

EXPOSIÇÃO AO FUNGICIDA CERCONIL WP®: EFEITOS SOBRE A
REPRODUÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL E ESTRUTURA QUÍMICA DO
LÁTEX DE SERINGUEIRA

JAQUELINE NASCIMENTO DA SILVA

**EXPOSIÇÃO AO FUNGICIDA CERCONIL WP®: EFEITOS SOBRE A
REPRODUÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL E ESTRUTURA QUÍMICA DO
LÁTEX DE SERINGUEIRA**

JAQUELINE NASCIMENTO DA SILVA

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre – Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional

Orientador:
Profa. Dra. Ana Paula Alves Favareto

632.95
S586e

Silva, Jaqueline Nascimento da
Exposição ao fungicida Cerconil WP®: efeitos sobre a reprodução em modelo experimental e estrutura química do látex de seringueira / Jaqueline Nascimento da Silva. – Presidente Prudente, 2016.
(incluir número de páginas)f.: il.

Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2016.

Bibliografia.

Orientador: Ana Paula Alves Favareto.

1. Defensivos agrícolas. 2. Doenças fungicas. 3. Reprodução. 4. Seringueira. I. Título.

JAQUELINE NASCIMENTO DA SILVA

**EXPOSIÇÃO AO FUNGICIDA CERCONIL WP®: EFEITOS SOBRE A
REPRODUÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL E ESTRUTURA QUÍMICA DO
LÁTEX DE SERINGUEIRA**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de
Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade
do Oeste Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre - Área de Concentração: Meio
Ambiente e Desenvolvimento Regional

Presidente Prudente, 25 de abril de 2016

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Ana Paula Alves Favareto - Orientadora
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Profª. Drª. Carla Dal Bianco Fernandez
Universidade do Sagrado Coração - USC
Bauru - SP

Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino
Universidade Estadual Paulista - UNESP
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

À minha mãe e meu pai: Luzia e Antônio Carlos. Meus maiores exemplos de perseverança e, que apesar das dificuldades, me deram apoio constante.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora por todo amor, carinho e proteção, demonstrado diariamente, por toda a minha vida, de modo que nunca permitiram que perdesse a fé de lutar por dias melhores.

A minha família por ser composta pelas pessoas que mais me incentivam, que mais celebram as minhas vitórias e que estão sempre comigo em todos os momentos da minha vida. À minha mãe, Luzia, um agradecimento especial por sempre acreditar em minha capacidade e pelas palavras de consolo nas horas difíceis.

As minhas orientadoras Ana Paula Alves Favareto e Patricia Alexandra Antunes, por toda atenção e dedicação, pelos conhecimentos que me foram oferecidos, tanto profissionais quanto pessoais. Serei eternamente grata por tudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional pela oportunidade.

Ao Prof. Carlos José Leopoldo Constantino, Casé, por ceder gentilmente o Laboratório de Filmes Finos e Espectroscopia Raman da UNESP para as medidas de Raman e, também, pela ajuda com a discussão dos resultados.

A Nayara, Kátia e Jennifer por todo o suporte dado com os animais. Muito obrigada pela amizade conquistada e pela dedicação de vocês com as “minhas meninas”.

Ao Carlos por ceder gentilmente as amostras de látex e se colocar à disposição para colaborar com a pesquisa.

Ao bom e velho amigo Daniel, que esteve presente nos bons e maus momentos desse trabalho. Obrigada por suportar o mal humor e o cansaço de muitos dias, por toda ajuda com a preparação dos filmes do Raman e todo suporte no laboratório e por torcer e comemorar comigo minhas vitórias.

A Taeko, Airison, Luis e Livia, obrigada por me ouvir quando eu precisava desabafar que as coisas não davam certo e por comemorar comigo quando tudo ia bem.

A Gracielle e ao Lucas e todo o pessoal do biotério, por toda a ajuda e colaboração com a parte experimental.

À Joyce, secretária do programa, pela simpatia e dedicação com que sempre me atendeu.

Aos colegas do Mestrado, pela agradável convivência.

A CAPES pelo financiamento concedido no período de desenvolvimento do projeto.

OBRIGADA!

“O mais belo sentimento é o sentido do mistério. É a origem de toda ciência verdadeira. Quem jamais conheceu esta emoção, quem não possui o dom da admiração é como se estivesse morto: seus olhos estão cerrados.” (Albert Einstein)

RESUMO

Exposição ao fungicida Cerconil WP[®]: efeitos sobre a reprodução em modelo experimental e estrutura química do látex de seringueira

O Brasil produz aproximadamente 1% da borracha natural derivada de seringueira (*Hevea brasiliensis*) no mundo, sendo o estado de São Paulo o maior produtor. O plantio de seringueira pode ser acometido por doenças fúngicas, especialmente a Antracnose. Isto leva à necessidade do uso de defensivos agrícolas, sendo o Cerconil WP[®], composto por tiofanato metílico e clorotalonil, um dos mais utilizados. Diante da ampla exposição de trabalhadores rurais e da população do entorno das plantações a estes compostos, torna-se extremamente importante avaliar a sua possível toxicidade e impactos à saúde. Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar os potenciais efeitos teratogênicos e de toxicidade materna da exposição ao fungicida Cerconil WP[®] em diferentes doses, utilizando o rato como modelo experimental. Além disso, o estudo também pretendeu identificar os efeitos deste composto sobre a estrutura química do látex de seringueira, via Espectroscopia de Espalhamento Raman. Para tanto, ratas Wistar adultas prenhes foram divididas em 4 grupos experimentais, que receberam 0 (controle), 400 (EA), 800 (EB) ou 1200mg/kg/dia (EC) de Cerconil WP[®], via gavagem, do 6^o ao 15^o dia gestacional (DG). No DG20, as ratas prenhes foram mortas e submetidas à laparotomia para coleta do útero gravídico e órgãos maternos. Os fetos coletados foram processados para análise esquelética e visceral. Ratas expostas ao fungicida apresentaram sinais clínicos de toxicidade. Houve redução no peso das ratas no DG12 em todos os grupos expostos em relação ao grupo controle. O peso do fígado materno foi reduzido no grupo EC em relação ao controle e a análise histopatológica do tecido hepático apresentou áreas com necrose focal, infiltrado inflamatório, presença de hepatócitos com núcleo picnótico e área com formação de degeneração gordurosa microvesicular de moderada intensidade nos grupos EB e EC. A porcentagem de fetos com peso adequado para a idade gestacional foi menor nos grupos EA e EB, em relação aos grupos controle e EC. Além disso, a porcentagem de fetos pequenos aumentou no grupo EA, em relação aos demais grupos experimentais, e no grupo EB em relação ao controle. Foi observado um aumento na incidência total de anomalias esqueléticas nos grupos expostos em relação ao grupo controle. As alterações esqueléticas observadas em maior frequência foram: diminuição dos centros esternais, ausência de processo xifoide e vertebra caudais, malformação do supra-occipital e redução no número de falanges anteriores e metatarsos. As medidas de Espectroscopia de Espalhamento Raman (linha de laser de 514,5 nm, 25 segundos de exposição e 3 a 5 acumulações) não apresentaram alterações químicas significativas no látex exposto *in vitro* a 2g/L de Cerconil WP[®]. Os resultados demonstram que a exposição oral de ratas prenhes ao Cerconil WP[®], durante a organogênese, pode afetar o desenvolvimento embrio-fetal e causar toxicidade leve sobre a saúde geral materna. No entanto, a estrutura molecular do látex exposto ao fungicida não foi afetada nas condições experimentais do estudo.

Palavras-chave: clorotalonil, tiofanato metílico, teratologia, reprodução, rato, Espectroscopia de Espalhamento Raman.

ABSTRACT

Exposure to fungicide Cerconil WP®: reproductive effects in experimental model and chemistry structure latex of rubber tree

Brazil produces approximately 1% of natural rubber derived from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in the world, and Sao Paulo state is the major producer. The plantation of rubber tree might be stricken by fungal diseases, specially Antracnose. This fact requires the necessity of agriculture defenders as Cerconil WP®, composed by thiophanate methyl and chlorothalonil, one of the most used. Facing the large exposure to these compounds of workers and population that live near plantations, it is extremely important evaluate its possible toxicity and health impacts. Once that, the present work had as objective identify potential teratogenic effects and maternal toxicity of exposure to Cerconil WP® fungicide in different doses, using rat as an experimental model. Moreover, the study also aimed to identify effects of this fungicide on the chemistry structure latex of rubber tree, via Raman Spectroscopy. Therefore, Wistar female rats, adults and pregnant were divided into 4 experimental groups, that received 0 (control), 400 (EA), 800 (EB) or 1200mg/kg/day (EC) of Cerconil WP®, via gavage, from 6^o to 15^o gestational day (GD). In GD20, pregnant rats were euthanized and submitted to laparotomy for collection of uterus and maternal organs. The fetuses were collect, processed to skeletal and visceral analysis. Rats that were exposure to the fungicide presented clinical signs of toxicity. Reduction in weight evidenced in all groups in comparison to the Control group in GD12. Weight of maternal liver was lower in group EC than Control and histopathologic analysis of hepatic tissue presented areas of focal necrosis, inflammatory infiltrate, picnotic nuclei in hepatocytes and microvesicular fat degeneration areas moderated in groups EB and EC. The percentage of fetuses with adequate weight for gestational age was lower in groups EA and EB, in relation to the Control and EC groups. Percentage of little fetuses increased in group EA, in relation to the other experimental groups, and in group EB in comparison to Control. In addition, there was an increase of total incidence of skeletal anomalies in groups exposure in relation to the control. Skeletal alterations observed in higher frequency were: decrease in esternal centres, absence of xiphoid process and caudal vertebrae, malformation of supra-occipital and reduction on number of anterior and metatarsus phalanges. Measures of Raman Spectroscopy (laser island of 514,5 nm, 25 seconds of exposure and 3 to 5 accumulations) did not show significant chemistry alterations on the latex exposure *in vitro* to 2g/L of Cerconil WP®. Results demonstrated that the oral exposure of pregnant rats to Cerconil WP®, during organogenesis, might affect on the embryo-fetal development and cause low toxicity to general maternal health. However, the molecular structure of latex exposed to the fungicide was not affect on the experimental study conditions.

Keywords: chlorothalonil, thiophanate methyl, teratology, reproduction, rat, Raman Spectroscopy.

LISTA DE SIGLAS

AIP – Adequado para a idade gestacional
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APABOR – Associação Paulista de Produtores e Beneficiadores de Borracha
CAPI – Comitê Assessor de Pesquisa Institucional
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
CL – Corpos lúteos
CO₂ – Dióxido de carbono
D – Diâmetro
d - Decídua
DAG – Distância anogenital
DF – Distrito Federal
DG – Dia gestacional
DL50 – Dose letal para 50% da população
e – Espongiotrofoblasto
EA – Exposta A
EB – Exposto B
EC – Exposto C
GIP – Grande para idade gestacional
H – Altura
IAC – Instituto Agrônômico de Campinas
IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA – Ingestão Diária Aceitável
IP – Índice placentário
KOH – Hidróxido de potássio
L - Labirinto
LMR – Limite Máximo de Resíduo
LOAEL – Menor dose em que se observa efeito adverso
LOEL – Menor dose em que se observa efeito
NOAEL – Maior dose em que não se observa efeito
PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PAIP – Adequação do peso para idade gestacional
PF – Peso fetal
PIP – Pequeno para idade gestacional
PP – Peso placentário
Rpm – Rotações por minuto
SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
Ts – Trofoblasto sincicial
UFPR – Universidade Federal do Paraná
USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
V – Volume

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Estrutura química da parte isoprênica da borracha natural	19
FIGURA 2 -	Estrutura química do tiofanato metílico	26
FIGURA 3 -	Estrutura química do clorotalonil	27
FIGURA 4 -	Diagrama de níveis de energia ilustrando a origem do espalhamentos Raman e Rayleigh	29
FIGURA 5 -	Protocolo de exposição	33
FIGURA 6 -	Análise esquelética e visceral dos fetos	37
FIGURA 7 -	Espectros de Espelhamento Raman das amostras de látex, Cerconil WP [®] e látex com Cerconil WP [®]	38
FIGURA 8 -	Fotomicrografias do fígado	44
FIGURA 9 -	Fotomicrografias do fígado - Tricrômico de Masson e PAS	45
FIGURA 10 -	Fotomicrografias do rim	46
FIGURA 11 -	Perda gestacional tardia do grupo EC	47
FIGURA 12 -	Fotomicrografias da placenta	51
FIGURA 13 -	Anomalias esqueléticas	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição do látex recém coletado	19
TABELA 2 - Atribuições das principais bandas de amostras de látex, Cerconil WP [®] e látex com Cerconil WP [®]	39
TABELA 3 - Consumo médio diário de água (mL) e ração (g) e evolução da massa corporal (g) das ratas do grupo controle e dos grupos expostos a 400 (EA), 800 (EB) e 1200mg/kg (EC) de Cerconil WP [®] durante o período gestacional	42
TABELA 4 - Peso dos órgãos maternos das ratas dos grupos controle e expostos a 400 (EA), 800 (EB) e 1200mg/kg (EC) de Cerconil WP [®]	43
TABELA 5 - Desempenho reprodutivo das ratas dos grupos controle e expostos a 400 (EA), 800 (EB) e 1200mg/kg (EC) de Cerconil WP [®]	48
TABELA 6 - Parâmetros fetais de ratos dos grupos controle e expostos a 400 (EA), 800 (EB) e 1200mg/kg (EC) de Cerconil WP [®]	50
TABELA 7 - Frequência de anomalias esqueléticas fetais de ratos dos grupos controle e expostos a 400 (EA), 800 (EB) e 1200mg/kg (EC) de Cerconil WP [®]	53
TABELA 8 - Pontos de ossificação em fetos de ratas dos grupos controle e expostos a 400 (EA), 800 (EB) e 1200mg/kg (EC) de Cerconil WP [®]	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Cultivo de seringueira no contexto nacional e regional	17
2.2	Borracha natural – Látex	18
2.3	Defensivos agrícolas: funções e impactos ambientais	21
2.4	Defensivos agrícolas: impactos causados à saúde	23
2.5	Defensivos agrícolas e alterações reprodutivas	25
2.6	Cerconil WP®	26
2.7	Técnicas de espectroscopia	27
2.7.1	Espectroscopia de Espalhamento Raman	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Fungicida de estudo	30
3.2	Análises químicas do látex de seringueira	30
3.3	Análise da toxicidade materna e dos efeitos teratogênicos em ratos	31
3.3.1	Animais e ambiente de experimentação	31
3.3.2	Obtenção de fêmeas prenhes	31
3.3.3	Exposição	32
3.3.4	Obtenção dos fetos e avaliação do desempenho reprodutivo	33
3.3.5	Histologia de órgãos maternos e placenta	34
3.3.6	Peso e classificação dos fetos	35
3.3.7	Peso das placentas e índice placentário	35
3.3.8	Análise das malformações externas	35
3.3.9	Análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas	36
3.3.10	Análise das anomalias e/ou malformações viscerais	36

3.4	Forma de análise dos resultado.....	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Análise química do látex de seringueira	38
4.2	Toxicidade materna	40
4.3	Análise do desempenho reprodutivo	47
4.4	Análises dos fetos e placentas	49
5	DISCUSSÃO	56
5.1	Análise química do látex de seringueira	56
5.2	Análise da toxicidade materna e dos efeitos teratogênicos em ratos	57
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	ANEXO - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO – CEUA.....	74

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A seringueira (*Hevea brasiliensis*), pertencente à família *Euphorbiaceae*, é uma espécie de grande importância por ser a principal fonte de borracha natural explorada no mundo. O Brasil responde por aproximadamente 1% da produção mundial de borracha natural, porém apesar dessa pequena contribuição, o setor tem grande importância no país. Isto pode ser confirmado pela presença de inúmeras indústrias de transformação, especialmente a pneumática, e por um consumo que ainda está longe de ser atendido pela produção nacional (INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP, 2007).

O déficit de borracha natural chega a quase 179 mil toneladas, justificando a necessidade de expansão da heveicultura nacional (INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP, 2007). A partir de 2003, os plantios de seringueira voltaram a crescer em São Paulo, motivados pelo “Plano de Expansão da Heveicultura Paulista” dirigido pela Associação Paulista de Produtores e Beneficiadores de Borracha (APABOR). A produção nacional está concentrada nos estados de São Paulo, Bahia, Mato Grosso, Espírito Santo, Minas Gerais e Goiás (RIPPEL; BRAGANÇA, 2009).

O plantio de seringueira, assim como o cultivo de outras espécies de plantas, pode ser atacado por diversas espécies de parasitas, gerando um prejuízo no rendimento e na produção de látex. Tal situação leva o agricultor a utilizar defensivos agrícolas, a fim de estabelecer um controle e garantir uma boa produção. Os defensivos agrícolas são desenvolvidos com o intuito de alterar a composição da fauna e flora, eliminando assim efeitos possivelmente nocivos que seres vivos podem causar às culturas. Com a elevada utilização têm ocorrido grandes impactos, pois esses produtos acabam sendo lixiviados, afetando as águas superficiais, os lençóis freáticos, além de afetar os organismos vivos de uma forma geral, podendo também influenciar na saúde do homem (BRASIL, 2002; CARSON, 2010).

O mercado brasileiro de defensivos agrícolas expandiu rapidamente na última década (190%), num ritmo de crescimento maior que o dobro do apresentado pelo mercado global (93%). Este crescimento coloca o Brasil em primeiro lugar no ranking mundial, desde 2008. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na safra 2010/2011, o consumo foi de 936 mil toneladas, movimentando

US\$ 8,5 bilhões entre dez empresas que controlam 75% deste mercado no país (ANVISA, 2013).

Os defensivos agrícolas podem ser classificados de diversas maneiras, uma delas é de acordo com o modo de ação do ingrediente ativo no organismo alvo, podendo ser: acaricidas (ação em ácaros), bactericidas (ação em bactérias), fungicidas (ação em fungos), inseticidas (ação em insetos), herbicidas (ação em plantas daninhas), algicidas (algas), rodenticidas (roedores), entre outros (BRASIL, 1997).

Outra forma de classificá-los é dada pela dose letal mediana (DL50), uma medida padrão de toxicidade aguda, onde são realizados testes com animais, por diferentes vias de exposição (via oral, dérmica ou respiratória). Os valores de DL50 podem variar, estipulando a dose/concentração letal para 50% da população exposta, ou seja, a dose requerida para matar 50% da população de animais em teste. Então, quanto menor o valor da DL50 maior será a toxicidade, apresentando maior risco ao ambiente e aos seres humanos (BAIRD, 2002).

Estes compostos constituem hoje um importante problema de saúde pública, tendo em vista a amplitude da população exposta durante a fabricação dos compostos (exposição ocupacional e da população do entorno das fábricas), na agricultura, no combate às endemias e em outros setores nas proximidades de áreas agrícolas. Além disso, a população de maneira geral, mesmo sem contato direto com estes setores, pode estar exposta por meio do ar, água e alimentos contaminados.

Entre 2007 e 2011, de acordo com os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), houve um crescimento de 67,4% de novos casos de acidentes de trabalho não fatais devido a defensivos agrícolas. Além disso, o coeficiente de intoxicações aumentou em 126,8%, crescimento este maior entre as mulheres (178%) (CENTRO COLABORADOR DE VIGILÂNCIA EM ACIDENTES DE TRABALHO, 2012). A problemática é ainda maior quando se trata de avaliar os efeitos crônicos dos agrotóxicos diante do progressivo aumento do consumo e intensificação do uso dessas substâncias no país (RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014).

Estudos relacionados a alterações em organismos vivos causadas por defensivos agrícolas são de extrema importância para a compreensão das interações que ocorrem entre essas substâncias químicas e os organismos vivos.

Esses estudos podem contribuir para que se avance na identificação dos mecanismos que levam a toxicidade e no desenvolvimento de tratamentos e medidas preventivas de intoxicações. Além disso, contribui na tomada de decisões do poder público na criação de leis e políticas públicas que visem o bem estar da população exposta aos defensivos agrícolas (SILVA; ANTUNES; FAVARETO, 2014).

Entre a variedade de defensivos agrícolas disponíveis no mercado, encontram-se o tiofanato metílico e o clorotalonil. Esses compostos fazem parte da formulação do composto Cerconil WP[®], um fungicida amplamente utilizado nos seringais para eliminação e prevenção da Antracnose, uma doença causada por fungos e conhecida popularmente como “mal das folhas” (IHARA, 2008).

O clorotalonil apresenta sinais clínicos de intoxicação inespecíficos e tem um efeito catártico, o qual, aparentemente, é devido à irritação do trato gastrointestinal. Já o tiofanato metílico apresenta sinais e sintomas de intoxicação em animais de experimentação, incluindo tremores, convulsões tônico-crônicas, diminuição do ritmo respiratório, letargia e midríase. A inalação e manipulação excessiva podem produzir irritação do trato respiratório, pele e mucosas (IHARA, 2008).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA), em roedores, o clorotalonil pode causar alteração do desenvolvimento embrionário, apenas em doses em que também há toxicidade materna, o que não é observado em coelhos (USEPA, 1999). Também tem sido relatado que o tiofanato metílico pode levar a retardo do desenvolvimento intrauterino e toxicidade materna (USEPA, 2005).

Os efeitos nocivos do uso de defensivos agrícolas para a saúde humana têm sido objeto de diversos estudos que apontam a possibilidade de ocorrência de anomalias congênitas, de câncer, doenças mentais e disfunções na reprodução e fertilidade humana. No entanto, estudos sobre os efeitos da associação do clorotalonil e tiofanato metílico (Cerconil WP[®]) sobre a saúde humana e animal, especialmente sobre a reprodução e o desenvolvimento, são escassos. Também não foram encontrados estudos sobre os possíveis impactos da associação destes fungicidas sobre a estrutura química do látex de seringueira, que podem afetar a produção e qualidade da borracha, ocasionando uma série de prejuízos econômicos.

Devido à problemática envolvida, o presente trabalho teve como objetivo identificar os potenciais efeitos teratogênicos da exposição ao fungicida Cerconil WP[®] (formulação comercial composta por tiofanato metílico e clorotalonil) em diferentes doses, utilizando o rato como modelo experimental. Além disso, o estudo também pretendeu identificar os efeitos deste composto sobre a estrutura química do látex de seringueira por meio da técnica de espectroscopia vibracional de espalhamento Raman.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cultivo de seringueira no contexto nacional e regional

A seringueira pertence ao gênero *Hevea* (família das euforbiáceas), com 11 espécies, das quais, *Hevea brasiliensis* é a mais produtiva e plantada comercialmente, com superior qualidade de látex. O gênero *Hevea* é originário da região amazônica, sendo que as áreas de plantio comercial são amplamente distribuídas em todo o mundo. É uma árvore de hábito ereto, podendo atingir, sob condições favoráveis, 30 metros de altura. Iniciando a produção das sementes aos 4 anos, e entre 6 e 7 anos (quando propagada por enxertia) a produção de látex (borracha). Esta pode se prolongar até 35 anos, com aproveitamento de madeira para processamento mecânico e energia (galhos), ao final deste período. A seringueira desenvolve-se bem em solos de textura leve, profundos e bem drenados, ligeiramente ácidos (pH 4,5-5,5), em altitudes até 600 m (IAPAR, 2007).

A seringueira tem-se tornado uma das poucas opções de cultivo permanente para sustentação do desenvolvimento de várias regiões do Estado de São Paulo. Foi por volta de 1941 que o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) interessou-se em pesquisar a cultura, em razão dos resultados de adaptabilidade observados (CUNHA, 1957). O Brasil foi o maior produtor e exportador mundial de borracha natural até a década de 1950, quando passou para a condição de importador, produzindo 30% da borracha que consome, sendo as regiões do Oeste Paulista e litorânea as mais adequadas para o cultivo desta planta (MARTINS et al., 2005; MORENO et al., 2006).

As sementes de seringueira apresentam grande variabilidade vegetativa e produtiva, sendo usadas somente para a formação de porta-enxertos em viveiros, e não para plantios a campo. Assim, a propagação preferencial é por enxertia, utilizando-se clones vigorosos. O material para plantio consiste de tocos enxertados e parafinados (com indução de raízes), transplantados em sacos plásticos. Ao apresentarem 1 a 2 "verticilos" foliares maduras, as mudas são levadas ao campo. O manejo do plantio inclui a desbrota de ramos ladrões do porta enxerto e poda das ramificações laterais da haste do enxerto até a altura desejada de formação de copa (IAPAR, 2007).

2.2 Borracha natural – Látex

O látex de borracha natural, ao ser extraído, possui coloração branca e consistência viscosa, sendo composto basicamente de partículas de poli-isopreno, compostos não borrachosos em menor quantidade, substâncias orgânicas e sais minerais, dispersos em água (CORNISH; WOOD; WINDLE, 1999). Outros constituintes presentes no látex e relatados em estudos fitoquímicos são: polissacarídeos, flavanóides, lipídeos, fosfolipídios e proteínas, ficou comprovado também a existência de alcanos, cetonas triterpênicas, triterpenóides, açúcares e ácidos graxos (UZABAKILIHU; LARGEAU; CASADEVALL, 1987).

A borracha natural é obtida através da coagulação do látex de árvores do gênero *Hevea brasiliensis*, originária da região setentrional da América do Sul. Esta é uma árvore com cerca de 10 a 15 metros de altura, com tronco retilíneo e diâmetro aproximado de 30 centímetros. As plantações de seringueiras apresentam uma densidade de, aproximadamente, 450 árvores por hectare e começam a produzir após 7 a 8 anos de plantio (BRASIL, 1993).

O látex de borracha natural extraído da *Hevea brasiliensis* é um sistema complexo de partículas coloidais polidispersas suspensas em um soro (SETHURAJ, 1992). Dois tipos de partículas predominam: as de borracha e os lutóides. Destacam-se ainda os complexos de Frey-Wyssling e o soro C, que contém proteínas aniônicas e sais minerais que conferem estabilidade coloidal ao sistema (SOUTHORN; YIP, 1968; SETHURAJ, 1992). A composição média do látex recém coletado é apresentada na Tabela 1.

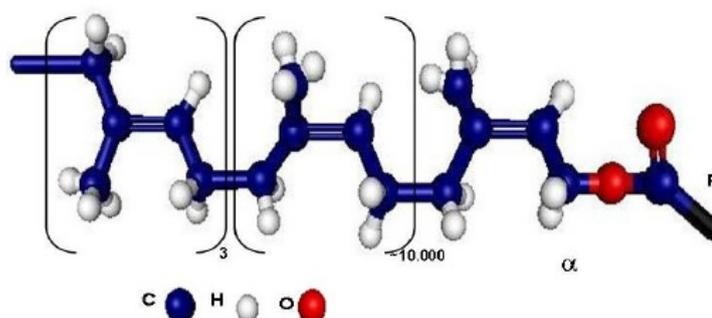
As partículas de borracha natural são moléculas de isopreno (Figura 1) que estão circundadas por uma monocamada composta por uma mistura complexa de proteínas, lipídios e longas cadeias de ácidos graxos, o que confere carga negativa a partícula. Estas partículas podem apresentar dimensões que variam de 5 a 3000 nm (RIPPEL; GALEMBECK, 2009). A membrana proteica atua como um antioxidante natural e em pH aproximadamente 10, o sistema coloidal é estável, negativamente carregado e disperso na fração aquosa do látex (soro). Por ser vulnerável a degradação e coagulação por processos químicos e bioquímicos em um curto intervalo de tempo, o látex é geralmente estabilizado pela adição de agentes químicos (BITTENCOURT et al., 1998).

TABELA 1- Composição do látex recém coletado

Composto	% em massa no látex
Borracha	25 - 45
Proteína	1 - 1,8
Carboidratos	1 - 2
Lipídeos neutros	0,4 - 1,1
Lipídeos polares	0,5 - 0,6
Inorgânicos	0,4 - 0,6
Aminoácidos, aminas, etc.	0,4 - 0,6
Água	49 - 71

Fonte: RIPPEL, 2005

FIGURA 1 – Estrutura química da parte isoprênica da borracha natural



Fonte: RIPPEL, 2005.

Os lutóides formam o segundo componente principal do látex de *Hevea brasiliensis*. Eles são constituídos de proteínas (solúveis e insolúveis), fosfolipídios e sais minerais (D'AUZAC; JACOB; CHRESTIN, 1989; BLACKLEY, 1997), ligados ou circundados por membranas e são, em média, maiores do que as partículas de borracha. Eles têm de 2000 a 5000 nm de diâmetro, ligados por uma membrana de cerca de 8 nm de espessura também com carga negativa.

Os constituintes dos lutóides são chamados de soro B e contém diversos elementos, como cálcio, magnésio, potássio e cobre, além do carbono e hidrogênio provenientes do isopreno e proteínas catiônicas (SCHOON; VAN DE BIE, 1955; RIPPEL; LEITE; GALEMBECK, 2000). Tais elementos tem ação floculante sobre as partículas de borracha no látex, auxiliando no processo de coagulação

(RIPPEL, 2005). O soro B do látex natural tem densidade de $1,020 \text{ g/cm}^3$ e contém diferentes espécies químicas como carboidratos, eletrólitos, proteínas e aminoácidos. A principal implicação dos carboidratos no látex é que estes são oxidados microbiologicamente a ácidos voláteis (fórmico, acético e propiônico) se o látex não é adequadamente preservado. A presença do carboidrato é considerada uma medida da qualidade do látex (BLACKLEY, 1997).

O soro C do látex contém, além de proteínas, bases nitrogenadas como colina, aminoácidos, ânions inorgânicos (fosfatos e carbonatos), sais minerais encontrados no soro B e outros de rubídio, manganês, sódio, potássio, cobre, magnésio, ferro e zinco (ARIYOSHI et al., 1997; FIORAVANTI, 2009). Estes elementos são absorvidos do solo, transportados na seiva e participam de reações que envolvem a biossíntese do látex (PIERRE; JEAN-LUC, 2003).

Sabe-se que o látex de seringueira apresenta algumas propriedades únicas, superiores a qualquer outro polímero, e até mesmo ao seu análogo sintético. A boa elasticidade, combinada com a baixa histerese mecânica, faz da borracha natural um material importante na produção de pneus, elementos de suspensão e para-choques (BIKALES; MARK; GAYLORD, 1973). É utilizada também na fabricação de produtos leves com alta resistência como balões, luvas cirúrgicas e preservativos (DALL'ANTONIA et al., 2006).

A utilização de borracha natural destaca-se, também, em inovações tecnológicas, como argamassas para construção civil, indústria aeronáutica e naval, tubos para usos em hospitais e centros cirúrgicos, compósitos condutores e materiais de alta precisão como válvulas e retentores. Existem inúmeras patentes registradas a respeito de artefatos de borracha natural, sendo várias dessas patentes de propriedades de empresas líderes mundiais (RIPPEL, 2005).

A borracha natural é uma importante matéria-prima agrícola renovável essencial para a manufatura de um amplo espectro de produtos em todos os ramos da atividade humana. Considerado um produto estratégico, é ao lado do aço e do petróleo (matérias-primas não renováveis), um dos alicerces que sustentam o progresso da humanidade (IAPAR, 2007). No Brasil, o Estado de São Paulo é a área de produção de látex mais importante e é responsável por 55% da produção de borracha brasileira, totalizando aproximadamente 75.000 toneladas de borracha por ano (IAC, 2011).

O látex usado neste trabalho foi colhido de árvores da seringueira *Hevea brasiliensis*, clone RRIM 600, o mais plantado na região do Planalto do Estado de São Paulo, por apresentar bom desempenho e vigor na produção. É um clone secundário desenvolvido pelo *Rubber Research Institute of Malaysia* – RRIM. Apresenta árvores altas, com caule vertical e de rápido crescimento quando jovem. A alta produção é seu ponto de destaque, sendo um dos que apresenta maior produtividade de borracha seca (IAC, 2011).

2.3 Defensivos agrícolas: funções e impactos ambientais

Os defensivos agrícolas são biocidas usados na agricultura com vistas a eliminar alguma forma de vida, são compostos aplicados para exterminar as pragas, plantas concorrentes e doenças das plantas. Esses produtos se constituem em um dos maiores poluentes químicos lançados em nosso planeta. São utilizados também em setores diversos, como no controle de pragas que atingem os jardins, de vetores implicados nas endemias zoonóticas regionais, no ambiente intradomiciliar para eliminar insetos, no controle de populações de ratos na região urbana, na erradicação de vegetação ao longo de ferrovias e rodovias e no setor pecuário (GRISÓLIA, 2005).

No Brasil, estas substâncias são referidas como praguicidas, defensivos agrícolas e mais recentemente de agrotóxicos. Esta última nomenclatura somente foi adotada após a sanção da Lei Federal nº. 7.802, de 11 de julho de 1989, atualmente regulamentada pelo Decreto 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que torna claro o caráter danoso destas substâncias capazes de destruir vida animal e vegetal.

Os primeiros defensivos agrícolas a serem utilizados no mundo foram os organoclorados no ano de 1872, que foi descoberto pelo alemão Ottmar Zeidler, e foi inicialmente representado pela substância diclordifenil-tricloroetano. A utilização de defensivos agrícolas na agricultura teve início na década de 1920, tendo sua aplicação se expandido por ocasião da 2ª Guerra Mundial, quando foram utilizados como arma química. O uso dessas substâncias se tornou mais amplo a partir desse período. No Brasil, foram inicialmente utilizados nos programas de saúde pública, com vistas ao controle de vetores (ROQUETO, 2012).

Os defensivos agrícolas foram introduzidos na agricultura com o intuito de promover a modernização e elevar o grau de produtividade do setor. Havia

interesses econômicos, por parte dos grandes proprietários, em promover o abastecimento de alimentos às cidades e indústrias. Desde o século XVI a adubação com esterco animal e com outros meios de origem orgânica tornava-se a cada dia mais inviável, pois existia uma intencionalidade em fornecer matéria-prima em grande quantidade para o setor industrial e para o mercado (ROQUETO, 2012).

O processo produtivo agrícola brasileiro está cada vez mais dependente dos defensivos agrícolas e fertilizantes químicos. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Defensivos agrícolas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), divulgados durante o 2º Seminário sobre Mercado de Defensivos agrícolas e Regulação, realizado em Brasília (DF), em abril de 2012, enquanto, nos últimos dez anos, o mercado mundial de defensivos agrícolas cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190%. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de defensivos agrícolas (ANVISA; UFPR, 2012).

Na safra, que envolve o segundo semestre de 2010 e o primeiro semestre de 2011, o mercado nacional de venda de defensivos agrícolas movimentou 936 mil toneladas de produtos, sendo 833 mil toneladas produzidas no País, e 246 mil toneladas importadas (ANVISA; UFPR, 2012). Em 2010, o mercado nacional movimentou cerca de US\$ 7,3 bilhões e representou 19% do mercado global de defensivos agrícolas. Em 2011, houve um aumento de 16,3% das vendas, alcançando US\$ 8,5 bilhões, sendo que as lavouras de soja, milho, algodão e cana-de-açúcar representam 80% do total das vendas do setor (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL, 2012).

De acordo com um estudo realizado pela ANVISA e UFPR (2012), existe uma concentração do mercado de defensivos agrícolas em determinadas categorias de produtos. Os herbicidas, por exemplo, representaram 45% do total de defensivos agrícolas comercializados. Os fungicidas respondem por 14% do mercado nacional, os inseticidas 12% e as demais categorias de defensivos agrícolas 29%.

Na safra de 2011 foram plantados no Brasil, 71 milhões de hectares de lavoura temporária (soja, milho, cana, algodão) e permanente (café, cítricos, frutas, eucaliptos), correspondendo a cerca de 853 milhões de litros de defensivos agrícolas pulverizados nessas lavouras, principalmente de herbicidas, fungicidas e inseticidas. Estes dados representam média de uso de 12 litros/hectare e exposição

média ambiental/ocupacional/alimentar de 4,5 litros de defensivos agrícolas por habitante (IBGE, 2012).

O uso incorreto de produtos químicos em áreas agrícolas representa grande ameaça ao meio ambiente. A natureza orgânica das moléculas de muitos produtos permite sua degradação, sendo necessário estudar os destinos e as consequências do transporte destas moléculas e seus resíduos (MATTOS; SILVA, 1999). Do ponto de vista ambiental, a crescente utilização de insumos químicos poderá acarretar consequências catastróficas, entre elas a contaminação de água potável, que é uma grande preocupação mundial. Parte dessa preocupação se deve ao fato de a maior parte dos biocidas produzidos acabarem atingindo a água, seja por deriva durante a aplicação, resíduos de embalagens vazias, lavagem de equipamentos, ou, até mesmo, efluentes de indústrias de biocidas (ROMERO et al., 2004).

2.4 Defensivos agrícolas: impactos causados à saúde

Além da contaminação ao meio ambiente, outra polêmica relacionada aos defensivos agrícolas é o dano causado a saúde. As estimativas da incidência de problemas de saúde humana relacionados com a utilização de defensivos agrícolas é muito variável. Os danos para o organismo humano começaram a ser noticiados a partir dos anos sessenta, com relatos de casos de intoxicação por organoclorados entre trabalhadores rurais. Esta classe passou a ser proibida pela legislação de vários países. Estima-se que entre 500 mil e 2,9 milhões de pessoas no mundo são intoxicadas anualmente, com uma taxa de fatalidade de 1%, aproximadamente (JEYEARATNAM, 1985). A maioria dos casos de doenças relacionadas a defensivos agrícolas envolve o uso de organoclorados e organofosforados que possuem atividade neurotóxica (US CONGRESS OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT, 1990; ARAÚJO, 2000).

A ampla utilização de defensivos agrícolas, o desconhecimento dos riscos associados a sua utilização, o consequente desrespeito às normas básicas de segurança, a livre comercialização, a grande pressão comercial por parte das empresas distribuidoras e produtoras e os problemas sociais encontrados no meio rural constituem importantes causas que levam ao agravamento dos quadros de contaminação humana e ambiental observados no Brasil. A esses fatores podem ser

acrescentados a deficiência da assistência técnica ao homem do campo, a dificuldade de fiscalização do cumprimento das leis e a culpabilização dos trabalhadores como contribuintes para a consolidação do impacto sobre a saúde humana, decorrente da utilização de defensivos agrícolas, como um dos maiores problemas de saúde pública no meio rural, principalmente nos países em desenvolvimento (PIMENTEL, 1996; PERES, 1999; OLIVEIRA-SILVA; MEYER; MOREIRA, 2000).

Os resultados do Programa de Análise de Resíduos de Defensivos agrícolas em Alimentos (PARA) da ANVISA (2013) mostram que 36% das amostras coletadas em todo o Brasil em 2011 e 29% das amostras de 2012 apresentaram resultados insatisfatórios. As irregularidades consistem em quantidades de defensivos agrícolas acima do Limite Máximo de Resíduo (LMR) permitido e outra quando a amostra apresenta resíduos de defensivos agrícolas não autorizados para o alimento pesquisado. Das amostras insatisfatórias, cerca de 30% se referem a defensivos agrícolas que estão sendo revisados pela ANVISA.

Além da contaminação direta do alimento, há outras fontes de contaminação que são expressivas no país, como por exemplo, o cultivo da cana-de-açúcar. Segundo um levantamento realizado por Armas et al (2007) na região da sub-bacia do Rio Corumbataí (integrante da bacia do Rio Piracicaba), no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2003, 85% do volume total de glifosato, atrazina, ametrina, 2,4-D, metribuzim, diuron e acetocloro consumidos foram destinados a cana-de-açúcar. Outro estudo realizado entre 2004 e 2005 na mesma sub-bacia detectaram, em amostras de água os herbicidas hexazinona, glifosato, clomazona e do grupo das triazinas (ametrina, atrazina e simazina), sendo a cultura de maior expressão a de cana-de-açúcar. Os níveis de detecção mais elevados foram das triazinas: ametrina 0,7-2,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$, atrazina 0,6-2,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e simazina 0,3-0,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$. (ARMAS et al., 2005).

Outra possível fonte de contaminação importante no Estado de São Paulo é a produção de seringueira, a principal fonte de borracha natural do mundo. Lima (1996) apresenta em um estudo de controle químico de plantas invasoras de seringais que os principais defensivos agrícolas utilizados são o diuron, glifosato, 2-4-D e metalocloro. Outros defensivos agrícolas entram nessa lista: benomyl, carbendazim, malathion e endosulfan (MELO et al., 2008). Outras substâncias químicas dentre as variedades de defensivos agrícolas encontrados no mercado de

defensivos agrícolas, encontram-se o tiofanato metílico e o clorotalonil. Esses compostos fazem parte da formulação do composto Cerconil WP[®], um fungicida amplamente utilizado nos seringais para eliminação e prevenção da Antracnose e material de estudo do presente trabalho.

2.5 Defensivos agrícolas e alterações reprodutivas

Dentre os possíveis efeitos adversos causados à saúde humana e animal, destacam-se as alterações reprodutivas e do desenvolvimento embriofetal, muitas vezes, associadas à desregulação endócrina causada por defensivos agrícolas. A exposição intrauterina a estes compostos pode causar restrição de crescimento e o aumento da incidência de malformações fetais (MATSUMOTO et al., 2010; WICKERHAN et al., 2012). Já no sistema reprodutor masculino, alterações como diminuição de espermatozoides e aumento de espermatozoides danificados (apresentando dano do DNA) são exemplos que podem ocorrer em animais expostos a esses compostos (BAIRD, 2002; DALLEGRAVE, E. et al. 2007; GHISELLI; JARDIM, 2007; SPIRO; STIGLIANI, 2008; AKCHA; SPAGNOL; ROUXEL, 2012; FEYZI-DEHKHARAGNI et al., 2012).

Estudos de exposição *in utero*, durante o período da organogênese, aos praguicidas Glifosato-Roundup (DALLEGRAVE; LANGELOH, 2003), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (AMARANTE JUNIOR et al. 2002) e trifetil hidróxido de estanho (SARPA et al., 2007) demonstraram o aparecimento de anormalidades esqueléticas e atraso de desenvolvimento ósseo em fetos de rato e camundongo.

Também tem sido demonstrado que o herbicida Linuron pode levar ao aumento de perdas pós-implantação e morte pós-natal, além de baixo peso corpóreo ao nascimento em ratos. Já em coelhos, este praguicida pode levar a um aumento de abortos, com consequente redução do número de fetos por ninhada, e incidência significativa de fetos com malformações ósseas do crânio (USEPA, 1995). O Linuron também pode reduzir a produção de testosterona fetal o que leva a malformações de tecidos andrógeno-dependentes (WILSON et al., 2009), além de decréscimo da distância anogenital, aumento de retenção de mamas e indução de malformações do epidídimo, juntamente com a distrofia testicular (MCINTYRE et al., 2000).

Khera et al. (1979) administraram dose de 500 mg/kg de Diuron (80% de pureza) dissolvido em óleo, em ratas prenhes do 6^o ao 15^o dia de gestação e

observaram diminuição do peso materno e dos fetos. No mesmo experimento, doses de 250 e 500 mg/kg aumentaram a incidência de fetos com malformações.

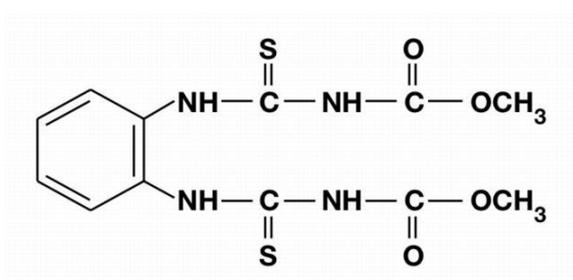
A exposição gestacional à atrazina pode causar alterações de desenvolvimento devido à possibilidade de transferência placentária. Dentre as possíveis alterações fetais destacam-se: a redução da dopamina fetal (LI et al., 2014) e implicações pós-natal como aumento da incidência de morte pós-natal (FRAITES et al., 2011) e atraso da instalação da puberdade (ROSEMBERG et al., 2007; DAVIS et al., 2011).

2.6 Cerconil WP®

Cerconil WP® é um defensivo agrícola do grupo dos fungicidas, composto por 200 g/kg de tiofanato metílico, 500 g/kg de clorotalonil e 300 g/kg de ingredientes inertes. Se apresenta em forma de pó molhável e possui classe toxicológica I, sendo extremamente tóxico. Sua classificação do potencial de periculosidade ambiental é classe II, muito perigoso ao meio ambiente (IHARA, 2008).

O tiofanato metílico (Figura 2) é um fungicida sistêmico utilizado em uma variedade de plantações. Essa substância degrada rapidamente em solo de texturas, sendo a taxa de conversão quatro vezes mais rápida em solo com pH 7,4 do que em solo com pH 5,6. 90% da substância é degradado em um período de 6 a 18 semanas em solos de várias texturas (ROQUETO, 2012). Os principais sintomas de intoxicação aguda pelo tiofanato metílico incluem tremores e 1 a 2 horas após a exposição a doses elevadas que levam a convulsões tônico-clônicas (ROQUETO, 2012).

FIGURA 2 – Estrutura química do tiofanato metílico

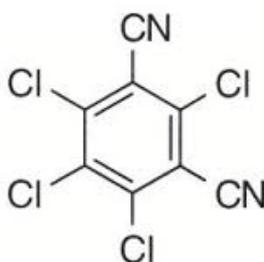


Fonte: ANVISA, 2005.

O clorotalonil (Figura 3) é um fungicida não sistêmico, de largo espectro, que vem sendo intensivamente utilizado em todo o mundo há mais de 30 anos. No Brasil, é indicado para diversas culturas olerícolas, frutíferas e ornamentais, além de alguns tipos de grãos, como o feijão e a soja (COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 1993). Segundo Cox (1997), este fungicida é o segundo mais utilizado nos Estados Unidos, com cerca de 5 milhões de kg aplicados anualmente. Ele também figura entre os mais utilizados no Brasil, com um volume de vendas anual de 1,6 milhão de kg, o que representa um mercado de 1,6 milhões de dólares. Seu principal mecanismo de ação envolve reações com grupos sulfidrilos e glutionas presentes em proteínas e cofatores de fungos (ROBERTS et al., 1999).

O clorotalonil é um representante do grupo químico dos organoclorados. Geralmente, as moléculas pertencentes a esse grupo apresentam alta persistência e elevada toxidez, sobretudo para os mamíferos (MONTGOMERY, 1997), sendo consideradas como poluentes em potencial ao ambiente. Entretanto, é considerado pouco persistente no ambiente, apresentando valores de meia vida de dissipação que variam de 5 a 36 dias, reflexo da rápida transformação microbiológica e da elevada formação de resíduos ligados, resultante da alta taxa de sorção dessa molécula (REGITANO et al., 2001).

FIGURA 3 – Estrutura química do clorotalonil



Fonte: ANVISA, 2009.

2.7 Técnicas de espectroscopia

As medidas baseadas na luz ou outras formas de radiação eletromagnética são amplamente empregadas em química analítica. As interações da radiação com a matéria são o objeto de estudo da ciência da espectroscopia. Os

métodos espectroscópicos de análise são baseados na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou pelas espécies atômicas de interesse (SKOOG; WEST; HOLLER, 2006).

A classificação dos métodos espectroscópicos é baseada na região do espectro eletromagnético envolvida na medida. As regiões espectrais que têm sido empregadas incluem os raios γ , os raios X, ultravioleta (UV), visível, infravermelha (IV), microondas e radiofrequência (RF). De fato, o uso corrente estende mais ainda o significado da espectroscopia de forma a incluir técnicas que nem mesmo envolvem o uso de radiação eletromagnética, como a espectroscopia acústica, de massas e de elétrons (SKOOG; WEST; HOLLER, 2006).

A espectroscopia tem desempenhado um papel fundamental no desenvolvimento da teoria atômica moderna. Além disso, os métodos espectroquímicos têm provido talvez as ferramentas mais amplamente empregadas para a elucidação de estruturas moleculares, bem como na determinação qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos e inorgânicos (SKOOG et al., 2010). No presente trabalho a técnica utilizada foi a Espectroscopia de Espalhamento Raman para avaliação das possíveis alterações químicas causadas ao látex de seringueira.

2.7.1 Espectroscopia de Espalhamento Raman

Na Espectroscopia de Espalhamento Raman a radiação incidente, geralmente no visível, é espalhada pela molécula com uma energia ligeiramente diferente da energia da radiação incidente, de forma que a diferença de energia entre a radiação incidente e a radiação espalhada está na região do infravermelho do espectro. Na espectroscopia IR os modos vibracionais são permitidos desde que haja uma variação do momento de dipolo induzido na molécula pela radiação incidente, enquanto que no espalhamento Raman deve haver uma variação da polarizabilidade induzida na molécula pela radiação incidente (SALA, 1996).

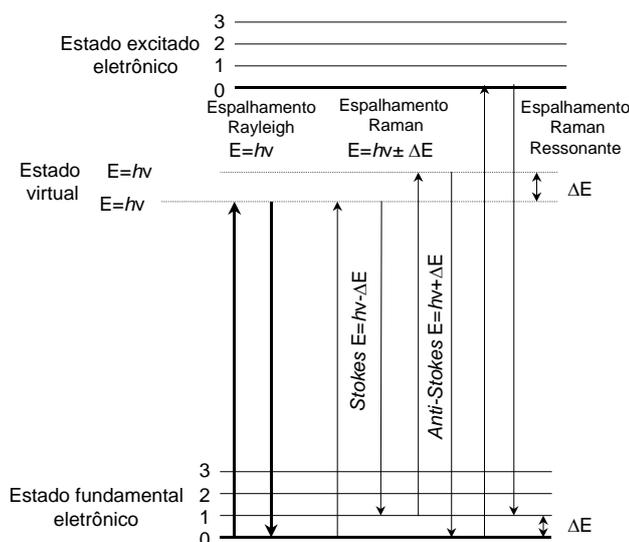
Ainda no caso Raman, outra abordagem é que a incidência da radiação eletromagnética produz uma perturbação dependente do tempo, a qual se manifesta por um estado virtual de energia. Quando os estados estacionários final e inicial são os mesmos, diz-se que o efeito da perturbação é o espalhamento Rayleigh, para o qual as frequências das radiações incidente e espalhada são as mesmas. Quando a frequência da radiação espalhada é maior que a da radiação incidente, tem-se o

espalhamento Raman anti-Stokes como resultado da transição da molécula para um estado vibracional de menor energia. No caso contrário, ou seja, quando a frequência da radiação espalhada é menor que a da radiação incidente, tem-se o espalhamento Raman Stokes (LASERNA, 1996).

O espalhamento Raman Stokes é mais intenso que o Raman anti-Stokes a temperatura ambiente, pois sua probabilidade de ocorrer é maior, uma vez que ele se dá para as moléculas situadas no estado fundamental de energia. No caso Raman anti-Stokes, o espalhamento ocorre para moléculas situadas em um estado vibracional excitado, cuja população é menor que no estado vibracional fundamental a temperatura ambiente, daí sua probabilidade de ocorrer ser menor (LASERNA, 1996).

A Figura 4 mostra esquematicamente um diagrama de energia envolvendo os espalhamentos Raman (Stokes e anti-Stokes) e Rayleigh. Quando a energia da radiação incidente coincide com uma transição eletrônica da molécula que espalha a luz tem-se o espalhamento Raman ressonante (RRS), o qual aumenta fortemente a probabilidade de uma transição que resultará em um espalhamento Raman (aumenta a seção de choque do espalhamento Raman em um fator em torno de 10^6) (LASERNA, 1996).

Figura 4 – Diagrama de níveis de energia ilustrando a origem dos espalhamentos Raman e Rayleigh



Fonte: LASERNA, 1996.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fungicida de estudo

Para conhecimento das principais substâncias utilizadas para melhoria de produtividade do látex de seringueira e escolha dos compostos a serem estudados, foi realizado um levantamento documental *in loco* junto às cooperativas e produtores de seringueira na região do Pontal do Paranapanema e da Alta Paulista. Desta forma, foram identificados e escolhidos os compostos a serem estudados.

Assim foram utilizados durante o estudo o tiofanato metílico [*Dimetyl-4-4'-(o-phenylene) bis (3-thioallophanate)*] e o clorotalonil (*Tetrachloroisophthalonitrile*), na formulação comercial Cerconil WP[®].

Para caracterização dos fungicidas de estudo, foi realizado levantamento bibliográfico sobre composição química, toxicologia e impactos ambientais e à saúde humana e animal.

3.2 Análises químicas do látex de seringueira

A amostra de látex de seringueira, pertencente ao clone RRIM 600, foi coletada no Sítio Irmãos Brioschi, localizado no município de Tupi Paulista – SP. O látex foi estabilizado com hidróxido de amônio 15% no ato da coleta e armazenado sob refrigeração.

A preparação dos filmes foi realizada nos laboratórios de Química do campus II da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE. As análises de Espalhamento Raman foram realizadas no Laboratório de Filmes Finos e Espectroscopia Raman da UNESP, campus Presidente Prudente, sob a supervisão e colaboração do Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino.

Para a realização das medidas de Espectroscopia de Espalhamento Raman foram preparados filmes de látex e látex com Cerconil WP[®]. Para a obtenção do filme contendo látex puro, o material foi depositado em placa de petri e levado a capela para coagular naturalmente. O filme contendo látex e Cerconil WP[®] (2g/L – dose utilizada na agricultura) foi preparado com auxílio de agitador magnético para homogeneização a 100 rpm. Após homogeneizada, a mistura foi depositada em placa de petri e levada a capela para coagulação.

A fim de observar a presença do Cerconil WP® no látex ou possíveis alterações químicas causadas pela interação com os defensivos agrícolas foram realizadas medidas de Espalhamento Raman. Foram coletados os espectros, e partir deles fez-se uma comparação do espectro dos filmes de látex puro, do Cerconil WP® e do látex com Cerconil WP®,

Os espectros de Raman foram obtidos com um espectrógrafo Renishaw Modelo in-Via equipado com um microscópio Leica. Os espectros foram coletados usando uma câmara de CCD Peltier (-70°C), espectrógrafo equipado com grade de 1800g/mm, resolução de 4 cm⁻¹ e uma lente de 50x para focar o laser em uma região de 1µm². Na aquisição e análise de dados utilizou-se o programa WIRE para Windows GRAMS/AT Versão 9.2 da Galactic Industries.

3.3 Análise da toxicidade materna e dos efeitos teratogênicos em ratos

3.3.1 Animais e ambiente de experimentação

Para este estudo, utilizou-se 10 ratos machos e 32 fêmeas, ambos adultos, da linhagem Wistar e provenientes do Biotério Central da UNOESTE, Presidente Prudente. Durante o período experimental, os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Campus II da UNOESTE, em gaiolas de polipropileno, sob condições controladas de luminosidade (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura (média de 25°), e receberam água e ração comercial para roedores à vontade.

Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNOESTE e somente foi iniciado após a aprovação nesta instância e pelo CAPI (Comitê Assessor de Pesquisa Institucional) da UNOESTE, protocolo nº 2242 (Anexo I).

3.3.2. Obtenção de fêmeas prenhes

No final da tarde, um pouco antes das luzes do biotério se apagarem, 2 fêmeas foram colocadas na caixa de cada macho, que estavam em gaiolas

individuais. Na manhã seguinte, foram coletados esfregaços vaginais, com o auxílio de hastes flexíveis com extremidade de algodão, embebidas em solução fisiológica, e depositados em lâmina histológica limpa e identificada. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz, sendo a presença de cabeças de espermatozoides e da fase de estro (presença principalmente de células corneificadas e ausência de células nucleadas ou de leucócitos) indicativos de acasalamento. Em caso positivo, este dia foi considerado como o dia zero de prenhez (dia gestacional zero = DG0).

Durante a prenhez, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais, sendo monitoradas quanto às condições gerais de saúde. Para tanto, as ratas foram pesadas a cada 4 dias e tiveram o seu consumo diário de ração e água estimados (em gramas e mL, respectivamente). Além disso, foram observados sinais clínicos indicativos de toxicidade, tais como, piloereção, alteração no padrão de deambulação no interior da gaiola, ocorrência de diarreia e perdas sanguíneas vaginais de acordo com Christian (2001). Após todos os acasalamentos, realizou-se a eutanásia dos ratos machos.

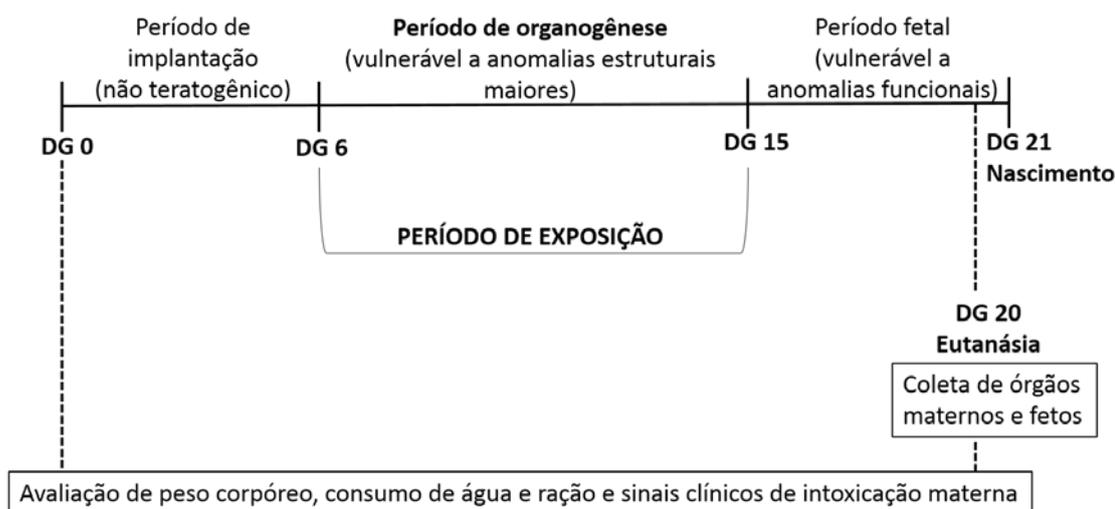
3.3.3 Exposição

Foi utilizado o fungicida com a formulação comercial Cerconil WP[®], contendo 200g/kg de tiofanato metílico e 500g/kg de clorotalonil. O composto apresenta classe toxicológica I e se apresenta em forma de pó molhável. As ratas prenhes (8 por grupo) foram alocadas aleatoriamente em quatro grupos experimentais:

- Controle: exposto a solução salina 0,9%;
- Grupo exposto A - EA: exposto a 200 mg/kg/dia de clorotalonil e 80 mg/kg/dia de tiofanato metílico, correspondendo a 400mg/kg/dia de Cerconil WP[®];
- Grupo exposto B - EB: exposto a 400 mg/kg/dia de clorotalonil e 160 mg/kg/dia de tiofanato metílico, correspondendo a 800mg/kg/dia de Cerconil WP[®];
- Grupo exposto C - EC: exposto a 600 mg/kg/dia de clorotalonil e 240 mg/kg/dia de tiofanato metílico, correspondendo a 1200mg/kg/dia de Cerconil WP[®];

A escolha das doses da substância foi baseada em estudos toxicológicos anteriores referentes ao clorotalonil (CASTRO; CHIORATO; PINTO, 1999) e tiofanato metílico (AMARA et al., 2014), considerando as toxicidades de DL50 oral para ratos (> 5000 mg/kg) e LOEL de 400 mg/kg/dia, para toxicidade materna e do desenvolvimento embriofetal, para o clorotalonil (MIZENS et al., 1983; USEPA, 1999). As ratas dos grupos tratados receberam Cerconil WP® diluído em suspensão aquosa uma vez por dia, via oral (gavagem), em um volume de 0,25mL/100g de peso corpóreo do DG6 ao DG15 (período da organogênese). As ratas do grupo controle receberam solução salina 0,9% no mesmo protocolo de administração dos grupos expostos (Figura 5).

FIGURA 5 – Protocolo de exposição



Fonte: Próprio autor.

3.3.4 Obtenção dos fetos e avaliação do desempenho reprodutivo

Para a avaliação das alterações estruturais e perdas gestacionais, os fetos foram obtidos por laparotomia. As laparotomias foram realizadas no DG 20, após a eutanásia das mães em câmara de CO₂. Durante a laparotomia, as vísceras das mães foram analisadas para possível detecção de anormalidades macroscópicas. O fígado, baço, coração e rins foram coletados e pesados. O fígado, rim e placenta foram fixados para posterior avaliação de possíveis alterações histológicas. Os cornos uterinos foram expostos para observação dos nódulos de

reabsorção e fetos, e inspeção dos ovários, sendo registrados: número de corpos lúteos (CL), indicativos do número de ovulações); número de sítios de implantação; presença de reabsorções (precoces ou tardias); número de fetos e sua localização no útero; peso do útero com fetos; peso de cada feto e respectiva placenta.

Com esses valores foram calculados os seguintes parâmetros relativos à fertilidade:

- Potencial de fertilidade (eficiência de implantação): sítios de implantação/corpos lúteos x 100;
- Taxa de Perdas Pré-Implantação = $\frac{N^{\circ} \text{ de CL} - N^{\circ} \text{ de implantações}}{N^{\circ} \text{ de CL}} \times 100$;
- Taxa de Perdas Pós-Implantação = $\frac{N^{\circ} \text{ de implantações} - N^{\circ} \text{ de fetos}}{N^{\circ} \text{ de implantações}} \times 100$;
- Taxa de Masculinidade ou Feminilidade = $\frac{N^{\circ} \text{ de fetos machos ou fêmeas}}{N^{\circ} \text{ total de fetos}} \times 100$;
- Razão sexual = $\frac{N^{\circ} \text{ de fetos machos}}{N^{\circ} \text{ de fetos fêmeas}} \times 100$.

3.3.5 Histologia de órgãos maternos e placenta

Um fragmento do lobo hepático medial, o rim esquerdo e as duas primeiras placentas do corno uterino esquerdo de cada rata foram fixados em formalina tamponada (formaldeído em PBS 10%) por 24 horas. Após este período, os órgãos foram seccionados transversalmente e retornaram à solução fixadora por mais 24 horas. Após a fixação, os tecidos foram lavados em água corrente e armazenados em álcool 70%, até o momento do processamento histológico. Um fragmento de cada órgão coletado foi submetido ao processamento histológico de rotina, que consistiu na inclusão do material em Paraplast e obtenção de cortes com espessura de 5µm. Foram obtidos cortes para a confecção de três lâminas de cada rata, sendo um deles corado com hematoxilina e eosina (HE) e os outros submetidos à coloração histoquímica Tricrômico de Masson e PSA (Ácido Periódico de Schiff). A avaliação histopatológica foi realizada em microscópio de luz (LEICA DM750). As fotomicrografias foram feitas no mesmo microscópio, com câmara acoplada (ICC50HD), a partir do software Leica LAS V4.2.

3.3.6 Peso e classificação dos fetos

Os fetos foram pesados em balança analítica. Os pesos corpóreos dos fetos foram classificados de acordo com Soulimane-Mokhtari et al. (2005) em:

AIP – recém-nascidos de peso adequado para idade gestacional: peso corpóreo compreendido entre a média de peso do grupo controle mais ou menos 1,7 x desvio-padrão do grupo controle;

PIP – recém-nascidos pequenos para idade gestacional: peso corpóreo inferior à média de peso do grupo controle menos 1,7 x desvio-padrão;

GIP – recém-nascidos grandes para a idade gestacional: peso corpóreo superior à média de peso do grupo controle mais 1,7 x desvio-padrão.

Além da análise do peso fetal, também foi realizada a medida do comprimento crânio-caudal médio dos fetos e da distância ânus-genital (DAG - distância entre o ânus e o tubérculo genital), para identificação do sexo. Ambas as medidas foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital. Para evitar os efeitos das diferenças de peso corpóreo entre os fetos na medida da DAG, foi realizada uma normalização direta, dividindo-se a DAG pela raiz cúbica do peso corpóreo, conforme descrito por Gallavan et al. (1999). Os resultados foram apresentados em valores absolutos e ajustados ao peso corpóreo.

3.3.7 Peso, índice e volume placentário

As placentas, livres de membrana e cordão umbilical foram pesadas em balança analítica. O índice placentário (IP) foi determinado pela relação entre o peso placentário (PP) e o peso fetal (PF) (CALDERON, 1988). Determinou-se o volume da placenta, admitindo-se que a placenta é uma fatia de um cilindro, com a seguinte fórmula: $V = \pi/4 \times D \times h$, onde V = volume, D = diâmetro, determinado pela média aritmética do maior e menor diâmetros da placenta, e H = altura, que representa a espessura da placenta (DEL NERO et al., 2002).

3.3.8 Análise das malformações externas

Após a pesagem, os fetos foram examinados externamente, com análise minuciosa dos olhos, boca, implantação das orelhas, conformação craniana,

membros torácicos e pélvicos, integridade da parede abdominal, perfuração anal e cauda (WILSON, 1965).

3.3.9 Análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas

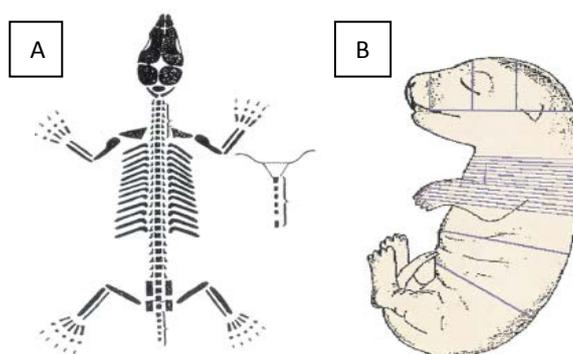
Para análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas utilizou-se o método de Staples e Schnell (1964). Metade dos fetos de cada ninhada foram colocados em álcool 70% e, após 1 semana, eviscerados, diafanizados com solução de hidróxido de potássio (KOH 1%) e corados com Alizarina. Os pontos de ossificação foram observados e contados na ninhada processada para a análise das malformações esqueléticas, segundo método proposto por Aliverti et al. (1979) (Figura 6).

Avaliou-se os pontos de ossificação nos seguintes locais: esternóbrios, falanges proximais e distais, metacarpos, metatarsos e vértebras caudais. Para cada região analisada, contou-se o número de pontos de ossificação em cada ninhada e esse valor foi dividido pelo número de fetos da ninhada, para obtermos uma média dos pontos de ossificação por ninhada. Posteriormente, todas as médias das ninhadas foram somadas para obtermos um total dessa quantidade em média dos pontos de ossificação.

3.3.10 Análise das anomalias e/ou malformações viscerais

A outra metade dos fetos de cada ninhada foi colocada em solução de Bodian para posterior preparação e análise de cortes seriados como descrito por Wilson (1965) (Figura 6) e análise em estereomicroscópio. Foram avaliados olhos, palato, cérebro e ouvido, tórax, abdômen (diafragma) e aparelho geniturinário.

FIGURA 6 – Análise esquelética e visceral dos fetos



A: Pontos de ossificação considerados para análise esquelética dos fetos. B: Desenho mostrando os planos de corte a serem usados na análise visceral dos fetos.

Fonte: DAMASCENO et al., 2008.

3.4 Forma de análise dos resultados

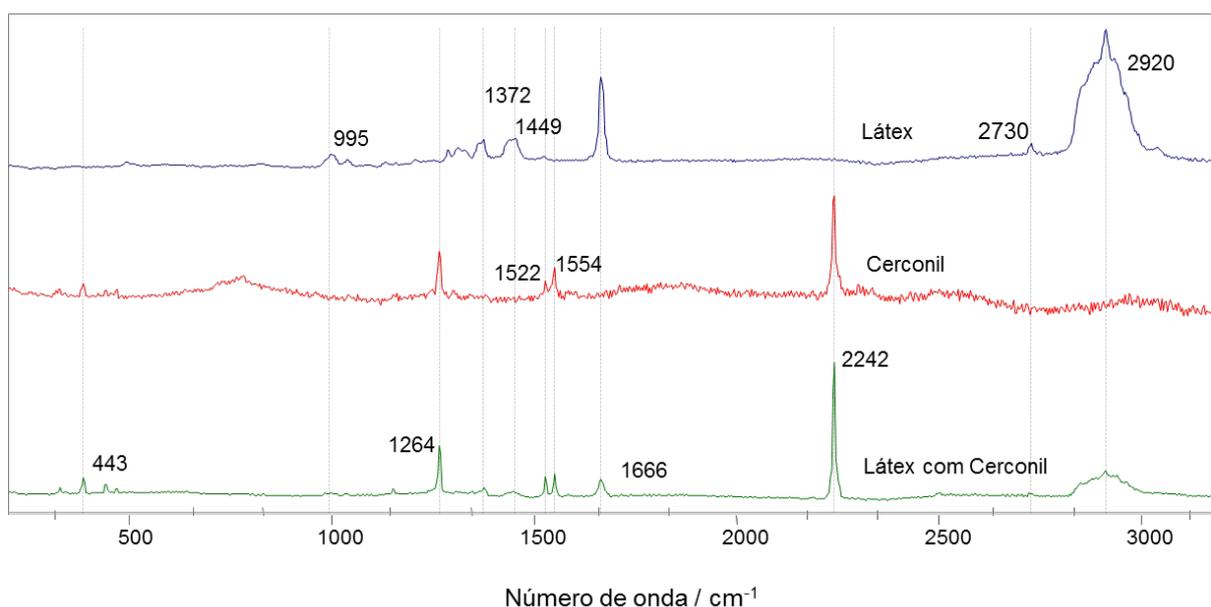
Para comparação dos resultados foram utilizados os testes estatísticos de Kruskal-Wallis, com o teste “a posteriori” de Dunn, e o teste exato de Fisher, dependendo das características de cada variável. Foi considerado como nível de significância estatística o limite de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram feitas utilizando o *software* estatístico InStat 5.0 da GraphPad Software.

4 RESULTADOS

4.1 Análise química do látex de seringueira

A Figura 7 apresenta os espectros de Espalhamento Raman das amostras de látex, Cerconil WP[®] e látex com Cerconil WP[®] obtidos na região de 3000 a 400 cm^{-1} com linha de laser de 514,5 nm, 25 segundos de exposição, 3 a 5 acumulações. A Tabela 2 mostra as atribuições das principais bandas das 3 amostras.

FIGURA 7 – Espectros de Espelhamento Raman das amostras de látex, Cerconil WP[®] e látex com Cerconil WP[®]



Fonte: Próprio autor.

TABELA 2. Atribuições das principais bandas de amostras de látex, Cerconil WP[®] e látex com Cerconil WP[®]

Amostra	Número de onda observado/cm ⁻¹	Centro calculado/cm ⁻¹ *	Intensidade relativa	Largura/cm ⁻¹	Atribuição
Látex	2920	2911,174	100	114,787	¹ CH ₂ estiramento
	2730	2728,180	6,677	7,900	² CH estiramento
	1666	1666,643	64,628	15,200	³ C=C estiramento
	1522	-	-	-	⁴ C=C estiramento
	1449	1446,003	16,358	31,788	³ CH ₂ deformação assimétrica
	1372	1368,465	13,411	26,361	³ CH ₃ deformação
Cerconil	995	913,942	10,934	354,339	² =CH
	2242	2242,816	100	12,067	⁴ C≡N estiramento
	1554	1549,205	20,575	28,970	⁵ N-H deformação
	1522	-	-	-	⁴ C=C estiramento
	1264	1266,601	41,780	15,345	⁶ C=O
Látex com Cerconil	443	478,704	4,789	96,640	⁷ C=C deformação
	2920	2899,425	31,893	113,932	¹ CH ₂ estiramento
	2730	2503,872	2,610	24,586	² CH estiramento
	2242	2242,896	100	8,034	⁴ C≡N estiramento
	1666	1666,339	34,492	13,148	³ C=C estiramento
	1554	1551,832	24,975	6,308	⁵ N-H deformação
	1522	1528,603	19,153	4,800	⁴ C=C estiramento
	1264	1266,583	36,300	6,957	⁶ C=O
443	442,003	2,879	6,792	⁷ C=C deformação	

¹CASIRAGHI; FERRARI; ROBERTSON, 2005. ²NALLASAMY; MOHAN, 2004. ³HAIDER et al., 2012. ⁴MINČEVA-SUKAROVA et al., 2012. ⁵LEE; MACHIDA, 1980. ⁶KIEFER; LONG, 1982. ⁷CHAABANE; HLEL; GUIDARA, 2008. *Referente a aplicação do tratamento Curvefit do programa GRAMS/AT Versão 9.2.

4.2 Toxicidade materna

Todas as ratas adultas foram acasaladas com machos, também adultos, e ficaram prenhes. Sinais clínicos de toxicidade do Cerconil WP[®] foram observados nos grupos EB e EC. Uma rata do grupo EB apresentou piloereção, enquanto outra apresentou alteração no padrão de deambulação no interior da gaiola. No grupo EC uma rata apresentou perda sanguínea vaginal. Tais sinais de toxicidade foram observados apenas durante o tratamento. O grupo controle não apresentou nenhum sinal clínico de toxicidade.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na evolução do peso corpóreo e na porcentagem de ganho de peso durante o período gestacional (Tabela 3) das ratas prenhes dos diferentes grupos experimentais. A única exceção ocorreu no DG 12, quando foi observada uma diminuição ($p < 0,05$) no peso das ratas dos grupos expostos, quando comparados ao grupo controle. No entanto, esta alteração de peso corpóreo não foi observada a partir do DG16.

A média do consumo diário de água e ração foi semelhante ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais. Apesar de uma diminuição de 22,57% e 24,40% no consumo dos grupos EB e EC, respectivamente, em relação ao grupo controle, esta não foi estatisticamente significativa ($p = 0,06$) (Tabela 3).

O peso do fígado materno foi reduzido ($p < 0,05$) nas ratas do grupo EC em relação ao grupo controle (Tabela 4). No entanto, o peso dos demais órgãos maternos avaliados (rins, coração, pulmão e baço) não foi afetado pela exposição ao fungicida.

A análise histopatológica do tecido hepático das ratas apresentou áreas com necrose focal, infiltrado inflamatório (Figura 8F e 8G) e presença de hepatócitos com núcleo picnótico (cromatina condensada, altamente eosinofílico), sugestivos de apoptose nos grupos EB e EC (Figura 8H e 8I). Além disso, foi observada área com formação de degeneração gordurosa microvesicular de moderada intensidade, nestes grupos experimentais (Figura 8D e 8E). A análise histoquímica pelo Tricrômico de Masson indicou reação positiva de mesma intensidade ao redor dos espaços porta entre os grupos experimentais (Figura 9A e 9B). No entanto, nos grupos de exposição ao fungicida foram observadas áreas de deposição de colágeno entre hepatócitos (Figura 9C). Foram observadas amplas áreas PAS positivas (hepatócitos com citoplasma com grânulos de carboidrato

corados em púrpura-magenta e núcleo contracorado em azul) em meio a áreas PAS negativas, nos grupos expostos às duas maiores doses do fungicida (Figura 9E e 9F), diferentemente do grupo controle, que apresentou marcação de menor intensidade ou marcação negativa (Figura 9D).

A região cortical e medular dos rins apresentou morfologia normal e semelhante entre os quatro grupos experimentais. A análise histoquímica dos rins pelo Tricrômico de Masson e PAS indicou reação positiva de mesma intensidade entre os grupos experimentais (Figura 10).

TABELA 3. Consumo médio diário de água (mL) e ração (g) e evolução da massa corporal (g) das ratas do grupo controle e dos grupos expostos a 400 (EA), 800 (EB) e 1200mg/kg (EC) de Cerconil WP® durante o período gestacional

Parâmetro	Controle	EA	EB	EC	P
¹ Peso Corpóreo (g)					
Dia gestacional 0	196,41 ± 9,26a	191,25 ± 10,91a	175,81 ± 37,08a	189,75 ± 22,06a	0,55
Dia gestacional 4	208,49 ± 8,84a	198,15 ± 10,24a	208,07 ± 20,70a	204,76 ± 23,47a	0,36
Dia gestacional 8	218,99 ± 13,64a	203,83 ± 5,91a	202,3 ± 22,80a	199,82 ± 21,96a	0,20
Dia gestacional 12	235,11 ± 11,57a	203,23 ± 15,78b	209,51 ± 32,25b	205,59 ± 21,29b	0,02
Dia gestacional 16	252,50 ± 14,70a	230,67 ± 25,76a	220,18 ± 39,01a	210,99 ± 36,61a	0,11
Dia gestacional 20	300,46 ± 22,64a	273,37 ± 26,96a	250,94 ± 52,08a	233,48 ± 59,83a	0,06
² Ganho de peso (%)	54,80 (50,16 – 57,22)	44,69 (39,33 – 50,19)	31,31 (11,61 – 80,37)	22,90 (2,88 – 44,69)	0,21
¹ Consumo de água (mL)					
Dia gestacional 4	31,09 ± 4,98a	31,21 ± 6,82a	31,07 ± 5,61a	29,38 ± 7,44a	0,38
Dia gestacional 8	35,62 ± 6,78a	32,71 ± 9,50a	29,28 ± 5,30a	28,60 ± 9,44a	0,22
Dia gestacional 12	43,59 ± 18,39a	30,42 ± 7,89a	38,03 ± 5,77a	32,50 ± 8,07a	0,11
Dia gestacional 16	43,59 ± 4,84a	40,54 ± 7,43a	33,75 ± 9,74a	32,97 ± 10,52a	0,06
Dia gestacional 20	54,69 ± 22,62a	40,83 ± 3,03a	35,18 ± 11,47a	36,56 ± 11,31a	0,16
¹ Consumo de ração (g)					
Dia gestacional 4	16,76 ± 5,15a	19,45 ± 5,10a	16,44 ± 5,73a	18,18 ± 2,46a	0,09
Dia gestacional 8	19,75 ± 2,82a	19,60 ± 6,02a	17,28 ± 6,09a	15,88 ± 4,08a	0,22
Dia gestacional 12	21,67 ± 1,43a	15,65 ± 4,26a	16,83 ± 7,01a	17,35 ± 6,78a	0,18
Dia gestacional 16	22,86 ± 2,24a	21,01 ± 3,86a	17,87 ± 6,76a	17,08 ± 8,42a	0,38
Dia gestacional 20	24,32 ± 1,35a	22,70 ± 4,98a	22,46 ± 4,58a	20,10 ± 7,48a	0,75

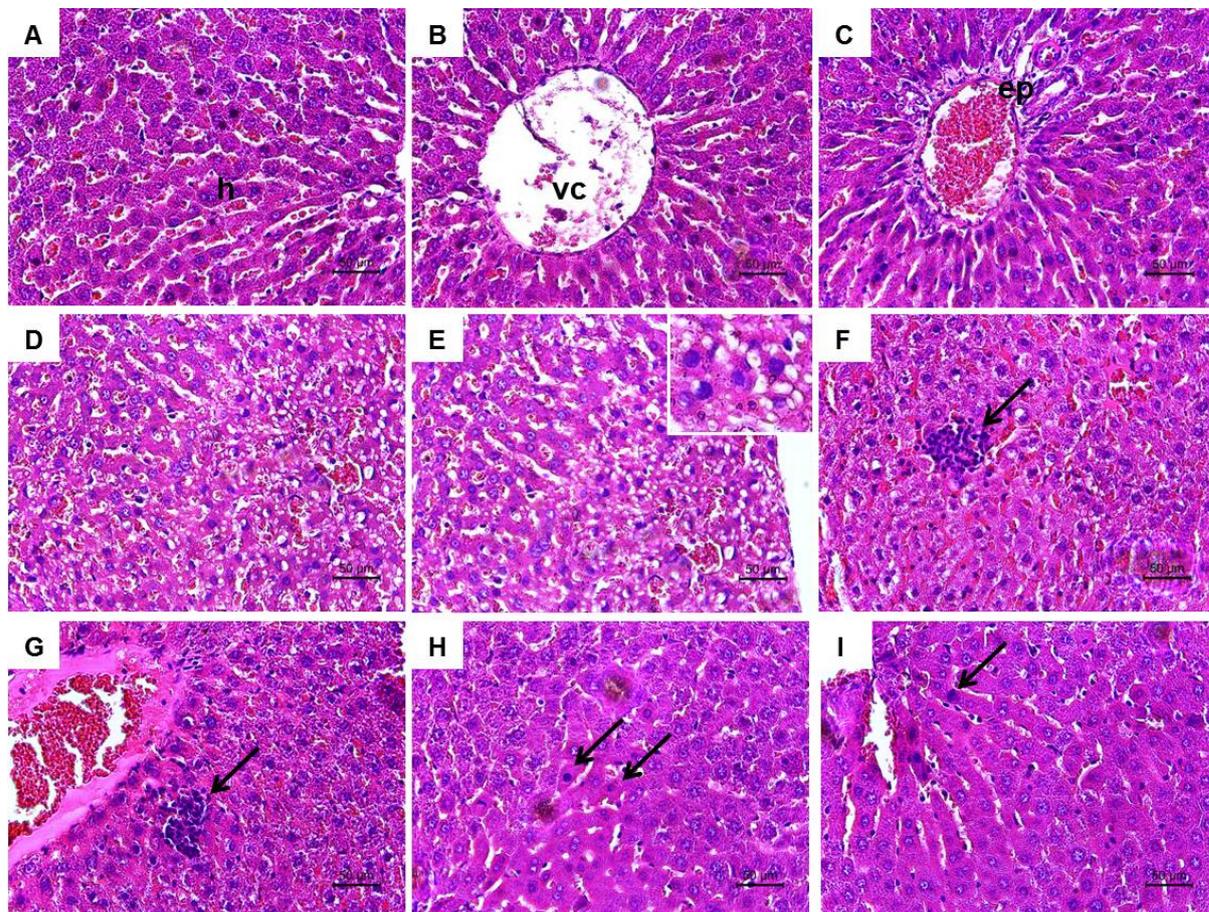
¹Valores expressos como média ± DP. ²Valores expressos como mediana (1º quartil-3º quartil). Teste Kruskal-Wallis, com teste “a posteriori” de Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (p<0,05).

TABELA 4. Peso dos órgãos maternos das ratas dos grupos controle e expostos a 400 (EA), 800 (EB) e 1200mg/kg (EC) de Cerconil WP®

Parâmetro	Controle	EA	EB	EC	P
Fígado (g)	14,48 ± 1,11a	12,38 ± 0,91ac	12,57 ± 2,80ac	11,54 ± 2,65bc	0,04
Rim (direito) (mg)	996,25 ± 102,81a	863,33 ± 80,91a	931,43 ± 100,40a	942,50 ± 77,04a	0,16
Rim (esquerdo) (mg)	945,00 ± 79,64a	851,67 ± 86,12a	928,57 ± 108,54a	937,50 ± 89,08a	0,30
Coração (mg)	805,00 ± 105,02a	748,33 ± 43,55a	817,14 ± 54,07a	770,00 ± 204,73a	0,25
Pulmão (g)	1,54 ± 0,17a	1,55 ± 0,13a	1,70 ± 0,34a	1,66 ± 0,35a	0,88
Baço (mg)	581,25 ± 63,79a	540,00 ± 82,95a	505,71 ± 81,82a	515,00 ± 155,47a	0,43

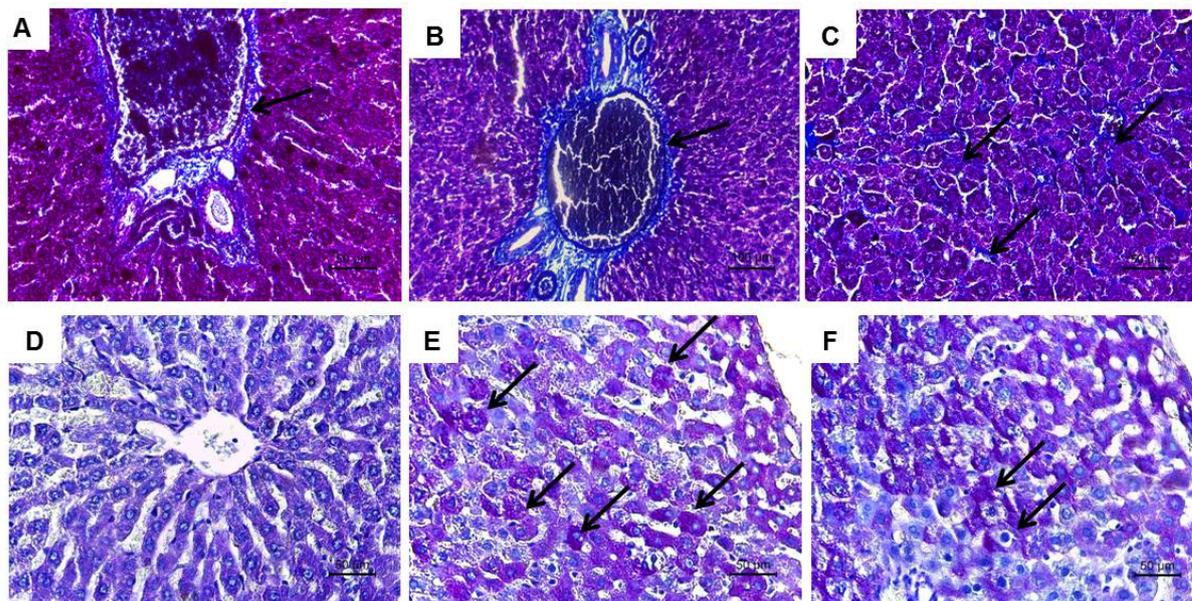
Valores expressos como média ± DP. Teste Kruskal-Wallis, com teste "a posteriori" de Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

FIGURA 8 - Fotomicrografias do fígado



A, B e C - Fígado normal de ratas do grupo controle. D e E - Fígado de rata do grupo exposto a 800 mg/kg/dia de Cerconil WP[®] com formação de degeneração gordurosa microvesicular de moderada intensidade. F e G - Fígado de rata do grupo exposto a 1200 mg/kg/dia de Cerconil WP[®] com foco de infiltrado inflamatório (seta) e hepatócitos com núcleo picnótico. H e I - Fígado de rata do grupo exposto a 800 mg/kg/dia de Cerconil WP[®] com hepatócitos com núcleo picnótico (seta). h – hepatócitos, vc – veia centrolobular, ep - espaço porta. Hematoxilina – eosina (HE).
 Fonte: Próprio autor.

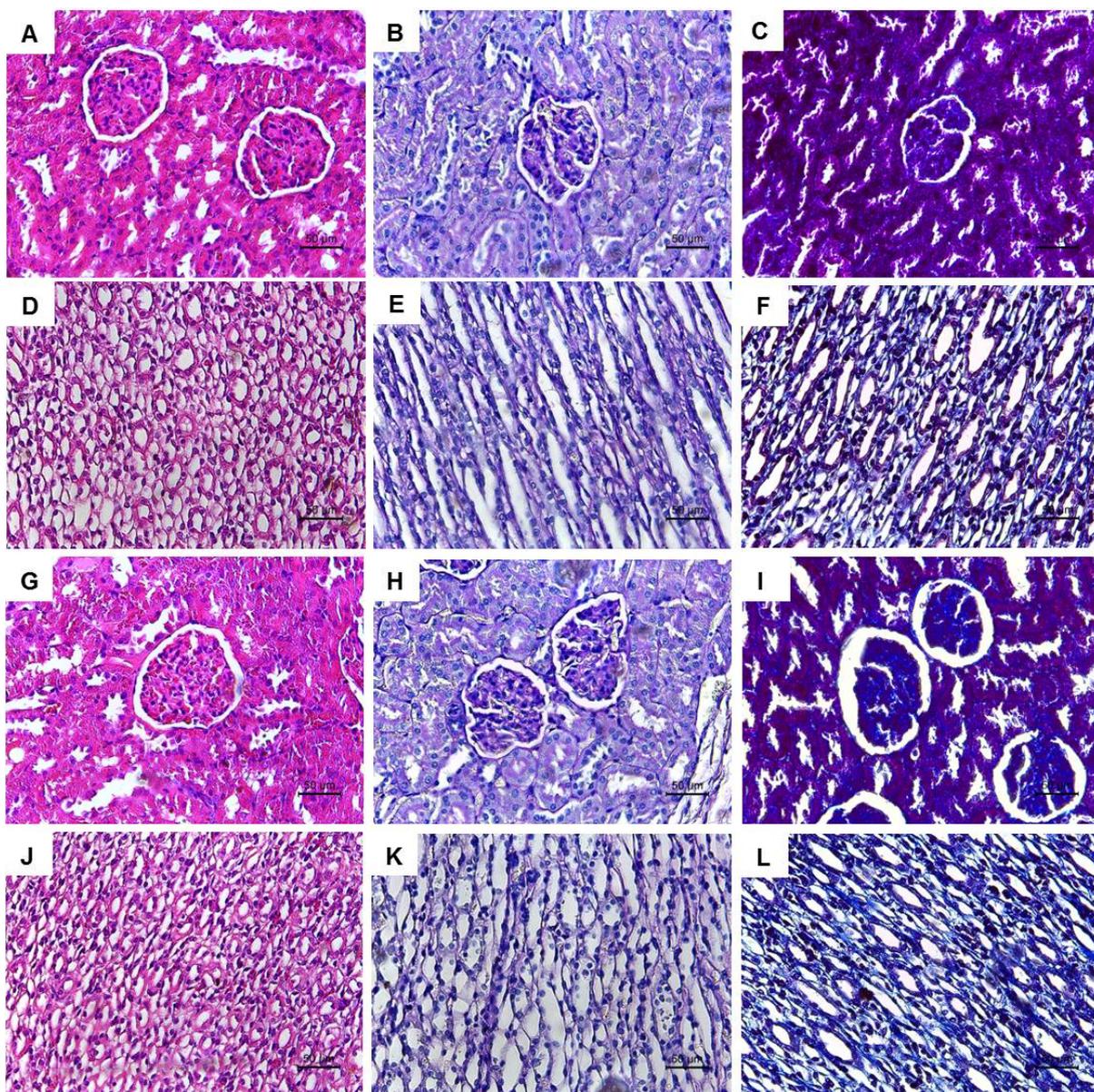
FIGURA 9 - Fotomicrografias do fígado - Tricrômico de Masson e PAS



A - Fígado de rata do grupo controle, mostrando espaço porta e deposição de colágeno circundante (seta). B - Fígado de rata do grupo exposto a 1200 mg/kg/dia de Cerconil WP[®], mostrando espaço porta e deposição de colágeno circundante (seta). C - Fígado de rata do grupo exposto a 800 mg/kg/dia de Cerconil WP[®] com aumento de fibras colágenas entre hepatócitos (setas). Tricrômico de Masson. D - Fígado de rata do grupo controle com marcação PAS negativa. E e F - Fígado de rata do grupo exposto a 800 mg/kg/dia de Cerconil WP[®], mostrando área de marcação PAS positiva (hepatócitos com citoplasma com grânulos de glicogênio corados em púrpura-magenta e núcleo contracorado em azul - setas). PAS.

Fonte: Próprio autor.

FIGURA 10 - Fotomicrografias do rim



A, B e C - Rim de rata do grupo controle, mostrando região cortical. D, E e F - Rim de rata do controle, mostrando região medular. G, H e I - Rim de rata do grupo exposto a 800 mg/kg/dia de Cerconil WP[®], mostrando região cortical. J, K e L - Rim de rata do grupo exposto a 800 mg/kg/dia de Cerconil WP[®], mostrando região medular. A, D, G, J – HE. B, E, H, K - PAS. C, F, I, L - Tricrômico de Masson.

Fonte: Próprio autor.

4.3. Análise do desempenho reprodutivo

Peso do útero com fetos, número de corpos lúteos, implantes, reabsorções, taxas de perda pré e pós-implantação, potencial de fertilidade e o número de fetos vivos foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais (Tabela 5). A taxa de perda pós-implantação não foi afetada pela exposição a diferentes doses do fungicida. No entanto, notou-se que algumas ratas do grupo EB e apenas uma rata do grupo EC (Figura 11) apresentaram um grande número de perdas gestacionais tardias (pós-implantação).

FIGURA 11 – Perda gestacional tardia do grupo EC



A – Feto normal com sua respectiva placenta. B e C – Produtos de gestação de rata do grupo EC. B – Perdas gestacionais tardias (perda pós-implantação), representada pelos pontos de reabsorção. C – Perdas gestacionais tardias com presença de placenta e feto dismórfico e pontos de reabsorção.

Fonte: Próprio autor.

TABELA 5. Desempenho reprodutivo das ratas dos grupos controle e expostos a 400 (EA), 800 (EB) e 1200mg/kg (EC) de Cerconil WP®

Parâmetro	Controle	EA	EB	EC	P
¹ Peso do útero com fetos (g)	63,41 ± 9,33a	63,62 ± 10,36a	51,31 ± 12,92a	47,54 ± 25,37a	0,28
¹ Número de corpos-lúteos (direito)	6,86 ± 2,41a	7,17 ± 1,72a	5,6 ± 1,34a	8,00 ± 2,34a	0,31
¹ Número de corpos-lúteos (esquerdo)	7,14 ± 2,27a	7,50 ± 1,52a	7,60 ± 2,19a	6,40 ± 2,30a	0,75
¹Número de corpos-lúteos (total)	14,00 ± 1,63a	14,67 ± 2,42a	13,2 ± 1,64a	14,4 ± 2,61a	0,72
¹ Número de implantes (direito)	5,57 ± 1,99a	6,67 ± 1,86a	5,40 ± 1,14a	6,00 ± 1,22a	0,56
¹ Número de implantes (esquerdo)	6,43 ± 1,62a	6,67 ± 1,51a	6,40 ± 2,30a	5,00 ± 1,00a	0,30
¹Número de implantes (total)	12,00 ± 1,53a	13,33 ± 1,21a	11,80 ± 1,48a	11,00 ± 1,87a	0,13
¹ Número de reabsorções (direito)	0,00 ± 0,00a	0,33 ± 0,52a	0,60 ± 0,55a	0,06 ± 1,34a	0,18
¹ Número de reabsorções (esquerdo)	0,14 ± 0,38a	0,17 ± 0,41a	1,00 ± 1,73a	1,00 ± 2,23a	0,71
¹Número de reabsorções (total)	0,14 ± 0,38a	0,50 ± 0,84a	1,60 ± 1,51a	1,60 ± 3,58a	0,13
¹ Número de fetos vivos (direito)	5,57 ± 1,99a	6,33 ± 1,51a	4,8 ± 0,84a	5,40 ± 1,82a	0,44
¹ Número de fetos vivos (esquerdo)	6,28 ± 1,80a	6,50 ± 1,76a	5,40 ± 1,34a	4,00 ± 2,45a	0,20
¹Número de fetos vivos (total)	11,86 ± 1,68a	12,83 ± 1,17a	10,20 ± 0,84a	9,40 ± 4,04a	0,48
² Potencial de fertilidade (%)	92,31 (85,12 – 92,82)a	93,09 (92,44 – 93,33)a	93,33 (91,67 – 100,00)a	68,75 (66,67 – 92,86)a	0,49
² Perda pré-implantação (%)	7,69 (7,18 – 14,88)a	6,90 (6,67 – 7,55)a	6,67 (0,00 – 8,33)a	31,25 (7,14 – 33,33)a	0,49
² Perda pós-implantação (%)	0,00 (0,00 – 0,00)a	0,00 (0,00 – 6,25)a	10,00 (8,33 – 16,67)a	0,00 (0,00 – 0,00)a	0,12

¹Valores expressos como média ± DP. ²Valores expressos como mediana (1º quartil-3º quartil). Teste Kruskal-Wallis, com teste “a posteriori” de Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (p<0,05).

4.4 Análises dos fetos e placentas

A média do peso corporal dos fetos foi semelhante ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais. No entanto, a porcentagem de fetos com tamanho adequado para a idade de gestação (AIP) diminuiu ($p < 0,05$) nos grupos EA e EB, em relação aos grupos controle e EC. Consequentemente, a porcentagem de fetos pequenos para a idade de gestação (PIP) aumentou ($p < 0,05$) no grupo EA em relação aos demais grupos experimentais, e no grupo EB em relação ao controle. A porcentagem de fetos grandes para a idade gestacional (GIP) foi semelhante entre os quatro grupos experimentais (Tabela 6).

Não ocorreu diferença estatística significativa no comprimento crânio-caudal médio, razão sexual e taxas de masculinidade e feminilidade e nas distâncias ânus-genital absoluta e relativa entre os grupos experimentais (Tabela 6).

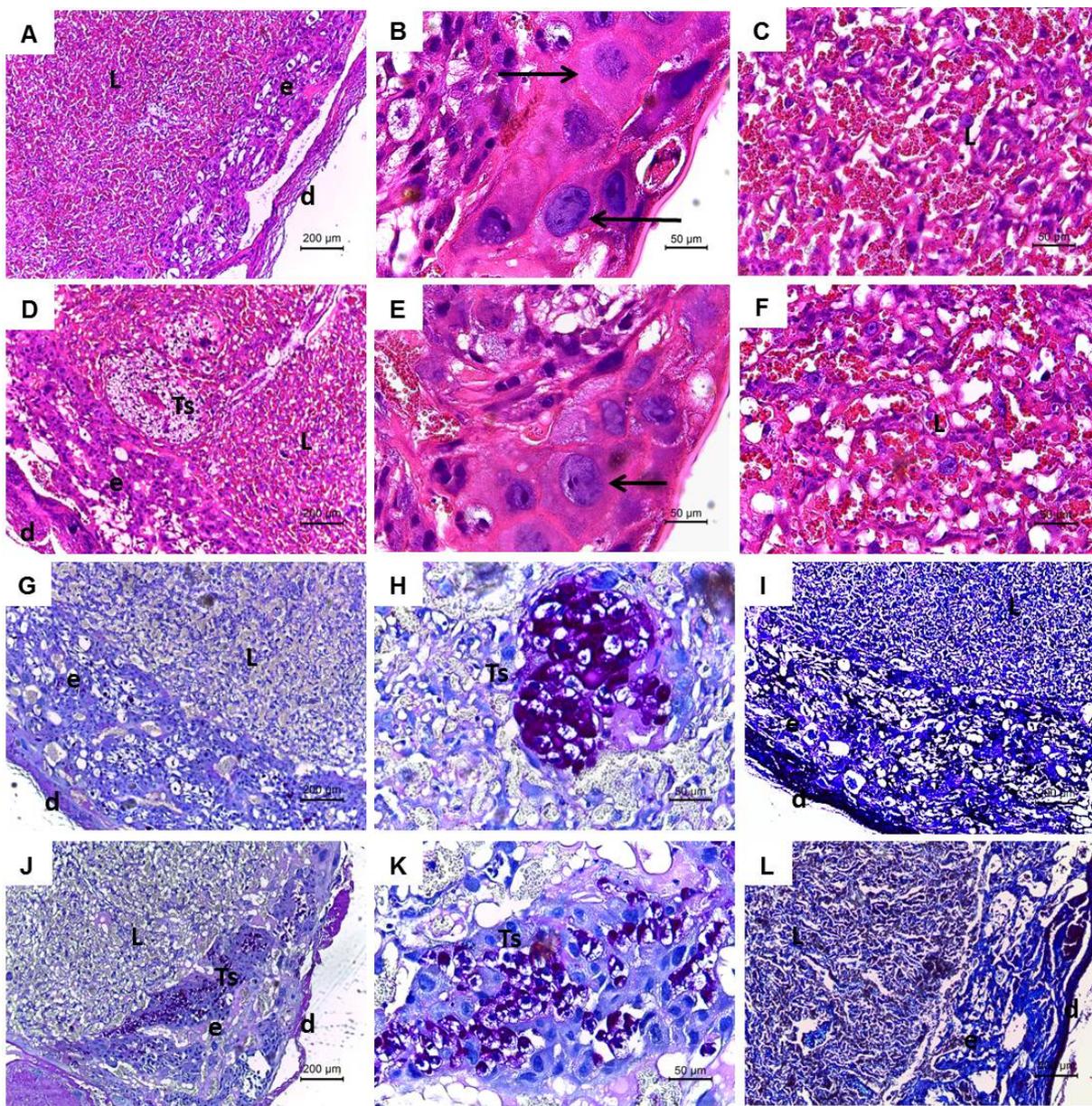
Não ocorreu diferença significativa no peso, índice e volume placentário (Tabela 6). A análise histológica do disco placentário revelou estrutura morfológica normal, com a presença da área do labirinto (Figura 12C e 12F), espongiotrofoblasto (Figura 12A e 12D), células trofoblásticas gigantes individualizadas e decídua nos quatro grupos experimentais (Figura 12B e 12E). A área de labirinto foi caracteristicamente maior do que a área de espongiotrofoblasto em todos os grupos. As células trofoblásticas gigantes estavam dispostas em rede, com citoplasma claro e núcleo com cromatina frouxa, indicando que estas se apresentavam funcionalmente ativas (Figura 12B e 12E). Não foi observada diferença de marcação PAS positiva nas diferentes camadas dos quatro grupos experimentais (Figura 12G e 12J). No entanto, as células do trofoblasto sincicial apresentaram-se ricamente coradas (púrpura-magenta), indicando acúmulo de carboidratos (Figura 12H e 12K). A análise histoquímica pelo Tricrômico de Masson indicou reação positiva de mesma intensidade entre os grupos experimentais (Figura 12I e 12L).

TABELA 6. Parâmetros fetais de ratos dos grupos controle e expostos a 400 (EA), 800 (EB) e 1200mg/kg (EC) de Cerconil WP®

Parâmetro	Controle	EA	EB	EC	P
¹ Peso dos fetos (g)	3,67 ± 0,14a	3,35 ± 0,57a	3,38 ± 0,77a	3,00 ± 1,29a	0,45
² AIP	74/83 (89.16%)a	43/77 (55.84%)b	32/51 (62.74%)b	40/47 (85.11%)a	-
² PIP	3/83 (3.61%)a	24/77 (31.17%)b	13/51 (25.49%)c	6/47 (12.76%)ac	-
² GIP	6/83 (7.23%)a	10/77 (12.99%)a	6/51 (11.76%)a	1/47 (2.13%)a	-
¹ Comprimento crânio-caudal médio (mm)	36,40 ± 2,16a	34,09 ± 1,67a	34,43 ± 3,72a	31,22 ± 8,14a	0,18
¹ Peso placentário (g)	0,49 ± 0,04a	0,41 ± 0,05a	0,47 ± 0,13a	0,39 ± 0,13a	0,14
¹ Índice placentário	0,13 ± 0,01a	0,30 ± 0,44a	0,14 ± 0,02a	0,14 ± 0,04a	0,85
¹ Volume placentário	31,34 ± 2,60a	34,88 ± 4,92a	29,72 ± 8,85a	27,62 ± 9,90a	0,30
³ Razão sexual (%)	100,00 (71,43 – 126,67)a	74,11 (58,48 – 121,43)a	100,00 (83,33 – 175,00)a	100,00 (71,43 – 175,00)a	0,75
³ Taxa de masculinidade (%)	50,00 (41,67 – 55,19)a	42,31 (36,89 – 54,40)a	50,00 (45,45 – 63,64)a	50,00 (41,67 – 63,64)a	0,75
³ Taxa de feminilidade (%)	50,00 (44,16 – 58,33)a	57,69 (45,60 – 63,11)a	50,00 (36,36 – 54,54)a	50,00 (36,36 – 58,33)a	0,75
¹ Distância ânus-genital absoluta (mm)					
Macho	3,71 ± 0,40a	3,51 ± 0,23a	3,81 ± 0,44a	3,24 ± 0,99a	0,57
Fêmea	2,19 ± 0,40a	2,19 ± 0,18a	2,32 ± 0,31a	1,93 ± 0,65a	0,73
¹ Distância ânus-genital relativa (mm/peso corporal ^{1/3})					
Macho	2,30 ± 0,25a	2,34 ± 0,22a	2,51 ± 0,15a	3,20 ± 1,65a	0,51
Fêmea	1,43 ± 0,26a	1,50 ± 0,21a	1,60 ± 0,21a	1,33 ± 0,38a	0,48

¹Valores expressos como média ± DP. Teste Kruskal-Wallis, com teste “a posteriori” de Dunn. ²Valores em número de fetos/total de fetos (porcentagem). Teste exato de Fisher. ³Valores expressos como mediana (1º quartil-3º quartil). Teste Kruskal-Wallis, com teste “a posteriori” de Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (p<0,05).

FIGURA 12 - Fotomicrografias da placenta



A, B e C - Placenta de rata do grupo controle, HE. D, E e F - Placenta de rata do grupo exposto a 400 mg/kg/dia de Cerconil WP[®], HE. G e H - Placenta de rata do grupo controle, PAS. I - Placenta de rata do controle. Tricrômico de Masson. J e K - Placenta de rata do grupo exposto a 800 mg/kg/dia de Cerconil WP[®], PAS. L - Placenta de rata do grupo exposto a 1200 mg/kg/dia de Cerconil WP[®]. Tricrômico de Masson. L – labirinto, e – espongiotrofoblasto, d – decídua, Ts – trofoblasto sincicial, células trofoblásticas gigantes (setas).

Fonte: Próprio autor.

Não foi observada ocorrência de malformações externas grosseiras e anomalias viscerais nos grupos experimentais. A incidência de anomalias esqueléticas foi aumentada nos grupos expostos em relação ao grupo controle (Tabela 7). A exposição gestacional ao fungicida aumentou ($p < 0,05$) a incidência de fetos com diminuição dos centros esternais nos grupos EA e EC em relação aos grupos controle e EB (Figura 13C e 13D). Um aumento da incidência de fetos com ausência de processo xifoide e com malformação do supra-occipital foi observado nos grupos EB e EA, respectivamente, em relação aos demais grupos experimentais. No grupo EB foi identificada maior frequência de ausência de vertebrae caudais em relação aos grupos controle e EA (Figura 13A e 13B).

Outras anomalias como: malformação do processo xifoide, basisfenóide e manúbrio, ausência de hámulo e manúbrio, centro vertebral bipartido (Figura 13G e 13F) e ossificação incompleta do crânio também foram identificadas, mas sem diferença significativa entre os grupos experimentais (Tabela 7).

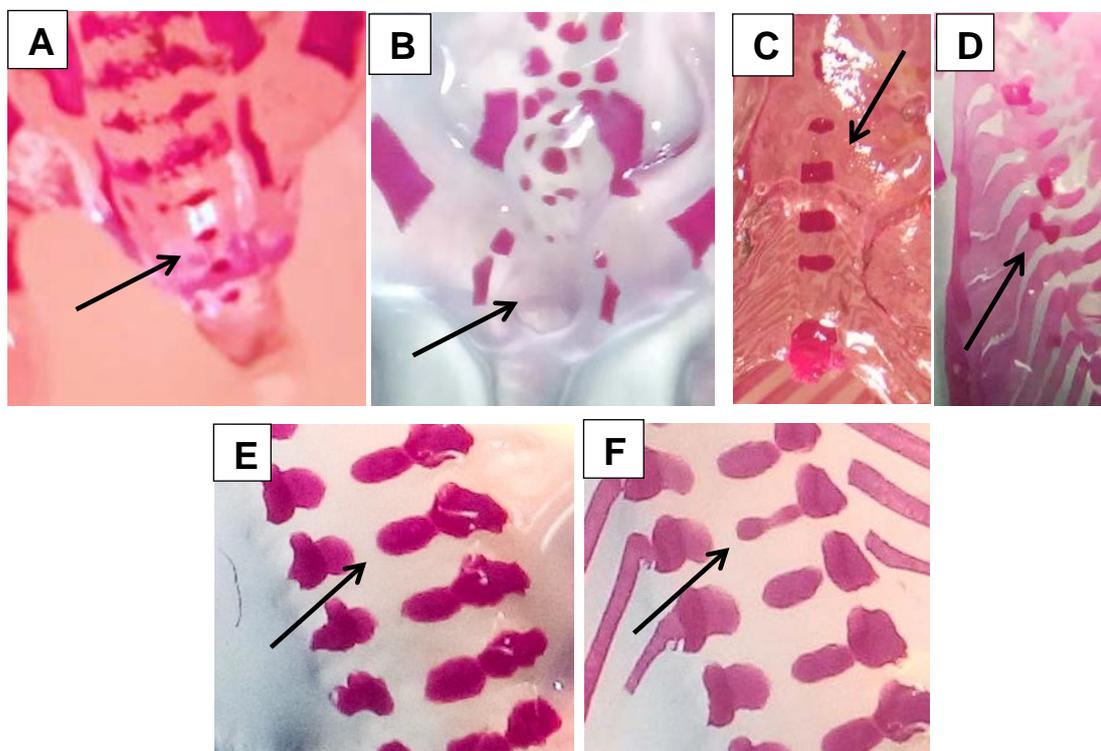
O número de falanges anteriores do lado direito diminuiu ($p < 0,05$) no grupo EA em relação aos demais grupos experimentais. Enquanto o número de falanges anteriores do lado esquerdo diminuiu ($p < 0,05$) no grupo EA em relação aos grupos controle e EB. O número de metatarsos diminuiu ($p < 0,05$) no grupo EB em comparação com o grupo controle (Tabela 8).

TABELA 7 - Frequência de anomalias esqueléticas fetais de ratos dos grupos controle e expostos a 400 (EA), 800 (EB) e 1200mg/kg (EC) de Cerconil WP®

Parâmetro	Controle	EA	EB	EC
Número de fetos com alterações/total de fetos analisados	5/41 (12,19%)a	25/38 (65,79%)b	16/25 (64,00%)b	13/21 (61,90%)b
Diminuição dos centros esternais	4/41 (9,76%)a	21/38 (55,26%)b	6/25 (24,00%)a	12/21 (57,14%)b
Ausência de processo xifoide	1/41 (2,44%)a	4/38 (10,53%)a	5/25 (20,00%)b	1/21 (4,76%)a
Supra-occipital malformado	0/41 (0,00%)a	14/38 (36,84%)b	3/25 (12,00%)a	0/21 (0,00%)a
Ausência de vertebrae caudais	0/41 (0,00%)a	0/38 (0,00%)a	4/25 (16,00%)bc	0/21 (0,00%)ac
Processo xifoide malformado	1/41 (2,44%)a	6/38 (15,79%)a	0/25 (0,00%)a	2/21 (9,52%)a
Ausência de hámulo	0/41 (0,00%)a	1/38 (2,63%)a	1/25 (4,00%)a	0/21 (0,00%)a
Centro vertebral bipartido	0/41 (0,00%)a	1/38 (2,63%)a	0/25 (0,00%)a	0/21 (0,00%)a
Ausência de manúbrio	0/41 (0,00%)a	0/38 (0,00%)a	3/25 (12,00%)a	0/21 (0,00%)a
Manúbrio malformado	0/41 (0,00%)a	0/38 (0,00%)a	1/25 (4,00%)a	0/21 (0,00%)a
Ossificação incompleta do crânio	0/41 (0,00%)a	0/38 (0,00%)a	1/25 (4,00%)a	0/21 (0,00%)a
Quatro vértebras sacrais	0/41 (0,00%)a	0/38 (0,00%)a	2/25 (8,00%)a	0/21 (0,00%)a
Basisfenóide malformado	0/41 (0,00%)a	0/38 (0,00%)a	0/25 (0,00%)a	1/21 (4,76%)a

Valores em número fetos alterados/total de fetos (porcentagem). Teste exato de Fisher. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

FIGURA 13 – Anomalias esqueléticas



A, C, E – Grupo controle. B – Grupo EC. D e F – Grupo EA. Em A observa-se a estrutura normal da região pélvica e caudal (vértebras caudais - seta), enquanto que em B, é destacado a ausência de vértebras caudais. Em C, observa-se o esterno e sua estrutura normal e em D destaca-se a malformação dos centros esternais (seta) e ausência de processo xifóide (seta). Em E, observa-se a estrutura normal da coluna vertebral (seta), enquanto que em H destaca-se o centro vertebral bipartido (seta).

Fonte: Próprio autor.

TABELA 8 - Pontos de ossificação em fetos de ratas dos grupos controle e expostos a 400 (EA), 800 (EB) e 1200mg/kg (EC) de Cerconil WP[®]

Parâmetro	Controle	EA	EB	EC	P
Total de fetos analisados	41	38	25	21	-
Falanges anteriores (direito)	5,44 ± 0,95a	4,34 ± 1,46b	5,68 ± 0,75a	5,28 ± 0,96a	0,00
Falanges anteriores (esquerdo)	5,22 ± 1,13a	4,37 ± 1,50bc	5,64 ± 0,86a	5,28 ± 0,96ac	0,00
Metatarsos (direito)	4,00 ± 0,00a	3,97 ± 0,16ac	3,88 ± 0,33bc	4,00 ± 0,00ac	0,04
Metatarsos (esquerdo)	4,00 ± 0,00a	3,97 ± 0,16ac	3,88 ± 0,33bc	4,00 ± 0,00ac	0,04
Metacarpos (direito)	3,71 ± 0,46a	3,68 ± 0,47a	3,76 ± 0,44a	3,86 ± 0,36a	0,50
Metacarpos (esquerdo)	3,73 ± 0,45a	3,66 ± 0,48a	3,76 ± 0,44a	3,86 ± 0,36a	0,42
Esternébras	3,93 ± 0,34a	3,74 ± 0,50a	3,52 ± 0,92a	3,76 ± 0,54a	0,06
Vertebras caudais	3,15 ± 0,42a	2,63 ± 0,59bc	2,52 ± 1,19ac	2,86 ± 0,48ac	0,00

Valores expressos como média ± DP. Teste Kruskal-Wallis, com teste "a posteriori" de Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise química do látex de seringueira

Inicialmente os filmes foram preparados pelo método *casting*, contendo de 2 a 10 gotas das amostras do Cerconil WP[®] misturados com o látex e levados a estufa para tratamento térmico. Diante da baixa intensidade de sinal e inconsistência dos resultados obtidos com esse tipo de filme, optou-se por homogeneizar o Cerconil WP[®] com o látex e deixar a mistura coagular naturalmente, dando origem a borracha natural adicionada de Cerconil WP[®]. A quantidade de material presente no filme de borracha natural apresentou melhor intensidade de sinal.

A amostra de látex apresentou bandas características da molécula do isopreno, composto em maior quantidade na borracha natural. Em 995 cm⁻¹ observa-se uma banda característica de ligações =CH, enquanto em 1372 cm⁻¹ e 1449 cm⁻¹ ocorre a deformação dos grupos -CH₃ e -CH₂, respectivamente. Já em 1522 cm⁻¹ e 1666 cm⁻¹ observa-se a banda do estiramento das ligações C=C e em 2730 cm⁻¹ e 2920 cm⁻¹ o estiramento das ligações -CH e -CH₂, pertencentes a molécula de isopreno (NALLASAMY; MOHAN, 2004; CASIRAGHI; FERRARI; ROBERTSON, 2005; HAIDER et al., 2012; MINČEVA-ŠUKAROVA et al., 2012).

Na amostra de Cerconil WP[®] pode-se observar bandas características das funções químicas presentes no clorotalonil e no tiofanato metílico, componentes da formulação do fungicida estudado. Em 1264 cm⁻¹ tem-se a presença de carbonila e em 1554 cm⁻¹ o desdobramento da ligação N-H, presentes no tiofanato metílico. Em 1522 cm⁻¹ observa-se o estiramento das ligações C=C, presente nos dois compostos, enquanto em 2242 cm⁻¹ aparece o grupo nitrila, função característica do clorotalonil (LEE; MACHIDA, 1980; KIEFER; LONG, 1982; CHAABANE; HLEL; GUIDARA, 2008; MINČEVA-ŠUKAROVA et al., 2012).

No espectro da mistura de látex e Cerconil WP[®] observou-se bandas características das amostras analisadas isoladamente, não apresentando novas bandas e interações intermoleculares significativas. Dessa forma, torna-se evidente a ausência de alteração na estrutura química do látex de seringueira exposto *in vitro* ao Cerconil WP[®], indicando apenas uma mistura física.

5.2 Análise da toxicidade materna e dos efeitos teratogênicos em ratos

A gestação é uma das fases mais vulneráveis do ciclo reprodutivo, em que ocorrem múltiplos e complexos eventos, envolvendo diferentes sistemas do organismo materno. Apesar da placenta constituir uma barreira à passagem de algumas substâncias químicas, sabe-se que, a maioria destas pode passar livremente por este órgão materno-fetal, podendo afetar o desenvolvimento intrauterino (DAMASCENO et al., 2008). Os impactos causados pela exposição a agentes químicos durante a gestação, geralmente são o aparecimento de malformações congênitas, reabsorções precoces e tardias e morte fetal (ROMAN et al., 2014).

Apesar da ampla utilização da formulação do fungicida Cerconil WP® na agricultura, os seus dados de mecanismo toxicológico são escassos, especialmente quanto ao sistema reprodutor. Apesar de existirem estudos toxicológicos relacionados aos efeitos dos seus princípios ativos isoladamente (tiofanato metílico e clorotalonil) (USEPA, 1999; USEPA, 2005), este é o primeiro estudo que relaciona a exposição ao Cerconil WP® com toxicidade materna e desenvolvimento pré-natal de ratos Wistar. Estudos toxicológicos gerais, em modelos animais, são obrigatórios para a liberação da comercialização de substâncias químicas produzidas. No entanto, os estudos reprodutivos iniciais, muitas vezes, são limitados e por isso estudos complementares devem ser realizados para avaliar a segurança de exposição (LO; FRIEDMAM, 2002).

Os resultados do presente estudo mostraram que a exposição ao Cerconil WP®, durante o período de organogênese, causou toxicidade materna e prejuízo ao desenvolvimento embriofetal, especialmente quanto ao processo de ossificação.

Sinais clínicos de toxicidade materna do Cerconil WP® foram observados em algumas ratas dos grupos expostos às duas maiores doses (duas ratas do grupo EB e uma rata do grupo EC). Além disso, houve uma redução do peso corpóreo das ratas no DG12 (aproximadamente no meio do período de exposição) em todos os grupos expostos ao fungicida. Entretanto, o peso foi recuperado após o término da exposição (a partir do DG16).

Ao considerar como indicativos de toxicidade materna sistêmica, os parâmetros de consumo de água e ração, peso corporal, piloereção, deambulação,

diarréia e mortalidade (MELLO et al., 2001), verifica-se que a exposição ao fungicida levou a uma toxicidade geral moderada nas maiores doses de exposição. Além disso, os efeitos causados foram pontuais e se manifestaram em apenas alguns animais.

A reprodução é frequentemente uma das primeiras funções a ser afetada quando a disposição de energia é limitada, sendo que uma nutrição inadequada pode repercutir diretamente na função reprodutiva (KRASNOW; STEINER, 2006). Desta forma, a avaliação da evolução do peso corpóreo e do estado nutricional é extremamente importante para o entendimento sobre a saúde geral dos animais, submetidos à exposição a um agente químico e para a melhor interpretação dos efeitos deste agente sobre o sistema reprodutor (CLEGG; PERREAULT; KLINEFELTER, 2001). É importante ressaltar que, as alterações fetais observadas no presente estudo podem ser consideradas como uma ação direta do fungicida estudado e não como resultado secundário da toxicidade materna. Isto porque o status nutricional geral das ratas não foi afetado de forma relevante.

Estudo de Cantarutti e Dalsenter (2005) demonstrou que a exposição oral, durante o período gestacional, aos praguicidas carbaril, lambda-cialotrina e metamidofós isolados ou em combinação, em dose 100 vezes superior à ingestão diária aceitável (IDA), não gerou sinais de toxicidade materna e fetal em ratas Wistar. As progenitoras expostas se alimentaram normalmente e não apresentaram diminuição no ganho de peso corpóreo, e a prole se desenvolveu normalmente.

Segundo Kim et al. (2007), o carrapaticida amitraz é embriotóxico e teratogênico na dose de 30mg/kg/dia para ratas expostas do DG1 ao DG19. A toxicidade materna foi observada com o aumento na incidência de sinais clínicos anormais e um ganho de peso corpóreo reduzido.

O fígado é um importante alvo toxicológico, dessa forma, vários estudos indicam alterações hepáticas após exposição a agroquímicos. Segundo Singh et al. (2007), a exposição ao inseticida endosulfan causou alterações degenerativas, incluindo aumento no tamanho dos hepatócitos, núcleo celular dilatado e congestão das veias centrais e portais. Outro estudo realizado com células do fígado humano sugere que, após exposição a baixos níveis do herbicida metolacoloro, ocorre uma diminuição no número de células devido a uma alteração do ciclo celular (LOWRY et al., 2013). A exposição aos herbicidas 2,4-D e glifosato-

roundup combinados, gerou hiper Cromatismo nuclear nos hepatócitos e homogeneidade nos tecidos em camundongos (ROMAN et al., 2009).

No presente estudo, o peso do fígado materno foi reduzido nas ratas do grupo EC em relação ao grupo controle, porém o peso dos demais órgãos avaliados não foi afetado pela exposição ao fungicida. Este resultado corrobora os achados histopatológicos do fígado.

O tecido hepático apresentou áreas com necrose focal, infiltrado inflamatório, presença de hepatócitos com núcleo picnótico, sugestivos de apoptose, e área de esteatose microvesicular nos grupos EB e EC. Alguns estudos indicam que o tiofanato metílico pode levar a alterações hepáticas morfológicas, depleção de glicogênio, apoptose hepatocelular e aceleração do metabolismo hepático de substâncias administradas concomitantemente (PAOLINI et al., 1999; BUONO et al., 2007). Esta característica pode interferir na toxicidade gerada pelo Cerconil WP[®], potencializando os efeitos observados em exposições isoladas aos componentes de sua formulação. Além disso, tem sido relatado que o clorotalonil pode causar aumento da peroxidação lipídica e dano oxidativo no DNA de células do fígado (LODOVICI et al., 1997; SUZUKI; KOMATSU; ISONO, 1997).

O peso e a histologia dos rins foram semelhante entre os grupos experimentais. Entretanto, estudo de exposição crônica de ratos machos e fêmeas ao clorotalonil indicou o aparecimento de adenomas e carcinomas do epitélio proximal tubular renal (WILKINSON; KILLEEN, 1996). Guven et al. (1998) observaram que a exposição de ratas prenhes do 6^o ao 21^o dia gestacional aos fungicidas propinebe e maneb levou à edema, degeneração celular, hemorragia densa e infiltrado inflamatório nos tecido renal.

No presente estudo, a redução pontual do peso corpóreo, os sinais clínicos de toxicidade e as alterações hepáticas observadas nas ratas prenhes expostas ao fungicida indicam que a LOAEL para toxicidade materna foi de 800 mg/kg/dia de Cerconil WP[®] (formulação contendo 400 mg/kg/dia de clorotalonil e 160 mg/kg/dia de tiofanato metílico). Os resultados apontam que a NOAEL no presente estudo foi de 400 mg/kg/dia de Cerconil WP[®]. Estes resultados corroboram a LOAEL observada para toxicidade materna (400 mg/kg/dia) relatada anteriormente após exposição oral (6^o ao 15^o DG) de ratos Sprague Dawley ao clorotalonil (USEPA,1999). No entanto, esta LOAEL foi relacionada ao aumento da mortalidade e redução de ganho peso gestacional (USEPA, 1999), o que não foi observado no

presente estudo nesta dose de exposição. A LOAEL para toxicidade materna do tiofanato metílico em coelhos, anteriormente relatada, foi de 40mg/kg/dia (USEPA, 2005), considerando redução de peso corpóreo e de consumo de ração, o que contrasta com o presente estudo.

A ausência de diferença significativa no número de corpos lúteos, entre os grupos experimentais, sugere que o ambiente hormonal materno estava adequado ao início do processo gestacional. Mesmo após a exposição ao fungicida Cerconil WP[®], não houve perturbação significativa deste processo, o que levou ao sucesso da implantação, indicado pela ausência de alteração no número de implantes e de reabsorções e na taxa de perda pré-implantação. A exposição materna não alterou o desempenho reprodutivo das ratas. O grupo EB apresentou menor número de fetos vivos em relação aos outros grupos experimentais, mas sem diferença estatística significativa. O mesmo ocorreu com o potencial de fertilidade no grupo EC.

O crescimento intrauterino é influenciado por fatores genéticos, imunológicos, endócrinos, nutricionais, vasculares e ambientais (CHAHOUD et al., 1999). O peso, índice, volume e histologia da placenta não foram afetados pelo fungicida, demonstrando que não houve comprometimento do fluxo sanguíneo útero-placentário, o que poderia levar à restrição de crescimento fetal (LANG et al., 2003).

No presente estudo, observou-se ausência de impacto do Cerconil WP[®] sobre a média de peso e comprimento crânio-caudal dos fetos, corroborando estudo de exposição ao herbicida 2,4-D (CHARLES et al., 2001). No entanto, ao considerar as porcentagens de classificação dos fetos em adequados, pequenos ou grandes para a idade gestacional verifica-se uma diferença relevante entre os grupos experimentais. Foi observado um aumento significativo na porcentagem de fetos pequenos para a idade gestacional nos grupos EA e EB, quando comparados ao grupo controle. Isto demonstra que a média do peso fetal isolada pode não ser o melhor indicativo de restrição de crescimento intra-uterino, conforme relatado por Sinzato et al. (2012). A diferença observada entre valor médio do peso fetal e adequação do peso à idade gestacional pode estar relacionada à diferença de tamanho entre fetos machos e fêmeas e a própria variabilidade do tamanho da ninhada.

A alteração nas taxas de razão sexual, masculinidade e feminilidade e distância ânus-genital pode ser usada como indicativo de possível potencial de

desregulação endócrina de substâncias químicas, especialmente de contaminantes ambientais (FUSSELL et al., 2015). A ausência de alterações nestes parâmetros, especialmente na distância ânus-genital, um sensível marcador de alteração hormonal pré-natal (AGRAMUNT; KOGEVINAS; CARRERAS, 2011), sugere que o Cerconil WP[®] não causou interferência endócrina, com impacto sobre o desenvolvimento sexual intrauterino.

Apesar do período da organogênese (6^o a 15^o dia gestacional – período de exposição) ser o mais susceptível ao surgimento de alterações morfológicas em ratos, não foram observadas malformações externas e viscerais após exposição ao Cerconil WP[®]. No entanto, ocorreu um aumento significativo na incidência total de fetos com anomalias esqueléticas, após a exposição ao fungicida. O final do período de exposição (DG15) corresponde ao início do processo de ossificação em ratos (FRITZ; HESS, 1970). Como este é um importante indicador de maturidade fetal, esta alteração pode ser considerada um relevante impacto ao desenvolvimento pré-natal.

Dallgrave e Langeloh (2003) constataram que o glifosato-roundup, um herbicida utilizado em larga escala na agricultura, pode ter alto grau de embriotoxicidade, alterando o desenvolvimento esquelético de fetos expostos.

As anomalias/malformações esqueléticas que foram significativamente aumentadas nos grupos expostos ao fungicida foram: centros esternais pequenos (grupo EA e EC), ausência de processo xifoide e de vertebrae caudais (grupo EB) e malformação do supra-occipital (grupo EA). Além disso, outras anomalias/malformações esqueléticas foram observadas como: malformação do processo xifoide, basisfenóide e manúbrio, ausência de hámulo e manúbrio, centro vertebral bipartido e ossificação incompleta do crânio. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais, quando consideradas individualmente.

Em um estudo com ratas expostas ao herbicida 2,4-D, do DG1 ao DG19, foi observada uma diminuição no peso do útero com fetos, peso corpóreo e tamanho fetal. Alterações morfológicas externas e esqueléticas também foram observadas, dentre elas: ossificação incompleta do crânio, esternébras, vertebrae e membros, costelas fundidas, assimétricas e bipartidas (MAZHAR et al., 2012). Outros estudos de exposição ao 2,4-D e ao carrapaticida amitraz também

observaram o aumento da frequência de anomalias esqueléticas em fetos expostos durante todo o período gestacional (CHARLES et al., 2001; KIM et al., 2007).

Segundo Berlinska e Sitarek (1997) a dose de 30mg/kg/dia de fenitroion retarda a ossificação do esterno e crânio, além de diminuir o peso e comprimento dos fetos expostos. Fetos expostos a citrinina e endosulfan, separados ou em combinação, apresentaram ossificação incompleta dos ossos do crânio, anomalias nas costelas e sacrais e ausência de vértebras caudais (SINGH et al., 2007).

A LOAEL observada para a toxicidade do desenvolvimento, no presente estudo, foi de 400 mg/kg/dia de Cerconil WP[®] (formulação contendo 200 mg/kg/dia de clorotalonil e 80 mg/kg/dia de tiofanato metílico), considerando as alterações esqueléticas observadas. Desta forma, a NOAEL foi menor que 400 mg/kg/dia de Cerconil WP[®]. USEPA (1999) relatou que a LOAEL para a toxicidade de desenvolvimento, relacionada ao aumento de reabsorções fetais e de perda pós-implantação foi de 400 mg/kg/dia de clorotalonil, alterações que não foram observadas no presente estudo. Para o tiofanato metílico, foi relatado aumento da frequência de costelas suprenuméricas e redução do peso fetal, já a partir da dose de 40 mg/kg/dia, em exposição de coelhos (USEPA, 2005).

6 CONCLUSÃO

Em geral pode-se concluir que a exposição ao Cerconil WP[®], nestas condições experimentais, não alterou a estrutura molecular do látex de seringueira. Além disso, a exposição oral de ratas prenhes ao fungicida, durante o período da organogênese, levou a alterações de desenvolvimento embriofetal nas três doses estudadas, especialmente quanto ao processo de ossificação. Apesar da ausência de impacto sobre o desempenho reprodutivo, o fungicida causou toxicidade sobre a saúde geral materna nas duas maiores doses. Tais resultados geram um alerta em relação à saúde do trabalhador rural, que pode estar exposto diariamente a esses compostos. Dessa forma, ressalta-se a importância de estudos que avaliem a toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento desses produtos e, também, identificação dos níveis de exposição real no local de trabalho, especialmente de mulheres em idade reprodutiva.

REFERÊNCIAS

- AGRAMUNT, S.; KOGEVINAS, M.; CARRERAS, R. Anogenital distance in newborns: a sensitive marker of prenatal hormonal disruption. **Medicina Clínica**, v. 137, p. 459-63, oct. 2011.
- AKCHA, F.; SPAGNOL, C.; ROUXEL, J. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 106-107, p. 104-113, jan. 2012.
- ALIVERTI, V. et al. The extent of fetal occification as an index of delayed developoment in teratogenic studies on the rat. **Teratology**, v. 20, n. 2, p. 237-242, oct. 1979.
- AMARA, B. I. et al. Methyl-thiophanate increases reactive oxygen species production and induces genotoxicity in rat peripheral blood. **Toxicology Mechanisms & Methods**, v. 24, n. 2, p. 679-87, dec. 2014.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Revisão das propriedades, usos e legislação do Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). **Caderno Pesquisa**, v. 13, n. 1, p. 60-70, jan./jun. 2002.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia/Monografias**. 2009. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em abr. 2016.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento Técnico** – Tiofanato Metílico. 2005. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B9092-1-0%5D.PDF>>. Acesso em abr. 2016.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Relatório de Atividades de 2011 e 2012**. Brasília, out., 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/58a5580041a4f6669e579ede61db78cc/Relat%C3%B3rio+PARA+2011-12+++30_10_13_1.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em abr. 2016.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; UFPR - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Seminário de mercado de agrotóxico e regulação**. Brasília: ANVISA, 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu++noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrotoxico+s+em+2012>>. Acesso em mar. 2016.
- ARAÚJO, A. J. et al. **Meio ambiente, saúde e trabalho**. 1.ed. Rio de Janeiro: CUT, Comissão de Meio Ambiente, 2000.

ARIYOSHI, H. et al. Expanded polytetrafluorethylene (ePTFE) vascular graft loses its thrombogenicity six months after implantation. **Thrombosis Research**, v. 88, n. 5, p. 427-433, dec. 1997.

ARMAS, E. D. et al. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1119-1127, set./out. 2007.

ARMAS, E. D. et al. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 975-982, maio 2005.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. cap. 6.

BERLINSKA, B.; SITAREK, K. Disturbances of prenatal development in rats exposed to fenitrothion. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 48, n. 3, p. 217-28, 1997.

BIKALES, N. M.; MARK, H. F.; GAYLORD, N. G. **Encyclopedia of polymer science and technology**. New York: American Chemical Society, 1973.

BITTENCOURT A. M. B et al. Aggregation stability of natural rubber latex with low dry rubber content (drc) in acidic medium. **Polymer Bulletin**, v. 40, n. 1, p. 111-116, jan. 1998.

BLACKLEY, D.C. **Polymers Latices**. Glasgow: Chapman & Hall, 1997.

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Superintendência da Borracha. **Curso básico em tecnologia de elastômeros**. [Brasília?], 1993. v. 1-6.

BRASIL. Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989 - Decreto n.º 4.074, de 4 de janeiro de 2002. 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. **Diário Oficial**, 08 de jan. 2002.

BUONO, S. et al. PPAR α mediates the effects of the pesticide methyl thiophanate on liver of the lizard *Podarcis sicula*. **Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 3, p. 306-14, apr. 2007.

CALDERON, I.M.P. **Modelo experimental em ratas para estudo do binômio diabete e gravidez**. 1988. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CANTARUTTI, T. F. P.; DALSENTER, P. R. **Risco tóxico de resíduos de pesticidas em alimentos e toxicidade reprodutiva em ratos Wistar**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CARSON, R. **Primavera Silenciosa**. 1. ed. São Paulo: Gaia, 2010.

CASIRAGHI, C.; FERRARI, A. C.; ROBERTSON, J. Raman spectroscopy of hydrogenated amorphous carbons. **Physical Review B.**, v. 72, n. 8, p. 1-14, aug. 2005.

CASTRO, V. L.; CHIORATO, S. H.; PINTO, N. F. Biological monitoring of embryo-fetal exposure to methamidophos or chlorothalonil on rat development. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 42, n. 6, p. 361-5, dec. 2000.

CENTRO COLABORADOR DE VIGILÂNCIA EM ACIDENTES DE TRABALHO. **Acidentes de trabalho devido à intoxicação por agrotóxicos entre trabalhadores da agropecuária 2000- 2011**. Salvador: Centro Colaborador de Vigilância em Acidentes de Trabalho, Universidade Federal da Bahia, 2012.

CHAABANE, I.; HLEL, F.; GUIDARA, K. Synthesis, Infra-red, Raman, NMR and structural characterization by X-ray Diffraction of [C₁₂H₁₇N₂]₂CdCl₄ and [C₆H₁₀N₂]₂Cd₃Cl₁₀ compounds. **PMC Physics B.**, v. 11, n. 1, p. 1-19, apr. 2008.

CHAHOU, I. et al. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 375-381, sep./oct. 1999.

CHARLES, J. M. et al. Developmental toxicity studies in rats and rabbits on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its forms. **Toxicological Science**, v. 60, p. 121–131, mar. 2001.

CHRISTIAN, M.S. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes, W. **Method of toxicology**. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001. p.1301-1381.

CLEGG, E. D.; PERREAULT, S. D.; KLINEFELTER, G. R. Assessment of male reproductive toxicology. In: Wallace H. (Ed.). **Principles and methods of toxicology**. 4.ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001. p. 1263-99.

COMPÊNDIO de defensivos agrícolas. 4. ed. São Paulo: Organização Andrei, 1993. p. 448. Disponível em: < <http://www.lce.esalq.usp.br/arquimedes/clorotalonil.pdf>>. Acesso em: mar de 2016.

CORNISH, K.; WOOD, D.F.; WINDLE, J.J; Rubber particles from four different species, examined by transmission electron microscopy and electron-paramagnetic-resonance spin labeling, are found to consist of a homogeneous rubber core enclosed by a contiguous, monolayer biomembrane. **Planta**, v. 210, n. 1, p. 85-96, nov. 1999.

COX, C. Chlorothalonil. **Journal of Pesticide Reform**. v. 17, n. 4, p. 14-20, 1997.

CUNHA, J. F. **Plantações experimentais de seringueira em São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1957. 8 p. Disponível em:

<<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/4153/1444>>. Acesso em abr. 2016.

D'AUZAC, J.; JACOB, J. L.; CHRESTIN, H. **Physiology of rubber tree latex**. Florida: CRC Press, 1989.

DALL'ANTONIA, A.C. et al. Avaliação de clones de borracha natural crua por ensaios padrão e análise dinâmico-mecânica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 3, p. 239-245, jan. 2006.

DALLEGRAVE, E. et al. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Archives of Toxicology**, v. 81, n. 9, p. 665-673, sep. 2007.

DALLEGRAVE, E.; LANGELOH, A. **Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato-Roundup em ratos Wistar**. 2003. Tese (Doutorado) - Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DAMASCENO, D. C. et al. **Anomalias congênitas: estudos experimentais**. Belo Horizonte: Coopmed, 2008.

DAVIS, L. K. et al. The effects of prenatal exposure to atrazine on pubertal and postnatal reproductive indices in the female rat. **Reproductive Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 43-51, jul. 2011.

DEL NERO, U. et al. Methodology to study the volume and placental density in human placenta at term. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, n. 10, p. 669-673, nov./dec. 2002.

FEYZI-DEHKHARGANI, S. et al. Atrazine in sub-acute exposure results in sperm DNA disintegrity and nuclear immaturity in rats. **Veterinary Research Forum**, Paris, v. 3, n. 1, p. 19-26, 2012.

FIORAVANTI, C. Marcas esmaecidas. **Revista FAPESP, Seção Tecnologia**, v. 157, p. 76-79, abr. 2009.

FRAITES, M. J. et al. Gestational atrazine exposure: effects on male reproductive development and metabolite distribution in the dam, fetus, and neonate. **Reproductive Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 52-63, jul. 2011.

FRITZ, H.; HESS, R. Ossification of the rat and mouse skeleton in the perinatal period. **Teratology**, v. 3, p. 331-337, nov. 1970.

FUSSELL, K. C. et al. Investigations of putative reproductive toxicity of low-dose exposures to flutamide in Wistar rats. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 12, p. 2385-2402, dec. 2015.

GALLAVAN, R. H. et al. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. **Reproductive Toxicology**, v. 13, p. 383-390, 1999.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 695-706, jun. 2007.

GRISÓLIA, K. C. Estudos da mutagênicidade dos agrotóxicos. In: GRISÓLIA, K. C. (Org.). **Agrotóxicos: mutações, reprodução e câncer**. 1. ed. Brasília, DF: Ed. UnB, 2005.

GUVEN, K. et al. The accumulation and histological effects of organometallic fungicides Propineb and Maneb in the kidneys of fetus and female rats during pregnancy. **Toxicology Letters**, v. 99, p. 91-98, oct. 1998.

HAIDER, K. S. et al. Technology and conservation of modern materials in design. Berlin: Technical University, 2012.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Programa Rubber Tree**. 2011.

Disponível em:

<<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/importancia.php>>. Acesso em fev. 2016.

IAPAR – Instituto Agrônomo do Paraná. **Boletim Técnico: Avaliação da produção de borracha**. Disponível em: <<http://www.iapar.br>>. Acesso em abr. 2016.

IBGE. **Produção agrícola: safras 1998 a 2011**. Disponível em

<www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric>. Acesso em mar. 2016.

IHARA. **Ficha de informações de segurança de produto químico: Cerconil WP**. 2008. Disponível em:

<<http://www.ihara.com.br/upload/produtos/fispq/1269463260.pdf>>. Acesso em fev. 2016.

INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP. **Rubber Statistical Bulletin**, Wembley, v.61, p. 61, 2007.

JEYEARATNAM, J. Health problems of pesticides usage in the third world. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 42, n. 8, p. 505-6, aug. 1985.

KHERA, K.S. et al. Teratogenicity studies on pesticide formulations of dimethoate, Diuron, and lindane in rats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 22, p. 522, dec. 1979.

KIEFER, W.; LONG, D. A. **Non-linear raman spectroscopy and its chemical applications**. Germany: Springer Science & Business Media, 1982.

KIM, J. C. et al. Avaliação de toxicidade para o desenvolvimento de amitraz em ratos Sprague-Dawley. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 1, p. 137-44, jan. 2007.

KRASNOW, S. M., STEINER, R. A. Physiological mechanisms integrating metabolism and reproduction. In: Knobil E, Neill JD (Ed.). **The physiology of Reproduction**. 4.ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2006. p. 2559-61.

LANG, U. et al. **Uterine blood flow: a determinant of fetal growth. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology***, v. 22, n. 110, p. 55-61, sep. 2003.

LASERNA, J.J. **Modern techniques in raman spectroscopy**. Toronto: John Wiley, 1996.

LEE, H.; MACHIDA, K. Resonance raman spectra and structure of p-aminoazobenzene Dyes in diprotonated form. ***Journal of Molecular Structure***, v. 68, p. 51-57, nov. 1980.

LI, Y. et al. Age-dependent dopaminergic dysfunction following fetal exposure to atrazine in SD rats. ***Environmental Toxicology and Pharmacology***, v. 37, n. 3, p. 1275-82, may 2014.

LIMA, J. S. et al. Methyl parathion activation by partially purified rat brain fraction. ***Toxicological Letters***, v. 87, p. 53-60, sep. 1996.

LODOVICI, M. et al. Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. ***Toxicology***, v. 117, n. 1, p. 55-60, feb. 1997.

LO, W. Y.; FRIEDMAN, J. M. Teratogenicity of recently introduced medications in human pregnancy. ***Obstetrics & Gynecology***, v. 100, n. 3, p. 465-473, sep. 2002.

LOWRY, D. M. et al. Mechanism of metolachlor action due to alterations in cell cycle progression. ***Cell Biology and Toxicology***, v. 29, n. 4, p. 283-291, aug. 2013.

MARTINS, M.A. et al. Avaliação da borracha natural de clones da série IAC por RMN13C no estado sólido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLIMEROS, 8. 2005, Aguas de Lindoia. **Anais... Águas de Lindóia**.

MATSUMOTO, M. et al. **Prenatal developmental toxicity of gavage or feeding doses of 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol in rats**. *Reproductive Toxicology*. v. 29, n. 3, p. 292-7, jun. 2010.

MATTOS, L. M.; SILVA, E. F. Influência das propriedades de solos e de agrotóxicos no potencial de contaminação de solos e águas subterrâneas. ***Agrotóxicos: Revista Ecotoxicológica e Meio Ambiente***, Curitiba, v. 9, p.103-124, dez. 1999.

MAZHAR, F. M. et al. Fetotoxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rats and the protective role of vitamin E. ***Toxicology and Industrial Health***, v. 30, n. 5, p. 480-8, jun. 2012.

MELO, D. F. et al. Compatibilidade de *Dicyma pulvinata* com defensivos agrícolas e eficiência do biocontrole do mal-das-folhas da seringueira em campo. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, Brasília, v.43, n.2, p.179-185, fev. 2008.

MELLO, J. R. B. et al. **Avaliação do extrato aquoso de *Crotalaria retusa Leguminosae* sobre a fertilidade de ratas**. Porto Alegre: Faculdade de Veterinária da UFRGS, v. 25, n.2, p.34-42, fev. 2001.

McINTYRE, B. S. et al. Effects of in utero exposure to linuron on androgen-dependent reproductive development in the male Crl:CD(SD)BR rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 167, n. 2, p. 87-99, sep. 2000.

MINČEVA-ŠUKAROVA, B. et al. Micro-Raman and Micro-FT-iR spectroscopic investigation of raw and dyed pan fibers. **Croatica Chemica Acta**, v. 85, p. 63-70, apr. 2012.

MIZENS, M. et al. **A teratology study in rats with technical chlorothalonil**. Ohio: Fermenta ASC, 1983.

MONTGOMERY, J. H. **Agrochemicals, Desk Reference**. 2. ed. New York: Lewis Publishers, 1997. p. 101-102.

MORENO, R.M.B. et al. Monitoramento e avaliação da borracha natural crua utilizando a técnica de análise térmica dinâmico-mecânica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.16, n. 3, p. 235-238, 2006.

NALLASAMY, P.; MOHAN, S. Vibrational spectra of *cis*-1,4-polyisoprene. **The Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 29, n. 1, jan. 2004.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; MEYER, A.; MOREIRA, J. C. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. **Human and Environmental Toxicology**, v. 19, p. 173-177, mar. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão de Meio Ambiente e Ecologia Humana. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília: Organização Pan-americana da Saúde, 1997. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>>. Acesso em: mar. 2016.

PAOLINI, M. et al. Molecular non-genetic biomarkers of effect related to methyl thiophanate cocarcinogenesis: organ- and sex-specific cytochrome P450 induction in the rat. **Cancer Letters**, v. 135, n. 2, p. 203-13, jan. 1999.

PERES, F. **É veneno ou é remédio? Os desafios da comunicação rural sobre agrotóxicos**. 1999. Dissertação (Mestrado) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

PIERRE, R.; JEAN-LUC, C. Vulcanizable rubber composition for the manufacture of a tire, and a tire, the tread of which comprises such a composition. **Michelin Rech. Tech**. 2003.

PIMENTEL, D. Green revolution agriculture and chemical hazards. **The Science of the Total Environment**, v. 188, n. 1, p. 86-98, sep. 1996.

REGITANO, J. B. et al. Transformation Pathways of ¹⁴C-chlorothalonil in Tropics Soils. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, v. 40, p. 295-302, apr. 2001.

RIGOTTO, R. M.; VASCONDELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 7, p. 1-3, jul. 2014.

RIPPEL, M. M.; BRAGANÇA, F. C. Borracha natural e nanocompósitos com argila. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 818-826, 2009.

RIPPEL, M.M. **Caracterização microestrutural de filmes e partículas de látex de borracha natural**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências na área de Físico-Química) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química- UNICAMP – Campinas-SP.

RIPPEL, M.M.; GALEMBECK, F. Nanostructures and Adhesion Rubber: New Era for Classic. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1024-1030, 2009.

RIPPEL, M. M.; LEITE, C. A. P.; GALEMBECK, F. Elemental mapping in natural rubber latex films by electron energy loss spectroscopy associated with transmission electron microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 11, p. 2541-2546, 2002.

ROBERTS, T. et al. **Metabolic pathways of agrochemicals**: part 2: insecticides and fungicides. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999. p. 1380-1384.

ROMAN, S. S. et al. Reproductive and maternal toxicity of hydroalcoholic extract of *Sonchus oleraceus* in rats wistar. **Perspectiva**, Erechim, v. 38, n.141, p. 69-77, mar. 2014.

ROMAN, S. S. et al. Toxicidade renal e hepática em camundongos prenhes expostos à associação do ácido 2,4 diclorofenoxiacético e do glifosato. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 2, p. 152-171, jun. 2009.

ROMERO, A. H. H. et al. Water quality and presence of pesticides – Southern Mexico. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 11-12, p. 1130-1141, 2004.

ROQUETO, M. A. **Estudo da degradação do fungicida tiofanato metílico em meio aquoso por processos oxidativos avançados H₂O₂/uv Fenton e Fenton/uv**. Ribeirão Preto: Universidade de Ribeirão Preto, 2012. Disponível em: <<http://www.unaerp.br/index.php/documentos/692-marco-antonio-roqueto/file>>. Acesso em: fev. 2016.

ROSENBERG, B. G. et al. Gestational exposure to atrazine: effects on the postnatal development of male offspring. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 3, p. 304-11, may/jun. 2008.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. São Paulo: Ed. da Universidade Estadual Paulista, 1995. p. 223.

SARPA, M. et al. Developmental toxicity of triphenyltin hydroxide in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 43-52, oct. 2007.

SCHOON, G.F.; VAN DE BIE, G.J. Particle size distribution in brominated *Hevea* lattices. **Journal of Polymer Science**, v. 16, p. 63-88, mar. 1955.

SETHURAJ, M.R. **Natural rubber, biology, cultivation and technology**. Netherlands: Elsevier Sci, 1992.

SILVA, J. N.; ANTUNES, P. A.; FAVARETO, A. P. A. O consumo crescente de agrotóxicos e suas implicações na saúde reprodutiva. **Fórum Ambiental da Alta Paulista: Saúde, Saneamento e Meio Ambiente**, v. 10, n. 12, p. 270-285, 2014.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL. **Dados de produção e consumo de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.sindiveg.org.br/>>. Acesso em: mar. 2016.

SINGH, N. D. et al. Citrinin and endosulfan induced maternal toxicity in pregnant Wistar rats: pathomorphological study. **Journal of Applied Toxicology**, v. 27, n. 6, p. 589-601, dec. 2007.

SINZATO, Y. K. et al. Neonatally induced mild diabetes in rats and its effect on maternal, placental, and fetal parameters. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 1-7, apr. 2012.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. **Fundamentos de química analítica**. 8.ed. São Paulo: Thomson Learning, 2006.

SOULIMANE-MOKHTARI, N. A. et al. Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. **Clinical Science**, London. v. 109, n. 3, p. 287-295, sep. 2005.

SOUTHORN, W.A.; YIP, E. J. Rubb. **Journal of Rubber Research Institute Malaya**, v. 20, 1968.

SPIRO, T. G.; STIGLIANI, W. M. **Química ambiental**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2008-2009.

STAPLES, R.E.; SCHNELL, V.L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. **Stain Technology**, v.39, p. 61-63, jan. 1964.

SUZUKI, T.; KOMATSU, M.; ISONO, H. Cytotoxicity of organochlorine pesticides and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 20, n. 3, p. 271-4, mar. 1997.

US CONGRESS OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT. **Fundamentals of neurotoxicity**. [S.l.]: Office of Technology Assessment. April 1990. Chapter 3: Identifying and controlling poisons of the nervous system.

USEPA. **Reregistration eligibility decision chlorothalonil, prevention, pesticides and toxic substances.** [S.l.]: [s.n.], 1999.

USEPA. **Reregistration eligibility decision thiophanate-methyl, prevention, pesticides and toxic substances.** [S.l.]: [s.n.], 2005.

UZABAKILIHU, B.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 11, p. 3041-3045, 1987.

WICKERHAN, E. L. et al. Reduced birth weight in relation to pesticide mixtures detected in cord blood of full-term infants. **Environment International**, v. 47, p. 80-85, oct. 2012.

WILKINSON, C. F.; KILLEEN, J. C. A mechanistic interpretation of the oncogenicity of chlorothalonil in rodents and an assessment of human relevance. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 24, p. 69-84, aug. 1996.

WILSON, J. C. **Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animal: teratology: principles and techniques.** Chicago: The University of Chicago Press, 1965.

WILSON, V. S. et al. **The herbicide linuron reduces testosterone production from the fetal rat testis during both *in utero* and *in vitro* exposures.** **Toxicology Letters**, v. 186, n. 2, p. 73-77, jan. 2009.

ANEXO - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO – CEUA

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EXPOSIÇÃO A TIOFANATO METÁLICO E CLOROTALONIL: EFEITOS SOBRE A ESTRUTURA QUÍMICA DO LÁTEX DE SERINGUEIRA E O DESENVOLVIMENTO EMBRIOFETAL EM RATOS", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número nº 2242 e tendo como participante(s) ANA PAULA ALVES FAVARETO (responsável), PATRICIA ALEXANDRA ANTUNES (docente), ANA CAROLINY CARRION PEREIRA (discente), BRUNA OLIVEIRA DOS SANTOS (discente), JAQUELINE NASCIMENTO DA SILVA (discente), CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO (externo), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ACESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente, 30 de Novembro de 2015.



Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq



Prof. Ms. Adriana Falcão de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE