

Aspectos da Avaliação da Exposição ao Metalaxil

Vera Lúcia S. S. de Castro

Introdução

Atualmente a noção de sustentabilidade é considerada como relevante para a sociedade moderna e passa a concentrar a interface produção alimentar/meio ambiente. Assim é que a proposta de um desenvolvimento sustentável, incluindo a atividade agrícola, contempla a conservação dos recursos naturais, a utilização de tecnologias apropriadas e a viabilidade econômica e social. A medida que o ambiente torna-se essencial no plano da saúde da coletividade, o desenvolvimento sustentável tornou-se parte integrante de decisão política de saúde ambiental.

É, portanto, a relação risco benefício que deve nortear a escolha da utilização desses produtos. O risco refere-se à probabilidade de que um organismo ou uma determinada população sofra um dano. Esta avaliação é realizada, quanto à saúde ambiental, identificando órgãos ou sistemas afetados que podem levar a enfermidades e desequilíbrios, e estabelecer as condições de exposição e dose ao agroquímico que levam ao dano e/ou enfermidade.

O estudo de uma determinada substância e seu potencial para causar danos durante o desenvolvimento animal, envolve a avaliação e a integração de dados de diversas categorias de observações. Assim, utilizam-se diferentes testes envolvendo diferentes organismos na tentativa de obter-se uma visão imparcial dos efeitos da substância em estudo.

Sobre os agrotóxicos e os possíveis efeitos decorrentes da exposição ao metalaxil

1. Considerações gerais

O modelo de agricultura utilizado no Brasil visa geralmente obter uma máxima produtividade possível de acordo com o local e a capacidade biológica da planta. Entretanto, tal modelo, muitas vezes, desestabiliza os agroecossistemas, provocando danos à saúde animal e humana. Os sistemas de produção intensivos elevam a necessidade de uso de agroquímicos, os quais aumentam as concentrações residuais e a deriva de agroquímicos ocorridas durante o processo de aplicação dos produtos, causando entre outros problemas, prejuízo à saúde do trabalhador rural e às comunidades vizinhas.

O Brasil é o oitavo maior consumidor de agrotóxicos por hectare no mundo (FAIRBANKS, 2001), e o uso indiscriminado desses compostos no campo pode resultar na intoxicação dos trabalhadores rurais com diferentes graus de severidade, constituindo-se um grave problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (PIRES et al., 2005). Mais ainda, muitas vezes, o baixo nível sócio-econômico do trabalhador rural em especial no que se refere à saúde e educação, resulta em um padrão de exploração do meio ambiente além da capacidade de suporte, causando impactos negativos sobre a biodiversidade e sobre os recursos naturais. Os fatores de risco associados à maior ocorrência de acidentes são a classe social mais baixa (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001; FEHLBERG et al., 2001), a cor não-branca e a insatisfação com o trabalho realizado (FEHLBERG et al., 2001). Outros fatores como a linguagem técnica empregada em ações educativas e de treinamento e a pressão da indústria/comércio podem também ajudar no processo de comunicação que realimenta a inserção desfavorável do homem do campo em uma economia de mercado mais ampla (PERES et al., 2001). Contudo, muitas vezes o trabalhador desenvolve estratégias de defesa frente a percepção da situação de potencial dano à saúde (PERES et al., 2004).

Além do aplicador, esses produtos podem se distribuir no ambiente – solo, água - podendo provocar agravos à saúde da população do entorno quer em sua forma original quer como metabólitos. Eles podem entrar em um organismo por diversas vias de exposição. Por exemplo, quando os pesticidas são dispersos no ambiente, as populações das áreas próximas serão possivelmente expostas por inalação de gases ou

partículas, ingestão de água ou comida, ou absorção pela pele através do contato com água de chuva, mar, rio, de uso doméstico, etc.. Tal exposição pode ocorrer por uma série de motivos, entre eles: presença de agrotóxicos estocados na proximidade da moradia; proximidade de algumas residências à área de trabalho; ao manuseio doméstico da lavagem de roupas utilizadas na aplicação e divisão social do trabalho, que destina às mulheres pequenas tarefas, como a aplicação manual de produtos químicos (CASTRO et al., 1999).

Devido à complexidade, interações e variabilidade dos ecossistemas e seus organismos, é difícil prever riscos mesmo com base em respostas biológicas pois uma mesma perturbação pode levar a diferentes respostas dependendo das variações das condições ambientais.

2. Efeitos do metalaxil na saúde

O metalaxil é um fungicida largamente utilizado em várias culturas no Brasil e no mundo (DUREJA et al., 2000; MATTHEWS et al., 2003) e pertence à classe dos fungicidas sistêmicos do grupo dos alaninatos. Em relação à toxicidade do metalaxil no organismo não-alvo de forma geral e, em especial em seres humanos, ainda não se conhece bem seus possíveis efeitos. A degradação do metalaxil no rato ocorre primeiramente pela via hidrólise do éster metílico, seguida da N-dealquilação, clivagem do éter metílico e finalmente por oxidação do metil benzeno com subsequente formação de conjugados com ácido glucurônico.

Depois de uma única dose oral de ^{14}C Metalaxil em ratos machos e fêmeas foi observado que mais de 60% da radioatividade administrada foi excretada dentro de 24 horas. Após seis dias da aplicação, 37-63% da radioatividade foi excretada na urina e 35-66% nas fezes; principalmente na forma de metabólitos. Muitos dos metabólitos excretados na urina do rato estavam tanto na sua forma livre quanto conjugado com ácidos glucurônicos (FAO, 1983). Foi ainda encontrada radioatividade residual em gordura, sangue e vários órgãos como fígado, rim, músculo, cérebro, coração, pulmões, e ovários. Comparativamente, em outros trabalhos foram observadas no sangue altas concentrações de metalaxil e seus metabólitos em períodos superiores a 6 horas e até 18 horas (KALOYANOVA et al., 1991). Em uma avaliação da excreção de metalaxil com ratas, em doses que não provocaram sinais evidentes de toxicidade, foi observado aumento da concentração eliminada, nos dias seguintes às administrações. Contudo, o

fato que a proporção entre as quantidades de metalaxil excretado em relação ao tempo não permaneceu constante e sim aumentou em relação às doses estudadas (10 e 20 mg kg⁻¹), pode indicar que ocorreu um certo acúmulo do produto pelo organismo. Considerando que o fungicida também é extensivamente excretado na forma de metabólitos, não dosados no trabalho, uma outra possibilidade é a de que com o aumento da dose haveria um aumento da quantidade de metalaxil excretado sem ter sofrido metabolização (CASTRO et al., 2004). Estudos mais detalhados a respeito do metabolismo do metalaxil deverão esclarecer esses pontos.

O metalaxil ainda pode afetar a atividade de algumas monooxigenases em camundongos tratados intraperitonealmente com dose única de 200 ou 400 mg Kg⁻¹ ou 200 mg Kg⁻¹ por três dias (PAOLINI et al., 1996). Ele inibe a atividade da monoaminoxidase (MAO) - o que promove o acúmulo da dopamina, da norepinefrina e a serotonina nos seus sítios de ação - provavelmente por interferir com o metabolismo das aminas (NAIDU, 1989). O metalaxil induz bradicardia em ratos de forma dose-dependente. Após a administração intraperitoneal de metalaxil, os ratos podem desenvolver sintomas de intoxicação do sistema nervoso central tais como: tremores, extensão tônica, ataxia e hipnoses, na dependência da dose (NAIDU & RADHAKRISHNAMURTY, 1988). Devido ao fato de interferir com os sistemas catecolaminérgicos, o fungicida pode eventualmente ocasionar prejuízos endócrinos por vários mecanismos uma vez que desde que a diferenciação e a maturação sexual em ratos machos dependem de complexas interações entre o hipotálamo, pituitária anterior e eixo gonadal, os agrotóxicos podem afetar a maturação sexual (DUTTA & MEIJER, 2003; CUMMINGS & KAVLOCK, 2004).

Atualmente além da preocupação quanto aos riscos de intoxicação por exposição aguda e crônica aos agrotóxicos, também estão sendo estudados os potenciais efeitos teratogênico e mutagênico. Apesar do metalaxil não possuir uma atividade clastogênica evidente do DNA, ele pode provocar alterações na homeostase celular que podem estar implicadas no processo de carcinogênese (HRELIA et al., 1996). Além disso, apesar do metalaxil possuir baixa toxicidade para mamíferos, a combinação de impurezas presentes nos produtos técnicos provenientes dos processos de síntese e estocagem, podem levar a diferenças marcantes na toxicidade desses produtos (DUREJA et al., 2000). Uma das impurezas identificadas do metalaxil, o 2,6-xilidina, é um carcinógeno nasal em ratos (TYDEN et al., 2004).

Biomarcadores

A avaliação dos efeitos da exposição humana aos agroquímicos, conta atualmente com um número limitado de indicadores biológicos ou biomarcadores reconhecidos e validados como aqueles utilizados na avaliação da exposição e intoxicação por inseticidas organofosforados. Assim, o estudo de alguns dos mecanismos envolvidos na exposição aos agroquímicos e o conhecimento dos processos através dos quais os agroquímicos possam afetar os organismos alvo e não-alvo são essenciais para o desenvolvimento de parâmetros a serem empregados na avaliação dos riscos à saúde pública e na tomada de decisões quanto à segurança de seu uso (LESKO & ATKINSON, 2001).

A análise do risco de contaminação de populações expostas envolve o conhecimento das fontes de emissão dos contaminantes e de suas transformações, do transporte e do acúmulo dos mesmos no ambiente, das rotas de ingresso no organismo, da biodisponibilidade, da dose biologicamente efetiva e de possíveis efeitos prejudiciais à saúde desses organismos. Desta forma, pode-se realizar dois tipos de monitoramento da exposição de uma população: (a) o monitoramento ambiental que é uma avaliação direta e que qualifica e/ou quantifica a exposição no ambiente (água, ar solo), e (b) o monitoramento biológico que é uma avaliação indireta e que qualifica e/ou quantifica a exposição de um indivíduo da população ou de uma amostra da população em amostras biológicas.

Para a realização do monitoramento biológico é necessário o conhecimento de um indicador biológico ou biomarcador. Estes indicadores devem expor os problemas e suas causas e serem úteis para alcançar os objetivos das políticas referentes à saúde (AMORIM, 2003). O biomarcador deve, tanto quanto possível, prover uma análise dos efeitos de estressantes ambientais, envolvendo a medida de respostas biológicas em uma escala temporal que evidencie alterações sutis, além de trazer informações quanto ao seu mecanismo de ação. A observação desses efeitos pode indicar sinais iniciais de alerta (AITIO & KALLIO, 1999). Nesse aspecto, é adequado desenvolver escalas de respostas biológicas em relação ao tempo que sejam sensíveis a severidade da exposição (efeito dose-resposta) e que espelhem a suscetibilidade de dano, principalmente aquele que se reflete no desenvolvimento dos jovens da população, após a exposição aos agroquímicos. Contudo, nem sempre é possível aos biomarcadores determinar um efeito específico ocasionado por um agroquímico e expressar correlações

diretas lineares devido à presença de vários agroquímicos no ambiente ou ainda estabelecer o poder estatístico adequado dos parâmetros usados nas correlações entre os efeitos observados e a exposição em amostras populacionais (ALONSO et al., 2004; CONOLLY & LUTZ, 2004; GAYLOR et al., 2004).

A fim de proceder ao monitoramento biológico, podem-se utilizar indicadores biológicos: a) de dose interna, acúmulo ou depósito que quantificam a substância e/ou seus metabólitos no organismo e relacionam a exposição ambiental à dose interna (relação dose-resposta); b) de efeito, que avaliam os efeitos biológicos que se traduzem em alterações funcionais celulares capazes de evidenciar as alterações que se instalam no órgão-alvo, como as alterações bioquímicas e celulares. O indicador biológico de efeito estabelece a relação entre a exposição e o efeito tóxico refletida em alterações pré-clínicas e agravos à saúde (hepatotoxicidade, neurotoxicidade); e c) de suscetibilidade ou genético, que procura o entendimento dos mecanismos relacionados a ação tóxica e o grau de resposta nos indivíduos (AMORIM, 2003).

Os biomarcadores de dose interna podem ser incorporados a modelos baseados na toxicocinética (*Physiologically Based Pharmacokinetic Models* - PBPK) para sua calibração e validação. A toxicocinética inclui os processos envolvidos desde a disponibilidade química até a concentração do toxicante nos órgãos alvo (absorção, distribuição, armazenamento, biotransformação e eliminação das substâncias inalteradas ou dos seus metabólitos). Esses estudos permitem avaliar as diferenças das vias de biotransformação entre diferentes espécies e a possível extrapolação para o homem através de modelos biológicos experimentais, ou mesmo estudar diferenças toxicocinéticas entre crianças e adultos. Assim, os biomarcadores podem ser usados para avaliar as relações dose-resposta em uma população e que possibilitam prever a distribuição do toxicante no organismo após diferentes períodos da exposição (GENTRY et al., 2003; DIACK & BOIS, 2005).

Influência do fator idade na toxicidade

O reconhecimento dos fatores que influenciam a toxicidade de um determinado nível de exposição a um agroquímico é fundamental na determinação do risco de exposição a estes agentes em populações. Entre os diversos fatores, a idade reveste-se de especial importância, uma vez que a fisiologia difere entre recém-nascidos, crianças e adultos. Em vários casos, os organismos mais jovens são mais suscetíveis aos efeitos

tóxicos dos contaminantes ambientais. Em crianças, a sensibilidade a possíveis efeitos tóxicos dos agroquímicos é por vezes maior que nos adultos, podendo sofrer danos com doses menores (MOSER et al., 2001; SCHEUPLEIN et al., 2002; COSTA et al., 2004). Esta sensibilidade seria resultante da diferença entre a fisiologia dos recém-nascidos, crianças e adultos em decorrência de alguns fatores como área corporal, relação da massa cerebral e corporal, período de desenvolvimento, ventilação, função renal e atividade enzimática (GENTRY et al., 2003).

Entre o grande número de pesticidas atualmente utilizados muitos possuem potencial mutagênico e embriofetotóxico. A exposição de fêmeas a pesticidas durante a fase reprodutiva pode levar a alterações no desenvolvimento animal (CASTRO, 2000a; 2000b; 2004). Embora o organismo materno possa alterar um químico ou pelo menos reduzir sua concentração, a função da placenta como barreira é limitada. Moléculas de muitas substâncias podem atravessá-la, tanto por simples difusão como por algum tipo de transporte ativo. Portanto, muitos toxicantes ou quaisquer outras substâncias que penetrem na fêmea prenhe, podem atingir o feto. A ocorrência de períodos críticos no desenvolvimento animal, durante a prenhez e imediatamente após o nascimento, permite o entendimento de algumas destas modificações (COSTA et al., 2004).

Contudo, diferentes suscetibilidades não implicam necessariamente em maiores riscos em crianças. O efeito real vai depender dos mecanismos fisiometabólicos e das características do produto em estudo (SCHEUPLEIN et al., 2002; ZWART et al., 2004). O biomonitoramento das possíveis conseqüências à exposição aos agroquímicos é, portanto, importante no que se refere a efeitos no desenvolvimento animal e potencial neurotoxicidade (NEWLAND et al., 2003; CHELONIS et al., 2004) e efeitos genotóxicos (TAIOLI & BONASSI, 2002). Baseado no fato de que as crianças são geralmente mais sensíveis que os adultos aos efeitos neurotóxicos e comportamentais, a reversibilidade dos efeitos neurotóxicos com o amadurecimento do organismo deve ser avaliada com cuidado em testes experimentais, mesmo na ausência da observação de sinais evidentes de dano neurológico (KIMMEL & MAKRIS, 2001).

Testes com animais

Os dados laboratoriais (testes com animais) aliados aos de campo (estudos epidemiológicos) são fundamentais no processo de avaliação de risco no tocante ao estabelecimento de quais são os efeitos na saúde decorrentes da exposição ambiental a

um contaminante. Assim, os modelos de estudo com animais tem sido amplamente utilizados na avaliação de possíveis prejuízos em decorrência da exposição aos agroquímicos.

Muitos agroquímicos afetam o sistema reprodutivo e os testes confirmam informações de seus efeitos sobre vários aspectos deste, incluindo gestação, parto, lactação, desmame, crescimento e desenvolvimento da prole (CLAUDIO et al., 1999). Tem-se procurado melhorar os protocolos experimentais disponíveis e adicionar alvos de estudo que possam fornecer uma melhor caracterização dos efeitos da exposição a esses compostos (LIMA, 2003). A fim de determinar os riscos através da exposição a substâncias químicas em humanos, muitas agências nacionais (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis- IBAMA) ou internacionais (U.S. Environmental Protection Agency- USEPA e *Organization for Economic Co-operation and Development*- OECD) requerem testes toxicológicos específicos. Uma revisão dos protocolos de testes requeridos pela USEPA levou à extensão do período de exposição a termo nos estudos de toxicidade pré-natal, neurotoxicidade, carcinogenicidade, entre outros, consistindo numa bateria de estudos de toxicidade, utilizando roedores e não roedores (KIMMEL & MAKRIS, 2001; REUTER et al., 2003). A evolução dos métodos de avaliação referentes aos testes de efeitos reprodutivos e no desenvolvimento animal aliada à adequação da legislação tem respondido ao estudo desses efeitos e estimulado a melhora dos protocolos de avaliação de neurotoxicidade decorrentes da exposição aos agroquímicos; o que será capaz de otimizar a detecção de possíveis efeitos relacionados à exposição (MEYER, 2003).

As avaliações cuidadosas sobre o desenvolvimento animal freqüentemente incluem, além das observações quanto ao aparecimento de sinais físicos, os aspectos referentes ao desenvolvimento neurocomportamental (ALDER, 1983). Na maioria das vezes, a toxicidade e em especial a neurotoxicidade ocasionada pela exposição a substâncias tóxicas é avaliada de acordo com algumas baterias de testes, descritas na literatura internacional. Contudo, tais baterias variam de acordo com as recomendações e/ou legislação de cada país ou de acordo com critérios estabelecidos pelos pesquisadores envolvidos no trabalho. Essas baterias podem ser realizadas através: (a) da aplicação de questionários, exames clínicos (ex: dano de condutividade nervosa periférica) e avaliações comportamentais no caso de seres humanos ou (b) da realização de protocolos experimentais em animais de laboratório. Um exemplo de bateria de testes

descrito é denominado FOB (*Functional Observational Battery*) (MOSER et al., 2001; 2004).

Exposição de ratas ao metalaxil e avaliação de alguns parâmetros reprodutivos

O objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos do metalaxil na reprodução e desenvolvimento animal em organismos expostos perinatalmente para o estabelecimento de indicadores desta exposição. Para tanto, foram realizados testes com alguns parâmetros reprodutivos em ratas expostas ao metalaxil bem como foram procedidas as observações de alguns possíveis efeitos neuromotores e comportamentais em seus filhotes.

Os animais utilizados foram ratos Wistar, mantidos em condições padronizadas de luz, umidade e temperatura no Biotério do Laboratório de Ecotoxicologia CNPMA – Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna – SP), sendo as matrizes fornecidas pelo Biotério Central da UNICAMP (Universidade de Campinas). Os animais foram alojados em grupo de 3 a 4 em gaiolas de polipropileno com cama de maravalha autoclavada. As gaiolas foram devidamente colocadas em salas com temperatura e umidade controladas ($22 \pm 2^\circ \text{C}$ e 65 a 70%, respectivamente) por meio de aparelhos de ar condicionado, ventilação e sistema de exaustão; iluminação artificial com um ciclo de luz claro – escuro 12h/12 horas, com início da fase clara às 7:00 horas. Água e comida (ração) foram fornecidas a vontade aos animais durante todo o período dos procedimentos experimentais.

Ratas fêmeas foram previamente examinadas e selecionadas para que estivessem nas fases de proestro/estro e tivessem ciclo estral regular, sendo distribuídas ao acaso em número de duas em gaiolas de polipropileno com um rato macho adulto para que ocorresse o acasalamento. Na manhã seguinte, o rato era retirado da gaiola e os esfregaços vaginais das fêmeas coletados. A presença de espermatozóide no lavado vaginal das ratas foi considerada como indicativa do 1º dia de prenhez e todas as fêmeas que apresentavam diagnósticos positivos foram, neste momento, separadas em gaiolas individuais.

O fungicida foi testado em várias doses. O metalaxil foi suspenso em água destilada esterilizada para que a dose administrada fosse de 10 e 20 mg kg⁻¹. O produto quando administrado na dosagem 20 mg kg⁻¹, mostrou-se tóxico aos animais utilizados que apresentaram tremores e insuficiência respiratória após a exposição.

As ratas foram divididas ao acaso, em grupos, conforme abaixo:

1. Grupo controle 1 (**Salina A**): Animais que receberam apenas o veículo (solução fisiológica) no período 1° ao 6° dia de prenhez;
2. Grupo controle 2 (**Salina B**): Animais que receberam apenas o veículo (solução fisiológica) no período de 6° ao 15° dia de prenhez;
3. Grupo Metalaxil **A1 (MET A1)**: Animais que receberam metalaxil na concentração 10 mg kg⁻¹ no período 1° ao 6° dia de prenhez;
4. Grupo Metalaxil **A2 (MET A2)**: Animais que receberam metalaxil na concentração 20 mg kg⁻¹ no período 1° ao 6° dia de prenhez;
5. Grupo Metalaxil **B1 (MET B1)**: Animais que receberam metalaxil na concentração 10mg kg⁻¹ no período 6° ao 15° dia de prenhez;
6. Grupo Metalaxil **B2 (MET B2)**: Animais que receberam metalaxil na concentração 20mg kg⁻¹ no período 6° ao 15° dia de prenhez;

As taxas de viabilidade ao nascimento e ao desmame foram avaliadas conforme (Tabela 6.1): VN = 100 x (número de filhotes natimortos / nascidos vivos) e VD = 100 x (número de filhotes desmamados / nascidos vivos)

As ratas foram mantidas em gaiolas-moradias com as suas respectivas crias. O número de ratos usados em cada grupo é apresentado nas tabelas entre parênteses. O peso das fêmeas e de suas proles foi observado diariamente durante todo o teste e do nascimento ao desmame (1° – 21° dias /vida) no período da manhã. Os filhotes continuaram sendo observados e pesados até a fase adulta nos dias 30, 60 e 90 de idade (Tabelas 6.2, 6.3 e 6.4).

Tabela 6.1: Avaliação da taxa de viabilidade ao nascimento e da taxa de viabilidade ao desmame, em ratas expostas por grupo ao fungicida metalaxil.

Grupos	Taxa de viabilidade (%)	
	Nascimento	Desmame
Sal A (10)	96,00 (96/100)	61,00 (61/100)
Met A1 (7)	89,48 (34/38)	100,00 (38/38)
Sal B (10)	98,70 (77/78)	67,53 (52/77)
Met B1 (9)	100,00 (87/87)	87,35 (76/87)

Tabela 6.2. Peso em gramas das ratas expostas ao metalaxil no 1º, 7º, 14º. e 20º. dias de prenhez. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões.

Grupos/ dias	1º	7º	14º	21º
Sal A (10)	223,24 ± 26,91	247,13 ± 25,68	264,30 ± 23,43	327,19 ± 24,89
Met A1 (7)	233,40 ± 22,96	252,14 ± 20,30	266,48 ± 18,83	314,75 ± 21,13
Sal B (10)	215,71 ± 15,19	236,31 ± 12,56	249,46 ± 12,54	295,55 ± 21,04
Met B1 (9)	240,35 ± 16,14	254,21 ± 20,11	259,48 ± 21,57	321,24 ± 19,87

Tabela 6.3. Peso em gramas dos filhotes das ratas no período de lactação (1º- 23º dias de vida). São apresentados as médias e os respectivos desvios padrões.

Grupos	Dias de vida			
	1º	7º	14º	21º
Salina A (10)	6,26 ± 0,56	11,30 ± 2,45	22,57 ± 4,19	37,37 ± 5,59
Met A1 (7)	6,47 ± 0,61	14,98 ± 2,22	25,78 ± 4,91	41,31 ± 8,06
Salina B (10)	6,39 ± 0,37	11,53 ± 2,23	21,19 ± 5,42	35,63 ± 6,75
Met B1 (9)	6,57 ± 0,35	12,53 ± 1,06	22,14 ± 2,49	35,07 ± 4,29

Tabela 6.4: Média e os respectivos desvios-padrões dos pesos (em gramas) dos filhotes no 30º, 60º e 90º dias de vida.

Grupos	30	60	90
Sal A (27)	70,00 ± 10,09	174,28 ± 29,19	230,13 ± 49,87
Met A1 (15)	81,16 ± 4,76	186,52 ± 36,89	240,66 ± 66,62
Sal B (27)	66,85 ± 8,14	172,22 ± 28,87	223,08 ± 47,79
Met B1 (18)	70,00 ± 5,85	173,77 ± 35,51	234,11 ± 42,28

Foram observadas a presença e a ausência de: a) reflexo de endireitamento: três filhotes de cada ninhada foram colocados sobre a mesa, em decúbito dorsal; mediu-se o tempo gasto para que voltassem a posição anterior, ou seja, apoiados sobre as quatro patas e, b) geotaxia negativa: três filhotes de cada ninhada foram colocados com a cabeça para baixo em uma plataforma a 25º e mediu-se o tempo gasto em segundos para que se reorientasse, ou seja, vire o corpo em 180º. Os filhotes tiveram 1 minuto para se reorientar. A observação desses dois testes foi feita de acordo com a idade dos filhotes e por determinado número de dias consecutivos, respectivamente entre os dias 2 a 5 e 7 a 11 (Tabela 6.5 e 6.6).

Tabela 6.5. Latência em segundos para o reflexo de endireitamento de filhotes de ratas expostos ao metalaxil com 2 a 5 dias de vida. São apresentados as médias e os respectivos desvios-padrões.

Grupos	Dias de vida			
	2º	3º	4º	5º
Salina A (30)	3,59 ± 3,22	2,16 ± 0,93	2,29 ± 1,64	2,13 ± 0,75
Met A2 (21)	5,52 ± 5,33	3,56 ± 3,25	1,80 ± 0,63	2,02 ± 1,03
Salina B (30)	4,76 ± 2,38	3,26 ± 1,62	1,26 ± 0,43	1,10 ± 0,31
Met B2 (27)	3,37 ± 1,20	4,74 ± 6,98	2,03 ± 0,87	1,95 ± 0,93

Tabela 6.6. Latência em segundos para a geotaxia negativa de filhotes de ratas expostos ao metalaxil ao 7º ao 11º dias de vida. São apresentados as médias e os respectivos desvios padrões.

Grupos	Dias de Vida				
	7º	8º	9º	10º	11º
Sal A (30)	23,66 ± 17,81	22,46 ± 17,94	18,03 ± 13,28	14,80 ± 12,83	13,26 ± 12,48
Met A2 (21)	29,57 ± 20,94	30,57 ± 22,04	28,65 ± 19,50	21,23 ± 17,60	11,28 ± 9,72
Sal B (30)	51,03 ± 18,47	39,90 ± 23,92	24,20 ± 23,25	22,40 ± 22,34	14,06 ± 17,01
Met B2 (27)	27,07 ± 20,53	18,92 ± 15,88	13,55 ± 13,50	15,11 ± 14,88	10,38 ± 7,27

Os dados de literatura a respeito do metalaxil em relação ao tema aqui abordado são geralmente escassos. Não se observaram alterações, quer na taxa de viabilidade ao nascimento quer na viabilidade ao desmame. De igual forma não se observaram modificações produzidas pelo fungicida na duração da prenhez, no peso dos filhotes ao nascer, no peso das ratas prenhes e ao desmame até a idade adulta. A inibição da MAO (monoamina oxidase) (NAIDU, 1989) pode estar envolvida nos prejuízos observados com a administração de doses maiores de metalaxil as ratas, uma vez que esta enzima é a principal rota de inativação de catecolaminas intraneurais. Estudos posteriores poderão confirmar essa hipótese.

Com o avanço do período gestacional, a unidade fisiológica mãe/placenta/feto passa por consideráveis alterações fisiológicas. Estas alterações promovem variações nos processos de absorção, distribuição e eliminação de xenobióticos. Tais alterações evidenciam-se melhor quando os organismos estão expostos às doses altas de um pesticida. Problema maior surge na tentativa de determinarem-se prejuízos das doses menores às sub-clínicas (que não produzem sinais tóxicos evidentes), que podem confundir-se com outros fatores alterando a reprodução animal e causando, por sua vez, efeitos mais sutis e não menos importantes. O desenvolvimento dos reflexos aqui estudados aparentemente não foram alterados pela exposição ao metalaxil.

Conclusão

De forma geral, conclui-se que o metalaxil não produziu efeitos prejudiciais no desenvolvimento dos filhotes na dose de 10 mg kg⁻¹ durante os períodos analisados no presente trabalho. Contudo, em doses maiores e em um período maior de observação,

ocorreram sinais de toxicidade nas ratas que receberam 20 mg kg⁻¹ do metalaxil, com dificuldade respiratória.

Agradecimento

Agradecemos a valiosa colaboração das estagiárias Helen Juliana Herget de Jesus e Karina Kleinfelder do Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança na realização das análises apresentadas nesse texto.

Referências

- AITIO, A.; KALIO, A. Exposure and effect monitoring: a critical appraisal of their practical application. *Toxicology Letters*, v.108, p.137-147, 1999.
- ALDER, S. Behavioral teratology. In: ZBINDEN, Q.; RACAGNI, G.; CUOMO, V.; WEISS, B. *Application of behavioral pharmacology in toxicology*. New York: Raven Press, 1983. p. 57-66.
- ALONSO, A.; GEYS, H.; MOLENBERGHS, G.; KENWARD, M.; VANGENEUGDEN, T. Validation on surrogate markers in multiple randomized clinical trials with repeated measurements: canonical correlation approach. *Biometrics*, v. 60, p. 845-853, 2004.
- AMORIM, L. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 6, supl. 1, p. 1-13, 2003.
- CASTRO, V.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Biological monitoring of embryo-fetal exposure to methamidophos or chlorothalonil on rat development. *Veterinary and Human Toxicology*, v.42, p. 361-365, 2000a.
- CASTRO, V.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. *Toxicology Letters*, v.118, p.93-102, 2000b.
- CASTRO, V.; FERRACINI, V.; KLEINFELDER, K.; TESSARI, C. *Biomonitoramento de fungicidas na urina de ratas prenhas: estudo do metalaxil*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa).
- CASTRO, V.; GÓES, K.; CHIORATO, S. Developmental toxicity potential of paclobutrazol in the rat. *International Journal of Environmental Health Research*, v. 14, n. 5, p. 371-380, 2004.
- CASTRO, V.; SILVEIRA, M.; PEREZ, M. Application of clinical indicators of exposition in the evaluation of family agriculture health: the Sumaré case – Brazil. *International Journal of Sustainable and Developmental World Ecology*, v. 6, p.172-184, 1999.
- CHELONIS, J.; FLAKE, R.; BALDWIN, R.; BLAKE, B.; PAULE, M. Developmental aspects of timing behavior in children. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 26, p. 461-476, 2004.
- CLAUDIO, L.; BEARER, C.F.; WALLINGA, D. Assessment of the U.S. Environmental Protection Agency methods for identification of hazards to developing organisms, part I: The reproduction and fertility testing guidelines. *American Journal of Industrial Medicine*, v. 35, p. 543-553, 1999.

- CONOLLY, R.; LUTZ, W. Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicological Sciences*, v. 77, p.151-157, 2004.
- COSTA, L.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.44, p. 87-110, 2004.
- CUMMINGS, A.; KAVLOCK, R. Gene-environment interactions: a review of effects on reproduction and development. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 34, n. 6, p. 461-485, 2004.
- DIACK, C.; BOIS, F. Pharmacokinetic-pharmacodynamic models for categorical toxicity data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.41, p. 55-65, 2005.
- DUREJA, P.; TANWAR, R. S.; CHOUDHARY, P. P. Identification of impurities in technical metalaxyl. *Chemosphere*, v. 41, p.1407-1410, 2000.
- DUTTA, H.; MEIJER, H. Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. *Environmental Pollution*, v.125, n.3, p. 355-60, 2003.
- FAIRBANKS, M. Defensivos agrícolas ampliam o mercado. *Química e Derivados*, n. 396, p. 398-403, 2001.
- FAO. Pesticide residues in food: 1982 evaluations. *FAO Plant Production and Protection Paper*, v. 61, p. 259-302, 1983.
- FEHLBERGA, M.F.; SANTOS, I.; TOMASIB, E. Prevalência e fatores associados a acidentes de trabalho em zona rural. *Revista de Saúde Pública*, v. 35, n. 3, p. 269-275, 2001.
- GAYLOR, D.; LUTZ, W.; CONOLLY, R. Statistical analysis of nonmonotonic dose-response relationships: research design and analysis of nasal cell proliferation in rats exposed to formaldehyde. *Toxicological Sciences*, v. 77, p.158-164, 2004.
- GENTRY, P.; COVINGTON, T.; CLEWELL III, H. Evaluation of the potential impact of pharmacokinetic differences on tissue dosimetry in offspring during pregnancy and lactation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 38, p. 1-16, 2003.
- GOLDEN, N.; RATTNER, B. Ranking terrestrial vertebrate species for utility in biomonitoring and vulnerability to environmental contaminants. *Reviews of Environmental Contamination Toxicology*, v. 176, p. 67-136, 2003.
- HRELIA, P.; MAFFEI, F.; FIMOIGNARI, C.; VIGAGNI, F.; CANTELLI-FORTI, G. Cytogenetic effects of metalaxyl on human and animal chromosomes. *Mutation Research*, v. 369, n.1-2, p. 81-86, 1996.
- KALOYANOVA, F.; IVANOVA-CHEMISHANSKA, L.; ZAYKOV, H.R.; BAYNOVA, A.; MIHAYLOVA, A.; MIRCHEVA, V.; ANTON, G.; SHUMKOV, N.; VERGIEVA, T.; HALKOVA, Z.H.; ILIEVA, P.; BARDAROV, V. Toxicological evaluation of agromet (metalaxyl) preparation. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, v. 35, p. 375-382, 1991.
- KIMMEL, C.; MAKRIS, S. Recent developments in regulatory requirements for developmental toxicology. *Toxicology Letters*, v.120, p. 73-82, 2001.
- LESKO, L.; ATKINSON, JR., J. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: Criteria, validation, strategies. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 41, p. 347-366, 2001.
- LIMA, B. Juvenile animals in safety testing: the european regulatory perspective. *Reproductive Toxicology*, v. 17, n. 4, p. 476-477, 2003.
- MATTHEWS, G.; WILES, T.; BALEGUEL, P. A survey of pesticide application in Cameroon. *Crop Protection*, v. 22, p. 707-714, 2003.
- MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicology Letters*, v.140-141, p. 21-30, 2003.

- MOSER, V.; PHILLIPS, P.; LEVINE, A.; McDANIEL, K.; SILLS, R.; JORTNER, B.; BUTT, M. Neurotoxicity produced by dibromoacetic acid in drinking water of rats. *Toxicological Sciences*, v.79, p.112-122, 2004.
- MOSER, V.; SHAFER, T.; WARD, T.; MEACHAM, C.; HARRIS, M.; CHAPIN, R. Neurotoxicological outcomes of perinatal heptachlor exposure in the rat. *Toxicological Sciences*, v.60, p.315-326, 2001.
- NAIDU, K.; RADHAKRISHNAMURTY, R. Metalaxyl-induced bradycardia in rats: mediated by α -adrenoreceptors. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 23, n. 4, p. 495-498, 1988.
- NAIDU, K. Inhibition of monoamine oxidase by the fungicide metalaxil. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 27, n. 3, p. 395-398, 1989.
- NEWLAND, M.; PENNYPACKER, H.; ANGER, W.; MELE, P. Transferring behavioral technology across applications. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 25, p. 529-542, 2003.
- OLIVEIRA-SILVA, J.; ALVES, S.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P.; MATTOS, R.; MOREIRA, J. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 35, n. 2, p. 130-135, 2001.
- PAOLINI, M.; MESIRCA, R.; POZZETTI, L.; SAPONE, A.; CANTELLI-FORTI, G. Biomarkers of effect in evaluating metalaxyl cocarcinogenesis. Selective induction of murine CYP 3A isoform. *Mutation Research*, v. 361, n. 2-3, p. 157-164, 1996.
- PERES, F.; DE LUCCA, S.; DA PONTE, L.; RODRIGUES, K.; ROZEMBERG, B. Percepção das condições de trabalho em uma tradicional comunidade agrícola em Boa Esperança, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 20, p. 1059-1068, 2004.
- PERES, F.; ROZEMBERG, B.; ALVES, S.; MOREIRA, J.; OLIVEIRA-SILVA, J. Comunicação relacionada ao uso de agrotóxicos em região agrícola do Estado do Rio de Janeiro. *Revista de Saúde Pública*, v. 35, n. 6, p. 564-570, 2001.
- PIRES, D.; CALDAS, E.; RECENA, M.C. Uso de agrotóxicos e suicídios no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 21, p. 598-605, 2005.
- REUTER, U.; HEINRICH-HIRSCH, B.; HELLWIG, J.; HOLZUM, B.; WELSCH, F. Evaluation of OECD screening tests 421 (reproduction/developmental toxicity screening test) and 422 (combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 38, p.17-26, 2003.
- SCHEUPLEIN, R.; CHARNLEY, G.; DOURSON, M. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity I. Biological basis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.35, p.429-447, 2002.
- TAIOLI, E.; BONASSI, S. Methodological issues in pooled analysis of biomarker studies. *Mutation Research/ Reviews in Mutation Research*, v.512, p.85-92, 2002.
- TYDEN, E.; TJALVE, H.; LARSSON, P. Metabolic activation of 2,6-xylidine in the nasal olfactory mucosa and the mucosa of the upper alimentary and respiratory tracts in rats. *Toxicological Sciences*, v. 81, p. 263-272, 2004.
- ZWART, L.; HAENEN, H.; VERSANTVOORT, C.; WOLTERINK, G.; VAN ENGELN, J.; SIPS, A. Role of biokinetics in risk assessment of drugs and chemicals in children. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 39, p. 282-309, 2004.