anti-agregante de plaquetas e hemolítica). Tanto o tebuconazol quanto o difenoconazol apresentaram resultados estatisticamente diferentes do controle positivo (p<0,05). Algumas concentrações apresentaram potencial pró-trombótico (Tabela 5), tornando os trombos mais rígidos e reduzindo a liberação de líquido pelo trombo, corroborando o efeito pró-coagulante observado neste trabalho (Tabela 4).

**Tabela 5.** Resultados da atividade trombolítica para ambos os fungicidas, apresentados pelas médias dos volumes liberados, em microlitros. C+: peçonha de *B. atrox*, 60µg/mL. C-: PBS. Dados seguidos das mesmas letras dos controles possuem igualdade estatística em relação a cada um deles ( $p < 0,05$ ). Os dados representam médias de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. \*Potencial pró-trombótico.

DIFENOCONAZOL		TEBUCONAZOL		
[µg/mL]	Volume (µL)	[µg/mL]	Volume (µL)	
31,25	35,83* b	25	38,16* b	C +
62,5	44 b	50	37,33* b	55 a
125	40,33 b	100	39 b	
250	40,83 b	200	31,33* c	C -
500	45,83 b	400	40,5 b	39,3 b

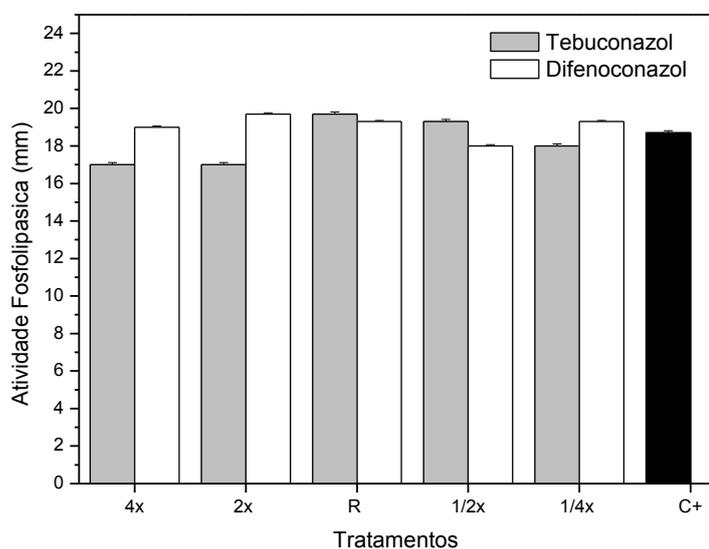
Ambos os fungicidas apresentaram atividade caseinolítica (Figura 1). O difenoconazol e o tebuconazol apresentaram atividade similar à observada para o controle positivo (peçonha de *B. atrox* - 60 µg/mL), sendo observada diferença estatística apenas para o valor obtido na concentração de 25µg/mL para o tebuconazol. Vale salientar que os fungicidas agiram como indutores de quebra da caseína, em grau semelhante ao exercido pela peçonha ofídica, cuja composição apresenta diversas classes de proteases.

**Figura 1.** Resultados da atividade caseinolítica para ambos os fungicidas, apresentados pelas médias dos tamanhos dos halos, em milímetros. C+: peçonha de *B. atrox*, 60 µg/mL. C-: PBS. Os dados representam médias de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. \*Difere estatisticamente do controle positivo ( $p < 0,05$ ).



Os resultados obtidos para a atividade fosfolipásica (Figura 2) mostram que todas as concentrações testadas para ambos os fungicidas apresentaram semelhança estatística ( $p < 0.05$ ) ao controle positivo (peçonha de *B. atrox*, 60 $\mu$ g/mL). Seguindo a mesma linha de raciocínio utilizada para a atividade caseinolítica, devemos destacar que os compostos avaliados mostram-se tóxicos uma vez que induzem a quebra de fosfolipídios (Figura 2), podendo assim ter ação sobre membranas celulares (KOEPPEN e STANTON, 2009), causando alterações no transporte de moléculas e íons, morte celular, além de afetarem processos como coagulação sanguínea (TORTORA e DERRICKSON, 2012) e resposta inflamatória intimamente relacionada à degradação de fosfolipídios (ex: degradação de ácido araquidônico resultando na síntese de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, via cicloxigenases e lipoxigenases).

**Figura 2.** Resultados da atividade fosfolipásica para ambos os fungicidas, apresentados pelas médias dos tamanhos dos halos, em milímetros. C+: peçonha de *B. atrox*, 60 $\mu$ g/mL. C-: PBS. Os dados representam médias de resultados obtidos em 3 experimentos independentes.

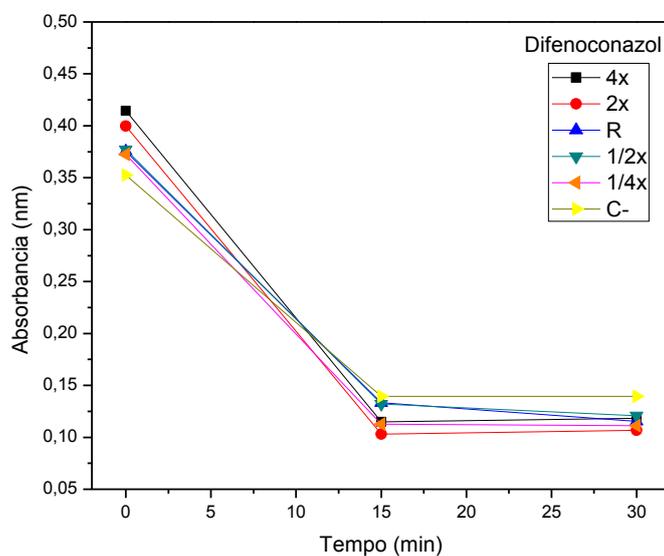


Para a atividade da enzima succinato desidrogenase foi observado um aumento da mesma (observado pela redução da absorção dos incubados em 630 nm), quando avaliada em 15 minutos de reação, na presença do tebuconazol na concentração de  $\frac{1}{4}$  da dose recomendada (Figura 4). Contudo, nenhum dado obtido neste ensaio foi considerado

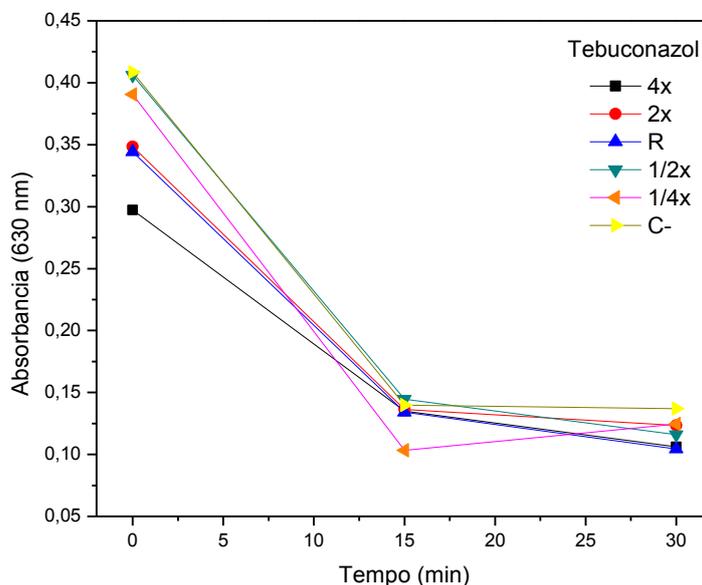
estatisticamente diferente do controle contendo apenas enzima e substrato. Faz-se necessário considerar a reavaliação do teste em diferentes condições, uma vez que alterações foram observadas, assim como outras enzimas relacionadas a ciclo de Krebs ou cadeia transportadora de elétrons devem ser futuramente avaliadas visando definir possíveis efeitos tóxicos destes fungicidas sobre mitocôndrias, implicando em alterações no metabolismo celular.

Em estudo feito por Syromyatnikov et al. (2017), o efeito de alguns fungicidas (sendo um deles o difenoconazol), sobre mitocôndrias de músculo para voo de abelhas polinizadoras (*Bombus terrestris*), foi avaliado. Os autores perceberam que o difenoconazol inibia a respiração mitocondrial ao nível do complexo I e glicerol-3-fosfatase desidrogenase na cadeia de transporte de elétrons.

**Figura 3.** Atividade da succinato desidrogenase extraída de fígado de frango na presença e ausência do difenoconazol. Os dados representam médias de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. C-: atividade da enzima sem tratamentos.



**Figura 4.** Atividade da succinato desidrogenase extraída de fígado de frango na presença e ausência do tebuconazol. Os dados representam médias de resultados obtidos em 3 experimentos independentes. C-: atividade da enzima sem tratamentos.



Embora tenham suas atividades contra fungos fitopatogênicos comprovadas, aumentando a produtividade e retorno econômico aos agricultores, os fungicidas quando largamente utilizados em plantações com uso descontrolado e sem regulamentação podem acarretar efeitos adversos para diversos organismos, afetando ecossistemas e o homem. Como comprovado por Mercadante et al. (2014) em estudo que avaliaram e quantificaram resíduos de tebuconazol na urina humana de trabalhadores rurais, esse composto foi encontrado nas quantidades de 10 a 473  $\mu\text{g/L}$  (TEB-OH) e 3 a 159  $\mu\text{g/L}$  (TEB-COOH). Outros experimentos nessa área demonstraram que os metabólitos TEB-OH e TEB-COOH, por se apresentarem excretados na urina, são bons biomonitorios de presença do tebuconazol no organismo humano (FUSTINONI et al., 2012). Assim sendo, com o acúmulo dentro do corpo humano demonstrado por estudos prévios, e em somatória aos resultados obtidos no presente trabalho, comprovam-se os riscos à saúde humana e prejuízos ao meio ambiente, referentes ao uso desses fungicidas, mediante sua ampla gama de ações tóxicas comprovadas cientificamente.

## CONCLUSÃO

Ambos os fungicidas contendo os princípios ativos tebuconazol e difenoconazol induziram distúrbios à homeostasia e apresentaram citotoxicidade sobre eritrócitos humanos. Vale salientar, que as menores concentrações do tebuconazol foram mais eficazes em causar alterações durante os testes realizados, enquanto que no difenoconazol foram observadas alterações nas concentrações mais elevadas. Estudos complementares devem ser realizados para determinar novas concentrações de uso para os fungicidas, diferentes das recomendadas, uma vez que se comprovou a indução de alterações em células e moléculas humanas, em concentrações inferiores às aquelas recomendadas pelos fabricantes. Além disso, sugere-se estudar a ação mutagênica e teratogênica dos compostos em seres humanos, uma vez que os agricultores trabalham com múltiplas exposições aos agrotóxicos em suas plantações, e nem sempre fazem uso de EPIs. Assim o acúmulo dos efeitos desses fungicidas no organismo pode resultar em alterações ainda mais relevantes que as encontradas nesse trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). 2013.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) <sup>a</sup>. Agrotóxicos. Monografias autorizadas. D-36 - Difenoconazol. 2016.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) <sup>b</sup>. Agrotóxicos. Monografias autorizadas. T-32 - Tebuconazol. 2016.
- Baurand, P.E., Capelli, N., Vaufleury, A. Genotoxicity assessment of pesticides on terrestrial snail embryos by analysis of random amplified polymorphic DNA profiles. *Journal of Hazardous Materials*, v. 298, p. 320–327. 2015.
- Castro, T. F. D. Toxicidade de fungicida comercial a base de tebuconazol em *Danio rerio*. 2016. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- Collins, A.; Dusinská, M.; Franklin, M.; Somorovská, M.; Petrovská, H.; Duthie, S.; Fillion, L.; Panayiotidis, M.; Raslová, K.; Vaughan, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 30, p.139-146. 1997.
- Demur, C.; Métais, B.; Canlet, C.; Tremblay-Franco, M.; Gautier, R.; Blas-Y-Estrada, F.; Sommer, C.; Gamet-Payraastre, L. Dietary exposure to a low dose of pesticides alone or as a mixture: The biological metabolic fingerprint and impact on hematopoiesis. *Toxicology*, v. 308, n. 0, p. 74-87. 2013.

Dong, F.; Li, J.; Chankvetadze, B.; Cheng, Y.; Xu, J.; Liu X. Chiral triazole fungicide Difenoconazole: Absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil. *Environmental Science & Technology*, v. 47(7), p. 3386-3394. 2013.

Edgar, W.; Prentice, C. R. M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. *Thrombosis Research*, v. 2, p. 85. 1973.

FAO/WHO. Pesticide residues in food - 1993 evaluations. Part II - Toxicology. World Health Organization, WHO/PCS/94.4, p. 855-874. 1994.

Fustinoni, S.; Mercadante, R.; Polledri, E.; Rubino, F. M.; Mandic-Rajcevic, S.; Vianello, G.; Colosio, C.; Moretto, A. Biological monitoring of exposure to tebuconazole in winegrowers. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, v. 211, p. S51-S51. 2014.

Gutierrez, J. M.; Avila, C.; Rojas, E.; Cerdas, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, v. 26, p. 411-13. 1988.

Hebert, E. M.; Raya, R. R.; Tailliez, P.; de Giori, G. S. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 59, p. 19-27. 2000.

IBGE/LSPA. Levantamento sistemático da produção agrícola. Janeiro, 2015.

Kang, Z.; Huang, L.; Buchenauer, H. Ultrastructural and cytochemical studies of effects of the fungicide metconazole on *Fusarium culmorum* *in vitro*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, v. 108, p. 419-432. 2001.

Kjeldsen, L. S.; Ghisari, M.; Bonefeld-Jørgensen, E. C. Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 272, n. 2, p. 453-464. 2013.

Koeppe, B. M.; Stanton, B. A. Berne & Levy Physiology. 6th ed. Philadelphia, PA: Mosby/Elsevier. 2009.

Konwick, B. J.; Garrison, A. W.; Avants, J. K.; Fisk, A. T. Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, v. 80, n. 4, p. 372-381. 2006.

Li, Y.; Ma, X.; Lu, G. Systematic investigation of the toxic mechanism of difenoconazole on protein by spectroscopic and molecular modeling. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 105, n. 3, p. 155-160. 2013.

Martinez, R. S.; Di Marzio, W. D.; Sáenz, M. E. Genotoxic effects of commercial formulations of Chlorpyrifos and Tebuconazole on green algae. *Ecotoxicology*, v. 24, n. 1, p. 45-54. 2014.

Menegola, E.; Di Renzo, F.; Metruccio, F.; Moretto, A.; Giavini, E. Effects of mixtures of azole fungicides in postimplantation rat whole-embryo cultures. *Archives of Toxicology*, v. 87, n. 11, p. 1989-1997. 2013.

Mercadante, R. Polledri, E.; Scurati, S.; Moretto, A.; Fustinoni, S. Identification and quantification of metabolites of the fungicide tebuconazole in human urine. *Chemical Research in Toxicology*, v. 27, n. 11, p. 1943-1949. 2014.

- Mourão, P. A. S.; Pereira, M. S.; Pavao, M. S. G.; Mulloy, B.; Tollefsen, D. M.; Mowinckel, M. C.; Abildgaard, U. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 23973–23984. 1996.
- Muri, S. D.; van der Voet, H.; Boon, P. E.; van Klaveren, J. D.; Bruschiweiler, B. J. Comparison of human health risks resulting from exposure to fungicides and mycotoxins via food. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 12, p. 2963-2974. 2009.
- Olive, P. L.; Banáth, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, v.1, n.1, p. 23-29. 2006.
- Parrón, T.; Requena, M.; Hernandez, A. F.; Alarcón, R. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 256, n. 3, p. 379-385. 2011.
- Rangel, M.; Malpezzi, E. L. A.; Susini, S. M. M.; Freitas, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon*, v. 35, p. 305-309. 1997.
- Singh N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Scheider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v. 175, p.184-191. 1988.
- Sivikova, K.; Dianovsky, J.; Holeckova, B.; Galdikova, M.; Kolesarova, V. Assessment of cytogenetic damage in bovine peripheral lymphocytes exposed to *in vitro* tebuconazole-based fungicide. *Chemosphere*, v. 92, p. 555–562. 2013.
- Syromyatnikov, M. Y.; Kokina, A. V.; Lopatin, A. V.; Starkov, A. A.; Popov, V. N. Evaluation of the toxicity of fungicides to flight muscle mitochondria of bumblebee (*Bombus terrestris* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 135, p. 41–46. 2017.
- Tortora, G. J. *Corpo Humano: fundamentos de anatomia e fisiologia*. 8 ed. Porto Alegre: Artmed. 2012.