



UEPB

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA – UEPB

CAMPUS I

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – C

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RONYLSO MARCELINO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO LARVICIDA PYRIPROXYFEN
(Sumilarv®) EM SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS ATRAVÉS DO
TESTE DO MICRONÚCLEO**

CAMPINA GRANDE – PB

2019

RONYLSOON MARCELINO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO LARVICIDA PYRIPROXYFEN
(Sumilarv®) EM SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS ATRAVÉS DO
TESTE DO MICRONÚCLEO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado, na forma de artigo, ao Departamento de Biologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campus I, como requisito obrigatório à conclusão do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Walclécio Morais Lira.

CAMPINA GRANDE – PB

2019

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586a Silva, Ronylson Marcelino da.
Avaliação do potencial mutagênico do larvicida Pyriproxyfen (Sumilarv®) em sangue periférico de camundongos através do teste do micronúcleo [manuscrito] / Ronylson Marcelino da Silva. - 2019.
23 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.
"Orientação : Prof. Dr. Walclécio Morais Lira, Departamento de Biologia - CCBS."
1. Pesticida. 2. Piriproxifeno. 3. Genotoxicidade. I. Título
21. ed. CDD 570

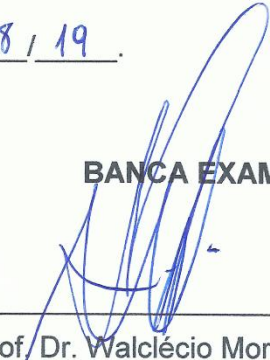
RONYLSO MARCELINO DA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO LARVICIDA PYRIPROXYFEN
(Sumilarv®) EM SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS ATRAVÉS DO
TESTE DO MICRONÚCLEO

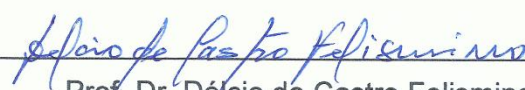
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado, na forma de artigo, ao Departamento de Biologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campus I, como requisito obrigatório à conclusão do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 09 / 08 / 19.


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Walclécio Moraes Lira (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Délcio de Castro Felismino
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. M.ª Nathálya Carvalho Farias
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

“Dou respeito às coisas desimportantes e aos seres desimportantes. Prezo insetos mais que aviões. Prezo a velocidade das tartarugas mais que a dos mísseis. Tenho em mim um atraso de nascença. Eu fui aparelhado para gostar de passarinhos.”

(Manoel de Barros)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe. Eu sou tudo que sou porque ela me amou.

À minha família pelo exemplo e amor incondicional.

Ao professor Walclécio por ter me acolhido, aconselhado e orientado durante essa jornada.

À equipe do Núcleo de Mutagênese Ambiental (NUMA) que contribuiu com mais que conhecimento e apoio para que este trabalho fosse concluído, em especial às técnicas Andeilma e Silvânia.

Aos amigos Hugo Gabriel, Paulo Vinícius, Monique Alves, Simone Cristina, Jeane Souza, Armando Lauro e José Rafael pela amizade, conselhos e apoio em todos os momentos.

Aos colegas de turma Maria Caroline, Izes Karolline, Bruna Alexandre, Tamyres Silva, Thiago França e Israel Silva, que compartilharam comigo os prazeres e dores da graduação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1 Abordagem Metodológica.....	10
2.2 Animais	10
2.3 Delineamento Experimental.....	10
2.3.1 Dosagem e Diluição do Pyriproxyfen	10
2.3.2 Tratamentos	11
2.4 Análise Citológica.....	12
2.5 Análise Estatística	12
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
3.1 Ensaio Agudo	12
3.2 Ensaio Subcrônico	15
4 CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS	21

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO LARVICIDA PYRIPROXYFEN (Sumilarv®) EM SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS ATRAVÉS DO TESTE DO MICRONÚCLEO

Ronylson Marcelino da Silva¹

Resumo

Pesticidas são compostos usados há milênios como forma de melhorar a produção agrícola e combater vetores de doenças. Entretanto, o contato com tais compostos tem gerado preocupação por conta de sua toxicidade potencial. O pyriproxyfen (PPF) é um larvicida recomendado pela Organização Mundial de Saúde, usado no tratamento de água potável no Brasil com o intuito de combater o mosquito *Aedes aegypti*, transmissor de diversas viroses. Apesar de sua eficiência contra insetos, o PPF tem demonstrado toxicidade em várias espécies não-alvo, inclusive mamíferos. Neste trabalho avaliou-se o potencial mutagênico do pyriproxyfen através do teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos, com exposição aguda (30 horas) e subcrônica (30 dias). Foram definidas três concentrações (250mg, 500mg e 1000mg) administradas via gavagem. Os resultados do teste agudo indicam que o pyriproxyfen teve atividade genotóxica nas concentrações de 500mg e 1000mg, enquanto que no ensaio subcrônico o larvicida se mostrou genotóxico na concentração de 250mg. Tais resultados sugerem que a toxicidade do pyriproxyfen pode não estar restrita a insetos.

Palavras-chave: Pesticida. Piriproxifeno. Genotoxicidade.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os compostos químicos com os quais as populações humanas entram em contato, os pesticidas talvez sejam os mais comuns. O primeiro registro de uso dessas substâncias remete aos sumérios, há 4500 anos, que utilizaram compostos de enxofre contra insetos e ácaros. Desde então substâncias orgânicas e inorgânicas têm sido produzidas e utilizadas com a finalidade de proteger plantações contra pragas e controlar vetores de doenças, como mosquitos (UNSWORTH, 2010).

O termo pesticida engloba compostos como larvicidas, herbicidas e também fungicidas além de fatores de crescimento vegetal. Seu objetivo principal é ser letal

¹ Graduando em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual da Paraíba – Campus I. Contato: ronylsonmarcelino@gmail.com

aos organismos alvo (pragas agrícolas), enquanto permanecem inofensivos para as espécies não alvo. Isso contribui para a geração de benefícios primários, secundários e terciários, como o aumento da produtividade agrícola, da qualidade dos alimentos e no controle de vetores de doenças (AKTAR et al., 2009). No entanto, o uso abusivo desses químicos tem fomentado preocupação dentro da comunidade científica. Muitos estudos apontam a relação entre o contato com pesticidas e o comprometimento da saúde humana (MEJÍA et al., 2014; IGBEDIOH, 1991; JEYARATNAM, 1985).

Um dos compostos atualmente em voga é o *pyriproxyfen* (PPF), um pesticida utilizado em lavouras de tomate, berinjela e algodão bem como no controle de populações de moscas, besouros e mosquitos ao redor do mundo (CARRIERE et al., 2012). O pyriproxyfen (4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy) propyl ether) é do grupo dos éteres piridiloxipropílicos, e usa a pirimidina como base química. Tem CAS de nº. 95737-68-1 e peso molecular de 321,5g mol⁻¹. É um sólido ceroso amarelo ou branco amarelado, com ponto de fusão de 47,4°C com densidade maior do que a água (1,242 g/mL a 25°C) (WHO, 2005). Se apresenta em formulação granulada, inodora e contém areia vulcânica (pedra-pomes ou pumice) em sua composição associada a um surfactante. Foi primeiro sintetizado e desenvolvido Por Sumitomo Chemical Co. Ltd. na década de 1990. Este produto é registrado sob o número 3.2586.0009.001-1 (Sumilarv® 0,5G) Sumitomo Chemical do Brasil na ANVISA/Ministério da Saúde. (SANTA CATARINA, 2014).

O pyriproxyfen pertence ao grupo dos larvicidas *IGR* (do inglês *Insect Growth Regulator*, regulador de crescimento de insetos), como o metopreno, e mimetiza o hormônio juvenil em insetos. Seu mecanismo de ação é inibir o aparecimento das características adultas, como o desenvolvimento de asas e órgãos reprodutivos maduros, nas larvas e pupas, mantendo-as imaturas. (EFSA, 2014). Muitos trabalhos atestam a eficiência do uso de pyriproxyfen no combate ao mosquito *Aedes aegypti*, transmissor das viroses Dengue, Febre de Chikungunya e Febre Zica quando aplicado em reservatórios d'água e isso contribuiu para sua utilização em ampla escala através de políticas de saúde pública que visam o combate as arboviroses (SIHUINCHA et al., 2005; RESENDE; GAMA, 2006; WANGAI, 2019.). No Brasil, tem sido usado para controle do mosquito *Aedes aegypti* desde 2014 (SANTA CATARINA, 2014)

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o pyriproxyfen não demonstrou mutagenicidade nos testes *in vitro* com *Salmonella typhimurium* (tesde de Ames) e a dose letal (via oral) em camundongos é de $DL_{50} > 5000$ mg/kg. O relatório concluiu que o PPF apresenta baixa toxicidade a mamíferos (WHO, 2005). Contudo, segundo o Pesticide Properties DataBase da Universidade de Hertfordshire, o pyriproxyfen está incluso na classe III da Classificação de Cramer – uma escala que estima os riscos de toxicidade de substâncias químicas – o que o coloca como substância com alta toxicidade potencial.

Uma substância é tóxica a um organismo vivo quando é capaz de provocar-lhe dano grave ou mesmo morte. A toxicidade aguda pode ser definida como o conjunto de efeitos adversos observados num sistema biológico, provocados por um químico após curto período de exposição (isto é, após uma única dose ou múltiplas doses dentro de 24h). Por conseguinte, a toxicidade subcrônica caracteriza-se pela manifestação de injúria decorrente de exposição a um agente tóxico, num período de tempo de até 30 dias (BARROS; DAVINO, 2008).

Dentre os efeitos provocados por substâncias tóxicas, as alterações no material genético são de grande importância do ponto de vista toxicológico. Tais alterações são denominadas *mutações*. Mutações são modificações na sequência de bases do DNA e podem ter efeitos prejudiciais, benéficos ou neutros para o organismo (GRIFFITHS, 2013). Apesar de remeter automaticamente a algo negativo, é interessante notar que sem mutações a vida como a observamos nos dias atuais jamais seria possível. Isso se dá principalmente porque as alterações no DNA têm a capacidade de gerar mudanças fenotípicas que podem ser benéficas ao organismo que as sofreu. É graças às mutações que a evolução é possível (MAYR, 2009). Muitas mutações ocorrem naturalmente no indivíduo, seja na replicação do DNA ou no seu processamento. Outras são provocadas por agentes exógenos, chamados *agentes mutagênicos*. Estes agentes podem ser compostos químicos (como a Ciclofosfamida ou o Etil-Metanosulfonato), agentes físicos (raios γ e raios X) ou biológicos (em casos excepcionais com *Helicobacter pylori*) (GRIFFITHS, 2013). As mutações do DNA provocadas por agentes mutagênicos merecem extrema atenção, uma vez que podem estar relacionadas ao aparecimento de neoplasias (BISHOP, 1991).

A área responsável por estudar os mecanismos e agentes mutagênicos é a Genética Toxicológica que tem ganhado destaque no meio científico desde que as preocupações com uma catástrofe global causada por agentes mutagênicos introduzidos no ambiente aumentaram. Através de técnicas e ensaios laboratoriais a Genética Toxicológica avalia o potencial mutagênico dos agentes com os quais o homem entra em contato diariamente, seja por fontes ocupacionais, de dieta ou poluição (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). Um dos ensaios de avaliação mutagênica mais amplamente utilizados é o *teste do micronúcleo*. Ele foi descrito pela primeira vez por W. Schmid em meados da década de 70 e consiste num procedimento realizado *in vivo* em mamíferos ou *in vitro* em cultura celular para identificar químicos com potencial clastogênico – agentes com capacidade de quebra cromossômica – ou aneugênico – agentes que interferem no fuso mitótico. Tais eventos são responsáveis pela formação de micronúcleos (SCHMID, 1975).

Micronúcleos (MNs) são núcleos arredondados ou levemente ovalados, localizados geralmente na região periférica do citoplasma celular e resultam de quebras cromossômicas ou interferência na segregação dos cromossomos durante a mitose. Os MNs são, portanto, fragmentos de cromossomos ou mesmo cromossomos inteiros que não foram incorporados no núcleo principal da célula após sua divisão. O teste é feito por meio da análise de células sanguíneas provenientes de animais previamente expostos a agentes potencialmente mutagênicos e se baseia na identificação de eritrócitos policromáticos (PCE) micronucleados, utilizando sangue periférico ou de medula óssea (FLORES; YAMAGUCHI, 2008). O teste do micronúcleo tem metodologia relativamente simples, baixo custo e funciona como um marcador biológico de danos genotóxicos, além de tornar possível avaliar o potencial mutagênico de muitos compostos com os quais o homem convive (SCHMID, 1975; SETÚBAL et al., 2005; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). O teste é reconhecidamente confiável como ensaio de monitoramento de riscos genotóxicos, sendo considerado padrão ouro juntamente com o teste cometa e a análise de aberrações cromossômicas (FLORES & YAMAGUCHI, 2008).

Com base no exposto, o presente trabalho objetiva levantar dados sobre a genotoxicidade do pyriproxyfen através do teste do micronúcleo realizado com sangue periférico de camundongos com exposição curta (teste agudo) e prolongada (teste subcrônico) ao larvicida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Abordagem Metodológica

A abordagem metodológica seguiu as Diretrizes para o Teste de Produtos Químicos N° 474 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), que trata do Teste do Micronúcleo em sangue periférico de camundongos (OCDE, 2016).

O estudo foi dividido em dois experimentos. Primeiramente avaliou-se a toxicidade do pyriproxyfen em exposição aguda, com duração de 30 horas. Em seguida avaliou-se a toxicidade subcrônica em exposição de 30 dias. Os experimentos foram subsequentes, uma vez que os animais utilizados no primeiro teste formaram os grupos do segundo.

2.2 Animais

Foram utilizados 30 camundongos da espécie *Mus musculus*, de linhagem *swiss albina*. Os animais eram jovens adultos saudáveis, com sete semanas de idade.

O peso médio versou em 26g (± 2 g) e os animais foram divididos em cinco grupos (A, B, C, D e E), sendo cada grupo experimental formado por seis animais (três fêmeas e três machos), separados por sexo e distribuídos ao acaso.

Os grupos experimentais foram mantidos em ambiente com temperatura em torno de 25°C (± 3 °C) com ciclo luminoso de 12 horas/luz e 12 horas/escuro. Ração Presence (Neovia®) e água foram providas *ad libitum*.

2.3 Delineamento Experimental

2.3.1 Dosagem e Diluição do Pyriproxyfen

O larvicida pyriproxyfen se apresenta em formulação granulada. Desse modo, sua diluição foi realizada através da maceração dos grãos utilizando um almofariz.

Foram definidas três concentrações do químico para a realização dos ensaios de genotoxicidade: 250mg, 500mg e 1000mg, diluídas, cada, em um litro de água destilada.

Posteriormente, as soluções do larvicida diluído foram armazenadas em garrafas PET previamente lavadas com álcool 70% e revestidas com papel alumínio para evitar contato direto com a luz solar. As soluções foram homogeneizadas diariamente durante 3 minutos para garantir a ressuspensão das mesmas.

2.3.2 Tratamentos

Os grupos experimentais A, B e C receberam as dosagens de 250mg, 500mg e 1000mg, respectivamente, através de gavagem. O grupo D consistiu no controle negativo (recebendo apenas água destilada como tratamento) e o grupo E no controle positivo – tratado com ciclofosfamida a 50mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal.

O primeiro experimento simulou uma intoxicação aguda e consistiu na administração do larvicida por via oral nos grupos A, B e C. Decorridas 30 horas, aproximadamente 5µL de sangue periférico foi colhido através de punção da veia caudal dos animais para realizar esfregaços sanguíneos. As lâminas foram produzidas em duplicata, codificadas e secas a temperatura ambiente por 24hrs. Posteriormente, foram fixadas em álcool metílico durante 10 minutos e coradas com Giemsa diluído na proporção de 1:9 e pH 6.8, durante 15 minutos.

O segundo experimento simulou uma intoxicação subcrônica e nele os animais receberam, via oral, uma única dose de pyriproxyfen a cada 24hrs, durante 30 dias. Ao fim, novos esfregaços foram realizados com sangue periférico coletado da veia caudal dos camundongos e as lâminas produzidas foram codificadas, fixadas e coradas como no experimento anterior.

Ao fim da fase experimental, os animais foram eutanasiados através de deslocamento cervical seguindo os protocolos da American Veterinary Medical Association para eutanásia de animais (LEARY, 2013).

2.4 Análise Citológica

Todas as lâminas foram codificadas e distribuídas aleatoriamente a fim de garantir que não se identificasse a qual grupo de tratamento ou a qual experimento pertenciam, mantendo a metodologia de teste cego. A análise foi realizada em microscópio óptico Olympus® Cx21, utilizando aumento de 1000x para contagem e identificação de eritrócitos policromáticos (PCE). Dois mil PCE foram contabilizados para cada lâmina e a ocorrência de micronúcleos registrada. Apenas as células coradas apropriadamente, com morfologia preservada e bem separadas entre si foram analisadas, como recomenda Ribeiro et al. (2003).

2.5 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do teste t de Student, utilizando o software Microsoft Excel® 2010 ao nível de significância de 5%. Os resultados dos grupos de tratamento (A, B e C) foram estatisticamente comparados aos do controle negativo para avaliar o potencial mutagênico do pyriproxyfen.

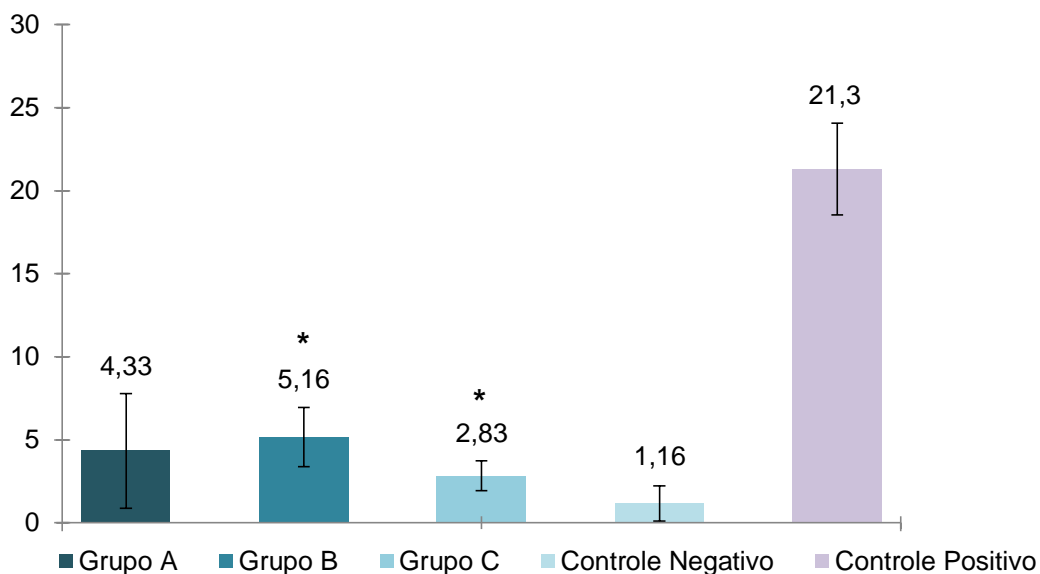
Também foram comparados os resultados do teste agudo (30 horas) ao ensaio subcrônico (30 dias) a fim de se analisar se houve incremento significativo na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados com o aumento do tempo de exposição, assim como as médias de machos e fêmeas para identificar alterações ligadas ao sexo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio Agudo

A frequência média de eritrócitos policromáticos micronucleados registrados após o ensaio agudo é mostrada na figura 1. De acordo com as análises estatísticas (adotando $p < 0.05$), não houve diferenças significativas na frequência de micronúcleos para o grupo A em comparação com o controle negativo. Entretanto, os grupos B e C apresentaram aumento significativo na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados quando comparados ao controle negativo.

Figura 1 – Frequência média de eritrócitos policromáticos micronucleados por grupo de tratamento após ensaio de toxicidade aguda.



Nota: Grupo A: 250mg; Grupo B: 500mg; Grupo C: 1000mg; Controle Negativo: água destilada; Controle Positivo: ciclofosfamida 50mg/kg p.c.; Barras: desvio padrão; Asteriscos (*): significância de $p < 0,05$ em relação ao controle negativo. Fonte: material autoral.

Os resultados do ensaio agudo indicaram que o pyriproxyfen teve atividade genotóxica nas concentrações de 500mg e 1000mg, nas condições testadas em experimento. Esses resultados divergem daqueles apontados em relatório da OMS (WHO, 2005), onde o larvicida não apresentou potencial mutagênico em mamíferos. A literatura frequentemente aponta o PPF como altamente tóxico a insetos, enquanto apresenta baixo risco a organismos não-alvo (SULLIVAN; GOH, 2008; WANGAI, 2019; RESENDE; GAMA, 2006). Entretanto, estudos demonstraram que em doses acima de 120mg por quilo de peso corporal, por dia, o PPF provoca hepatomegalia e mudanças nas concentrações de lipídios do plasma sanguíneo em ratos. Também há registros de anemia modesta em camundongos, ratos e cães em altas doses (WHO, 2005).

O Grupo C apresentou média de eritrócitos policromáticos micronucleados significativamente menor que o grupo B, mesmo tendo recebido uma dose maior do pyriproxyfen. A fim de elucidar estes resultados, avaliou-se a atividade citotóxica do PPF nesta concentração. Segundo Ribeiro et al. (2003) um químico é citotóxico quando diminui a frequência de eritrócitos policromáticos dentre um número total de

células. Para tanto, a razão PCE/PCE+NCE é calculada, sendo NCE os eritrócitos normocromáticos (hemácias). Foram contadas 200 células totais (entre eritrócitos normo e policromáticos) para cada animal do grupo. Apenas as células bem espaçadas entre si, coradas corretamente e com morfologia preservada foram analisadas. A análise estatística revelou que houve diferenças significativas quando comparado o Grupo C ao controle negativo (Tabela 1). Tais resultados demonstram que o pyriproxyfen foi citotóxico na concentração em questão e justificam a queda no número de PCE micronucleados para a maior dose (1000mg) apontando para novos mecanismos de toxicidade do pyriproxyfen.

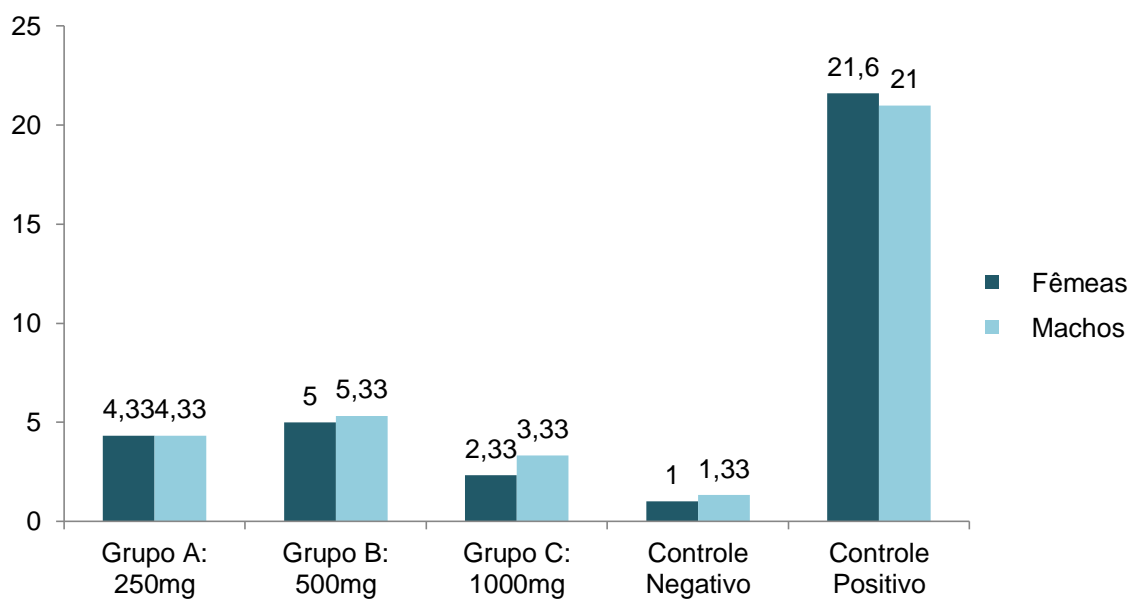
Tabela 1 – Avaliação da citotoxicidade do pyriproxyfen para o Grupo C após ensaio agudo.

Tratamento	Razão PCE/PCE+NCE						Média±SD
	F1	F2	F3	M1	M2	M3	
Grupo C	0,03	0,055	0,035	0,02	0,025	0,05	0,035*±0,01
Controle Negativo	0,05	0,08	0,095	0,12	0,09	0,115	0,091±0,02

Nota: Grupo C: 1000mg; Controle Negativo: água destilada; F: fêmeas; M: machos; SD: desvio padrão; Asterisco (*): significância de $p < 0,05$ em relação ao controle negativo. Fonte: material autoral.

Também foram comparadas as frequências médias entre machos e fêmeas (figura 2) a fim de se identificar se houve diferenças influenciadas pelo sexo na ocorrência de micronúcleos. A análise estatística não mostrou diferenças significativas entre as médias de eritrócitos policromáticos micronucleados por sexo, por grupo de tratamento, o que indica que o pyriproxyfen não exerceu atividade tóxica diferenciada para ambos os sexos.

Figura 2 – Frequência média de eritrócitos policromáticos micronucleados por sexo, por grupo de tratamento, após ensaio de toxicidade aguda.



Fonte: material autoral.

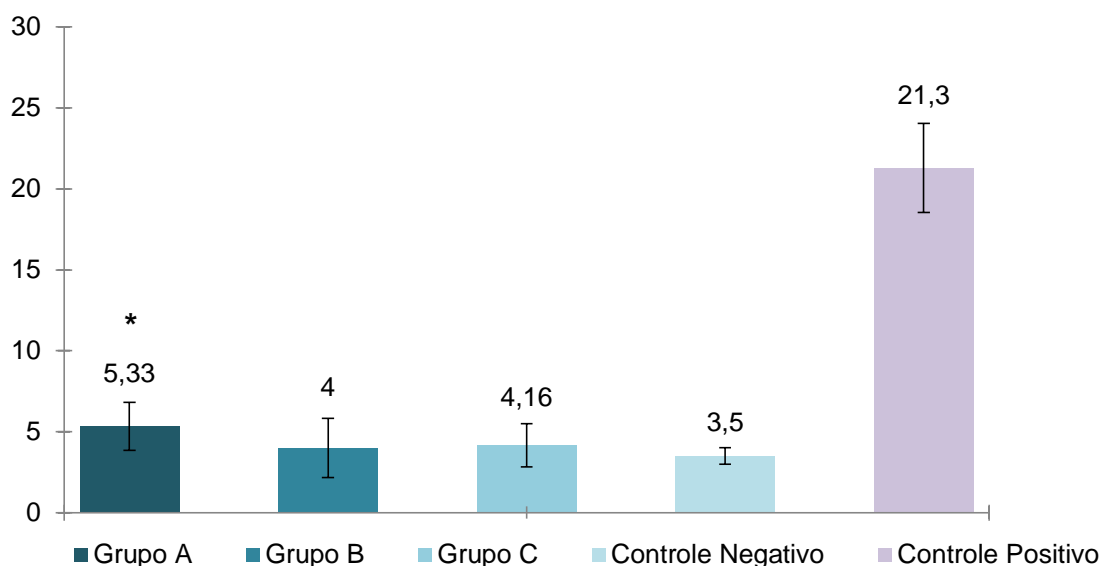
Nossos resultados são reforçados pelos de Maharajan, et. al., (2018) que relataram dano cromossômico provocado pelo pyriproxyfen em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) quando avaliado pelo Ensaio Cometa. Os autores verificaram ainda que o larvicida provoca edema pericárdico, hiperemia e severas alterações no desenvolvimento, na frequência cardíaca e no tamanho dos corações de embriões tratados com apenas 1.66 µg/mL do químico. Em ensaio agudo, Lajmanovich et al. (2019) reportaram que o pyriproxyfen altera os sistemas de enzimas antioxidantes (responsáveis por eliminar radicais livres dos tecidos), a frequência cardíaca e a motilidade de girinos de *Odontoprynus americanus*. Esses registros, aliados aos nossos resultados, sugerem que o PPF pode ser tóxico mesmo em exposições curtas ao larvicida.

3.2 Ensaio Subcrônico

Ao se analisar a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados após 30 dias (figura 3), verifica-se que não houve diferenças significativas entre as médias

dos grupos B e C ao comparar com o controle negativo. Por outro lado, a média do Grupo A apresentou diferença significativa em comparação ao controle negativo.

Figura 3 - Frequência média de eritrócitos policromáticos micronucleados por grupo de tratamento após ensaio de toxicidade subcrônica.



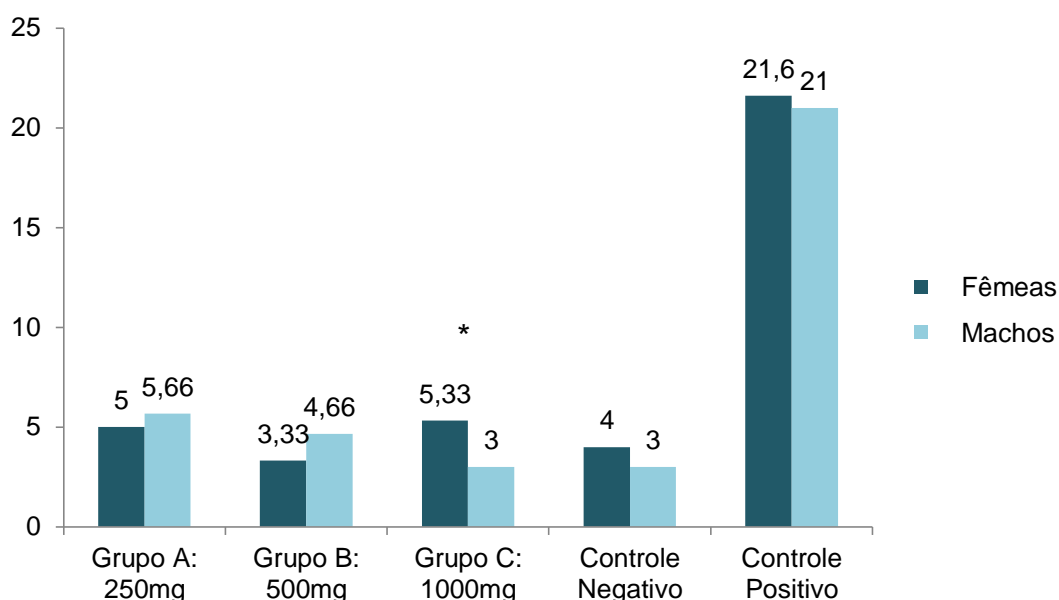
Nota: Grupo A: 250mg; Grupo B: 500mg; Grupo C: 1000mg; Controle Negativo: água destilada; Controle Positivo: ciclofosfamida 50mg/kg p.c.; Barras: desvio padrão; Asterisco (*): significância de $p < 0,05$ em relação ao controle negativo. Fonte: material autoral.

Nossos resultados indicam que o PPF se mostrou genotóxico em baixa concentração após 30 dias de tratamento. A literatura carece de trabalhos que tratem da toxicidade subcrônica do pyriproxyfen. No entanto, o diflubenzuron, um larvicida da mesma classe do PPF, mostrou-se genotóxico em ratos tratados durante 28 dias quando avaliados através do Ensaio Cometa e do teste do micronúcleo (BARROS, 2013).

As frequências médias de eritrócitos policromáticos micronucleados entre machos e fêmeas (Figura 4) também foram comparadas. Observou-se que a análise estatística não evidenciou diferenças significativas entre as médias de fêmeas e machos para os grupos A e B, enquanto que o Grupo C apresentou significância. Este resultado é contrário aqueles publicados pelo Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1986), que concluíram que machos e fêmeas não são particularmente mais sensíveis à maioria dos químicos no ensaio do micronúcleo.

Provavelmente os nossos resultados foram influenciados pela variabilidade biológica dos animais.

Figura 4 – Frequência média de eritrócitos policromáticos micronucleados por sexo, por grupo de tratamento, após ensaio de toxicidade subcrônica.



Asterisco (*): significância de $p < 0,05$ em relação ao controle negativo. Fonte: material autoral.

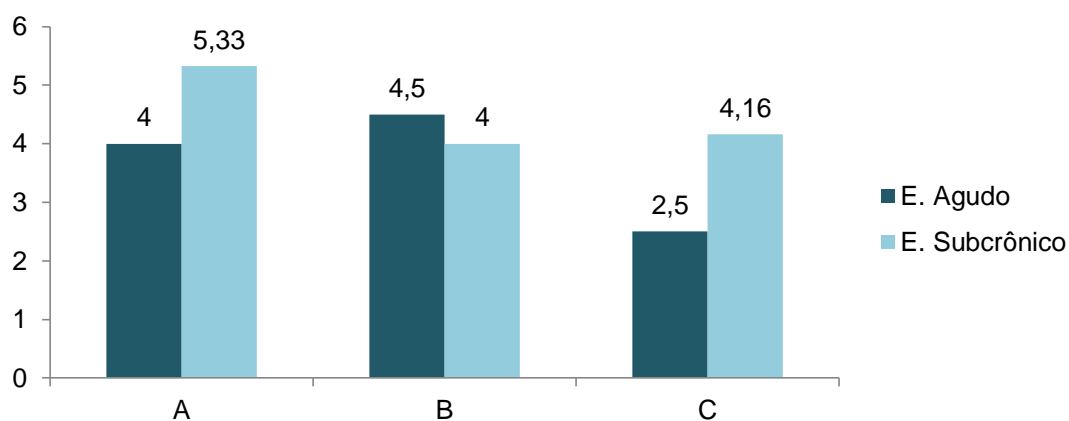
Apesar dos poucos trabalhos disponíveis que tratem da genotoxicidade do pyriproxyfen, a literatura tem registro de outros efeitos adversos provocados pelo larvicida em diversas espécies. Truong *et al.* (2016) concluíram que o pyriproxyfen provocou alterações morfológicas e comportamentais em embriões de peixe-zebra, enquanto Legrand *et al.* (2017) identificaram que o PPF é tóxico a copépodes estuarinos como *Eurytemora affinis*. Santos *et al.* (2017) relataram que microcrustáceos como *Artemia salina* e *Daphnia magna* apresentaram efeitos ecotoxicológicos adversos quando em contato com o pyriproxyfen. O pyriproxyfen também apresentou alta toxicidade em tilápias do Nilo, provocando alterações no comportamento locomotor e lesões graves no tecido hepático, além de alterar as concentrações de proteínas no extrato cerebral dos animais em ensaio agudo e crônico (SILVA, 2017). Utilizando biomarcadores, Nasr *et al.* (2015) identificaram que o PPF reduziu a atividade da enzima acetilcolinesterase (importante no processo de antioxidação de tecidos) em minhocas. Adicionalmente, Bayoumi *et al.* (2003) verificaram efeitos citotóxicos do pyriproxyfen em linhagens de células CHO-

K1 de mamíferos. Tais registros, alinhados aos nossos resultados, sugerem que a toxicidade do PPF pode não estar restrita apenas a insetos.

De acordo com Sullivan e Goh (2008), o pyriproxyfen é altamente propenso a ser bioacumulado, o que sugere que seus possíveis efeitos deletérios sejam agravados com o passar do tempo. Essa tendência não foi observada no presente estudo, uma vez que as médias de eritrócitos policromáticos micronucleados (Figura 5) não diferiram significativamente entre os grupos experimentais do ensaio agudo e subcrônico, quando comparadas estatisticamente.

Koyama et al. (1989) reportaram em estudo de exposição crônica (com duração de 6 meses) que ratos exibiram perda de peso e aumento no tamanho de fígado, rins e glândula tireoide, mas não houve mortes registradas mesmo quando tratados com doses elevadas de pyriproxyfen. Tais observações sinalizam que a toxicidade do PPF deve ser também avaliada por parâmetros fisiológicos e histológicos, além dos testes genotóxicos.

Figura 5 – Frequência média de eritrócitos policromáticos micronucleados por ensaio de toxicidade.



Nota: Grupo A: 250mg; Grupo B: 500mg; Grupo C: 1000mg. Fonte: material autoral.

4 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que o pyriproxyfen pode ter ação genotóxica e citotóxica e que sua toxicidade não se limita apenas a insetos e outros invertebrados, mas pode estender-se a organismos não-alvo como mamíferos. Mesmo em curto período de exposição o larvicida pode apresentar riscos à estabilidade genômica e celular.

Nesse sentido, tem-se como perspectiva através de novos estudos identificar quais os mecanismos de toxicidade exibidos pelo pyriproxyfen, sob diferentes concentrações e tempos de exposição, e avaliar com maior precisão seus potenciais riscos à saúde humana e aos ecossistemas.

ABSTRACT

Pesticides are compounds used for millennia as a way to improve agricultural production and combat disease vectors. However, contact with such compounds has raised concern because of their potential toxicity. Pyriproxyfen (PPF) is a larvicide recommended by the World Health Organization, used to treat drinking water in Brazil to combat the *Aedes aegypti* mosquito, a transmitter of various viruses. Despite its effectiveness against insects, PPF has been shown to be toxic in a number of non-target species, including mammals. In this study, the mutagenic potential of pyriproxyfen was evaluated by micronucleus testing in mouse peripheral blood, with acute (30 hours) and subchronic (30 days) exposure. Three concentrations (250mg, 500mg and 1000mg) administered via gavage were defined. The results of the acute test indicate that pyriproxyfen had genotoxic activity at concentrations of 500mg and 1000mg, whereas in the subchronic test larvicide was genotoxic at 250mg. These results suggest that pyriproxyfen toxicity may not be restricted to insects.

Key-words: Pesticide. Pyriproxyfen. Genotoxicity.

REFERÊNCIAS

- AKTAR, M. W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2009.
- BARROS, Aline Lima de. **Avaliação dos efeitos toxicológicos após exposição aguda e subaguda ao inseticida diflubenzuron em roedores**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde – Faculdade de Ciências da Saúde), Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, 2013.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da Toxicidade. *In*: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. Ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. p. 61-70.
- BAYOUMI, A. E. et al. Cytotoxic effects of two antimolting insecticides in mammalian CHO-K1 cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, p. 19-23, 2003.
- BISHOP, J. M. Molecular Themes in Oncogenesis. **Cell**, v. 64, n. 2, p. 225-248, 1991.
- CARRIERE, Y., *et al.* Large-scale, spatially-explicit test of the refuge strategy for delaying insecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, n. 3, p. 775-780, 2012.
- COLLABORATIVE STUDY GROUP FOR THE MICRONUCLEUS TEST. Sex differences in the micronucleus test. **Mutation Research**, v. 172, p. 151-163, 1986.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of confirmatory data submitted for the active substance pyriproxyfen. **EFSA Journal**, v.12, n. 8, 2014.
- FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do Micronúcleo: Uma Triagem para Avaliação Genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, set./dez. 2008.
- GRIFFITHS, A. J. F *et al.* **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- IGBEDIOH, S. Effects of agricultural pesticides on humans, animals and higher plants in developing countries. **Archives of Environmental Health**, v. 46, n. 4, p. 218-24, 1991.
- JEYARATNAM, J. Health problems of pesticide usage in the Third World. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 42, n. 8, p. 505–506, 1985.

KIRSCH-VOLDERS, M. *et al.* The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 8, p. 873-899, 2011.

KOYAMA, Y. *et al.* A six-month chronic dietary toxicity study of pyriproxyfen in rats. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 14, n. 1, p. 43-64, 1989.

LAJMANOVICH, R. C., *et al.* Insecticide pyriproxyfen (Dragon®) damage biotransformation, thyroid hormones, heart rate, and swimming performance of *Odontophrynus americanus* tadpoles. **Chemosphere**, v. 220, p. 714-722, 2019.

LEARY, S. *et al.* AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 2013. Disponível em: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2019, 12:31.

LEGRAND, E. *et al.* Individual and mixture acute toxicity of model pesticides chlordecone and pyriproxyfen in the estuarine copepod *Eurytemora affinis*. **Environmental Science Pollution Research**, v. 24, n. 6, 2017.

MAHARAJAN, K., *et al.* Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 132-145, 2018.

MAYR, E. **O que é a Evolução**. Rio de Janeiro: Rocco, 2009.

MEJÍA, R. *et al.* Pesticide-Handling Practices in Agriculture in El Salvador: An Example from 42 Patient Farmers with Chronic Kidney Disease in the Bajo Lempa Region. **Occupational Diseases and Environmental Medicine**, v. 2, n.3, 2014.

NASR, M. H. *et al.* Biomarker Response and Biomass Toxicity of Earthworms *Aporrectodea caliginosa* Exposed to IGRs Pesticides. **Environmental & Analytical Toxicology**, v. 5, n. 6, 2015.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. **Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4**, Paris: OECD Publishing, 2016.

PESTICIDE PROPERTIES DATABASE. **Pyriproxyfen**. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/574.htm#none>. Acesso em: 08 mai. 2019, 16:21.

RESENDE, M. C.; GAMA, R. A. Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxyfen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 72-75, jan./fev., 2006.

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

SANTOS, V. S. V., *et al.* Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of *Aedes aegypti* on nontarget organisms: Redefining the use of pyriproxyfen. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 80, n. 3, p.155-160, 2017.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE (Santa Catarina). Orientação Técnica de 14 de novembro de 2014. **Assunto: Orientações para uso do larvicida Pyriproxyfen 0,5G no Programa de Controle da Dengue em Santa Catarina**. Florianópolis: Diretoria de Vigilância Epidemiológica, 2014.

SETÚBAL, A.M.G. *et al.* Micronúcleo: um Importante Marcador Biológico Intermediário na Prevenção do Câncer Bucal. **Revista Odonto Ciência**, v.20, n. 28, p. 137-141, abr./jun., 2005.

SIHUINCHA, M. *et al.* Potential Use of Pyriproxyfen for Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Peru. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 4, p. 620-629, jul. 2005.

SILVA, Fabio Francisco da. **Potencial toxicológico e o impacto do piriproxifeno nos parâmetros zootécnicos de tilápia do nilo (*oreochromis niloticus*, linnaeus, 1758)**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo-AL, 2017.

SULLIVAN, J. J.; GOH, K. S. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. **Journal of Pesticide Science**, v. 33, n. 4, p. 339-350, 2008.

TRUONG, L. *et al.* Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. **Environmental Pollution**, v. 218, November, p. 1089–1093, 2016.

UNSWORTH, J. **History Of Pesticide Use**. Disponível em http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31. Acesso em 22 mar. 2019, 15:42.

WANGAI, L. N. Efficacy of Sumilarv 0.5G - An Insect Growth Regulator - Pyriproxyfen, Against Mosquito Larvae in Kenya. **Journal of Medical Microbiology and Diagnosis**, v. 8, n. 1, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pyriproxyfen in Drinking-water**. Geneva, Switzerland, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Who specifications and evaluations for public health pesticides – pyriproxyfen**. FAO/WHO EVALUATION REPORT 715/2005. Geneva, Switzerland, 2005.