

**STÉFANI CIBELE ROSSI**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MISTURA DE PESTICIDAS SOBRE O SISTEMA  
REPRODUTIVO DE RATAS WISTAR EXPOSTAS DURANTE A PRENHEZ E  
LACTAÇÃO**

Monografia apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de graduada em Ciências  
Biológicas, no Departamento de Farmacologia,  
Setor de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter.

**CURITIBA**

**2005**

## DEDICATÓRIA e AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos e ao meu namorado pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Paulo Roberto Dalsenter pela orientação.

Aos meus colegas de laboratório pela disposição em compartilhar seus conhecimentos.

Aos ratos que tiveram sua vida sacrificada em nome da ciência.

## EPIGRAFE

**“O caminho da vida pode ser o da liberdade e da beleza, porém nos extraviamos. A cobiça envenenou a alma dos homens... levantou no mundo as muralhas do ódio... e tem nos feito marchar a passo de ganso para a miséria e os morticínios. Criamos a época da velocidade, mas nos sentimos enclausurados dentro dela. A máquina que produz em abundância, tem nos deixado em penúria. Nossos conhecimentos fizeram-nos céticos, nossa inteligência empedernidos e cruéis. Pensamos em demasia e sentimos bem pouco. Mais do que máquinas, precisamos de humanidade. Mais do que inteligência, precisamos de afeição e doçura. Sem essas virtudes, a vida será de violência e tudo será perdido... Não sois máquinas! Homens é que sois!”.**

**C. CHAPLIN em “O último discurso”.**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	v
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	9
2.1 REPRODUÇÃO.....	9
2.1.1 Sistema Reprodutivo de Ratas Wistar.....	9
2.1.2 Fisiologia da Prenhez.....	11
2.1.3 Fisiologia do Parto.....	11
2.2 TOXICOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO.....	12
2.2.1 Efeitos dos toxicantes na fertilidade.....	12
2.2.2 Efeitos dos toxicantes no desenvolvimento embrionário e fetal.....	12
2.3 DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	13
2.4 INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL – IDA.....	14
2.5 USO DE PESTICIDAS.....	15
2.6 ÍNDICE MONOGRÁFICO DOS PESTICIDAS UTILIZADOS (ANVISA, 2003).....	19
2.6.1 Carbaril.....	19
2.6.2 Lambda-Cialotrina.....	20
2.6.3 Metamidofós.....	22
2.7 TOXICOCINÉTICA E MECANISMO DE LESÃO TOXICOLÓGICA.....	23
2.7.1 Inseticidas Organofosforados e Carbamatos.....	23
2.7.2 Inseticidas Piretróides.....	23
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
4.1 ANIMAIS.....	26
4.2 SUBSTÂNCIAS.....	26
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	26
4.4 FÓRMULAS UTILIZADAS.....	28
4.5 ACASALAMENTOS.....	29
4.6 DOSES E TRATAMENTO.....	29
4.7 AVALIAÇÃO DAS PROGENITORAS.....	29
4.8 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES.....	29
4.9 AVALIAÇÃO DAS DESCENDENTES FÊMEAS.....	30

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4.10.1 Análise de variância (ANOVA) seguido de Bonferroni.....	30
4.10.2 Teste Kruskal-Wallis.....	31
4.10.3 Qui-quadrado.....	31
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
5.1 GANHO DE MASSA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO.....	32
5.2 DADOS REFERENTES À PREENHEZ.....	33
5.3 MASSA DE ÓRGÃOS DAS PROGENITORAS.....	33
5.4 DESENVOLVIMENTO DA PROGÊNIE DURANTE A LACTAÇÃO.....	34
5.5 DESENVOLVIMENTO SEXUAL DA PROGÊNIE FEMININA.....	34
5.6 MASSA DE ÓRGÃOS DA PROGÊNIE FEMININA.....	35
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
6.1 DADOS DA PREENHEZ E LACTAÇÃO.....	37
6.2 DESENVOLVIMENTO DOS DESCENDENTES NO PERÍODO LACTACIONAL.....	38
6.3 DESENVOLVIMENTO SEXUAL DOS DESCENDENTES.....	38
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>39</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>

## RESUMO

Os pesticidas são substâncias usadas para prevenir ou reduzir a proliferação de pragas, seu uso mais comum é na agropecuária e na jardinagem. O uso destes pode gerar problemas pela contaminação ambiental e pela falta de seletividade ao organismo alvo. Os pesticidas atuam suprimindo algum mecanismo biológico importante do organismo alvo, e sabendo que não atuam com grande seletividade entre os organismos e ainda que os processos metabólicos que ocorrem nas células são muito semelhantes de um organismo para outro, os pesticidas podem representar uma ameaça também para organismos não alvos. O presente trabalho objetivou avaliar possíveis efeitos tóxicos reprodutivos em ratas e sua progênie feminina após exposição durante a prenhez e lactação à mistura de pesticidas, utilizando-se doses correspondentes à IDA (ingestão diária aceitável) e IDAx100.

Os pesticidas usados neste estudo foram escolhidos levando-se em conta os Limites Máximos de Resíduos (LMR), a concentração encontrada em diferentes culturas, a Ingestão Diária Aceitável (IDA), e a presença do resíduo em mais de uma cultura. Estes foram usados na forma comercial: SEVIN® (carbaril, IDA=0,003 mg/kg/dia), FORTIS® (lambdacialotrina, IDA=0,05 mg/kg/dia) e TAMARON® (metamidofós, IDA=0,004 mg/kg/dia). Foram utilizados três grupos de 10 fêmeas prenhes: um controle (CO) e dois tratados (IDA e IDAx100). Os pesticidas foram administrados via oral diariamente, do 6º dia de prenhez ao 21º dia de lactação. As variáveis avaliadas nas progenitoras foram a massa corporal e relativa de órgãos (fígado e rins), o tempo de prenhez, índice de nascimento e de perdas pós-implante. As variáveis avaliadas na progênie feminina foram o desenvolvimento ponderal, o dia da abertura do canal vaginal e do primeiro estro, a regularidade do ciclo estral e a massa corporal e relativa de órgãos (fígado e rins). Nenhuma das variáveis analisadas tanto nas progenitoras, quanto na progênie teve efeito nocivo significativo, indicando que as substâncias, nas doses testadas, não induzem efeitos adversos sobre o sistema reprodutivo em desenvolvimento.

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 1950, quando se iniciou a "revolução verde", foram observadas profundas mudanças no processo tradicional de trabalho na agricultura bem como em seus impactos sobre o ambiente e a saúde humana. Novas tecnologias, muitas delas baseadas no uso extensivo de agentes químicos, foram disponibilizadas para o controle de doenças, aumento da produtividade e proteção contra insetos e outras pragas agrícolas (MOREIRA *et al.*, 2002). Com o advento desta tecnologia, faz-se necessária a investigação científica das substâncias utilizadas, uma vez que a toxicidade destes compostos pode afetar espécies não alvo e acarretar prejuízos à saúde. Também foi preciso implementar uma legislação e fiscalização adequadas para garantir que a utilização destas substâncias se dá de forma segura. O uso de agrotóxicos na produção agrícola e a conseqüente contaminação dos alimentos têm sido de constante preocupação no âmbito da saúde pública (ANVISA, 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) ocorrem milhares de mortes por intoxicação com agrotóxicos, principalmente, organoclorados e organofosforados, e meio milhão de pessoas sofrem envenenamento por ingestão ou inalação (SANTAMARTA, 2001).

A intoxicação por agrotóxicos pode se dar através:

- da manipulação direta do produto durante o processo de formulação,
- durante a administração, ou durante a colheita,
- pela dispersão dos agrotóxicos ao longo dos diversos componentes do meio ambiente (lençóis freáticos e atmosfera),
- através da ingestão destes sob forma de resíduo em diferentes culturas.

De um modo geral, o consumo de agrotóxicos no meio rural decresce na seguinte ordem: herbicidas > inseticidas > fungicidas. Embora os herbicidas sejam mais utilizados, em geral a toxicidade deste grupo de substâncias é inferior à dos inseticidas. Estes inseticidas englobam compostos quimicamente bastante diferenciados, que podem ser agrupados em quatro categorias principais: os organoclorados, os piretróides, os organofosforados e os carbamatos. Os compostos pertencentes à categoria dos organofosforados e à dos carbamatos apresentam mecanismo comum de ação baseado na inibição da acetilcolinesterase e são os responsáveis pelo maior número de intoxicações no meio rural (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

O risco de efeitos adversos à saúde humana relacionado ao uso de pesticidas depende fundamentalmente do perfil toxicológico do produto, do tipo e da intensidade da exposição experimentada pelos indivíduos e da susceptibilidade da população exposta (DELGADO *et al.*, 2004).

A toxicidade dos agentes químicos foi inicialmente caracterizada para efeitos agudos, neurotóxicos e carcinogênicos. No entanto, atualmente existe a preocupação em avaliar os riscos decorrentes da exposição crônica e os efeitos adversos sobre o comportamento, reprodução e desenvolvimento (NEUBERT e CHAHOUD, 1995). Contaminantes ambientais, incluindo os pesticidas, que possuem a capacidade de atuar sob o sistema reprodutivo ou em outras funções reguladas pelo sistema endócrino têm se tornado foco de grande interesse pela saúde humana e ambiental.

Qualquer substância exógena, natural ou sintética, que interfira na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais é chamada de desregulador endócrino (EPA, 1997). Recentemente alguns cientistas têm proposto que substâncias químicas podem estar desregulando o sistema endócrino de seres humanos e de animais silvestres. Uma variedade de substâncias químicas tem sido testada em animais de laboratório, e existem fortes evidências que esta exposição está associada com efeitos adversos na reprodução e no desenvolvimento de peixes e animais silvestres (EPA, 2005).

A disfunção da tireóide em aves e peixes; a diminuição da fertilidade em aves, peixes, crustáceos e mamíferos; a diminuição do sucesso da incubação em aves, peixes e tartarugas; graves deformidades de nascimento em aves, peixes e tartarugas; anormalidades metabólicas em aves, peixes e mamíferos; anormalidades de comportamento em aves; desmasculinização e feminilização de peixes, aves e mamíferos machos; desfeminização e masculinização de peixes e aves fêmeas são possíveis efeitos dos pesticidas atuando como desreguladores endócrinos nos organismos vivos. (SANTAMARTA, 2001).

Vários trabalhos têm sido feitos para avaliar a toxicidade de numerosos pesticidas ingeridos sob forma de resíduo na dieta, mas a grande maioria destes estudos simula a exposição a apenas um tipo de substância e de forma isolada. Porém, quando nos alimentamos, estamos ingerindo diferentes tipos de pesticidas que podem interagir, e por isso entendemos que são de grande importância os estudos que envolvem misturas de pesticidas.

Este trabalho propôs avaliar os possíveis efeitos adversos sobre o sistema reprodutivo de ratas e sua progênie feminina quando estas são expostas a uma mistura de pesticidas durante a prenhez e lactação. Para tanto foi utilizado um protocolo adaptado proposto pelo Comitê Consultivo de Testes e Triagem dos Desreguladores Endócrinos (EDSTAC), que foi instituído pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) (EPA, 2002).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 REPRODUÇÃO

A reprodução é o processo pelo qual um organismo é capaz de originar novos indivíduos, sendo garantida a perpetuação das espécies.

Para que o processo reprodutivo se desenvolva com sucesso é exigido o funcionamento ajustado dos diversos órgãos envolvidos na reprodução, que incluem tanto o sistema neuroendócrino (hipotálamo e hipófise) quanto o genital.

#### 2.1.1 Sistema Reprodutivo de Ratas Wistar

O sistema reprodutivo das fêmeas de ratos Wistar, modelo biológico utilizado neste trabalho, é formado pela vagina, um conjunto de ductos sexuais (corpo uterino, cornos uterinos, ovidutos), nos quais ocorre o transporte dos oócitos, o desenvolvimento dos embriões em caso de fertilização e a saída dos fetos por ocasião do parto, e um par de ovários. As fêmeas apresentam seis pares de glândulas mamárias: três na região torácica, um na abdominal e dois na inguinal.

As fêmeas são animais poliétricos não estacionais ou anuais, apresentando ovulação espontânea e o estro ocorrendo por um período de 12 a 14 horas cada, e a cada 4 ou 5 dias.

A ativação do corpo lúteo não é espontânea e depende de um estímulo neural da estimulação mecânica da cérvix uterina, próximo do momento da ovulação.

Os estágios do ciclo são facilmente identificados de maneira citológica nos esfregaços vaginais (fig. 01). O ciclo estral é dividido em quatro fases ou períodos que diferem pelos tipos celulares da vagina:

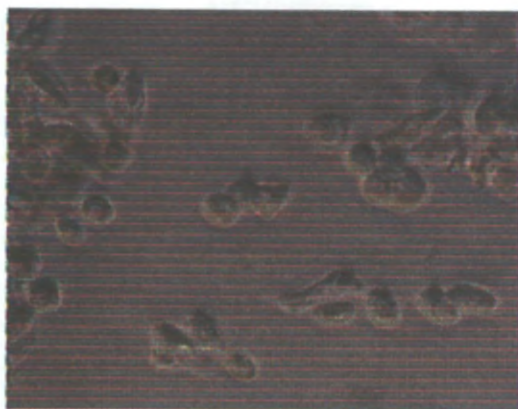


Fig 1A - Proestro



Fig 1B - Estro

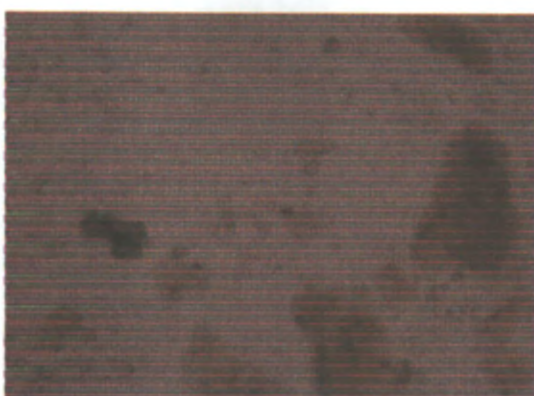


Fig 1C - Metaestro

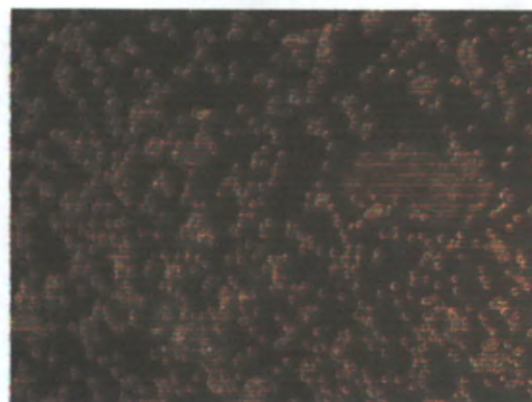


Fig 1D -Diestro

O proestro é a fase na qual ocorre o amadurecimento de mais de um folículo ovariano. As células mais freqüentes são as epiteliais grandes, nucleadas e redondas (fig. 1A). Tem duração de 25 a 27 horas e precede o estro. Nesta fase ocorrem os valores mais altos de estradiol que retornam a valores basais no início da madrugada do estro.

O estro é fase em que ocorre a ovulação. Inicia-se à noite e tem duração de aproximadamente 12 a 14 horas. Observam-se apenas células queratinizadas (fig. 1B).

O metaestro é a fase luteínica que corresponde à formação de estruturas denominadas corpos lúteos na superfície do ovário, exatamente onde ocorreram as ovulações. Os corpos lúteos produzem o hormônio progesterona, que impede a maturação de novos folículos e permite a manutenção da gestação. Há a presença de leucócitos, muco, células queratinizadas e epiteliais (fig. 1C). Tem duração de 6 a 8 horas.

O diestro é a fase que corresponde à atuação da progesterona para impedir o amadurecimento dos novos folículos. A duração do ciclo estral depende do tempo necessário para a regressão do corpo lúteo e a cessação da ação da progesterona, normalmente é de 55 a 57 horas. Na secreção vaginal há predominância de leucócitos, células epiteliais e muco em abundância (fig. 1D) (ANDERSEN *et al*, ???).

### 2.1.2 Fisiologia da Prenhez

Durante a prenhez, a massa da mãe (variando com o número de fetos e as condições de alimentação) aumenta de 15 a 25%. No terço final da prenhez, o metabolismo energético aumenta cerca de 30 a 40%. O volume minuto do coração comparativamente com o estado não-prenhe, aumenta em aproximadamente de 30 a 35%. Devido ao aumento das necessidades vitamínicas, de substâncias minerais e de elementos residuais, o aproveitamento destes aumenta cerca de 10 a 30%. A alimentação, conforme as necessidades do animal durante a prenhez é de grande importância para o crescimento dos fetos como para a capacidade de adaptação da regulação metabólica no período perinatal.

O crescimento dos fetos leva, lentamente, ao aumento do tamanho do útero, cujas fibras musculares aumentam em comprimento e espessura. Esta hipertrofia da musculatura uterina é importante no parto, para a expulsão dos fetos.

As glândulas endócrinas dos fetos já assumem sua função precocemente, durante o desenvolvimento fetal. Isso é de grande importância para o crescimento e para o metabolismo dos fetos. Nos animais maternos, a atividade de diversas glândulas endócrinas aumenta: a secreção de tiroxina e triiodotironina, de insulina e de STH aumenta. Estes processos de adaptação estimulam, nos animais prenhez, o acúmulo de proteínas e de gordura, a ingestão alimentar aumenta.

A prenhez de ratos tem duração média de vinte e dois dias. Através da extirpação da hipófise ou das supra-renais de fetos perto do final da prenhez, desencadeia-se um prolongamento da prenhez, o que deve ser devido à ausência da secreção de glicocorticosteróides (KOLB, 1987).

### 2.1.3 Fisiologia do Parto

No desencadeamento do parto participam diversas alterações na função das glândulas endócrinas ou alterações das concentrações hormonais no plasma sanguíneo. Um papel importante desempenham:

a) A maturação da função das supra-renais. Nos últimos dias antes do parto, a secreção de cortisol nos fetos aumenta acentuadamente, o que estimula o desencadeamento do parto.

b) A queda do teor de progesterona no plasma sanguíneo alguns dias antes do parto, que faz com que a musculatura uterina se torne cada vez mais capaz de reagir à ocitocina. O teor de estrógenos no plasma sanguíneo aumenta no final da prenhez de maneira considerável, aumentando o número de receptores de ocitocina na musculatura uterina. O teor de prostaglandinas no plasma aumenta.

c) A dose limiar para a ocitocina na musculatura uterina diminui. Através da dilatação da cérvix desencadeia-se uma liberação de ocitocina a partir do lobo anterior da hipófise.

Durante o processo do parto podemos diferenciar três períodos, o de preparação, o de dilatação e o de expulsão.

a) No período de preparação ocorre um aumento da irrigação sanguínea e um aumento do armazenamento líquido no canal do parto, sob influência de estrógenos. Os ligamentos largos da bacia ficam menos tensos, a vulva se edemacia.

b) No período de dilatação ocorre um maior número de contrações para que ocorra a dilatação cervical. As contrações se iniciam no ápice dos cornos uterinos, e são ondulares. Sob influência das contrações o feto é pressionado em direção a cérvix, e esta passa a dilatar-se cada vez mais, o conteúdo das vesículas fetais age como amortecedor de pressão. Após a abertura do canal cervical, o feto é empurrado para o espaço vaginal, até atingir a vulva, e até que as bolsas líquidas se rompam. Com o rompimento das bolsas encerra-se a fase de dilatação.

c) Na fase de expulsão as contrações uterinas apoiadas em grau cada vez maior pela prensa abdominal. A duração de período de expulsão varia de espécie para espécie (KOLB, 1987).

## **2.2 TOXICOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO (OSWEILER, 1998)**

### **2.2.1 Efeitos dos toxicantes na fertilidade**

Estrógenos ou toxicantes estrogênicos impedem a liberação de gonadotrofina e inibem a atividade ovariana.

- Além de suprimir a ovulação, os estrógenos estimulam a atividade no útero e na vagina. Os efeitos estrogênicos incluem o crescimento uterino e edema, hiperplasia endometrial, aumento da atividade miometrial, metaplasia escamosa vaginal e queratinização epitelial vaginal.
- DDT e seus metabólitos causam o enfraquecimento da casca dos ovos em aves de rapina e têm sido associados com retardo do estro e menor ovopostura.

### **2.2.2 Efeitos dos toxicantes no desenvolvimento embrionário e fetal**

Os toxicantes que atravessam a barreira placentária afetam o crescimento ou a sobrevivência fetal. O acesso aos tecidos em desenvolvimento depende da natureza da substância química e do caráter da placenta materno-fetal. Placentas mais complexas (ex. a

placenta de múltiplas camadas dos animais superiores) tornam mais difícil aos xenobióticos ter acesso ao feto. Ratos possuem placenta hemotricorial (três epitélios separam o sangue materno da placenta) e humanos placenta hemocorial (o sangue materno está em contato direto com o cório), esta diferença dificulta a extrapolação dos dados de experimentos com ratos para humanos, quando realizados durante a prenhez.

a) Com exceção da radiação, a exposição materna às substâncias químicas propicia acesso ao feto através de rotas normais do organismo materno (ex. toxicantes ingeridos por via oral passam pelo fígado, (biotransformação), ao sangue, à placenta e ao feto).

b) Na barreira placentária as substâncias químicas são absorvidas através das membranas celulares e das junções intercelulares da placenta de acordo com os princípios químicos e físicos comuns da absorção. A biotransformação dos xenobióticos pode ocorrer na placenta por mecanismos similares aos do fígado, mas a intensidade da atividade metabólica usualmente é menor na placenta.

A ausência de efeito tóxico na mãe não exclui acúmulo tóxico no feto. Por exemplo, a exposição ao mercúrio pode não causar sinais clínicos severos na gestante, mas o mercúrio pode acumular-se no feto, causando defeitos de desenvolvimento devido às altas exigências fetais de síntese protéica.

O crescimento fetal reduzido pode resultar de nutrição fetal insuficiente ou da exposição à toxicantes durante o segundo e terceiro trimestre de gestação.

A teratogenia é o desenvolvimento de defeitos funcionais ou estruturais não letais no feto. A curva dose-resposta típica para os teratógenos é muito íngreme, presumivelmente porque o feto tem menos mecanismos de detoxificação e menos reserva funcional do que um adulto.

## 2.3 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Alterações em sistemas endócrinos, nervoso, imunológico e aos efeitos carcinogênicos entre outros, alertam para a necessidade de estudos sobre o impacto ambiental das substâncias e dos seus produtos de degradação. Os compostos químicos que exercem efeitos tóxicos a curto, médio ou longo prazo são utilizados para os mais variados fins na indústria e na agricultura.

A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) define como desregulador endócrino (DE) todo composto químico que interfere no sistema endócrino, não apenas nas glândulas e respectivos hormônios, mas também no processo de síntese, armazenamento, liberação e transporte de hormônios aos receptores. O Programa Internacional de Segurança Química (IPCS), a Organização para a Cooperação no Desenvolvimento e Economia (OCDE) e o Comitê Científico para Toxicidade, Ecotoxicidade e Ambiente

(SCTEE) adotam como definição de desregulador endócrino toda substância ou a mistura de substâncias exógenas que alteram uma ou várias funções do sistema e têm, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, sua descendência e sub-populações (CREMESP, 2005). Nos seres humanos, a principal via de exposição aos desreguladores endócrinos é a digestiva, pelo consumo de alimentos contaminados. O leite materno também pode conter compostos tóxicos.

Alguns dos desreguladores estão sendo responsabilizados pelo avanço da idade para o aparecimento normal da puberdade. Muitos estudos demonstram que essas substâncias provocam alteração na função reprodutiva e anormalidades no desenvolvimento dos animais. Os desreguladores podem ser de origem sintética ou natural.

Agindo como antagonistas, os desreguladores endócrinos podem bloquear os receptores hormonais. Entre os DE destacam-se o diclodifeniltricloroetano (DDT), e seus produtos de degradação e o hexaclorobenzeno (HCB). Seus efeitos no sistema endócrino são provenientes do bloqueio de receptores hormonais atuando como antagonistas. Utilizado como fungicida, o HCB tem estudos realizados *in vitro* com células de próstata e *in vivo* com animais de laboratório que demonstram ação androgênica (CREMESP, 2005).

Uma das dificuldades em se pesquisar DEs está em se determinar a relação entre os efeitos e as substâncias que atuam como desreguladores endócrinos, principalmente em decorrência da múltipla exposição a agentes químicos.

## 2.4 INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL – IDA

O potencial tóxico de um aditivo depende de propriedades intrínsecas ao composto químico e seus metabólitos, assim como de sua capacidade de acúmulo no organismo. Aliado a isto, cada espécie viva exposta a um dado xenobiótico apresenta diferentes reações que variam com a dose, idade, sexo, estado nutricional e fatores genéticos. A avaliação toxicológica de aditivos para alimentos visa determinar o potencial tóxico de um aditivo e a dose que evidencia este potencial. Para o estabelecimento da segurança de um aditivo, os resultados dos ensaios toxicológicos são interpretados, determinando-se um nível de dose sem efeito adverso observável (NOEL – NO Effect Level), utilizado no cálculo da IDA para cada aditivo. Os valores da IDA são obtidos dividindo-se os valores de NOEL por um fator de segurança previamente estipulado que procura considerar, entre outros, a diferença de sensibilidade entre espécies animais e o homem, a heterogeneidade da população humana e a possibilidade de sinergismo entre substâncias químicas (SETOR1, 2005).

A IDA é, portanto, a quantidade máxima que se for ingerida todos os dias durante toda a vida, parece não oferecer risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos atuais. Ela é expressa em miligramas do pesticida por kg de peso corpóreo (EPA, 2005).

## 2.5 USO DE PESTICIDAS

Os agrotóxicos começaram a ser usados em escala mundial após a 2ª guerra mundial. Vários serviram de arma química nas guerras da Coreia e do Vietnã, como o Agente Laranja, desfolhante que dizimou milhares de soldados e civis.

Posteriormente, os países que tinham a agricultura como principal base de sustentação econômica - na África, na Ásia e na América Latina - sofreram fortes pressões de organismos financiadores internacionais para adquirir essas substâncias químicas. A alegação era que os agrotóxicos garantiriam a produção de alimentos para combater a fome. Com o inofensivo nome de “defensivos agrícolas”, eles eram incluídos compulsoriamente, junto com adubos e fertilizantes químicos, nos financiamentos agrícolas.

A utilização de agrotóxicos na agricultura nacional em larga escala ocorreu a partir da década de 70 (CUT-RJ, 2000). Segundo dados fornecidos pela Associação Brasileira da indústria Química, em 2004 o Brasil consumiu U\$ 4,2 bilhões de agrotóxicos. Desta forma, considerando-se o consumo em dez países que representam 70% do mercado mundial de agrotóxicos, o Brasil aparece em 4º lugar no “*ranking*”. O emprego de agrotóxicos nos Estados do Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins representa atualmente 70% do total utilizado no País. (ANVISA, 2004).

A preocupação com a presença de agrotóxicos nos alimentos é tão antiga quanto à introdução destes químicos no controle de pragas e doenças que afetam a produção agrícola. Porém, somente em anos mais recentes, os avanços do conhecimento científico aliados ao desenvolvimento tecnológico na área laboratorial, vêm permitindo a estruturação de serviços para verificação da qualidade do alimento em relação à presença de agrotóxicos. Ao longo das duas últimas décadas o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos no Brasil tem se constituído por múltiplos esforços isolados de Órgãos Estaduais de Saúde/Agricultura e instituições de pesquisas (ANVISA, 2004).

No Brasil, os produtos com pesticidas são obrigados a apresentar no rótulo a cor correspondente à classe de sua toxicidade, conforme demonstrado na tabela I.

Tabela 01 - Classificação dos pesticidas.

Classe	Faixa	Classificação do produto
I	vermelha	extremamente tóxico
II	amarela	altamente tóxico
III	azul	medianamente tóxico
IV	verde	pouco tóxico

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA/MS), o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz do Ministério da Saúde (INCQS/FIOCRUZ/MS) e a Secretaria de Saúde do Paraná iniciaram em 2001, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) (ANVISA, 2003).

O PARA foi desenvolvido em nível nacional, como um programa para avaliar a qualidade dos alimentos, frente ao uso de agrotóxicos, um antigo anseio das autoridades sanitárias, nas esferas Federal, Estadual e Municipal, objetivando principalmente garantir a segurança do consumidor em relação aos níveis de resíduos de agrotóxicos em alimentos (ANVISA, 2003).

Através do relatório do PARA e dados sobre o consumo alimentar domiciliar *per capita* anual da Pesquisa de Orçamentos Familiares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - POF/IBGE, realizada no período de 1986-1987 e 1995-1996 que abrangeu nove regiões metropolitanas, além de Brasília e do município de Goiânia, totalizando 187 municípios (IBGE, 2003), foi possível inferir sobre as quantidades e os tipos de agrotóxicos que a população está sendo exposta.

No PARA foram analisadas 1295 amostras referentes à:

- 165 amostras de alface
- 96 de banana
- 183 de batata
- 138 de cenoura
- 143 de laranja
- 99 de maçã
- 144 de mamão
- 144 de morango
- 186 de tomate

Das 1295 amostras 1278 (98,68%) foram analisadas e 17 (1,32%) foram rejeitadas por impossibilidade de realização das análises (ANVISA, 2003).

Constatou-se já na primeira fase do PARA que São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Pernambuco apresentaram 81,2% das amostras contendo algum resíduo de agrotóxico, e destes, 22,17% (233 amostras) de frutas, verduras e legumes vendidos em supermercados tinham irregularidades graves:

- 94 amostras com agrotóxicos além do limite permitido pela legislação
- 74 amostras tinham pesticidas não-autorizados devido ao alto grau de toxicidade nos produtos
- 65 amostras tinham os dois problemas anteriores
- Foram encontrados 33 ingredientes ativos de pesticidas sendo usados em culturas não-permitidas
- Foram encontrados 3 ingredientes de uso desautorizado no Brasil: clorpirifós metil, dieldrin e paration etílico (COLLUCCI, 2003).

Na pesquisa realizada pelo PARA, foram encontrados resíduos acima do Limite Máximo de Resíduo (LMR) para os agrotóxicos: Acefato, Azoxistrobina, Carbofurano, Clorotalonil, Diclorvós, Fenitrotiona, Iprodiona, Lambda-cialotrina, Metamidofós, Permetrina e Triazofós.

Dentre os pesticidas com consumo mais próximo da Ingestão Diária Aceitável (IDA), estão: Carbaril, Carbofurano, Dicofol, Metamidofós, Metidationa, Monocrotofós, Parationa metílica e Triazofós.

Entre os pesticidas em que foram encontrados resíduos em mais de uma cultura estão: Acefato, Captana, Carbaril, Carbendazim, Clorotalonil, Clorpirifós, Diazinona, Diclorvós, Dicofol, Dimetoato, Ditiocarbamatos (CS<sub>2</sub>), Endossulfano, Fenitrotiona, Iprodiona, Lambda-cialotrina, Metamidofós, Metidationa, Parationa metílica, Procimidona, Tetradona e Triazofós (Anvisa, 2003).

Foram ainda pesquisadas várias listas (elaboradas por diferentes agências internacionais) de agentes classificados como desreguladores endócrinos ou possíveis desreguladores endócrinos. Foram encontrados listados os seguintes pesticidas: Carbaril, Carbendazim, Carbofurano, Clorpirifós, Diclorvós, Dicofol, Dimetoato, Endossulfan, Iprodiona, Lambda-cialotrina, Permetrina, Procimidona, Vinclozina (FOE, 2000, GOETTLICH, 2003, PAN UK, 2001).

Através dos dados levantados e expostos anteriormente foi possível à construção de uma tabela de classificação de agrotóxicos por níveis de exposição (tabela 2).

Tabela 02 - Tabela de classificação de agrotóxicos por níveis de exposição.

> LMR 10 x > LMR	> 10%IDA > 25%IDA	+ de 1 cultura + de 3 culturas	Listados como Desregulador endócrino	Coincidem 2x Coincidem 3x	Classe química
Acefato Azoxistrobina		Acefato		Acefato	Organofosforado
	Carbaril	Captana Carbaril	Carbaril <sup>2</sup>	Carbaril	Metilcarbamato de naftila
Carbofurano	Carbofurano	Carbendazim	Carbendazim <sup>1,3,4</sup> Carbofurano <sup>3,4</sup>	Carbendazim Carbofurano	Benzimidazol Metilcarbamato de benzofuranila
Clorotalonil		Clorotalonil Clorpirifós Diazinona	Clorpirifós <sup>1,3,4</sup>	Clorotalonil Clorpirifós	Isoftalonitrila Organofosforado
Diclorvós	Dicofol	Diclorvós Dicofol Dimetoato	Diclorvos <sup>3,4</sup> Dicofol <sup>2,3</sup> Dimetoato <sup>3,4</sup>	Diclorvós Dicofol Dimetoato	Organofosforado Organoclorado Organofosforado
Fenitrotiona		Ditiocarbamato s Endosulfano	Endosulfano <sup>2,3</sup>	Endosulfano	Clorociclodieno Organofosforado
Iprodiona		Fenitrotiona Iprodiona	Iprodiona <sup>1,2</sup>	Fenitrotiona Iprodiona	Dicarboximida Piretróide
Lambda- cialotrina	Metamidofós	Lambda- cialotrina	-cialotrina <sup>2</sup>	Lambda- cialotrina	Organofosforado
Metamidofós	Metidationa Monocrotofó s	Metamidofós Metidationa		Metamidofós Metidationa	Organofosforado
Permetrina	Parationa metílica	Parationa metílica	Permetrina <sup>2,3</sup> Procimidona <sup>2,3,4</sup>	Parationa metílica	Organofosforado Dicarboximida
Triazofós	Triazofós	Procimidona Tetradiona Triazofós	Vinclozolina <sup>1,2,3,4</sup>	Procimidona Triazofós	Organofosforado

<sup>1</sup>(FOE, 2000), <sup>2</sup>(GOETTLICH, 2003), <sup>3</sup>(PAN UK, 2001), <sup>4</sup>(REYES, 2001)

A escolha dos pesticidas foi baseada na tabela supracitada bem como considerando a disponibilidade do produto e sua classe química, de forma a não utilizar dois pesticidas da mesma classe.

## 2.6 ÍNDICE MONOGRÁFICO DOS PESTICIDAS UTILIZADOS (ANVISA, 2003)

### 2.6.1 Carbaril – C03

a) Ingrediente ativo ou nome comum: CARBARIL (carbaryl)

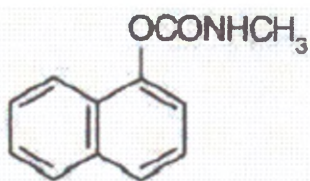
b) Sinonímia: NAC

c) N° CAS: 63-25-2

d) Nome químico: 1-naphthyl methylcarbamate

e) Fórmula bruta: C<sub>12</sub> H<sub>11</sub> N O<sub>2</sub>

f) Fórmula estrutural:



g) Grupo químico: Metilcarbamato de naftila

h) Classe: Inseticida

i) Classificação toxicológica: Classe II

j) Uso agrícola: autorizado conforme indicado.

Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de abacaxi, abóbora, alho, banana, batata, cebola, couve-flor, feijão, maçã, pastagens, pepino, repolho e tomate.

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança
Abacaxi	Foliar	0,5	7 dias
Abóbora	Foliar	0,1	3 dias
Alho	Foliar	0,2	14 dias
Banana	Foliar	0,2	14 dias
Batata	Foliar	0,1	30 dias
Cebola	Foliar	0,1	14 dias
Couve-flor	Foliar	0,02	14 dias
Feijão	Foliar	0,5	3 dias
Maçã	Foliar	2,0	7 dias
Pastagens	Foliar	100,0	5 dias
Pepino	Foliar	0,02	3 dias
Repolho	Foliar	0,2	14 dias
Tomate	Foliar	0,1	3 dias

Produtos de origem animal (*)	LMR (mg/kg)
Aves (parte comestível)	0,5
Aves (pele)	5,0
Carnes	1,0
Ovos (sem casca)	0,5

(\*) Intervalo de segurança não determinado por tratar-se de resíduo estranho

l) Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,003 mg/kg peso corpóreo

m) Emprego domissanitário: autorizado conforme indicado.

Entidades especializadas	2,5 % p/p
Pós e granulados	5,0 % p/p
Volatilizantes	não permitido

### 2.6.2 Lambda-Cialotrina - C63

a) Ingrediente ativo ou nome comum: LAMBDA-CIALOTRINA (lambda-cyhalothrin)

b) Sinonímia: Cyhalothrin; Cyhalothrin K; Clocythrin; PP 321

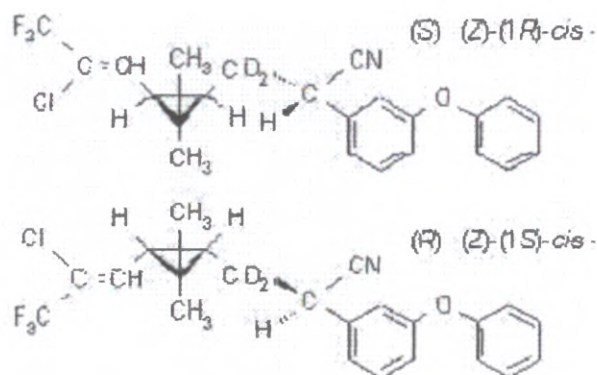
c) N° CAS: 91465-08-6

d) Nome químico: reaction product comprising equal quantities of (S)-á-cyano-3-phenoxybenzyl (Z)-(1R,3R)-

3-(2-chloro-3,3,3-trifluoro prop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate and (R)-á-cyano-3-phenoxybenzyl(Z)-(1S,3S)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate

e) Fórmula bruta: C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>ClF<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>

f) Fórmula estrutural:



g) Grupo químico: piretróide

h) Classe: Inseticida

i) Classificação toxicológica: Classe III

j) Uso agrícola: autorizado conforme indicado

Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, citros, couve, feijão, fumo, milho, soja, tomate e trigo.

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança
Algodão	Foliar	0,05	10 dias
Amendoim	Foliar	0,02	21 dias
Arroz	Foliar	0,05	30 dias
Batata	Foliar	0,05	3 dias
Café	Foliar	0,05	1 dia
Cebola	Foliar	0,05	3 dias
Citros	Foliar	1,0	21 dias
Couve	Foliar	0,05	10 dias
Feijão	Foliar	0,05	15 dias
Fumo	Foliar	UNA	UNA
Milho	Foliar	0,05	15 dias
Soja	Foliar	0,05	20 dias
Tomate	Foliar	0,05	3 dias
Trigo	Foliar	0,05	15 dias

L(ED) - Formulação L(ED) - exclusiva para aplicação eletrodinâmica

U.N.A. = Uso Não Alimentar

OBS: os LMRs referem-se à cialotrina – soma de todos os isômeros

l) Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,05 mg/kg peso corpóreo

m) Emprego domissanitário: autorizado conforme indicado.

1 - Aplicação por entidades especializadas e em campanhas de saúde pública.

1.1 - Tipo de formulação: Emulsão em água

Concentração máxima permitida.....2,5% p/v

1.2 - Tipo de formulação: Concentrado emulsionável

Concentração máxima permitida.....5,0% p/v

1.3 - Tipo de formulação - pó molhável

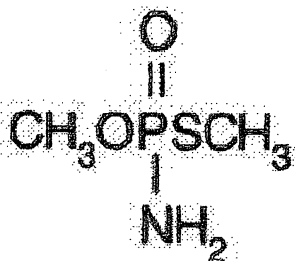
Concentração máxima permitida.....10% p/p

1.4 - Tipo de formulação: Microencapsulado

Concentração máxima permitida.....10% p/p

### 2.6.3 Metamidofós - M10

- a) Ingrediente ativo ou nome comum: METAMIDOFÓS (methamidophos)  
 b) Sinonímia: Fósforo-amido-tioato-0,S-dimetílico  
 c) N° CAS: 10265-92-6  
 d) Nome químico: 0,S-dimethyl phosphoramidothioate  
 e) Fórmula molecular: C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>PS  
 f) Fórmula estrutural:



- g) Grupo químico: Organofosforado  
 h) Classe: inseticida e acaricida  
 i) Classificação toxicológica: Classe I  
 j) Uso agrícola: autorizado conforme indicado.

Modalidade de emprego: Aplicação foliar nas culturas de algodão, amendoim, batata, feijão, soja, tomate (\*) e trigo.

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança
Algodão	Foliar	0,05	21 dias
Amendoim	Foliar	0,1	21 dias
Batata	Foliar	0,1	21 dias
Feijão	Foliar	0,01	21 dias
Soja	Foliar	0,01	23 dias
Tomate	Foliar	0,5	21 dias
Trigo	Foliar	0,1	21 dias

(\*) Uso autorizado somente para tomate rasteiro, com fins industriais.

OBS: Para todas as culturas o uso deverá ser exclusivamente via trator, pivô central ou aérea.

l) Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,004 mg/Kg peso corpóreo

m) Reavaliação estabelecida pelas Resoluções n° 06 e n° 07 de 14/10/99 e concluída em abril de 2002.

## **2.7 TOXICOCINÉTICA E MECANISMO DE LESÃO TOXICOLÓGICA (OSWEILER, 1998)**

### **2.7.1 Inseticidas Organofosforados (Metamidofós) e Carbamatos (Carbaril):**

#### **Toxicocinética**

A absorção pode ocorrer por toda a superfície corporal, especialmente no trato gastrointestinal, pele, pulmões e olhos. A distribuição é rápida, mas produtos organofosforados e carbamatos não acumulam em tecido adiposo.

A maioria dos organofosforados e carbamatos são rapidamente e quase completamente eliminados, resíduos em tecidos ou sangue são mínimos em poucas horas de exposição. Condições ácidas (p.ex., no estômago) aumentam a estabilidade do organofosforado e promovem sua persistência.

#### **Mecanismo da lesão toxicológica**

Inseticidas organofosforados e carbamatos inibem competitivamente a acetilcolinesterase (AChE) e outras colinesterases, fosforilando a enzima por se ligarem ao sítio esterásico da enzima. Em geral, a inibição produzida por organofosforados tende a ser irreversível, enquanto que a produzida por carbamatos tende a ser reversível.

Como pode ocorrer exposição a diferentes pesticidas em um mesmo indivíduo, é provável que haja toxicidade adicional com a exposição simultânea carbamatos aos organofosforados (EPA, 2005).

### **2.7.2 Inseticidas Piretróides (Lambda-Cialotrina):**

#### **Toxicocinética**

Esterases plasmáticas e hepáticas hidrolisam prontamente no trato gastrointestinal a ligação éster do inseticida, e por tanto, a toxicidade oral é muito baixa. Por sua rápida biotransformação a distribuição dos piretróides é relativamente sem importância. O inseticida hidrolisado é menos tóxico.

Os metabólitos resultantes da hidrólise são conjugados com glicina, ácido glicurônico e sulfatos, e são excretados pela urina.

### **Mecanismo da lesão toxicológica**

As piretrinas atuam nos canais de sódio da membrana de axônios, diminuindo e retardando a condutância de sódio para o interior e suprimindo o efluxo de potássio. Elas também podem inibir a adenosina trifosfatase (ATPase), o que pode afetar a condução de cátions na membrana axonal. O resultado final é uma diminuição do potencial de ação e a geração de impulsos nervosos repetitivos.

Além disso, os piretróides do Tipo 2 interferem na ligação do Ácido Gama-amino butírico (GABA) e do ácido glutâmico nos sítios receptores.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a possível toxicidade em ratas expostas a diferentes doses de misturas de pesticidas constantemente ingeridos pela população.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliar a toxicidade reprodutiva em ratas expostas durante a prenhez e lactação, à mistura dos pesticidas: Carbaril, Lambda-cialotrina e Metamidofós.
- ❖ Avaliar a toxicidade reprodutiva em descendentes de ratas expostas durante a prenhez e lactação, à mistura dos pesticidas: Carbaril, Lambda-cialotrina e Metamidofós.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos, *Rattus norvegicus* variedade Wistar, criados no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em salas com temperatura constante (20–24°C), obedecendo a uma fase claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 7 às 19 horas) e recebendo água e ração *ad libitum*.

### 4.2 SUBSTÂNCIAS

As substâncias utilizadas no presente estudo foram: Carbaril, Lambda-cialotrina e Metamidofós, tais pesticidas foram escolhidos entre os que se enquadraram em três dos critérios demonstrados na tabela 02, foi também considerada a disponibilidade do produto e sua classe química, de forma a não utilizar dois pesticidas da mesma classe. Os produtos foram adquiridos em lojas especializadas, em suas formas comerciais: SEVIN® (carbaril), FORTIS® (lambda-cialotrina) e TAMARON® (metamidofós).

Foram utilizadas misturas destes pesticidas. A mistura foi realizada no animal, ou seja, os pesticidas foram administrados seqüencialmente, para os grupos teste e o veículo (água destilada) para o grupo controle. Este veículo foi determinado conforme orientação dos fabricantes dos pesticidas, mantidas condições de pH para maior estabilidade da diluição para administração nos animais.

### 4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A partir da adaptação do protocolo proposto pelo EDSTAC (Endocrine Disruptor Screenig and Testing Advisory Committee), o Ensaio de Exposição Gestacional/Lactacional (EPA, 2002), que detecta efeitos reprodutivos e de desenvolvimento, mediados por alterações nas vias estrogênica, androgênica e tireoideana, é que foi delineado o estudo em questão. O protocolo desenvolvido está apresentado esquematicamente abaixo:

**1° Acasalamento:**

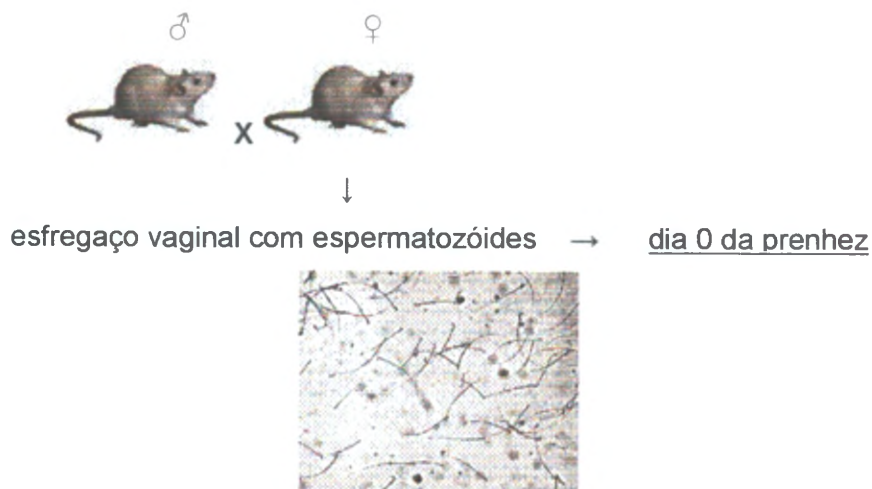


Fig. 02 – esfregaço vaginal com espermatozoides

**2° Tratamento:** Três gavagens diárias e sequenciais de pesticidas no grupo teste e de água no controle, administradas nas progenitoras.



Fig. 03 – gavagem

Início: 6° dia de prenhez → Término: 21° dia de lactação (dia do desmame)



**Sacrifício da progenitora**

❖ As progenitoras foram avaliadas durante o tratamento e após o sacrifício quanto ao:

- ganho de massa (g) durante a prenhez e a lactação
- tempo da prenhez (dias)
- tamanho das ninhadas e razão sexual
- massa relativa (%) de órgãos (fígado e rins)
- número de implantes uterinos.

❖ **A progênie feminina foi observada:**

**Após o nascimento quanto ao:**

- desenvolvimento ponderal (massa dos descendentes nos dias 1, 7, 14 e 21 após o nascimento)
- dia do descolamento das orelhas
- do aparecimento dos pêlos
- dia da abertura dos olhos

**E a partir da puberdade até o sacrifício (≈ 65 dias) quanto ao:**

- dia da abertura do canal vaginal
- 1° estro e regularidade do ciclo estral
- massa relativa (%) de órgãos (fígado e rins)

#### 4.4 Fórmulas Utilizadas

$$\text{índice de nascimento (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de filhotes nascidos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de filhotes nascidos}} \times 100$$

$$\text{índice de viabilidade (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de filhotes vivos no 4}^\circ \text{dpn}}{\text{n}^\circ \text{ de filhotes nascidos vivos}} \times 100$$

4° dia pós natal (dpn)

$$\text{índice de desmame (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de filhotes vivos no desmame}}{\text{n}^\circ \text{ de filhotes nascidos vivos}} \times 100$$

$$\text{razão sexo} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de filhotes machos}}{\text{n}^\circ \text{ de filhotes fêmeas}}$$

$$\text{perdas pós-implantes (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ implantes} - \text{n}^\circ \text{ filhotes nascidos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de implantes}} \times 100$$

#### 4.5 ACASALAMENTOS

Ratas Wistar (n=30) foram acasaladas com ratos machos adultos durante a fase escura do ciclo de luz (12 horas), na proporção de um macho para três fêmeas. Foram feitos esfregaços vaginais diários (como o esquema anterior demonstra) de cada fêmea para verificar a presença de espermatozóides e confirmar a cópula. Os acasalamentos foram repetidos diariamente até a obtenção de um número suficiente de progenitoras para a realização dos experimentos. As progenitoras foram mantidas em caixas coletivas de polipropileno (414 x 344 x 168 mm), em número de quatro por caixa, e separadas individualmente no 18<sup>a</sup> dia de prenhez.

#### 4.6 DOSES E TRATAMENTO

As fêmeas prenhez obtidas durante os acasalamentos foram separadas randomicamente em quatro grupos (10/grupo). Foram usados grupos experimentais com 10 animais cada. Um grupo foi tratado apenas com o veículo e utilizado como controle (CO). Os outros dois grupos foram tratados diariamente por via oral (gavagem), um com a dose correspondente a ingestão diária aceitável de cada pesticida (IDA) e o outro com a dose 100 vezes acima da ingestão diária aceitável (IDAx100).

#### 4.7 AVALIAÇÃO DAS PROGENITORAS

As progenitoras foram avaliadas quanto ao ganho de massa durante a prenhez e a lactação, tempo da prenhez, tamanho das ninhadas. O ganho de massa na prenhez e lactação foi registrado percentualmente em relação ao peso do 1<sup>o</sup> dia de prenhez e lactação, respectivamente. No 21<sup>o</sup> dia da lactação (desmame) as progenitoras foram sacrificadas por decapitação, colhido o sangue e o plasma e o útero retirado para a contagem do número de implantes uterinos. Foram avaliadas as perdas pós-implantes, a razão sexual e os índices de parto, de nascimento, viabilidade e desmame, assim como a massa de órgãos (fígado e rins).

O fígado, o sangue e o plasma foram armazenados em -70°C para posteriores avaliações bioquímicas.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES

A 1<sup>a</sup> geração de descendentes foi avaliada para as variáveis de desenvolvimento geral: tamanho das ninhadas, razão sexual, massa dos filhotes ao nascer e ao desmame,

viabilidade dos descendentes, período (dia) para descolamento bilateral dos pavilhões auriculares, surgimento de pêlos e abertura bilateral dos olhos.

#### **4.9 AVALIAÇÃO DAS DESCENDENTES FÊMEAS**

**Desenvolvimento ponderal** – O desenvolvimento ponderal foi feito tomando-se a massa dos descendentes nos dias 1, 7, 14 e 21 após o nascimento.

**Abertura do canal vaginal** – Para cada grupo de tratamento, 15 descendentes fêmeas foram separadas randomicamente, no dia do desmame. A partir do 30º dia pós-natal, as descendentes foram examinadas diariamente para registro do dia da completa abertura do canal vaginal.

**Primeiro estro e regularidade do ciclo estral** - A partir do dia da abertura completa do canal vaginal, foi realizado, diariamente, o esfregaço vaginal, para a observação, em microscopia de luz (aumento de 200x), dos tipos celulares do epitélio vaginal, para o registro do dia do primeiro estro e avaliação da regularidade do ciclo estral. Observado o tempo (dias) entre dois estros consecutivos durante 15 dias (dois ou três ciclos completos) foram consideradas regulares as fêmeas que apresentaram dois ou três estros em 15 dias.

**Variáveis reprodutivas** – As descendentes fêmeas foram sacrificadas por decapitação, com 65 dias, sendo então retirados: fígado e rins. Todos os órgãos foram dissecados cuidadosamente para a retirada da gordura adjacente e assim registradas suas massas, sendo reportado o valor absoluto e em relação à massa corporal

#### **4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

##### **4.10.1 Análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste de Bonferroni**

- ❖ Variáveis com medidas intervalares e distribuição normal.
- ❖ Diferenças entre os grupos.
- ❖ Massa corporal e relativa de órgãos e o ganho de massa das progenitoras durante a prenhez e a lactação.

#### 4.10.2 Teste Kruskal-Wallis

- ❖ Variáveis com medidas ordinais ou aquelas que não apresentaram distribuição normal ou homogeneidade entre as variâncias.
- ❖ Variáveis analisadas: dados da prenhez (tamanho das ninhadas, duração da prenhez e número de implantes uterinos), e variáveis de desenvolvimento geral e sexual das progênies.

#### 4.10.3 Qui-quadrado

- ❖ Variáveis indicadas como índices e percentuais.
- ❖ Variáveis analisadas: índices de nascimento, viabilidade e desmame, bem como as perdas pós-implante e a razão sexual.

O nível de significância estatística utilizado foi de 5% ( $p < 0,05$ ). A massa corporal dos filhotes e as variáveis de desenvolvimento geral e sexual dos filhotes foram analisadas utilizando as ninhadas como unidades estatísticas.

Para a análise estatística e a confecção dos gráficos foi utilizado o programa Graphpad Prism® versão 3.0.

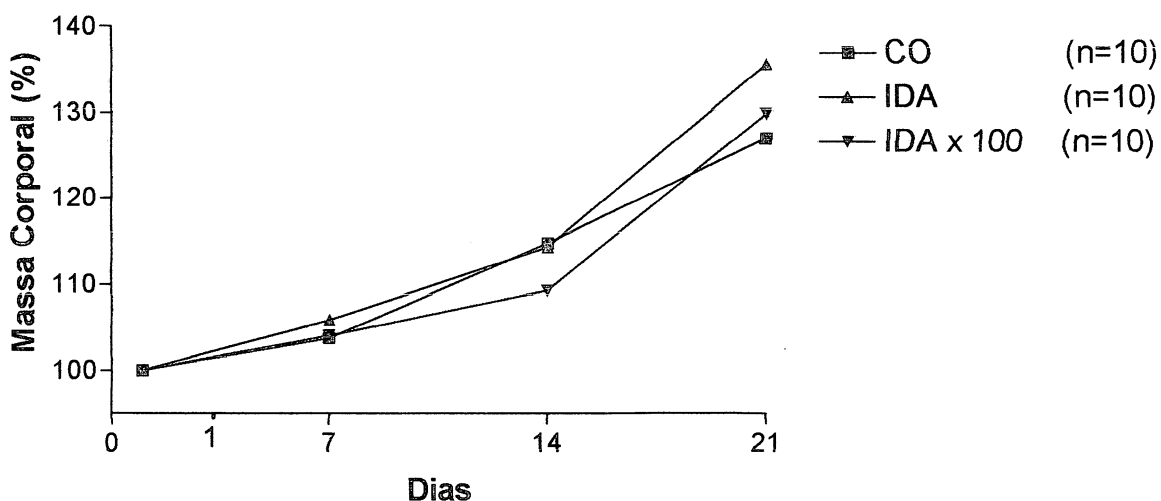
## 5 RESULTADOS

## BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## 5.1 Ganho de massa durante a Gestação e Lactação

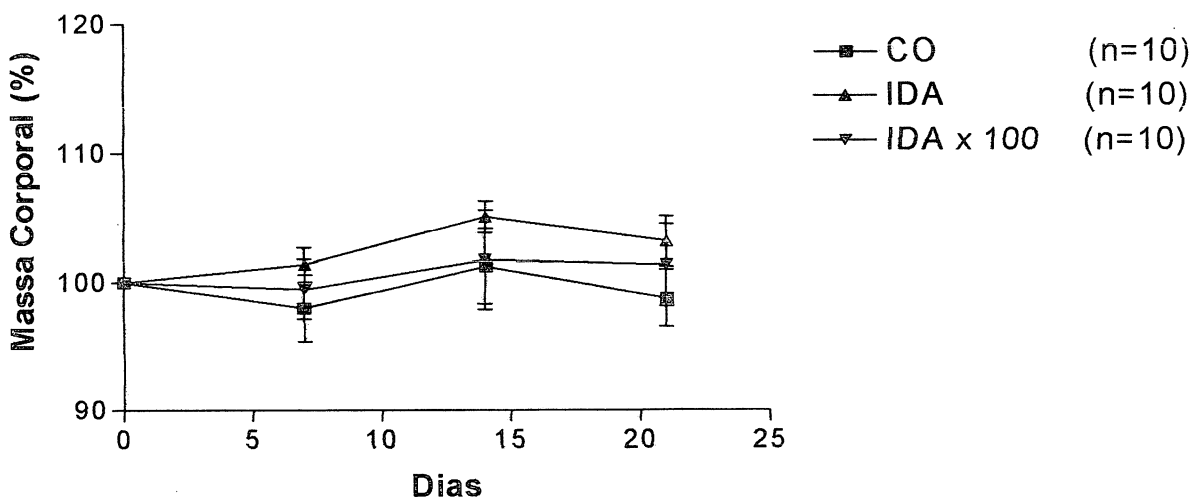
A administração da mistura de pesticidas (carbaril, lambda-cialotrina e metamidofós) nas doses avaliadas não afetou o ganho de massa corporal das progenitoras no período de prenhez (Figura 04), nem interferiu na sua massa durante a lactação (Figura 05).

FIG. 04 - MASSA RELATIVA CORPORAL DURANTE A PREENHEZ.



NOTA: Ganho percentual em relação à massa corporal no primeiro dia de gestação.

FIG. 05 - MASSA RELATIVA CORPORAL DURANTE A LACTAÇÃO.



NOTA: Ganho percentual em relação à massa corporal no primeiro dia de lactação.

## 5.2 Dados Referentes à Prenhez

Os pesticidas não interferiram na duração da prenhez, no índice de nascimento, desmame e viabilidade, nas perdas pós-implantes, no tamanho das ninhadas e na proporção entre filhotes machos e fêmeas (tabela 03).

TABELA 03 - DADOS REFERENTES À PREENHEZ.

Variáveis / Grupos	CO (n=10)	IDA (n=10)	IDAx100 (n=10)
Tempo de Prenhez (dias)	22 ± 0,42	22 ± 0,45	22 ± 0,58
Tamanho das Ninhadas	9,90 ± 3,07	9,75 ± 2,73	10,0 ± 1,83
Índice de Nascimento %	97	99	100
Índice de Viabilidade %	87	90	91
Índice de Desmame %	87	89	70
Perdas Pós- implantes %	13,2 ± 24,2	9,1 ± 16,6	2,5 ± 4,47
Razão Sexual (%) (m/f)	57 / 43	46 / 54	54 / 46

NOTA: As progenitoras foram utilizadas como unidade estatística.

## 5.3 Massa de Órgãos das Progenitoras

A massa relativa dos órgãos (fígado e rins) não foi afetada pelos pesticidas nas doses avaliadas para as ratas progenitoras expostas durante a prenhez e lactação (tabela 04).

TABELA 04 - MASSA RELATIVA DE ÓRGÃOS DAS PROGENITORAS.

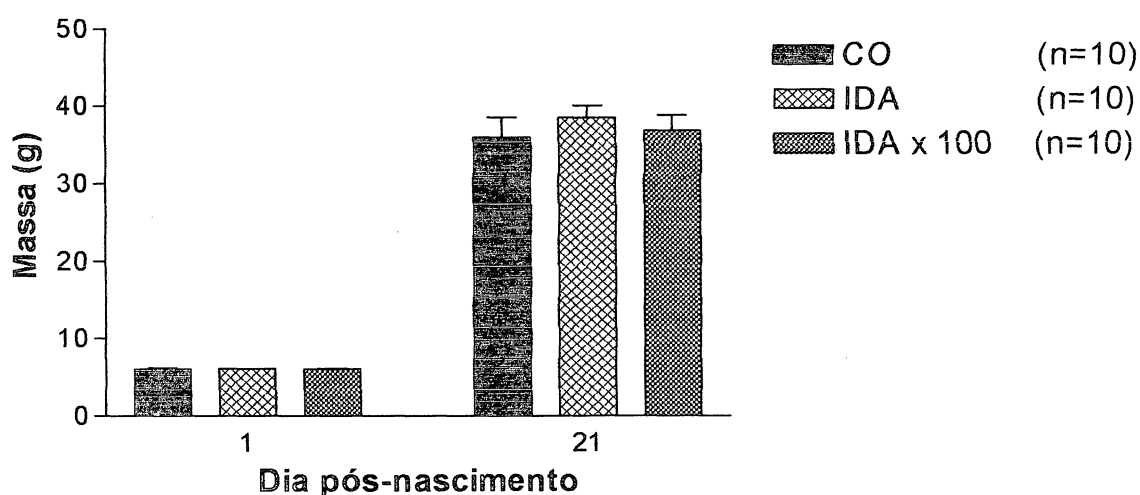
Variáveis / Grupos	CO (n=10)	IDA (n=10)	IDAx100 (n=10)
Massa relativa do fígado (%)	4,63 ± 0,22	4,67 ± 0,16	4,67 ± 0,20
Massa relativa dos rins (%)	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Massa corporal absoluta (g)	374 ± 4,73	371 ± 7,09	355 ± 6,08

NOTA: A massa relativa de órgãos foi calculada em relação à massa corporal no dia do sacrifício.

#### 5.4 Desenvolvimento da progênie durante a Lactação

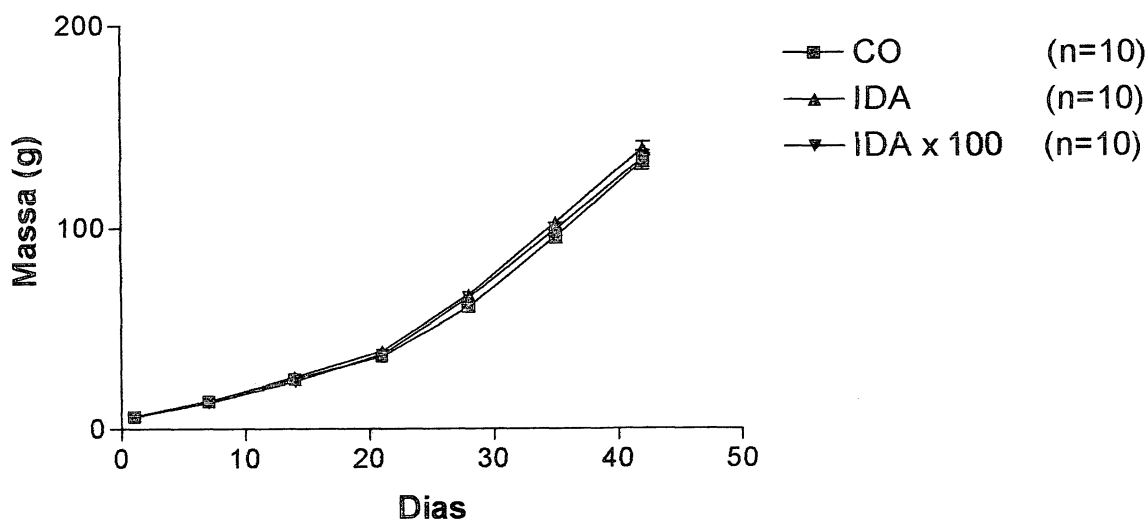
A massa corporal ao nascer (1° dia pós natal - dpn) e ao desmame (21° dia pós natal - dpn) (Figura 06), bem como o desenvolvimento ponderal (Figura 07) não diferiram entre os descendentes expostos à mistura de pesticidas e os que receberam apenas veículo. O período (dias) para descolamento bilateral das orelhas, aparecimento de pêlos e abertura bilateral dos olhos (tabela 05) também não foi afetado.

FIG. 06 – MASSA ABSOLUTA DOS FILHOTES NO 1°DPN E NO 21°DPN



NOTA: As ninhadas foram utilizadas como unidade estatística.

FIG. 07 – DESENVOLVIMENTO PONDERAL DOS FILHOTES.



NOTA: As ninhadas foram utilizadas como unidade estatística.

TABELA 05 – DESENVOLVIMENTO GERAL DOS DESCENDENTES ATÉ O DESMAME.

<b>Variáveis / Grupos</b>	<b>CO</b> <b>(n=10)</b>	<b>IDA</b> <b>(n=10)</b>	<b>IDAx100</b> <b>(n=10)</b>
<b>Descolamento de Orelhas (dias)</b>	<b>3 ± 0,54</b>	<b>3,66 ± 0,95</b>	<b>3,54 ± 1,47</b>
<b>Aparecimento de Pêlos (dias)</b>	<b>8,62 ± 0,64</b>	<b>8,79 ± 0,6</b>	<b>8,67 ± 0,51</b>
<b>Abertura de Olhos (dias)</b>	<b>15,3 ± 0,46</b>	<b>15,3 ± 0,51</b>	<b>15,0 ± 0,56</b>

NOTA: As ninhadas foram utilizadas como unidade estatística.

### 5.5 Desenvolvimento Sexual da Progênie Feminina

A exposição à mistura dos pesticidas não interferiu no tempo para a abertura do canal vaginal da progênie feminina, pois não houve diferença significativa entre os grupos testados e o grupo controle. Também não interferiu no dia do primeiro estro, no intervalo de dias entre os estros e na regularidade do ciclo estral (três ciclos completos) (tabela 06).

TABELA 06 – DESENVOLVIMENTO SEXUAL DA PROGÊNIE FEMININA.

<b>Variável / Grupos</b>	<b>CO</b> <b>(n=10)</b>	<b>IDA</b> <b>(n=10)</b>	<b>IDAx100</b> <b>(n=10)</b>
<b>Abertura de Canal Vaginal (dias)</b>	<b>34,7 ± 0,66</b>	<b>35,5 ± 1,51</b>	<b>35,4 ± 1,37</b>
<b>Intervalo (dias) entre estros</b>	<b>6,2 ± 1,09</b>	<b>7,42 ± 1,82</b>	<b>6,29 ± 0,96</b>
<b>Dia do 1º. estro</b>	<b>38,2 ± 3,30</b>	<b>39,0 ± 3,62</b>	<b>40,1 ± 4,38</b>
<b>Ciclo regular (nº animais)</b>	<b>25 (78,1%)</b>	<b>34 (79,1%)</b>	<b>31 (79,5%)</b>

NOTA: As ninhadas foram utilizadas como unidade estatística.

### 5.6 Massa de Órgãos da Progênie Feminina

A massa relativa dos órgãos da progênie feminina (fígado, rins) não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos teste e o grupo controle (tabela 07).

TABELA 07 - MASSA RELATIVA DE ÓRGÃOS PROGÊNIE FEMININA.

Variáveis / Grupos	CO (n=10)	IDA (n=10)	IDAx100 (n=10)
Massa corporal absoluta (g)	202 ± 8,69	207 ± 4,91	206 ± 4,45
Massa do fígado (%)	3,46± 0,06	3,75± 0,07	3,82± 0,08
Massa dos rins (%)	0,33± 0,01	0,33± 0,01	0,33± 0,01

NOTA: A massa relativa de órgãos foi calculada em relação à massa corporal no dia do sacrifício.

## 6 DISCUSSÃO

Durante a produção agrícola o uso de agrotóxicos é uma das maneiras mais comuns para a obtenção de melhores rendimentos. Porém, quando estes são encontrados nas culturas em forma de resíduos, podem representar riscos para a saúde da população pela exposição crônica através da dieta.

Atualmente há uma crescente preocupação em relação à possibilidade de interação entre os diferentes compostos, podendo haver efeitos adversos sobre a saúde humana e/ou animal. Uma especial atenção tem sido dada aos possíveis efeitos adversos pela exposição a substâncias químicas durante os períodos críticos de desenvolvimento. Estes efeitos podem ser muitas vezes irreversíveis (EPA, 1996).

Vários estudos podem ser feitos para caracterizar a toxicidade reprodutiva de substâncias isoladas ou misturadas. Dentre esses estudos, a exposição *in utero* e durante a lactação a substâncias suspeitas, é um protocolo validado e indicado. Pressupõe-se que uma alteração em animais de laboratório possa ser observada em seres humanos expostos aos mesmos compostos. Desta maneira destaca-se a importância deste tipo de teste para a obtenção de dados toxicológicos. Para estimar a toxicidade em seres humanos a partir de um estudo em animais, são respeitadas as diferenças inter-específicas, e a maior sensibilidade do ser humano em relação a outros mamíferos (PRESIBELLA, 2004; DOURSON e cols., 2002; LU, 1991).

Pouco se sabe sobre o possível efeito adverso de substâncias misturadas. É necessário utilizar protocolos validados pelas agências reguladoras e pela comunidade científica, para avaliar os riscos da exposição aos contaminantes ambientais.

A exposição de animais experimentais pela via oral a diferentes pesticidas procura aproximar-se ao que a população está sujeita através da dieta. No presente trabalho foram avaliados os efeitos da administração concomitante dos pesticidas lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós sobre o sistema reprodutivo de ratas Wistar e sua progênie feminina expostas durante a prenhez e lactação. Tais pesticidas são substâncias suspeitas de interferirem adversamente sobre o sistema endócrino.

### 6. 1 DADOS DA PRENHEZ E LACTAÇÃO

Os dados obtidos durante o período da prenhez e lactação permitem avaliar se houve toxicidade materna. A mortalidade, a massa corporal durante o tratamento, dados da prenhez e alterações comportamentais são sinais de possível toxicidade (EPA, 1991; EPA, 1996). Variações no peso podem indicar efeitos negativos no desenvolvimento dos filhotes.

A administração da mistura dos pesticidas (carbaril, lambda-cialotrina e metamidofós) nas doses correspondentes à IDA e IDAx100, não afetou o ganho de massa das progenitoras durante a prenhez e a lactação, tão pouco a massa do fígado e dos rins nas doses testadas. Os dados da prenhez (tempo de prenhez, índice de nascimento, índice de desmame, índice de viabilidade, perdas pós-implantes, tamanho das ninhadas e razão sexual) também não foram influenciados indicando que a mistura nas doses utilizadas não induz toxicidade materna.

## 6.2 DESENVOLVIMENTO GERAL DOS DESCENDENTES NO PERÍODO LACTACIONAL

O desenvolvimento geral no período lactacional (desenvolvimento ponderal, tempo para o descolamento dos pavilhões auriculares, tempo para o aparecimento de pêlos e tempo para a abertura de olhos), não foi afetado pela mistura dos pesticidas carbaril, lambda-cialotrina e metamidofós nas doses testadas. Estes resultados são indicativos da ausência de toxicidade na progênie em desenvolvimento nas doses testadas.

## 6.3 DESENVOLVIMENTO SEXUAL DAS DESCENDENTES FÊMEAS

As variáveis utilizadas para avaliação da possível interferência endócrina dos pesticidas no desenvolvimento sexual foram: o tempo para abertura do canal vaginal, dia do primeiro estro e regularidade do ciclo estral. Agentes que influenciam no equilíbrio hormonal podem acelerar ou retardar o desenvolvimento sexual (EPA, 1996).

Substâncias com efeito estrogênico podem adiantar a abertura do canal vaginal e desregular o ciclo estral. As variáveis investigadas na progênie feminina não apresentaram diferença significativa no tempo para a abertura do canal vaginal, no dia para o primeiro estro e na regularidade do ciclo estral. Estes resultados sugerem que a mistura dos pesticidas não induz efeitos estrogênicos nas doses testadas nestas variáveis.

Quando a mistura foi investigada no teste uterotrófico de (anti)estrogenicidade (uterotrófico), feito em ratas imaturas, os resultados sugeriram um efeito estrogênico, pois a massa absoluto e relativo do útero foi significativamente maior quando comparado ao controle tratado com água destilada (ARAÚJO, 2005). No presente trabalho a progênie feminina foi exposta *in útero* e durante a lactação, já no teste uterotrófico a administração é feita diretamente no animal a ser avaliado. Desta maneira a concentração da substância que chega ao animal através da placenta e do leite é menor do que quando administrada via oral.

## 7 CONCLUSÕES

- ❖ Não foi observada toxicidade geral em ratas expostas a diferentes doses (IDA e IDAx100) de misturas de pesticidas constantemente ingeridos pela população.
- ❖ Não houve toxicidade reprodutiva em ratas expostas durante a prenhez e lactação, à mistura dos pesticidas: Carbaril, Lambda-cialotrina e Metamidofós.
- ❖ Não houve toxicidade reprodutiva na progênie feminina de ratas expostas durante a prenhez e lactação à mistura dos pesticidas: Carbaril, Lambda-cialotrina e Metamidofós.
- ❖ Uma vez que a população está em contato diário com os pesticidas, os estudos crônicos aproximam-se mais da realidade. Vários parâmetros ainda devem ser analisados para se concluir que a mistura destes pesticidas realmente não causa toxicidade, no entanto ela se mostrou segura para as variáveis analisadas em ratas prênhez e sua progênie feminina.

## 8 REFERÊNCIAS

- AMANN, R. P. et al. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 586-592, 1976.
- ANDERSEN, M. L. *et al.* Ratos Reprodução. In: **Princípios Éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação**. 1. ed. São Paulo: Cromossete, p. 104 – 109.
- ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia: Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos: relatório anual 2003. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 22 dez., 2003.
- ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia: Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos: relatório anual 2004. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 24 nov., 2005.
- ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia: monografia de produtos agrotóxicos. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 22 dez., 2003.
- ARAÚJO, S.L. Exposição de ratos wistar aos inseticidas lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós. Curitiba, 2005. 89f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- CANTARUTI, T. F. Exposição de ratos wistar a mistura de pesticidas. Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- CARSON R. Silent Spring: Penguin Books, 2000 (reimpressão): 323p
- CIÊNCIA ONLINE. Aspectos relativos a resíduos de pesticidas em alimentos na saúde pública. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <[http://www.cienciaonline.org/revista/04\\_10/artigo\\_esp.asp](http://www.cienciaonline.org/revista/04_10/artigo_esp.asp)> Acesso em: 7 nov., 2005.
- COLLUCCI, C. 22% dos alimentos estão contaminados. **Folha de S. Paulo**, 21 abr. 2003. Cotidiano, saúde, p. C4.
- CREMESP. Impacto dos compostos químicos na saúde. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em:<<http://www.cremesp.org.br/?siteAcao=Revista&id=185>> Acesso em: 27 out., 2005.
- CUNNINGHAM, J. G. Fisiologia da Lactação. In: **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, p. 326-337.
- CUT (Central Única dos Trabalhadores). Meio ambiente, saúde e trabalho. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em:< [www.sindipetro.org.br](http://www.sindipetro.org.br)> Acesso em: 24 nov., 2005.
- DOURSON, M.; CHARNLEY, G.; SCHEUPLEIN, R. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. II Risk and regulation. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 35, n. 3, p. 448-467, 2002.

EPA (Environmental Protection Agency). Special report on environmental endocrine disruption: An Effects Assessment and Analysis. EPA/630/R-96/012, Washington, 1997.

EPA (Environmental Protection Agency). Protocol RTI P. O. Box 12194 research triangle park, NC 27709 RTI-839. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/scipoly/oscpdo/meetings/002/march/inuterolactationprotocol.pdf>> Acesso em: 05 abr. 2002.

EPA (Environmental Protection Agency). What Are Endocrine Disruptors? **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <<http://www.epa.gov/oscpmont/oscpdo/edspoverview/whatare.htm>> Acesso em: 08 nov., 2005.

Friends of the Earth (FOE). **Hormone Disrupting Chemicals Found in Baby Food**. London, 2000. Disponível em: <[http://www.foe.co.uk/resource/press\\_releases/20001201150619.html](http://www.foe.co.uk/resource/press_releases/20001201150619.html)>

GOETTLICH P.; **What are Endocrine Disruptors?** 2001(rev.5dec03). Disponível em: <<http://www.mindfully.org/Pesticide/EDs-PWG-16jun01.htm>>

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)> Acesso em: 22 dez., 2003.

KOLB, L. *et al.* Fisiologia da reprodução, prenhez e parto. In: **Fisiologia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p.402-404.

LU, F. C. Toxicology evaluation: assessment of safety/risk. In: **Basic Toxicology: fundamentals, target, organs, and risk assessment**. 2. ed. Miami: Taylor & Francis, 1991, p. 327-344.

NEUBERT, D.; CHAHOUD, I. Possible consequences of pré-or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. *Endocrin Chem Environ*, v. 3, p. 24-52, 1995.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER (NPIC).The U.S.EPA Reference Dose Tracking Report. Washington, 1997. Disponível em: <http://npic.orst.edu/tracking.htm>.

OSWEILER, G. D. *et al.* Toxicologia do sistema reprodutor femenino. In: **Toxicologia Veterinária**. São Paulo: Artes Médicas, 1998, p. 157-159.

Pesticide Action Network UK(PAN UK). **The List of Lists**. London, 2001. Disponível em: <<http://www.pan-uk.org/briefing/ListofL.pdf>>

PRESIBELLA, K. M. Efeitos da associação dos pesticidas deltametrina e endossulfano sobre o sistema reprodutivo de ratos wistar. Curitiba, 2004.125f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PRT6. Procuradoria Regional do Trabalho – Região 6. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <[www.prt6.gov.br](http://www.prt6.gov.br)> e < Acesso em: 22 dez., 2003.

REYES, L.L., Tóxicos ambientais desreguladores do sistema endócrino. *RFML*.série III, 6(4):213-225, 2001.

SANTAMARTA J. Por um futuro sem contaminantes orgânicos persistentes. **Agroecol.e Desenv.Rur.Sustent.**, Porto Alegre, v.2, n.1, p.46-56, jan./mar.2001.

SANTAMARTA J. A ameaça dos disruptores endócrinos. **Agroecol.e Desenv.Rur.Sustent.**, Porto Alegre, v.2, n.3, p.18-29, jul./set.2001.

STOR1. Ingestão diária aceitável. **Citação e referências a documentos eletrônicos.** Disponível em <<http://www.setor1.com.br>> Acesso em: 23 out., 2005.