

PUCRS

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

MAGALI GHISOLFI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE PRODUTOS COMERCIAIS
CONTENDO CARBENDAZIM OU TEBUCONAZOL UTILIZANDO TESTE DE
MICRONÚCLEO EM *TRADESCANTIA PALLIDA***

Porto Alegre
2020

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

MAGALI GHISOLFI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE PRODUTOS COMERCIAIS
CONTENDO CARBENDAZIM OU TEBUCONAZOL UTILIZANDO TESTE
DE MICRONÚCLEO EM *TRADESCANTIA PALLIDA***

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Flavia Valladão Thiesen
Co-orientadora: Profa. Dra. Eliane Romanato Santarém

Porto Alegre
2020

Ficha Catalográfica

G427a Ghisolfi, Magali

Avaliação do potencial genotóxico de produtos comerciais contendo carbendazim ou tebuconazol utilizando Teste de Micronúcleo em Tradescantia pallida / Magali Ghisolfi . – 2020.

45.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Valladão Thiesen.

Co-orientadora: Profa. Dra. Eliane Romanato Santarém.

1. Agrotóxico. 2. Genotoxicidade. 3. Fungicidas. 4. Micronúcleos. 5. Tradescantia. I. Thiesen, Flávia Valladão. II. Santarém, Eliane Romanato. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

MAGALI GHISOLFI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE PRODUTOS COMERCIAIS
CONTENDO CARBENDAZIM OU TEBUCONAZOL UTILIZANDO TESTE
DE MICRONÚCLEO EM *TRADESCANTIA PALLIDA***

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra Mirna Bainy Leal

Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre
2020

AGRADECIMENTOS

À minha mãe *in memorium*, Lurdes Helena Silvani Ghisolfi, que durante esse trabalho infelizmente nos deixou e não estará presencialmente no encerramento, isso praticamente me fez desistir mas, sua lembrança, carinho, amor incondicional, dedicação, compreensão pelas inúmeras vezes que o nosso distanciamento foi necessário e pelas várias ocasiões que não pude estar ao seu lado me fez continuar nessa trajetória.

À minha orientadora, Prof. Dra. Flávia Valadão Thiesen, pela sua orientação científica, confiança, motivação, dedicação, paciência, estímulo e incentivo a continuar e terminar esse projeto. Tudo foi determinante e com certeza fez diferença.

À minha orientadora, Prof. Dra. Eliane Santarém, pela parceria, aprendizado e disponibilidade para nos ensinar praticamente tudo sobre plantas aos membros desse trabalho, sem dúvidas esse apoio foi muito importante para o começo dessa trajetória.

Aos estagiários de iniciação científica, Guilherme Rosa Melo, Giulia Prevedello e Valentina Piffero, pelo esforço em aprender, pelas várias horas no laboratório realizando as análises microscópicas pelo tempo que se dedicaram ao trabalho e pelo bom ambiente de convívio que propuseram.

Ao laboratório de pesquisa da Pucrs pela disponibilização do espaço e uso de utensílios, reagentes e equipamentos e principalmente, ao técnico Eduardo pelo todo o auxílio no manuseio dos materiais.

A todos os membros do Programa de Pós-Graduação da Escola de Farmácia pela oportunidade.

À Universidade e seus professores que me acolheram desde a graduação realizando um sonho de ser uma profissional que, hoje pode ajudar na saúde de muitas pessoas.

Aos meus colegas e superiores que inúmeras vezes que tive que sair do ambiente de trabalho para ir às aulas e nos compromissos do mestrado. Além disso, por me aturarem e ouvirem nas horas de desespero quando não tinha plantas de *Tradescantia*, nos dias que os testes davam errados, não havia inflorescências suficientes e nas lamentações de não conseguir escrever tal dissertação. Sei que, incomodei muito mas, sem dúvidas só tenho a agradecer.

Ao meu colega Jean Vinicius Freitas por acreditar na minha capacidade e que em meios aos desafios do mestrado ainda me guiou em uma nova e grande oportunidade profissional.

Ao meu companheiro pelas incontáveis vezes que me ouviu nas mais diversas reclamações, queixas, desesperos e choro nessa caminhada. Seu apoio e conselhos foram fundamentais nesse trajeto da minha vida.

Agradeço a Deus por poder chegar tão longe mesmo com tantas dificuldades, incertezas e negatividade conseguiremos terminar e ainda olhar para trás e dizer que tudo passou e agora estamos mais fortes do que antes.

RESUMO

Os alimentos de origem vegetal são essenciais à dieta humana e sua produtividade é aumentada com a aplicação de agrotóxicos nas lavouras. Uma das classes de agrotóxicos mais empregadas engloba os fungicidas, os quais podem ser empregados nas plantações ou nos alimentos já colhidos. No entanto, estes compostos não afetam apenas os fungos e podem causar danos ao meio ambiente e à saúde do homem. Os produtos comerciais contendo pesticidas possuem em suas formulações substâncias passíveis de alterar os efeitos tóxicos dos princípios ativos, por isso é fundamental realizar a avaliação de toxicidade destes compostos. O uso de plantas, como *Tradescantia pallida*, em ensaios de genotoxicidade tem apresentado grande potencial devido seu baixo custo, simplicidade e sensibilidade. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial genotóxico das formulações comerciais Bendazol® e Folicur® EC 200, contendo tebuconazol e carbendazim respectivamente, em níveis iguais ou inferiores aos limites máximos permitidos em alimentos, através do Teste de Micronúcleo em *Tradescantia pallida*. Inflorescências da planta foram expostas a concentrações de 0,005 e 0,5 ppm de carbendazim e 0,007; 0,07 e 0,7ppm de tebuconazol. Azida sódica foi usada como controle positivo e água destilada como controle negativo. A visualização dos micronúcleos nas tétrades foi realizada com um microscópio, após as anteras serem fixadas em uma solução de ácido acético/etanol (1:3) por 24 horas. O número de micronúcleos foi determinado e expresso como frequência de formação de micronúcleos por 1500 tétrades. Os resultados indicaram que o carbendazim não mostrou efeito significativo na formação de micronúcleos em relação ao controle negativo. Entretanto, as concentrações 0,07 e 0,7 ppm de tebuconazol aumentaram a formação de micronúcleos, mostrando potencial genotóxico em doses abaixo ou igual ao limite máximo de resíduos em tomates. Esse resultado comprova a sensibilidade do Teste Trad-MCN, uma vez que detectou efeito genotóxico em concentrações inferiores a 1 ppm. Este é o primeiro estudo para avaliação de potencial genotóxico dos fungicidas carbendazim e tebuconazol empregando o teste de Micronúcleo em *T. pallida* a níveis tão baixos, os quais são permitidos em alimentos em vários países.

Palavras-chave: Agrotóxico. Genotoxicidade. Fungicidas. Micronúcleos. *Tradescantia*.

ABSTRACT

Plant foods are essential to the human diet and their productivity is increased with the application of pesticides in crops. One of the most widely used classes of pesticides includes fungicides, which can be used on plantations or on food already harvested. However, these compounds do not only affect fungi but also cause damage to the environment and human health. Commercial products containing pesticides have in their formulations substances that can alter the toxic effects of the active ingredients, so it is essential to carry out the toxicity assessment of these compounds. The use of plants, such as *Tradescantia pallida*, in genotoxicity tests has shown great potential due to its low cost, simplicity and sensitivity. The objective of the present study was to evaluate the genotoxic potential of the commercial formulations Bendazol® and Folicur® EC 200, containing tebuconazole and carbendazim respectively at levels equal to or below the maximum limits allowed in food, using the Micronucleus Test in *Tradescantia pallida*. Inflorescences of the plant were exposed to concentrations of 0.005 and 0.5 ppm of carbendazim and 0.007; 0.07 and 0.7 ppm of tebuconazole. Sodium azide was used as positive control and distilled water as negative control. The visualization of the micronucleus in the tetrads was performed with a microscope, after the anthers were fixed in a solution of acetic acid/ethanol (1:3 v/v) for 24 hours. The number of micronucleus was determined and expressed as the frequency of micronucleus formation per 1500 tetrads. The results indicated that carbendazim did not show a significant effect on the formation of micronucleus in relation to the negative control. However, tebuconazole concentrations 0.07 and 0.7 ppm increased the formation of micronucleus, showing genotoxic potential at doses below or equal to the maximum residue limit in tomatoes. This result proves the sensitivity of the Trad-MCN Test, since it detected a genotoxic effect in concentrations below 1 ppm. This is the first study to assess the genotoxic potential of the fungicides carbendazim and tebuconazole using the Micronucleus test in *Tradescantia pallida* at such low levels, which are allowed in foods in several countries.

Keywords: Pesticide. Genotoxicity. Fungicides. Micronucleus. *Tradescantia*.

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil
ATP	Adenosina trifosfato
CBZ	Carbendazim
CYP450	Citocromo P450
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EFSA	Autoridade Europeia para Segurança Alimentar
EU	União Europeia
FAO	Organização para Agricultura e Alimentação dos Estados Unidos da América
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão Diária Aceitável
LMR	Limites Máximos de Resíduos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MN	Micronúcleos
p.c.	peso corporal
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Trad- MCN	Teste de Micronúcleos em <i>Tradescantia pallida</i>

LISTA DE TABELAS

Table 1 – Effect of Carbendazim on micronucleus formation on pollen mother cells of <i>Tradescantia pallida</i> through Trad-MCN assay.....	27
Table 2 – Effect of Tebuconazole on micronucleus formation on pollen mother cells of <i>Tradescantia pallida</i> through Trad-MCN assay.....	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 O USO DE AGROTÓXICOS NA AGRICULTURA.....	14
3.1.1 Tebuconazol	16
3.1.2 Carbendazim	17
3.2 GENOTOXICIDADE	18
3.2.1 Genotoxicidade dos agrotóxicos	19
3.2.2 Biomarcadores de genotoxicidade	20
4 ARTIGO CIENTÍFICO	22
5 CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

O processo produtivo agrícola brasileiro está cada vez mais dependente dos agrotóxicos (CARNEIRO, 2015). Segundo a Lei nº 7.802, de 1989, e o Decreto nº 4.074, de 2002, que a regulamenta, agrotóxicos e afins são:

Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 2002).

Apesar de sua eficácia em aumentar a produtividade das culturas (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011; FURLAN; KREUTZWEISER, 2015), tornando-os importantes para o manejo de pragas e aumento da produção (LESMES-FABIAN *et al.*, 2012), muitos desses produtos podem apresentar perigos potenciais para o meio ambiente e para a saúde humana (LOBO; BOLAÑOS, 2014). Embora apresentem toxicidade seletiva contra diferentes pragas, os agrotóxicos também são capazes de interagir com biomoléculas de espécies não-alvos e desencadear efeitos toxicológicos para seres humanos (MONDAL; GOHSH; MUKHOPADHYAY, 2012). Além disso, esses agentes podem alterar o habitat e causar sérios problemas de poluição, afetando diversos compartimentos do ecossistema (MOHAMMED; MA, 1998).

Alimentos com resíduos de agrotóxicos podem produzir efeitos tóxicos, usualmente decorrentes da exposição crônica dos seus consumidores que, mesmo adoecendo, terão dificuldade para relacionar a patologia à exposição aos agrotóxicos (MOHAMMED; MA, 1998).

Com o objetivo de monitorar os resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA), visa mitigar o risco à saúde decorrente da exposição a essas substâncias pela dieta, mediante avaliação do cenário de irregularidades e risco à saúde, a partir dos resultados das análises das amostras coletadas (ANVISA, 2019).

Os produtos comerciais contendo os princípios ativos carbendazim e tebuconazol estão entre os agrotóxicos com maior índice de detecção no ciclo de

2017/2018 do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, e ambos foram encontrados em níveis acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR) e/ou em culturas para as quais seu uso não é aprovado (ANVISA, 2020). O LMR é um parâmetro agrônômico, derivado de estudos de campo simulando o uso correto do agrotóxico pelo agricultor. Todavia, o LMR está relacionado tanto com a segurança dos alimentos comercializados, quanto com a presença de resíduos de agrotóxicos, e constitui um dos componentes para o cálculo da exposição e avaliação do risco dietético que antecede o registro de um agrotóxico ou a autorização da inclusão de novas culturas em seu uso (ANVISA, 2016).

A avaliação de risco de resíduos de agrotóxicos nos alimentos é baseada na avaliação toxicológica de compostos únicos, e não existe procedimento internacionalmente aceito para avaliar a exposição cumulativa a vários resíduos de pesticidas em culturas alimentares, vegetais e frutas (DONKOR *et al.*, 2016). Geralmente, o alimento é a principal via de exposição humana, sendo a exposição aos resíduos de pesticidas através da dieta considerada maior do que por outras vias, como o ar e a água potável (KNEZEVIC; SERDAR; AHEL, 2012; LOZOWICKA *et al.*, 2013). A possibilidade de exposição a esses resíduos é parte integrante do processo de avaliação de riscos para garantir que a ingestão diária aceitável (IDA) do produto não seja excedida (DONKOR *et al.*, 2016).

Muitos organismos, como plantas, peixes, insetos e invertebrados, são utilizados como bioindicadores, com base na análise de tecidos ou fluidos. Algumas plantas, como *Tradescantia* sp., *Tillandsia* sp, *Allium cepa* e *Vicia faba*, têm sido empregadas na avaliação da genotoxicidade de poluentes ambientais ou no estudo do potencial genotóxico de substâncias químicas como os agrotóxicos (QUINTANA *et al.*, 2013). O gênero *Tradescantia*, da família *Commelinaceae*, compreende mais de 500 espécies, e algumas destas e seus clones são usadas como bioindicadores genéticos para avaliar atividade mutagênica, como é o caso da *T. pallida* (FADIC *et al.*, 2016).

Desenvolvido em 1980, o Teste de Micronúcleo em *Tradescantia* (Trad-MCN), é considerado uma valiosa ferramenta por muitos pesquisadores pela simplicidade da metodologia e sensibilidade desta planta a agentes genotóxicos (MA *et al.*, 1994; RODRIGUES *et al.*, 1997; BATALHA *et al.*, 1999; GUIMARÃES *et al.*, 2000). O ensaio Trad-MCN é um teste citogenético baseado na formação de micronúcleos que resultam da quebra cromossômica nas células-mãe do grão de pólen

(RODRIGUES; PIMENTEL; WEINSTEIN *et al.*, 1998). Micronúcleos (MN) são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que se perdem na divisão celular e, por isso, não são incluídos no núcleo das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas. Refletem, portanto, a ocorrência tanto de danos estruturais quanto de aneuploidia, permitindo, conseqüentemente, detectar a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos (EVANS, 1997).

Uma vez que, os fungicidas carbendazim e tebuconazol são utilizados em diversas culturas de hortaliças e grãos, e muitas vezes seus resíduos estão acima dos limites permitidos, torna-se importante avaliar a genotoxicidade destes produtos na sua forma comercial.

Desta forma, o presente estudo teve como propósito avaliar o potencial genotóxico de produtos comerciais a base de carbendazim ou tebuconazol através do Teste de Micronúcleo em *Tradescantia* (Trad-MCN).

Esta dissertação irá apresentar os resultados na forma de um artigo a ser submetido à publicação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial genotóxico de produtos comerciais a base de carbendazim ou tebuconazol através do Teste de Micronúcleo em *Tradescantia* (Trad-MCN).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o potencial genotóxico do agrotóxico Bendazol® (a base de carbendazim) em concentrações inferiores ou iguais ao LMR para tomates através do Teste Trad-MCN;
- b) Avaliar o potencial genotóxico do agrotóxico Folicur® 200EC (a base de tebuconazol) em concentrações inferiores ou iguais ao LMR para tomates através do Teste Trad-MCN;
- c) Investigar a sensibilidade do Teste Trad-MCN para detectar a genotoxicidade de agrotóxicos nas concentrações em que podem ser encontrados em alimentos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O USO DE AGROTÓXICOS NA AGRICULTURA

Os agrotóxicos consistem em um grupo de agentes químicos de origem natural ou sintética, utilizados para obter uma maior produção agrícola (BOLOGNESI, 2003; BOUHAFS *et al.*, 2009). São usados extensivamente para controle de pragas na agricultura e pecuária, e a exposição a esses produtos representa um risco à saúde humana (KIM; KABIR; JAHAN, 2017).

O manejo para o controle de pragas no cultivo de hortaliças é realizado com o uso dos pesticidas em sua forma comercial, o que, na maioria dos países em desenvolvimento, baseia-se unicamente na recomendação do fabricante. Essas recomendações estão presentes nas bulas e rótulos e são resultantes de estudos que identificam as propriedades toxicológicas e ambientais do agrotóxico (GLOVER-AMENGOR; TETTEH, 2008). Na maior parte dos casos, não há um sistema de monitoramento adequado para a aplicação de fungicidas e alguns produtores não têm conhecimento ou experiência em relação aos procedimentos necessários para realizar o uso correto destes produtos. Em síntese, os usuários dessa classe de produtos usam, muitas vezes, concentrações superiores àquelas recomendadas (ECOBICHON, 2001; ASOGWA; DONGO, 2009).

Existem mais de 600 tipos de pesticidas empregados na agricultura mundial e, destes, os fungicidas, como tebuconazol e carbendazim, estão em 3º lugar entre as classes de agrotóxicos mais utilizadas (PATUSSI; BUNDCHEN, 2013; MOHAMMED, 1998). Conforme divulgação do último ranking da FAO, o Brasil está na 44ª posição no consumo de agrotóxicos por hectare, com consumo relativo de 4,31 quilos de agrotóxicos por hectare cultivado em 2016. O país, sob o critério de consumo de pesticidas em função da sua produção agrícola, aparece em 58º lugar, com uso de 0,28 quilos de agrotóxicos por tonelada de produto agrícola. Para realização deste cálculo foram utilizados os valores de produção de grãos, fibras, frutas, raízes e nozes, e o consumo total de pesticidas disponível no portal de estatísticas da FAO (BRASIL, 2019a; FAO, 2019). O alto consumo total de agrotóxicos no país é influenciado pela ocorrência de duas a três safras por ano, implicando na necessidade de maior controle de pragas para evitar quebra de ciclo de reprodução vegetal (BRASIL, 2019a).

O controle e a compilação anual de informações sobre segurança alimentar ficam a critério de cada país. No Brasil, segundo o último relatório PARA divulgado em 2019, foram analisadas 4.616 amostras de alimentos de origem vegetal, cultivados no ciclo 2017/2018, e 3.544 amostras (77%) foram consideradas satisfatórias quanto aos agrotóxicos pesquisados, sendo que em 2.254 (49%) destas não foram detectados resíduos. Em 1.290 amostras (28%) havia resíduos em concentrações iguais ou inferiores ao Limite Máximo de Resíduos (LMR). Porém, 1.072 amostras (23%) foram consideradas insatisfatórias por possuírem resíduos de agrotóxicos acima do LMR ou agrotóxicos não permitidos para a cultura avaliada. O LMR está relacionado com a segurança dos alimentos comercializados e constitui um dos componentes empregados na avaliação do risco dietético que antecede o registro de um agrotóxico ou a autorização do seu uso em novas culturas (ANVISA, 2016). É um parâmetro agrônômico, derivado de estudos de campo e, quando atendido, estima-se que o nível do agrotóxico é seguro e ocorreu uso adequado.

Em levantamento da ANVISA (2020), os resíduos de 122 ingredientes ativos diferentes resultaram em 8.270 detecções, pois algumas amostras tinham mais de uma irregularidade. Os ingredientes ativos tebuconazol, carbendazim e imidacloprido apresentaram o maior índice de irregularidades. O ingrediente ativo tebuconazol foi detectado em 570 amostras, o que corresponde a 12% das amostras monitoradas. O carbendazim foi detectado em 526 amostras, o que corresponde a 11% das amostras analisadas. Estes dados reafirmam os índices do relatório PARA anterior, no qual amostras coletadas no período de 2013 a 2015 também apresentaram tebuconazol e carbendazim entre os três ingredientes ativos com maior índice de detecções (ANVISA, 2016).

Diversas análises em alimentos mostram resíduos desses fungicidas em produtos da alimentação humana. Em estudo realizado na França para avaliar a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos empregados na dieta infantil, a presença de carbendazim e tebuconazol foi detectada (NOUGADÈRE *et al.*, 2020). Da mesma forma, no Uruguai, um estudo realizado com o objetivo de investigar a distribuição de resíduos de pesticidas durante a colheita e o processamento de arroz, na safra de 2009-2010, revelou a presença de resíduos de tebuconazol em todas as mercadorias, incluindo arroz polido, arroz integral e matrizes. No arroz integral, foram detectados também resíduos de carbendazim, incluindo níveis acima do limite máximo estabelecido pela União Europeia para essa cultura (PAREJA *et*

al., 2012). Em estudo realizado por Kong *et al.* (2012) foi avaliado o efeito do processamento doméstico (lavagem, descasque, descaroçamento e fabricação de sucos) da maçã nos níveis de resíduos de cinco pesticidas, entre eles tebuconazol e carbendazim. Os resultados indicaram a presença dos mesmos na casca, na polpa, no bagaço e no suco da fruta. Mesmo com a extração de suco, foram detectados resíduos de tebuconazol no bagaço. Níveis mais elevados de resíduos de carbendazim foram encontrados no suco. A lavagem da fruta removeu 42% e 50% desses fungicidas, respectivamente. Na província de Majmaah (Arábia Saudita) amostras de tomate, pasta de tomate e Ketchup® foram testadas para resíduos de agrotóxicos. Oito resíduos foram detectados em 36% das amostras analisadas, sendo o carbendazim o segundo agrotóxico mais encontrado (ELHALEEM, 2020).

3.1.1 Tebuconazol

O tebuconazol, nome químico (RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-ol, pertence à classe dos fungicidas azóis, composta por agrotóxicos amplamente empregados para controle de fungos na produção de grãos, flores, frutas e vegetais e na conservação de madeira (KJAERSTAD *et al.*, WOO *et al.*, 2010). O tebuconazol é indicado para aplicação foliar em culturas como a de abacaxi, abóbora, abobrinha, acelga, acerola, álamo, alface, algodão, alho, soja, tomate, uva, trigo, entre outras. Sua Ingestão Diária Aceitável (IDA) é 0,03 mg/kg p.c. (peso corporal), e pertence à classe toxicológica IV (ANVISA, 2016). Seu limite máximo de resíduos para cultura de tomate (FAO, 2020) é de 0,7 mg/kg e no Brasil, é 0,3 mg/kg (ANVISA, 2020). Apresenta solubilidade de 36 mg L⁻¹ na água e *pka* 5,0 (LEWIS *et al.*, 2016), sendo fortemente absorvido no solo, predominantemente na matéria orgânica (CADKOVA *et al.*, 2012; TCHAIKOVSKAVA *et al.*, 2016). Em ambiente terrestre apresenta tempo de meia-vida de cerca de 600 dias (PAUL *et al.*, 2018) e em ambientes aquáticos é persistente devido sua alta estabilidade química e consequente baixa biodegradabilidade (YU *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2018).

Os fungicidas azóis atuam na inibição do citocromo P450 (CYP450) dependente da enzima lanosterol 14 α -desmetilase, que promove a desmetilação do lanosterol, um intermediário na biossíntese do ergosterol, interferindo assim na síntese de esteróis, os quais são essenciais para a constituição normal da

membranas fúngicas (MENEGOLA *et al.*, 2006; LABOURDETTE *et al.*, 2010). Apresentam ação sobre fungos terrestres, e aquáticos (ZUBROD *et al.*, 2011; CUCO *et al.*, 2017).

Estudos relatam que a exposição ao tebuconazol pode causar múltiplos efeitos tóxicos, incluindo toxicidade no desenvolvimento (EFSA, 2013; BERNABO *et al.*, 2016), na tireoide (YU *et al.*, 2013; BERNABO *et al.*, 2016; MUGHAL; FINI; DEMENEIX, 2018), no fígado (EFSA, 2013; SCHMIDT *et al.*, 2016; KNEBEL *et al.*, 2018), genotoxicidade (CASTRO *et al.*, 2018; ARAGÃO *et al.*, 2019) e danos reprodutivos (SANCHO; VILLARROEL; FERRANDO, 2016). O tebuconazol foi classificado como um possível carcinógeno humano por Cui *et al.* (2018). Em mamíferos pode causar alterações no desenvolvimento neurológico e comprometimento do sistema imune de ratos (MOSER *et al.*, 2001).

3.1.2 Carbendazim

Agrotóxico com nome químico metil benzimidazol-2-ilcarbamato, pertence ao grupo químico benzimidazol e tem como alvo um amplo espectro de patógenos fúngicos. Atua por meio da inibição da formação de microtúbulos mitóticos e da divisão celular (MAGNUCKA *et al.*, 2007). É um fungicida sistêmico, pré-emergente (YUNLONG *et al.*, 2009), empregado no controle de fungos na agricultura, silvicultura e como medicamento veterinário (MAGNUCKA *et al.*, 2007). Possui indicação de aplicação foliar nas culturas de algodão, citros, maçã, arroz, feijão, milho e soja (ANVISA, 2020).

Conforme especificações da ANVISA (2019) e da U.S. Environmental Protection Agency (EPA, 2014) sua classificação toxicológica é III. A Ingestão Diária Aceitável (IDA) deste agrotóxico é 0,02 mg/kg p.c. (ANVISA, 2019). Apresenta solubilidade em água de 8 mg L⁻¹, pka 4,53 e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) na água de 34 dias (IUPAC, 2020). A dissipação do carbendazim no meio ambiente foi investigada em algumas culturas. Na manga, o tempo de meia-vida foi de 1 a 5 dias e seguiu cinética de primeira ordem (DEVI, 2015). Já na dose recomendada em uvas, o $t_{1/2}$ foi de 4,6 a 7,3 dias (BANERJEE, 2005). Em estudo realizado por Zhou *et al.* (2018), a dissipação de carbendazim nos brotos de chá verde seguiu cinética de primeira ordem, com $t_{1/2}$ de 2,6 dias.

A aplicação intensiva de carbendazim (CBZ) e sua exposição causam efeitos tóxicos em seres humanos, como regulação negativa da imunidade humoral (SINGHAL *et al.*, 2003), desregulação endócrina (MORINAGA *et al.*, 2004) e toxicidade reprodutiva, incluindo falência espermatogênica (YU *et al.*, 2009; RAJESWARY *et al.*, 2007). Em conformidade com a tabela toxicológica da EPA, o carbendazim é considerado do grupo C, classificado como possível carcinógeno em humanos. Pesquisas experimentais relatam a formação de neoplasias hepatocelulares em fêmeas de camundongos (EPA, 2014) e a indução da atividade tumoral em células do ovário humano (HIDETAKA *et al.*, 2004). Devido sua toxicidade, é proibido em alguns países (ZHOU *et al.*, 2018), principalmente países europeus, incluindo a França (BOUCAUD-MAITRE, *et al.*, 2019). Em outro estudo, carbendazim, após um período de exposição de 96 horas, provocou várias anomalias de desenvolvimento em embriões do peixe Zebrafish e houve aumento nas concentrações dos marcadores bioquímicos colinesterase (ChE), glutathione-S-transferase (GST), lactato desidrogenase (LDH) e catalase (CAT) (ANDRADE *et al.*, 2016).

3.2 GENOTOXICIDADE

Todas as células do corpo humano dependem de fornecimento adequado de nutrientes e oxigênio para manter sua função e, com eles, produzem energia para que o organismo possa executar seu metabolismo. Esta produção ocorre via cadeia respiratória mitocondrial. Entretanto, cerca de 5% do oxigênio que é inspirado, ao invés de ser envolvido na produção de energia (adenosina trifosfato - ATP) gera espécies ativas de oxigênio (radicais livres). Essas moléculas são altamente reativas com outras moléculas celulares e, se não forem controladas, podem causar diversos danos fisiológicos e doenças (CSISZAR *et al.*, 2009). Por esse motivo, os radicais livres são combatidos pelo organismo através de um sistema antioxidante enzimático. Este sistema transforma radicais livres, como o superóxido e o peróxido de hidrogênio, em moléculas de água. Além deste sistema endógeno, moléculas antioxidantes provenientes de frutas e verduras atuam na defesa do organismo contra os radicais livres. Entretanto, quando a produção de radicais livres é maior que o seu controle pelos sistemas antioxidantes exógenos e endógenos, ocorre estresse oxidativo. O estresse oxidativo causa danos importantes ao organismo,

como peroxidação lipídica e mutações no Ácido desoxirribonucleico (DNA). Essas alterações, em geral, são conhecidas como genotoxicidade. Assim, a ocorrência de maior genotoxicidade indica maior nível de estresse oxidativo (FRONZA *et al.*, 2011).

Os agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, provocando alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA. Na grande maioria dos casos, o dano celular é reparado pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. Caso essa lesão não seja reparada, as mutações podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação do DNA; nesse caso o agente genotóxico é denominado mutagênico. Embora ocorram mutações espontâneas, a maioria delas é induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais os seres humanos e outros organismos podem ser expostos (CALVIELLOA *et al.*, 2005).

3.2.1 Genotoxicidade dos agrotóxicos

São inúmeros os estudos que associam o uso de agrotóxicos a seus efeitos nocivos na saúde humana (COLOSIO *et al.*, 2003; PERES; MOREIRA, 2003). As substâncias utilizadas como agrotóxicos podem possuir na sua composição moléculas oxidantes, as quais podem formar radicais livres nos sistemas biológicos (LUZ; SANTOS; MELO, 2003). Esses radicais são moléculas instáveis, que reagem com as estruturas celulares modificando a estrutura lipoprotéica da membrana e alterando a permeabilidade da célula (ANDRADE JR. *et al.*, 2005), provocando alterações que podem atingir o núcleo celular e o DNA, podendo assim desencadear doenças graves e carcinogênese (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O dano citogenético induzido pelos agrotóxicos ocorre dependendo do grau de exposição, da quantidade, da natureza química e das possíveis combinações entre os pesticidas utilizados, além das características e condições do ambiente. Em humanos, sabe-se que um baixo grau de exposição está associado a resultados negativos para danos citogenéticos. É importante ressaltar que a exposição crônica em baixas doses pode ser cumulativa e por isso também pode induzir tais danos (BOLOGNESI, 2003).

3.2.2 Biomarcadores de genotoxicidade

Desde a década de 1970, o uso de biomarcadores vem sendo amplamente aplicado em muitos países para avaliar de forma contínua a qualidade ambiental e monitorar a ecotoxicidade de metais pesados, partículas, agrotóxicos, fármacos e outros poluentes em sedimentos, água, solo e ar (CORONAS *et al.*, 2009; PATRA *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2008).

Os biomarcadores são espécies biológicas que indicam situações de risco para a saúde humana e para os ecossistemas (MA, 1981; FADIC *et al.*, 2016). Em tese existe uma correlação da intensidade da exposição com o efeito biológico decorrente da substância em questão. Em geral, os estudos desses biomarcadores de genotoxicidade incluem a detecção direta, ao microscópio, de danos no DNA. Atualmente, diversos testes citogenéticos podem ser aplicados com essa finalidade, como trocas entre cromátides irmãs, teste cometa, teste do micronúcleo (MN) e o teste de aberrações cromossômicas (MORO *et al.*, 2013; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

O ensaio cometa (eletroforese em gel de célula única; SCGE) é uma técnica eletroforética de alta sensibilidade e reprodutibilidade. É o método mais frequentemente empregado para medir danos no DNA em células eucarióticas ou tecidos desagregados e depende do relaxamento do DNA superenrolado (AZQUETA; COLLINS *et al.*, 2013).

No entanto, metodologias de biomonitoramento com plantas, como a determinação das frequências dos micronúcleos em tétrades de *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. "Purpurea" (Trad-MCN), têm sido empregadas com sucesso como indicadores de resposta genotóxica e em estudos para avaliação da poluição ambiental (CARVALHO-OLIVEIRA *et al.*, 2005; PEREIRA; CAMPOS JÚNIOR; MORELLI *et al.*, 2013; SPÓSITO *et al.*, 2015, AMATO-LOURENCO *et al.*, 2017). Importante destacar que é provável que os resultados obtidos através do teste Trad-MCN não sejam reproduzidos se realizados em células humanas, e os efeitos genotóxicos observados nos bioensaios vegetais não podem ser diretamente extrapolados para seres humanos (PRAJAPATI E TRIPATHI, 2008).

As aberrações cromossômicas se dividem em numéricas e estruturais, e o aumento de sua ocorrência indica a presença de fatores estressantes sobre um determinado tecido, órgão ou organismo. Por isso, a ocorrência de aberrações

cromossômicas (ACs) representa um importante biomarcador de efeito quando se busca prevenir um processo de doença, uma vez que o aumento na frequência de ACs ainda não caracteriza um desfecho nocivo ao indivíduo. As alterações cromossômicas numéricas incluem euploidia e aneuploidia, resultado de uma não disjunção mitótica, quando os cromossomos se desprendem do fuso mitótico no processo de divisão da célula-mãe, o que gera então duas células-filhas com número incorreto de cromossomos, normalmente um par a mais ou a menos (VALENTE *et al.*, 2017).

3.3 TESTE DE MICRONÚCLEO EM *Tradescantia pallida* (TRAD-MCN)

O Teste de Micronúcleo em *Tradescantia* (Trad-MCN), desenvolvido em 1980, é considerado uma valiosa ferramenta por muitos pesquisadores pela simplicidade da metodologia e sensibilidade desta planta à exposição a agentes genotóxicos (MA *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2005). É um teste citogenético baseado na formação de micronúcleos que resultam da quebra cromossômica nas células-mãe do pólen meiótico na fase de tétrades jovens (RODRIGUES; PIMENTEL; WEINSTEIN, 1998).

Micronúcleos (MN) são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que se perdem na divisão celular e, por isso, não são incluídos no núcleo das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas (HEDDLE, 1983). Refletem, portanto, a ocorrência tanto de danos estruturais quanto de aneuploidia, permitindo, conseqüentemente, detectar a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos (EVANS, 1997).

Biomonitoramento com micronúcleo é mais vantajoso quando comparado aos demais testes, pois permite a triagem de grande número de substâncias. Além de avaliar danos cromossômicos, possui reprodutibilidade satisfatória e foi adaptado ao estudo de diferentes espécies (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

4 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo a seguir será submetido à publicação na Environmental Toxicology and Pharmacology (fator de impacto 3, 061)

***Tradescantia* micronucleus test indicates genotoxic effect of fungicide tebuconazole**

Magali Ghisolfi; Giulia Zanchi Prevedello; Guilherme Rosa Melo; Valentina Piffero; Eliane Santarém; Flavia Valladão Thiesen

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, School of Health and Life Sciences, Porto Alegre, RS, Brazil.

ABSTRACT

The extensive use of fungicides for pest control can generate many environmental and human health damages. The objective of this work was to evaluate the genotoxic potential of commercial products containing the fungicides carbendazim and tebuconazole using the *Tradescantia* micronucleus bioassay (Trad-MCN). Young inflorescences of *Tradescantia pallida* were subjected to fungicide treatments at concentrations of 0.005 and 0.5 ppm for Bendazol® (carbendazim), and 0.007; 0.07 and 0.7 for Folicur 200EC® (tebuconazole). Visualization of micronuclei in the tetrads was carried out under a microscope after anthers were fixed in a solution of acetic acid/ethanol (1:3) for 24 hours. The number of micronuclei was registered until 1500 tetrads were analyzed per treatment. Results showed that no significant number of micronucleus was formed in tetrads from inflorescences treated with carbendazim, regardless the concentration tested. On the other hand, tebuconazole treatment showed toxicity, resulting in 5.27 and 4.2% of tetrads with micronuclei at 0.07 and 0.7 ppm, respectively. This is the first study for the evaluation genotoxicity potential of the fungicides carbendazim and tebuconazole employing the Trad-MCN at such low levels, which are allowed in food in several countries.

Keywords: Benzimidazole fungicide. Carbendazim. *Tradescantia pallida*. Genotoxicity.

1 INTRODUCTION

Fungicides are pesticides frequently use against fungal diseases of agricultural crops. They consist of one or more active agents and several adjuvants, which improve their applicability and solubility. Although some pesticides show specific pest-reducing effects, they may also affect non-target organisms¹. The extensive utilization of pesticides possibly enhances their accumulation in the agricultural fields and environmental components, and their residues in food has posed serious risks to human health, such as acute and chronic effects including developmental effects and neurological disruptors².

Evaluation of the risk associated with residues of these substances, present in the environment and in food, is of great interest. Pesticide formulations may have more adverse effects on the living systems than the pure agents themselves. The release of genotoxic chemicals in natural ecosystems has an impact on frequency of mutation, leading to modification of genetic pools of wild populations, affecting ecosystems³. Modifications in DNA integrity produced by an exposure to organic pollutants are biomarkers that indicate to the necessity of the implementation of corrective actions to avoid degradation of ecosystems and health problems.

Plants are recognized as excellent indicators of cytogenetic and mutagenic effects of environmental chemicals and are applicable for the detection of mutagens⁴. The *Tradescantia* micronucleus bioassay (Trad-MCN) is a cytogenetic test based on the formation of micronuclei which result from chromosome breakage in the meiotic pollen mother cells⁵. This method has great sensitivity and reproducibility to detect clastogenic activity of pesticides⁶. Moreover, it is an economic and fast bioassay, making it a practical method to this type of evaluation. Despite these advantages, there are few studies assessing pesticides genotoxicity on Trad-MCN. Pesticides database on genotoxic effects usually are based on studies performed on animal cells, rather than plant cells. Thereby, it is imperative to accumulate data on responses and sensitivity of this method.

Carbendazim (CBZ) and tebuconazole (TBZ) are fungicides widely used in crops in South America^{3,7,8}, USA⁹, and Asia¹⁰. Carbendazim, a benzimidazole fungicide, carbendazim can be also found in food or nature as a breakdown product of other fungicides, such as benomyl and thiophanate-methyl¹¹. It is a broad spectrum, systemic fungicide that acts on the organization of microtubules, which

control major cellular functions, particularly mitosis and cell shape¹². Tebuconazole, a common triazole fungicide, inhibits the enzyme lanosterol 14- α -demethylase, which regulates the ergosterol synthesis, essential for formation of the fungal cell membrane¹. They are widely used to control plant diseases to ensure high yield of crops, post-harvest food storage and as a seed pre-planting treatment. These fungicides are frequently used in fruit, vegetables and grain crops and its residues can be detected in food, like grapes and soy derivatives, soil and water^{9,13,14}. Tebuconazole metabolites were already detected in urine collected from diapers of children who consumed solid food¹⁴.

Carbendazim and tebuconazole have low toxicity to mammalian, with oral LD50 of > 2000 mg kg⁻¹ and 1700 mg kg⁻¹ bodyweight (bw) for rats, respectively^{4,15}. Reports on effects on the living systems are available, mainly when non-target organisms are considered. Carbendazim extensive and repeated use induces toxic effects on humans, invertebrates, aquatic life forms and soil microorganisms. This fungicide may cause embryotoxicity, apoptosis, teratogenicity, hepatocellular dysfunction and hepatic lipid metabolism disorder, gut microbiota dysbiosis, endocrine-disrupting effects, infertility, disruption of haematological functions, mitotic spindle abnormalities, mutagenic and aneugenic effects^{13,15,16}. Likewise, testing tebuconazole in cyanobacteria resulted in a markedly reduction in the photosynthetic pigments, metabolic as well as enzymatic activities¹⁷. Deleterious effect on amphibia are also reported¹⁸. Moreover, it has the capability to disrupt the endocrine balance of organisms, interact with the mammalian cytochrome P450 system, affect fish growth and survival, induce oxidative stress and developmental toxicity^{4,19}. It was observed that tebuconazole has a potential reproductive toxicity to human by affecting the expression of protease, hormones, angiogenic factors, growth factors and cytokines at a concentration of 10 μ mol L⁻¹. Also, it reduces cell viability, disturbs normal cell cycle distribution and induces cell apoptosis of human trophoblast cells²⁰.

The present study was designed to evaluate the potential genotoxic effects of CBZ and TBZ formulations, through Trad-MCN bioassay. As far as we know, this is the first study to assess the genotoxicity of these fungicides using the Trad-MCN bioassay, and our result will be of importance in predicting the effect of CBZ and TCZ residues in food.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Pesticides and positive control

The fungicides carbendazim and tebuconazole were used as genotoxic agents. Carbendazim, Methyl benzimidazol-2-ylcarbamate, (Bendazol®, Adama Brasil, commercial fungicide containing 50% m/v). Tebuconazole, (RS)-1-(4-Chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1H,1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol (Folicur 200EC®, Bayer, commercial fungicide with 20 % of the analyte). Sodium azide 99%, used as positive control, was acquired from Proton Química, Brazil. Commercial pesticides were, then, prepared as aqueous solutions at increasing concentrations up to Maximum Residue Limits for Pesticides adopted by the Codex Alimentarius Commission for tomato⁴, one of the most common and widely consumed vegetables in the world²¹ mainly in salads and sauces. The doses were 0.005 and 0.5 ppm for carbendazim, and 0.007; 0.07 and 0.7 for tebuconazole.

2.2 *Tradescantia* micronucleus assay (Trad-MCN)

The Trad-MCN assay was conducted following the protocol of Ma⁵. A population of approximately 50 mature plants containing an average of four to six mature plants at different stages of growth was maintained throughout the experimentation period. Plants were watered every other day and regularly fertilized with NPK fertilizer. No pesticides were applied to or around the plants during the experimentation period.

For each experiment, young inflorescences were selected, and 15 to 20 cuttings per treatment were randomly grouped. Before exposure to the pesticides, *Tradescantia* cuttings were maintained in deionized water for a 24-h adaptation period. Following this period, cuttings were exposed to pesticides by immersing the stems directly into the freshly prepared aqueous solutions/suspension. Treatment consisted of 8 h-exposure to the different concentrations of pesticide aqueous solutions. Positive and negative controls were also used, using sodium azide (80 ppm) and deionized water, respectively. All treatments were performed in triplicate.

After treatment with pesticides, the inflorescences were maintained for 24 h in distilled water for recovery and then fixed in a solution of acetic acid/ethanol (1:3) for

another 24 h and stored in 70% ethanol. When dissected, the young anthers were squashed and stained with acetocarmine (2% w/v)^{22,23}. Preparation with early tetrads were examined under the Zeiss microscopic (magnification 400 x) and the number of micronuclei registered until 1500 tetrads were analyzed per treatment.

2.3 Statistical analysis

The number of micronuclei were determined and expressed as frequency of micronuclei formation per 1500 tetrads. Frequency data was transformed by arcsen $\sqrt{x}/100$. Data were analyzed by variance analysis (ANOVA) and means were separated with Tukey test ($\alpha = 0.05$).

3 RESULTS AND DISCUSSION

A broad range of *in vivo* and *in vitro* assays have been used for genotoxicity assessment of pesticides. In this study, we evaluated the effects of the formulate fungicides CBZ and TBZ with the Trad-MCN assay. There are some studies about genotoxicity of these fungicides in animal cells, but few are described in plants. Our results expand the knowledge about genotoxic effects of these pesticides, what is very important since they are widely used around the world. Plant assay systems are more useful than most of the other systems for assessing chromosome damage and somatic mutations by environmental pollutants²⁴.

Since there are no available data for carbendazim and tebuconazole on the bioassay of *Tradescantia pallida*, we assessed the potential genotoxic effect of commercial fungicide formulations of carbendazim and tebuconazole. As even established levels should be re-evaluated from time to time, the concentrations tested in this study were selected according Codex-Alimentarius MRLs. These concentrations can be found as result of recommended agricultural practices.

The fungicides carbendazim and tebuconazole were evaluated for clastogenicity with the Trad-MCN assay. Results indicated that the different concentrations of carbendazim tested showed no significant effect on micronuclei formation when compared to the negative control (Table 1).

Table 1 – Effect of Carbendazim on micronucleus formation on pollen mother cells of *Tradescantia pallida* through Trad-MCN assay.

Carbendazim concentration (ppm)	Frequency of Micronuclei (%)
0	0.93 b*
0.005	2.42 b
0.5	7.20 ab
Sodium azide (positive control)	10.96 a

* Data is presented as average frequency of micronuclei formation considering 1500 tetrads assayed. Different letters indicate significant differences among the treatments ($p < 0.05$)

Palanikumar *et al.*¹³ observed a dose-dependent increase in micronuclei formation in carbendazim exposed milkfish (*Chanos chanos*), using concentrations between 0.00285 and 0.04531 ppm. Chromosomal break was detected on root meristem cells of *Hordeum vulgare* L., indicating the clastogenic potential of carbendazim at concentrations from 50 to 500 ppm²². Carbendazim treatment lead to a significant dose and duration-dependent decrease in percent mitotic index, with related increase in mitotic inhibition, when added to soil at concentrations ranging from 2.5 to 10 ppm, using *Allium cepa* root tip bioassay¹². On the contrary to these findings, our results showed no toxicity of carbendazim through Trad-MN test. However, we tested concentrations 0.005 and 0.5ppm based on Codex-Alimentarius MRLs, which were lower than previously referred by other studies.

The formation of micronuclei in pollen mother cells of *T. pallida* treated with tebuconazole was more significative than those obtained with carbendazim, and differences regarding the concentrations used could be noticed. The lowest concentration tested (0.007 ppm) showed no toxicity to plant cells, whereas the concentrations 10 to 100-fold higher increased micronuclei formation as response to the exposure to the pesticide (Table 2). There are few studies demonstrating the clastogenic effects of tebuconazole and the results of triazole testing vary according to the test and the concentration used as well as to the target cell, but the great majority confirm its genotoxic effect. The study that investigated the genotoxicity of tebuconazole formulation in green algae species, *Pseudokirneriella subcapitata* and *Nannocloris oculata*, resulted in genotoxicity after 24 h of exposure to concentrations of 3 and 6 mg L⁻¹³. In addition, cytotoxic and genotoxic effects were seen in *Allium*

cepa L. after treatment with the tebuconazole-based fungicide Raxil® at concentrations varying from 1800 to 6000 ppm²⁵. Genotoxic, cytotoxic, and phytotoxic effects of tebuconazole were also observed on the root tips of *Allium cepa* in a dose-dependent manner at concentrations between 12.5 and 200 mg L⁻¹²⁶. In the assay with the macrophyte *Bidens laevis*, the genotoxic effect of tebuconazole was detected in a linear concentration-response manner, showing that cytotoxicity can take place at environmentally concentration in the order of µg L⁻¹⁷. Tebuconazole also induced cytogenetic damage in cells of *Danio rerio* gills and blood cells of zebrafish, evidenced by comet assay and micronucleus test, respectively²⁷. However, some tebuconazole formulations, as Orius® (tebuconazole) and Prosaro® (tebuconazole and prothioconazole), were not able to induce micronuclei at significant levels in bovine lymphocytes *in vitro* at concentrations as high as 60 and 30 µg m L⁻¹ respectively^{1,28}.

Table 2 – Effect of Tebuconazole on micronucleus formation on pollen mother cells of *Tradescantia pallida* through Trad-MCN assay.

Tebuconazole concentration (ppm)	Frequency of Micronuclei (%)
0	1.48 c*
0.007	1.04 c
0.07	5.27 b
0.7	4.29 b
Sodium azide (positive control)	12.43 a

* Data is presented as average frequency of micronuclei formation considering 1500 tetrads assayed. Different letters indicate significant differences among the treatments (p<0.05)

The exact molecular mechanisms which contribute to alterations of a certain endpoint might be different for different fungicides. In the case of micronuclei formation, our results confirm this statement and show the importance of testing a range of concentrations and employing different bioassays to further understand and interpret the mechanisms of action.

Carbendazim causes changes in chromosome number *in vitro* and *in vivo* as a result of its interference with mitotic spindle proteins¹³. It produces aneuploidy via inhibition of microtubular function rather than direct DNA mutagenesis²⁹. In a study performed in *Enchytraeus albidus*, with analyses by microarray, it was observed that

intracellular signaling and microtubule-based movement were affected by carbendazim. This fungicide induced transcripts encoding for intermediate filament proteins which are involved in DNA ligation during DNA repair³⁰. It has been suggested that exposure to low doses of carbendazim over long periods work via epigenetic changes such as interference with DNA repair that lead to persistent DNA damage rather than direct DNA damage¹⁰. The biological effects exerted by azole fungicides are suspected to be the consequence of a plethora of different individual target molecules such as, for example, the nuclear receptors. Studies indicate an onset of molecular effects on AHR (aryl hydrocarbon receptor) target genes at sub-toxic concentrations, both *in vivo*(rats) and *in vitro* (human liver cells)¹⁹.

But this known difference in carbendazim and tebuconazole mechanisms of action do not explain differences in genotoxicity. Methods based on molecular tools can aggregate knowledge about fungicides mechanisms of action in cells and genomes, and help to explain the difference in genotoxicity among fungicides This approach associating molecular DNA markers with classical bioassays will allow the advance in the investigation of the toxic effect of the substances²⁶. Microarray analysis of gene transcription confirmed by qPCR and dose-response studies are necessary to determine tebuconazole mechanism of action in cells and genomes.

4 CONCLUSION

It can be concluded that the use of tebuconazole should be under control in crops, as it tested positive for genotoxicity at very low levels, even those allowed in food in several countries. This is the first study for the evaluation genotoxicity potential of the fungicides carbendazim e tebuconazole employing the *Tradescantia* MCN assay. This bioassay confirmed to be an important bioassay for genotoxicity evaluation for individual contaminant, as it detected genotoxicity at realist levels. It can be used to explore other substances profiles.

It is important to expand the knowledge about genotoxic effects of carbendazim and tebuconazole, as they are widely used around the world and there is an increasing use of fungicides, since fungal diseases are more common than any other plant diseases. The practical relevance of this study is that the doses tested correspond to the MRL doses in tomato, one of the most common and widely consumed vegetable in the world. These results highlight the risk to which the

consumers may be exposed through food contaminated with tebuconazole and the importance of expanding and intensifying measures to control the distribution and use of this product, in order to reduce the risks of damages to human health and the environment.

Further studies are needed to better understand the origin of these damages, and molecular analyses may provide a complementary tool in the assessment of different genotoxic effects of compounds. Also detailed investigations are required to correlate tebuconazole micronuclei formation and biochemical enzyme responses.

REFERENCES

1. Schwarzbacherová V, Šiviková K, Drážovská M, Dianovský J. Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by triazole fungicide in cultured bovine lymphocytes. *Caryologia* [Internet]. 2015;68(3):233–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00087114.2015.1032613>.
2. Boudh S. SJS. Pesticide Contamination: Environmental Problems and Remediation Strategies. In: Bharagava R. CP, ed. *Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management*. Singapore: Springer International Publishing; 2019.
3. Martinez RS, di Marzio WD, Sáenz ME. Genotoxic effects of commercial formulations of Chlorpyrifos and Tebuconazole on green algae. *Ecotoxicology*. 2015;24(1):45–54.
4. Food E, Authority S. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tebuconazole. *EFSA Journal*. 2014;12(1):1–98.
5. Ma TH. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environmental Health Perspectives*. 1981;37(January):85–90.
6. Rodrigues GS, Pimentel D, Weinstein LH. *In situ* assessment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program I - *Tradescantia* micronucleus assay. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1998;412(3):235–44.

7. Moreyra LD, Garanzini DS, Medici S, Menone ML. Evaluation of Growth, Photosynthetic Pigments and Genotoxicity in the Wetland Macrophyte *Bidens laevis* Exposed to Tebuconazole. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* [Internet]. 2019;102(3):353–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-019-02539-8>.
8. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA - Relatório das amostras analisadas de 2017-2018 [Internet]. 2019. Available from: http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relatório+--+PARA+2017-2018_Final.pdf/e1d0c988-1e69-4054-9a31-70355109acc9.
9. Battaglin WA, Sandstrom MW, Kuivila KM, Kolpin DW, Meyer MT. Occurrence of azoxystrobin, propiconazole, and selected other fungicides in US streams, 2005-2006. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2011;218(1–4):307–22.
10. Rai B, Mercurio SD. Environmentally relevant exposures of male mice to carbendazim and thiram cause persistent genotoxicity in male mice. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020;10629–41.
11. Liu J, Zhang P, Zhao Y, Zhang H. Low dose carbendazim disrupts mouse spermatogenesis might Be through estrogen receptor related histone and DNA methylation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [Internet]. 2019;176(January):242–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.103>.
12. Verma S, Srivastava A. Cytogenotoxic consequences of carbendazim treatment monitored by cytogenetical analysis using *Allium* root tip bioassay. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2018;190(4).
13. Palanikumar L, Kumaraguru AK, Ramakritinan CM, Anand M. Toxicity, biochemical and clastogenic response of chlorpyrifos and carbendazim in milkfish *Chanos chanos*. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2014;11(3):765–74.
14. Oerlemans A, van Dael MFP, Vermeulen RCH, Russel FGM, Scheepers PTJ. Urine collection methods for non-toilet-trained children in biological monitoring studies: Validation of a disposable diaper for characterization of tebuconazole exposure. *Toxicology Letters* [Internet]. 2018;298(March):201–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.09.018>
15. Singh S, Singh N, Kumar V, Datta S, Wani AB, Singh D, *et al.* Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. *Environmental Chemistry Letters*. 2016;14(3):317–29.

16. Jin Y, Zeng Z, Wu Y, Zhang S, Fu Z. Oral exposure of mice to carbendazim induces hepatic lipid metabolism disorder and gut microbiota dysbiosis. *Toxicological Sciences*. 2015;147(1):116–26.
17. Kumar N, Bora A, Kumar R and Amb MK. Differential Effects of Agricultural Pesticides Endosulfan and Tebuconazole on Photosynthetic pigments, Metabolism and Assimilating Enzymes of Three Heterotrophic, Filamentous Cyanobacteria. *J Biol Environ Sci*. 2012;6(16):67–75.
18. Bernabò I, Guardia A, Macirella R, Sesti S, Crescente A, Brunelli E. Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). *Aquatic Toxicology*. 2016;172: 56–66.
19. Knebel C, Heise T, Zanger UM, Lampen A, Marx-Stoelting P, Braeuning A. The azole fungicide tebuconazole affects human CYP1A1 and CYP1A2 expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent pathway. *Food and Chemical Toxicology* [Internet]. 2019;123 (October 2018):481–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.039>.
20. Zhou J, Zhang J, Li F, Liu J. Triazole fungicide tebuconazole disrupts human placental trophoblast cell functions. *Journal of Hazardous Materials* [Internet]. 2016;308: 294–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.055>.
21. Ganesan M, Han YJ, Bae TW, Hwang OJ, Chandrasekkhar T, Shin AY, *et al*. Overexpression of phytochrome A and its hyperactive mutant improves shade tolerance and turf quality in creeping bentgrass and zoysiagrass. *Planta*. 2012;236(4):1135–50.
22. Singh P, Srivastava AK, Singh AK. Cell cycle stage specific application of cypermethrin and carbendazim to assess the genotoxicity in somatic cells of *Hordeum vulgare* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2008;81(3):258–61.
23. Sisenando HA, Batistuzzo De Medeiros SR, Saldiva PH, Artaxo P, Hacon SS. Genotoxic potential generated by biomass burning in the Brazilian Legal Amazon by *Tradescantia* micronucleus bioassay: A toxicity assessment study. *Environmental Health: A Global Access Science Source*. 2011;10(1):1–9.
24. Constantin MJ, Owens ET. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays a report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 1982;99(1):1–12.

25. Fisun K, Rasgele PG. Genotoxic effects of raxil on root tips and anthers of *Allium cepa* L. *Caryologia*. 2009;62(1):1–9.
26. Bernardes PM, Andrade-Vieira LF, Aragão FB, Ferreira A, da Silva Ferreira MF. Toxicity of Difenoconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2015;226(7).
27. Castro TFD, da Silva Souza JG, de Carvalho AFS, de Lima Assis I, Palmieri MJ, Vieira LFA, *et al.* Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to tebuconazole-based commercial product. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [Internet]. 2018;62(June):140–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.06.011>.
28. Šiviková K, Dianovský J, Holečková B, Galdíková M, Kolesárová V, Bernabò I, *et al.* Genotoxic effects of commercial formulations of Chlorpyrifos and Tebuconazole on green algae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* [Internet]. 2015;24(1):45–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-019-02539-8>.
29. Bentley KS, Kirkland D, Murphy M, Marshall R. Evaluation of thresholds for benomyl- and carbendazim-induced aneuploidy in cultured human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2000;464(1):41–51.
30. Novais SC, de Coen W, Amorim MJB. Gene expression responses linked to reproduction effect concentrations (EC10,20,50,90) of dimethoate, atrazine and carbendazim, in *Enchytraeus albidus*. *PLoS ONE*. 2012;7(4).

5 CONCLUSÕES

Nesse estudo foi determinado que, mesmo em concentrações muito baixas, inclusive abaixo do limite máximo de resíduos, o tebuconazol em formulação comercial é potencialmente genotóxico, quando avaliado através do Teste Trad-MCN. No caso do produto a base de carbendazim, o fungicida não apresentou efeito significativo na formação de micronúcleos em relação ao controle negativo

O Teste de Micronúcleo foi sensível para detectar genotoxicidade, nas doses frequentemente encontradas em alimentos *in natura*. Contudo, considerando que esse estudo é o primeiro a realizar avaliação de potencial genotóxico com tebuconazol e carbendazim em Trad-MCN, é necessário dar continuidade às pesquisas.

Portanto, ações para controle, uso e manuseio do fungicida tebuconazol, além do desenvolvimento de novas tecnologias e revisão dos limites máximos de resíduos em alimentos, são fundamentais.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELHALEEM, Z. A. Pesticide residues in tomato and tomato products marketed in Majmaah province, KSA, and their impact on human health. **Environ Sci Pollut Res**, v. 27, p. 8526–8534, 2020.
- ALMEIDA, V. S; CARNEIRO, F. F; VILELA, N. J. Agrotóxicos em hortaliças: segurança alimentar, riscos socioambientais e políticas públicas para promoção da saúde. **Actas em Saúde Coletiva**, v. 4, p. 84–99, 2009.
- AMATO-LOURENCO, L. F. *et al.* Biomonitoring of genotoxic effects and elemental accumulation derived from air pollution in community urban gardens. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 1438–1444, 2017.
- AMORIM, L. C. A. O uso de biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v. 1, n. 2, p. 124-32, 2003.
- ANDRADE JR., D. R. *et al.* Os Radicais Livres de Oxigênio e as Doenças Pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, jan. 2005.
- ANDRADE, S. *et al.* Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v; 173, p. 228, Apr. 2016.
- ANVISA. Agência de Vigilância Sanitária. Monografias Autorizadas. **Carbendazim**. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>. Acesso em: 12 abr. 2020.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Carbendazim**. 2020. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/c24.pdf/a019eb91-b52d-492d-8140-ae82f54d5698>. Acesso em: 25 mar. 2020.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA - Relatório das amostras analisadas de 2017-2018** [Internet]. 2019. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relatório+PARA+2017-2018_Final.pdf/e1d0c988-1e69-4054-9a31-70355109acc9. Acesso em: 12 abr. 2020.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Relatório das Análises de Amostras de Monitoradas no período de 2013 a 2015**. 2016.

- ARAGÃO, F. B. *et al.* Cyto(genotoxicity of commercial fungicides based on the active compounds tebuconazole, difenoconazole, procymidone, and Iprodione in *Lactuca sativa* L. meristematic cells. **Water Air Soil Pollut. Focus**, v. 230, p. 25, 2019.
- ASOGWA, E. U.; DONGO, L. N. Problems associated with pesticide usage and application in Nigerian cocoa production: a review. **Afr J Agric Res**, v. 4, p. 675–683, 2009.
- AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Arch Toxicol**, v. 87, p. 949–968, 2013.
- BALLESTRER, E. Teste de micronúcleos como ferramenta para avaliação da exposição ocupacional a pesticidas: revisão. **Revinter**, v. 10, n. 1, p. 19-28, fev. 2017.
- BANERJEE, K. Residue dynamics of carbendazim and mancozeb in grape (*Vitis vinifera* L.) berries. **Toxicol Environ Chem**, v. 87, p. 77–81, 2005.
- BATALHA, J. R. F. *et al.* Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. **Mutation Research**, v. 426, p. 229–232, 1999.
- BEN OTHMÈNE, Y. *et al.* Tebuconazole induced cardiotoxicity in male adult rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 137, p. 111134, 2020.
- BERNABÒ, I. *et al.* Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). **Aquat Toxicol**, v. 172, p. 56-66, 2016.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.
- BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutat Res**, v. 543, n. 3, p. 251-272, 2003.
- BOSCHNER, R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 73-89, 2007.
- BOUCAUD-MAITREA, D. *et al.* Human exposure to banned pesticides reported to the French Poison Control Centers: 2012–2016. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 69, p. 51-56, July 2019.
- BOUHAFS, N. *et al.* Micronucleus induction in erythrocytes of tadpole rana saharica (green frog of North Africa) exposed to Artea 330EC. **AEJTS**, 1, v. 1, p. 07–12, 2009.

BRASIL. **Decreto n. 4072 de 4 de janeiro de 2002.** Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm. Acessado em: 20 nov. 2019.

BRASIL. **Decreto n. 7.272, de 25 de agosto de 2010.** Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em: 22 mar. 2020.

BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002.** Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em: 22 nov. 2019.

BRASIL. Lei n. 7.802, de 12 de julho de 1989 (lei federal dos agrotóxicos). **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 jul. 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brasil ocupa o 44º lugar no consumo de agrotóxicos.** 2019a. Disponível em: www.mapa.gov.br. Acesso em: 20 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Ranking da FAO mostra que uso de defensivos no Brasil é menor que em diversos países da Europa.** 2019b. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/ranking-da-fao-mostra-que-uso-de-defensivos-no-brasil-e-menor-que-em-diversos-paises-da-europa>. Acesso em: 15 dez. 2019.

ČADKOVÁ, E. *et al.* Sorption of tebuconazole onto selected soil minerals and humic acids. **J Environ Sci Health B**, v. 47, n. 4, p. 336–342, 2012.

CALVIELLOA, G. *et al.* DNA Damage and Apoptosis Induction by the Pesticide Mancozeb in Rat Cells: Involvement of the Oxidative Mechanism. **JANO Rome**, v. 63, n. 14, p. 39-46, July 2005.

CARNEIRO, F. F. (Org.). *et al.* **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CARVALHO-OLIVEIRA, R. *et al.* Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in Sao Paulo, Brazil. **Environ Res**, v. 98, p. 1–7, May 2005.

CASSAL, V. B. *et al.* Agrotóxicos: Uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 437–445, 2014.

CASTRO, T. F. D. *et al.* Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to tebuconazole-based commercial product. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 62, p. 140-146, 2018.

CESNIEN, T. *et al.* Use of *Tradescantia* clone 4430 for direct long-term soil mutagenicity studies. **Mutation Research**. v. 768, p. 23–32, 2014.

COLOSIO, C.; TIRAMANI, M.; MARONI, M. Neurobehavioral effects of pesticides: State of the art. **NeuroToxicology**, v. 24, n. 4–5, p. 577–591, 2003.

CORONAS, M. V. *et al.* Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. **Environ**, v. 35, p. 1023–1029, 2009.

CSISZAR, A. *et al.* Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. **Front Biosci**, v. 14, p. 3128-44, 2009.

CUCO, A. P. *et al.* Concentration and timing of application reveal strong fungistatic effect of tebuconazole in a *Daphnia*-microparasitic yeast model. **Aquat Toxicol**, v. 193, p. 144–151, 2017.

CUI, N. *et al.* Chiral triazole fungicide tebuconazole: enantioselective bioaccumulation, bioactivity, acute toxicity, and dissipation in soils. **Environ Sci Pollut Res**, v. 25, p. 25468-25475, 2018.

DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticides exposure, safety issues, and risk assessment indicators. **Int J Environ Res Public Health**, v. 8, p. 1402–1419, 2011.

DEVI, P. A.; PARAMASIVAM, M.; PRAKASAM, V. Degradation pattern and risk assessment of carbendazim and mancozeb in mango fruits. **Environ Monit Assess**, v. 187, n. 1, p. 1–6, 2015.

DONKOR, A. *et al.* Pesticide residues in fruits and vegetables in Ghana: a review. **Environ Sci Pollut Res**, v. 23, p. 18966–18987, 2016.

ECOBICHON, D. J. Pesticide use in developing countries. **Toxicology**, v. 160, p. 27–33, 2001.

EFSA. The European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam. **EFSA J**, v. 11, p. 3067, 2013.

EPA. U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Pesticides**. Disponível em : http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/chemicals/carbendazim_ra.pdf. Acesso em: 13 jan. 2014.

EU COMMISSION. Commission Regulation (EU)2018/1514 of 10 October 2018. **Off J Eur Union**, v. 256, p. 8–32. 2018. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R1514&from=EN>. Acesso em: 13 mar. 2019.

EVANS, H. J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. **Mutation Research**, v. 392, p. 05–10, 1997.

FADIC, X. *et al.* *Tradescantia* as a biomonitor for pesticide genotoxicity evaluation of iprodione, carbaryl, dimethoate and 4,4'-DDE. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 146–151, 2016.

FAO. **Codex Alimentarius International Food Standards**. Disponível em: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/en/?p_id=72. Acesso em: 1 abr. 2020.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**.

FARIA, N. M. X. *et al.* Trabalho rural e intoxicações por agrotóxicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 5, p. 1298–1308, 2004.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: Conceitos, Doenças Relacionadas, Sistema de Defesa e Estresse Oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 61-68, jan. 1997.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, U. M. Teste do Micronúcleo: uma triagem para a avaliação genotóxica. **Saúde e Pesquisa**, v. 1, p. 337-40, 2008.

FRONZA, A. *et al.* Association between auditory pathway efferent functions and genotoxicity in young adults. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 1, Jan./Feb. 2011.

FURLAN, L.; KREUTZWEISER, D. Alternatives to neonicotinoid insecticides for pest control: case studies in agriculture and forestry. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 22, n. 1, p. 135–147, 2015.

GARRIDO, L. R.; SONEGO, O. R. **Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado**. Porto Alegre: EMBRAPA, 2003.

GLOVER-AMENGOR, M.; TETTEH, F. M. Effect of pesticide application rate on yield of vegetables and soil microbial communities. **W Afr J Appl Eco**, v. 12, p. 1–7, 2008.

GUIMARÃES, E. T. *et al.* Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) assay. **Environ Exp Bot**, v. 44, n. 1, p. 1-8, 2000.

GULIAEV, A. B.; HANG, B.; SINGER, B. Structural insights by molecular dynamics simulations into specificity of the major human AP endonuclease toward the benzene-derived DNA adduct, pBQ C. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 9, p. 2844-52, 2004.

HABENSCHUS, M. *et al.* In vitro enantioselective study of the toxicokinetic effects of chiral fungicide tebuconazole in human liver microsomes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 181, p. 96-105, 2019.

HEDDLE, J. A. A rapid in vitro test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, p. 1987-1990, 1983.

HIDETAKA, M. *et al.* **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 145, p. 1860, 2004.

HUAN, Z. *et al.* Acute toxicity and genotoxicity of carbendazim, main impurities and metabolite to earthworms (*Eisenia foetida*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 1, p. 62e69, 2016.

IUPAC. **International Union of Pure and Applied Chemistry**. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/116.htm>. Acesso em: 18 abr. 2020.

KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Sci Total Environ**, v. 575, p. 525–5354, 2017.

KJÆRSTAD, M. *et al.* Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. **Reproductive Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 573-582, 2010.

KNEBEL, C. *et al.* Unexpected effects of propiconazole, tebuconazole and their mixture on the receptors CAR and PXR in human liver cells. **Toxicol Sci**, v. 163, p. 170-181, 2018.

KNEZEVIC, Z.; SERDAR, M.; AHEL, M. Risk assessment of the intake of pesticides in Croatian diet. **Food Control**, v. 23, p. 59–65, 2012.

KONG, Z. *et al.* Effect of home processing on the distribution and reduction of pesticide residues in apples. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 29, n. 8, p. 1280-1287, 2012.

LABOURDETTE, G. *et al.* Fluopyram: a new antifungal agent for the control of problematic plant diseases of many crops. **Julius-Kühn-Archiv**, n. 428, p. 91-92, 2010.

LESMESS-FABIAN, C. *et al.* Dermal exposure assessment of pesticide use: The case of sprayers in potato farms in the Colombian highlands. **Sci Total Environ**, v. 430, p. 202-208, 2012.

LEWIS, K. A. *et al.* An international database for pesticide risk assessments and management. **Hum Ecol Risk Assess**, v. 22, n. 4, p. 1050–1064, 2016.

LI, Z. *et al.* Residue transfer and risk assessment of carbendazim in tea. **J Sci Food Agric**, v. 98, p. 5329–5334, 2018.

LIRA, O. F. C. *et al.* **Projeto Piloto de Biomonitoramento com *Tradescantia pallida* em municípios com Alto Risco Ambiental. Estado de Mato Grosso. Cuiaba. 2008.**

LOBO, T. M.; BOLAÑOS, A. Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad em expostos a plaguicidas. **Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud**, n. 2, p. 18-26, 2014.

- LOPES, C. *et al.* Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde Debate**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 117, p. 518-534, abr./jun. 2018.
- LOZOWICKA, B. *et al.* Evaluation of pesticide residues in fruit from Poland and health risk assessment. **Agric Sci**, v. 4, n. 5B, p. 106–111, 2013.
- LUZ, N. B.; SANTOS, H. P.; MELO, G. W. Avaliação da Resposta Espectral de Folhas de Aveia Preta (*Avena strigosa*) Cultivadas em Diferentes Solos da Serra Gaúcha, com Adição de Cobre e Matéria Orgânica. In: **ANAIS DO SBSR**, 11, 2003, Belo Horizontes. Resumos. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2003. p. 2343-2349.
- MA, T. H. *et al.* *Tradescantia* micronucleus bioassay. **Mutation Research**, v. 310, p. 221-230, 1994.
- MA, T. H. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. **Environ Health Perspect**, v. 37, p. 85–90, Jan. 1981.
- MAGNUCKA, E. G. *et al.* Action of benzimidazole fungicides on resorcinolic lipid metabolism in rye seedlings depends on thermal and light growth conditions. **Pesti Biochem Physio**, v. 88, p. 219–225, 2007.
- 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, p. 45–54, 2015.
- MENEGOLA, E. *et al.* Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects. **Reproductive Toxicology**, v. 22, p. 186–195, 2006.
- MICHAEL, A.; IRENE, A. Em **Handbook of Preservatives**; Taft, A., eds.; **Synapse Info Resources**. New York: 2004.
- MOHAMMED, K. B.; MA, T. H. *Tradescantia*-micronucleus and -stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. **Mutation Research**, v. 426, p. 193–199, 1998.
- MONDAL, S.; GOHSH, R. C.; MUKHOPADHYAYA, S. K. Studies on the electrolytes and microelements in Wistar rat following multiple exposures to acetamiprid. **Toxicol Ind Health**, v. 28, p. 422-427, 2012.
- MOREYRA, L. D. *et al.* Evaluation of Growth, Photosynthetic Pigments and Genotoxicity in the Wetland Macrophyte *Bidens laevis* Exposed to Tebuconazole. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 102, p. 353–357, 2019.
- MORINAGA, H. *et al.* A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN). **Endocrinology**, v. 145, p. 1860–1869, 2004.

MORO, A. M. *et al.* Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants. **Mutat Res**, v. 754, n. 1-2, p. 63-70, 2013.

MOSER, V. C. *et al.* The effects of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological, and reproductive function in rats. **Toxicol Sci**, v. 62, p. 339-352, 2001.

MUGHAL, B. B.; FINI, J.; DEMENEIX, B. A. THYROID-disrupting chemicals and brain development: an update. **Endocr Connect**, v. 7, p. R160-R186, 2018.

NOUGADÈRE, A. *et al.* Dietary exposure to pesticide residues and associated health risks in infants and young children – Results of the French infant total diet study. **Environment International**, v. 137, p. 105529, 2020.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. (Ed.). **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

PAREJA, L. *et al.* Occurrence and Distribution Study of Residues from Pesticides Applied under Controlled Conditions in the Field during Rice Processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4440-4448, 2012.

PATRA, M. *et al.* Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environ Exp Bot**, v. 52, p. 199–223, 2004.

PATUSSI, C.; BÜNDCHEN, M. Avaliação in situ da genotoxicidade de triazinas utilizando o bioensaio Trad-SHM de *Tradescantia* clone 4430. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 4, p. 1173-1178, 2013.

PAUL, P. A. *et al.* Effects of Pre- and Postanthesis Applications of Demethylation Inhibitor Fungicides on Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol in Spring and Winter Wheat. **Plant disease**, v. 102, n. 12, p. 2500-2510, 2018.

PEREIRA, B. B.; CAMPOS JÚNIOR, E. O.; MORELLI, S. In situ biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlândia, Brazil, using a *Tradescantia* micronucleus assay. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 87, p. 17–22, 2013.

PERES, F.; MOREIRA J. **É veneno ou é remédio?** Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2003. 384 p.

PRAJAPATI. S.K.,TRIPATHI. B.D. **Assessing the genotoxicity of urban air pollutants in Varanasi City using *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay.** **Environ. Int.**, v. 34, pp. 1092-1096, 2008.

QUINTANA, R. V. *et al.* Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales. **Revista Internacional de Contaminacion Ambiental**, v. 29, n. SPEC.ISSUE, p. 133–157, 2013.

RAJESWARY, S. *et al.* Modulation of antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats. **Reproduction Toxicology**, v. 24, p. 371–380, 2007.

- RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. E. (ed.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA; 2003.
- RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1-3, 2014.
- RODRIGUES, G. S. *et al.* *Tradescantia* bioassay as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 16, p. 325-359, 1997.
- RODRIGUES, G. S.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L. H. In situ assessment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program I -*Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation research**, v. 412, p. 235–244, 1998.
- RODRÍGUEZ, Y. A. *et al.* *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p. 438–442, 2015.
- SANCHO, E.; VILLARROEL, M. J.; FERRANDO, M. D. Assessment of chronic effects of tebuconazole on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna* after different exposure times. **Ecotox Environ Safe**, v. 124, p. 10-17, 2016.
- SCHMIDT, F. *et al.* Combination effects of azole fungicides in male rats in a broad dose range. **Toxicology**, v. 355–356, p. 54-63, 2016.
- SILVA, J. M. *et al.* Agrotóxicos e Trabalho: Uma Combinação Perigosa Para a Saúde do Trabalhador Rural. **Ciência & Saúde**, São Paulo, v. 10, n. 4, abr. 2005.
- SINGHAL, L. K. *et al.* Down regulation of humoral immunity in chickens due to carbendazim. **Toxicology In Vitro**, v. 17, p. 687–692, 2003.
- SISENANDO, H. A. *et al.* *Tradescantia pallida*: Mais do que uma linda flor, um importante bioindicador da qualidade ambiental. **Genética na Escola**, v. 4, n. 2, p. 09-13, 2009.
- SOUZA, R. *et al.* Genotoxic action of a metallic-insecticide using *Tradescantia pallida* as test organism. **Toxicology Letters**, v. 238, n. 2, p. S118, 2015.
- SPÓSITO, J. C. V. *et al.* Genetic instability in plants associated with vehicular traffic and climatic variables. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 120, p. 445–448, 2015.
- TCHAIKOVSKAYA, O. N. *et al.* Interaction of humic acids with organic toxicants. **Russ Phys J**, v. 59, n. 4, p. 597-603, 2016.
- VALENTE, D. *et al.* Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, n. 1-2, 2017.

VERMA, S., SRIVASTAVA, A. Cyto-genotoxic consequences of carbendazim treatment monitored by cytogenetical analysis using *Allium* root tip bioassay. **Environ Monit Assess**, v. 190, p. 238, 2018.

WOO, C. et al. Tebuconazole and propiconazole tolerance and possible degradation by Basidiomycetes: A wood-based bioassay. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 403e408, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace Guidelines**. Geneva, Suíça: 1996, 1:214 p.

YU, G. C. et al. Involvement of Sertoli cells in spermatogenic failure induced by carbendazim. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 287-292, 2009.

YU, L. et al. Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae following exposure to hexaconazole and tebuconazole. **Aquat Toxicol**, v. 138–139, p. 35-42, 2013.

YU, Y. et al. Effects of repeated applications of fungicide carbendazim on its persistence and microbial community in soil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 2, p. 179-85, 2009.

YUNLONG, Y. U. et al. Effects of repeated applications of fungicide carbendazim on its persistence and microbial community in soil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 2, p. 179-85, January 2009.

ZHANG, X. et al. Isolation and characterization of carbendazim-degrading *Rhodococcus erythropolis* djl-11. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e74810, 2013.

ZHOU, L. et al. Residue transfer and risk assessment of carbendazim in tea. **J Sci Food Agric**, v. 98, p. 5329–5334, 2018.

ZHOU, Q. et al. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Anal Chim Acta**, v. 606, p. 135–150, 2008.

ZUBROD, J. P. et al. Ecotoxicological impact of the fungicide tebuconazole on an aquatic decomposer-detritivore system. **Environ Toxicol Chem**, v. 30, p. 2718–2724, 2011.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br