

# POTENCIAL MUTAGÊNICO DO FUNGICIDA MANCOZEBE EM *Astyanax jacuhiensis* (Teleostei: Characidae)

## MUTAGENIC POTENTIAL OF THE FUNGICIDE MANCOZEB IN *Astyanax jacuhiensis* (Teleostei: Characidae)

Angélica GOLDONI<sup>1</sup>; Luciano Basso da SILVA

1. Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brasil. 2. Professor titular, Grupo de Pesquisa em Indicadores de Qualidade Ambiental, Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brasil. [lucianosilva@feevale.br](mailto:lucianosilva@feevale.br)

**RESUMO:** O Mancozebe é um fungicida etilenobisditiocarbamato (EBDC) amplamente utilizado, cujos efeitos tóxicos já foram estudados em diversas espécies. No entanto, até o momento nenhum estudo avaliou o potencial mutagênico deste agrotóxico em peixes. Os efeitos mutagênicos de uma exposição aguda (120 h) a quatro diferentes concentrações (0,3 mg/L, 0,7 mg/L, 1,5mg/L e 2,5 mg/L) de uma formulação comercial à base de Mancozebe foram avaliados através do teste do micronúcleo (MN) e da ocorrência de anormalidades nucleares (AN) nos eritrócitos da espécie *Astyanax jacuhiensis*. Para a determinação das frequências de MN e AN, foram analisadas 2000 células por animal. Os resultados não demonstraram diferenças significativas ( $P \geq 0,05$ ) na frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares entre o grupo controle e os quatro tratamentos à base de Mancozebe, indicando que este fungicida não apresenta evidências de genotoxicidade em peixes da espécie *Astyanax jacuhiensis*, quando expostos às concentrações testadas neste trabalho.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fungicidas. Peixes. Genotoxicidade. *Astyanax jacuhiensis*.

### INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos líderes mundiais em consumo de agrotóxicos (FARIA et al., 2007). Esses produtos tornaram-se indispensáveis para a agricultura moderna, constituindo uma categoria heterogênea de substâncias químicas cuja aplicação ainda é o meio mais eficiente e aceitável para o controle de pragas, ervas daninhas e doenças em plantas (BOLOGNESI, 2003). Embora o uso de defensivos agrícolas tenha aspectos positivos, estas substâncias podem chegar a reservatórios de água, rios e riachos, produzindo impactos adversos na biota aquática, onde, mesmo em concentrações não letais, podem provocar alterações em múltiplos níveis de organização, incluindo moléculas, tecidos, órgãos, indivíduos, populações e comunidades (GRISOLIA, 2005). Entre os animais aquáticos que não são alvo dos agrotóxicos, destacam-se os peixes, visto que eles podem metabolizar, concentrar e armazenar poluentes presentes nos corpos d'água (VAN DER OOST et al., 2003).

Os fungicidas constituem um dos principais defensivos utilizados na agricultura, sendo o Mancozebe um produto de amplo espectro comercializado em grande escala e indicado para uma ampla variedade de culturas que vão desde hortaliças até cereais. Seu princípio ativo é o etilenobisditiocarbamato (EBDC) (GRISOLIA, 2005). O modo de aplicação do Mancozebe é realizado através de pulverização ou tratamento de

sementes, estando disponível no mercado brasileiro como pó molhável (MARRS; BALLANTYNE, 2004).

De acordo com dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os fungicidas da classe dos ditiocarbamatos são compostos derivados do ácido ditiocarbâmico que apresentam baixa toxicidade aguda. No entanto, os EBDCs apresentam riscos associados ao seu principal produto de metabolização, a etilenotiorúria (ETU). Evidências de carcinogenicidade (SHUKLA et al., 1990; BELPOGGI et al., 2002), desordens reprodutivas (BALIGAR; KALIWAL, 2001; JOSHI et al., 2005; ROSSI et al., 2006) e neurotoxicidade (NORDBY et al., 2005) têm sido relatadas em animais de laboratório ou em trabalhadores rurais expostos ao Mancozebe. A ANVISA o classifica como um fungicida de classificação ambiental II, ou muito perigoso ao meio ambiente.

O conhecimento sobre a genotoxicidade dos agrotóxicos utilizados nas culturas brasileiras é de extrema importância, visto que muitas destas substâncias acarretam danos ao DNA, os quais podem desencadear processos de carcinogênese e anormalidades morfológicas, ou alterações nos gametas, influenciando na sobrevivência e na fertilidade das populações (BOLOGNESI, 2003). Dentre os diversos testes disponíveis, o teste do micronúcleo é um dos ensaios mais utilizados em avaliações genotóxicas, tendo se mostrado eficiente para a avaliação do potencial mutagênico de

diversas substâncias em peixes (MATSUMOTO; CÓLUS 2000; GRISOLIA, 2002; ÇAVAS; KÖNEN, 2007). Os micronúcleos (MN) podem se originar tanto por fragmentos cromossômicos quanto por cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo principal durante a divisão (UDROIU, 2006). Em peixes, outras alterações nucleares em eritrócitos, como núcleos segmentados ou que apresentam invaginações (anormalidades denominadas “notched” e “blebbed”), também têm sido utilizadas como indicadores de exposição a substâncias genotóxicas (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2007; NGAN et al., 2007).

Embora os estudos sobre os efeitos biológicos dos ditiocarbamatos tenham aumentado nos últimos anos, nenhum autor avaliou o potencial mutagênico do Mancozebe em peixes. Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial mutagênico do fungicida Mancozebe em peixes da espécie *Astyanax jacuhiensis* (COPE, 1894) expostos a diferentes concentrações de uma formulação comercial contendo este ingrediente ativo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

O experimento foi realizado com peixes adultos da espécie nativa *Astyanax jacuhiensis*, com comprimento médio de  $11 \pm 2,5$  cm, obtidos de um piscicultor e previamente aclimatados em aquários com aeração artificial e oferta de ração comercial por três dias. Os animais não foram alimentados durante o experimento.

### Delineamento Experimental

Os peixes foram distribuídos em cinco aquários de dez litros (7 a 8 animais por aquário) com água de poço artesiano e aeração constante, cada um correspondendo aos seguintes tratamentos: quatro tratamentos contendo diferentes concentrações do produto formulado à base de Mancozebe 80% diluído em água (0,3 mg/L, 0,7 mg/L, 1,5 mg/L e 2,5 mg/L) e um controle negativo com água tratada. Ao final de 120 horas de exposição, foram retiradas amostras de sangue periférico para a posterior realização do teste do micronúcleo e de anormalidades nucleares.

As concentrações escolhidas para os tratamentos com Mancozebe foram baseadas em dados de toxicidade referentes a concentrações médias letais ( $CL_{50}$ ) deste agrotóxico em diferentes espécies de peixes, variando de 2,2 mg/L para a espécie *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) até 9,0 mg/L para a espécie *Carassius auratus* (L., 1758)

(EXTOXNET, 2010). Previamente, foram realizados testes pelo nosso grupo de pesquisa utilizando concentrações menores de Mancozebe e um menor período de exposição (72 horas), não ocorrendo efeitos genotóxicos (dados não publicados).

### Teste do Micronúcleo e Anormalidades Nucleares

As amostras de sangue periférico coletadas da veia caudal dos animais foram espalhadas sobre lâminas de vidro e fixadas em metanol absoluto durante dez minutos, coradas com uma solução de Giemsa 10% por dez minutos e enxaguadas em água corrente, passando por uma lavagem em água destilada. Todas as lâminas foram codificadas e analisadas por um único examinador sem o conhecimento dos tratamentos aos quais pertenciam. A análise das amostras foi realizada com a utilização de microscópio óptico, examinando-se 2000 eritrócitos de cada peixe. Os critérios para a identificação de micronúcleos foram os mesmos adotados por Grisolia (2002): (a) seu diâmetro deve ser menor que um terço do diâmetro do núcleo principal, (b) os micronúcleos devem estar claramente separados do núcleo principal e (c) os micronúcleos devem possuir coloração e intensidade semelhantes às do núcleo principal. Núcleos com morfologia anormal foram considerados como: “blebbed”, quando apresentavam uma pequena invaginação da membrana; “notched”, quando apresentavam invaginações profundas ou em maior número; e segmentados, quando se caracterizavam pela presença de um núcleo parcialmente ou totalmente dividido (CARRASCO et al., 1990).

### Análise Estatística

Os grupos expostos aos diferentes tratamentos foram comparados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando o nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o número médio de micronúcleos e anormalidades nucleares por 1.000 células de *Astyanax jacuhiensis* expostos a diferentes concentrações de Mancozebe por um período de 120 horas. Não foi observada mortalidade durante o período de exposição. As frequências de micronúcleos variaram de 0,0/1.000 células nos tratamentos com Mancozebe a 0,3mg/L, 0,7 mg/L e 2,5 mg/L a 0,4/1.000 células no tratamento com Mancozebe a 1,5 mg/L. O grupo controle apresentou uma taxa de micronúcleos de

0,2/1.000 células. As diferenças observadas entre o grupo controle e os quatro tratamentos com o fungicida não foram estatisticamente significantes ( $p = 0,76$ ). Levando em consideração a análise de anormalidades nucleares em eritrócitos, a classe de alterações com o maior frequência foi a classe

“blebbed”, sendo que não foram encontradas diferenças significativas ( $P \geq 0,05$ ) entre o grupo controle e os grupos expostos ao Mancozebe em nenhuma das classes de anormalidades consideradas.

**Tabela 1.** Médias e desvios padrão de micronúcleos e anormalidades nucleares em 1.000 eritrócitos de *A. jacuhiensis* expostos a diferentes concentrações de Mancozebe.

Tratamento	N	Micronúcleo	“Blebbled”	“Notched”	Segmentado
Controle Negativo	7	0,2 ± 0,7	3,7 ± 3,3	0,8 ± 0,9	0,1 ± 0,3
Mancozebe 0,3 mg/L	7	0,0 ± 0,0	1,1 ± 1,7	0,4 ± 0,7	0,5 ± 0,9
Mancozebe 0,7 mg/L	7	0,0 ± 0,0	2,2 ± 2,2	0,4 ± 0,7	1,0 ± 2,2
Mancozebe 1,5 mg/L	5	0,4 ± 0,5	2,2 ± 2,5	0,4 ± 0,8	2,4 ± 3,2
Mancozebe 2,5 mg/L	8	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,3

Os resultados obtidos em outros estudos sobre o potencial genotóxico do fungicida Mancozebe são conflitantes, dependendo da metodologia utilizada e dos organismos utilizados como modelo. Em um estudo realizado por Calviello et al. (2006), na Itália, relatou-se um aumento significativo de danos ao DNA em células de ratos Wistar expostas *in vitro* ao Mancozebe. Georgian e colaboradores (1983) estudaram os efeitos do Mancozebe sobre as células de medula óssea de ratos Wistar (*in vivo*) e sobre linfócitos humanos (*in vitro*), revelando um aumento nas frequências de aberrações cromossômicas de modo dose-dependente nos ratos e nos linfócitos humanos. A atividade genotóxica do Mancozebe também foi documentada em um estudo realizado por Krüger (2009), revelando um aumento na frequência de anormalidades da anáfase-telófase em bulbos de *Allium cepa* expostos a uma formulação comercial do produto. No entanto, em um estudo realizado por Vasudev e Krishnamurthy (1994), não foram encontrados aumentos significativos na frequência de micronúcleos em eritrócitos de camundongos expostos *in vivo* a uma formulação comercial a base de Mancozebe.

A contaminação aquática pode provocar danos genotóxicos em peixes, os quais afetam o sucesso reprodutivo, padrões genéticos e subsequente dinâmica populacional (BELFIORE; ANDERSON, 2001). Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram que o Mancozebe não foi capaz de induzir danos ao DNA da espécie *A. jacuhiensis*, embora não se possa descartar a possibilidade de efeitos genotóxicos com concentrações mais elevadas ou com maior tempo

de exposição. No entanto, concentrações mais elevadas podem não ser encontradas na natureza e Farah et al. (2003), estudando os efeitos dos pesticidas 2,4-D (diclorofenoxiacético) e PCP (pentaclorofenol), relataram um aumento significativo da frequência de micronúcleos em peixes após 48, 72 e 96 horas de exposição. De acordo com Udroui (2006), para a detecção de micronúcleos, é necessário que populações de células em divisão passem por pelo menos um ciclo celular completo; o número máximo de eritrócitos micronucleados em peixes ocorre de um a cinco dias após a exposição, sendo que na maioria das espécies isto ocorre após dois ou três dias. Devido à total falta de informações a respeito da genotoxicidade dos etilenoditiocarbamatos em peixes, novos estudos são necessários para a avaliação dos riscos ao meio ambiente, associados ao uso indiscriminado desta classe de pesticidas.

Os resultados do presente trabalho demonstram que o fungicida Mancozebe não apresenta evidências de genotoxicidade em peixes da espécie *Astyanax jacuhiensis*, quando expostos às concentrações e tempo de exposição utilizados. Considerando a ampla utilização deste fungicida mundialmente, é de extrema importância a caracterização dos possíveis efeitos genotóxicos deste produto, assim como a elucidação do processo de formação da etilenotiouréia através da metabolização do Mancozebe em organismos silvestres.

**ABSTRACT:** Mancozeb, a widely used ethylenebisdithiocarbamate (EBDC) fungicide, has been studied for its toxic effects on several species. However, no study has evaluated the genotoxic potential of this agrochemical in fish. Therefore, the mutagenic effects of an acute exposure (120 h) in aquarium to four different concentrations (0,3 mg/L, 0,7 mg/L, 1,5mg/L and 2,5 mg/L) of a Mancozeb commercial formulation were evaluated using the micronucleus (MN) test and the analysis of nuclear abnormalities (NA) in *Astyanax jacuhiensis* erythrocytes. To determine the frequencies of MN and NA, 2000 cells per fish were evaluated. The results showed no significant differences ( $P \geq 0.05$ ) in the micronuclei and nuclear abnormalities frequencies between the control group and the four groups treated with Mancozeb, indicating that this fungicide does not present evidence for genotoxicity on *Astyanax jacuhiensis*, when exposed to the concentrations tested in this work.

**KEYWORDS:** Fungicides. Fish. Genotoxicity. *Astyanax jacuhiensis*.

## REFERÊNCIAS

- BALIGAR, P. N.; KALIWAL, B. B. Induction of gonadal toxicity to female rats after chronic exposure to Mancozeb. **Industrial Health**, Kawasaki, v. 39, p. 235-243, jul. 2001.
- BELFIORE, N. M.; ANDERSON, S. L. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 489, p. 97-122, dec. 2001.
- BELPOGGI, F.; SOFFRITTI, M.; GUARINO, M.; LAMBERTINI, L.; CEVOLANI, D.; MALTONI, C. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 982, p. 123-136, apr. 2002.
- BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 543, p. 251-272, jun. 2003.
- CALVIELLO, G.; PICCIONI, E.; BONINSEGNA, A.; TEDESCO, B.; MAGGIANO, N.; SERINI, S.; WOLF, F. I.; PALOZZA, P. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 211, p. 87-96, mar. 2006.
- CARRASCO, K. R.; TILBUTY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, nov. 1990.
- ÇAVAS, T.; KÖNEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 263-268, jul. 2007.
- EXTOXNET. Disponível em: <http://extoxnet.orst.edu/pips/mancozeb.htm> . Acessado em 28 de junho de 2010.
- FARAH, M. A.; ATEEQ, B.; ALI, M. N.; AHMAD, W. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 54, n. 1, p. 25-29, jan. 2003.
- FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Pesticides poisoning in Brazil: the official notification system and challenges to conducting epidemiological studies. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 25-38, jan./mar. 2007.
- GEORGIAN, L.; MORARU, I.; DRAGHICESCU, T.; DINU, I.; GHIZELEA, G. Cytogenetic effects of alachlor and mancozeb. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 116, p. 341-348, mar. 1983.
- GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 518, p. 145-150, jul. 2002.

- GRISOLIA, Cesar Koppe. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2005. 392 p.
- JIRAUNGKOORSKUL, W.; KOSAI, P.; SAHAPHONG, S.; KIRTPUTRA P.; CHAWLAB, J.; CHARUCHAROEN, S. Evaluation of micronucleus test's sensitivity in freshwater fish species. **Research Journal of Environmental Sciences**, New York, v. 1, n. 2, p. 56-63, 2007.
- JOSHI, S. C.; GULATI, N.; GAJRAJ, A. Evaluation of toxic impacts of mancozeb on testis in rats. **Asian Journal of Experimental Sciences**, Jaipur, v. 19, n. 1, p. 73-83, 2005.
- KRÜGER, Rosângela Angelise. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa***. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) – Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS. 2009.
- MARRS, Timothy C.; BALLANTYNE, Bryan. **Pesticide toxicology and international regulation**. New Jersey: John Wiley and Sons, 2004. 592 p.
- MATSUMOTO, F. E.; CÓLUS, I. M. S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 489-492, jun. 2000.
- NGAN, P. V.; GOMES, V.; PASSOS, M. J. A. C. R.; USSAMI, K. A.; CAMPOS, D. Y. F.; ROCHA, A. J. S.; PEREIRA, B.A. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station “Comandante Ferraz”, King George Island. **Polar Biology**, New York, v. 30, p. 209-217, jan. 2007.
- NORDBY, K. C.; ANDERSEN, A.; IRGENS, L. M.; KISTENSEN, P. Indicators of mancozeb exposure in relation to thyroid cancer and neural tube defects in farmer's families. **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, Oslo, v. 31, n. 2, p. 89-96, apr. 2005.
- ROSSI, G.; BUCCIONE, R.; BALDASSARRE, M.; MACCHIARELLI, G.; PALMERINI, M. G.; CECCONI, S. Mancozeb exposure in vivo impairs mouse oocyte fertilizability. **Reproductive toxicology**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 216-219, feb. 2006.
- SHUKLA, Y.; ANTONY, M.; KUMAR, S.; MEHROTRA, N. K. Carcinogenic activity of a carbamate fungicide, mancozeb, on mouse skin. **Cancer Letters**, Clare, v. 53, p. 191-195, feb. 1990.
- UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 79, p. 201-204, aug. 2006.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 13, p. 57-149, feb. 2003.
- VASUDEV, V.; KRISHNAMURTHY, N. B. In vivo cytogenetic analyses of the carbamate pesticides Dithane M-45 and Baygon in mice. **Mutation Research Letters**, Amsterdam, v. 323, n. 3, p. 133-135, mar. 1994.