

FUNGICIDAS ETILENO-BISDITIOCARBAMATOS: ASPECTOS DE  
GENOTOXICIDADE, CARCINOGENICIDADE E TERATOGENICIDADE

CESAR KOPPE GRISOLIA\*

Os fungicidas Etíleno-bisditiocarbamatos (EDBC) são utilizados na agricultura há mais de quarenta anos, principalmente em importantes culturas para consumo humano, tais como cereais, frutas e legumes. Entretanto, os efeitos adversos deste grupo de fungicidas sobre a saúde humana são preocupantes, especialmente aqueles relacionados à mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade. Quanto à mutagenicidade verifica-se a existência de uma série de resultados positivos em diferentes sistemas biológicos, como também alguns resultados negativos. Os testes de carcinogênese experimental em roedores apresentaram resultados positivos para a tireoide, e em nível de epidemiologia os dados ainda são inconclusivos. Com relação à teratogenicidade tem-se um fator complicante, a etilenotioúrea (ETU), o principal produto de degradação dos fungicidas EDBC, que pode atingir quantidades de até 20% durante tal processo. Assim, tanto os fungicidas EDBC como a ETU apresentam resultados positivos de teratogênese em roedores. Esta revisão discute tais especialidades toxicológicas dos fungicidas etíleno-bisditiocarbamatos.

\* Doutor em Genética pela Universidade de São Paulo, Professor Adjunto da Universidade de Brasília

## 1 INTRODUÇÃO

Nos países do terceiro mundo tem ocorrido crescente aumento no uso de pesticidas, tanto na agricultura como nos programas governamentais de controle de vetores de doenças parasitárias. Entretanto, a maioria dos pesticidas é importada dos países industrializados, nos quais estão sob severas regulamentações de uso. Esta utilização intensa acarreta excesso de resíduos nos alimentos, exposição humana e contaminações ambientais (1). Neste contexto, pode-se verificar a grande preocupação da comunidade científica internacional com os efeitos destes compostos químicos sobre o patrimônio genético das populações, em nível de epidemiologia do câncer e das mal-formações congênitas.

Os fungicidas etileno-bisditiocarbamatos (EBDC) pertencem ao grupo químico dos ditiocarbamatos. Seus produtos formulados são largamente empregados na agricultura como fungicidas não-sistêmicos, controlam amplo espectro de fungos, principalmente em regiões quentes e úmidas. São indicados para uso em ampla variedade de cereais, frutas, verduras e legumes, apresentando-se em produto formulado como Mancozeb, Maneb, Zineb e Metiram.

Estudos sobre a farmacocinética dos fungicidas EBDC em camundongos, demonstraram que o Mancozeb é rapidamente absorvido após administração oral, atingindo seu pico no nível plasmático após duas horas. É rapidamente metabolizado e excretado tanto pelas fezes como pela urina.

No teste crônico em ratos, os quais foram tratados via dieta com concentrações de 0; 60; 125 e 750 ppm por dois anos, encontrou-se os seguintes resultados: decréscimo no ganho de peso corpóreo; decréscimo nos níveis dos hormônios tireoidianos T<sub>3</sub> (triodotirosina) e T<sub>4</sub> (tiroxina); aumento nos níveis do hormônio estimulante da tireoide (TSH); aumento de peso da tireoide; e hipertrofia das células foliculares da tireoide com 750 ppm. Os efeitos tumorais foram observados em ambos os sexos na forma de adenomas e carcinomas de células foliculares da tireoide na concentração mais alta (2).

## 2 GENOTOXICIDADE

Com relação ao potencial de mutagenicidade dos fungicidas EBDC, verifica-se respostas positivas em diferentes microrganismos: em *Saccharomyces cereviseae* linhagem D3, tanto o Mancozeb como o Maneb e o Zineb induziram aumentos significativos nas freqüências de recombinantes quando submetidos ao sistema de ativação metabólica. Em *Aspergillus nidulans* houve a indução de mutações gênicas (3 e 4). Tais respostas são as de maior sensibilidade, pois relacionam-se aos ensaios de mutagenicidade com fungicidas sobre fungos. Mediante testes em nível molecular *in vitro*, o Mancozeb e o Maneb induziram aumentos na síntese não-programada de DNA em fibroblastos de pulmão humano (3). ARIAS (5) avaliou os efeitos da

formulação comercial do Maneb 80 em embriões de galinha, onde os ovos em fase embrionária foram tratados via imersão por 30 segundos com doses de 0,5; 1,5; 4,5; 13,5 e 27,0 g/L de Maneb em solução aquosa e em seguida incubados por quatro dias. Nestas condições houve aumento nas freqüências de trocas entre cromátides irmãs (TCI), entretanto não houve indução de aberrações cromossômicas. Doses de 0,5 a 4,5 g/L não induzem TCI, e na dose de 27,0 g/L na qual a freqüência de TCI dobra em relação aos controles, há mortalidade de embriões muito alta (cerca de 70%), sendo esta dose acima de dez vezes à recomendada para uso no campo. GEORGIAN e colaboradores (6) estudaram os efeitos do Mancozeb sobre as células de medula óssea de ratos Wistar (teste *in vivo*) e sobre os linfócitos humanos em cultura temporária (teste *in vitro*). Seus dados indicaram que o Mancozeb induziu aumento na frequência de aberrações cromossômicas de modo dose-dependente, tanto nos ratos como nos linfócitos humanos.

JABLONICKÁ et al (7) investigaram 44 trabalhadores expostos profissionalmente durante a produção do fungicida Mancozeb (Novozir 80). Todos os componentes da amostra estavam em idade reprodutiva, homens e mulheres com idade média de 28 e 31 anos, respectivamente. Os dados obtidos nesta avaliação foram comparados com os de uma população controle com as mesmas características, mas sem o histórico de exposição ao Mancozeb. Os resultados mostraram claramente que houve aumento estatisticamente significativo nas freqüências de aberrações cromossômicas e trocas entre

cromátides irmãs na população exposta ao Mancozeb. Entretanto, havia grande diferença entre o número de fumantes na população exposta (25 fumantes) contra 5 não fumantes no grupo de 30 controles. Sabe-se que o tabagismo pode interferir neste tipo de avaliação, principalmente quanto às freqüências de trocas entre cromátides irmãs. NEWTON & LILLY (8) detectaram efeitos clastogênicos do Dithane M-45, cujo princípio ativo é o Mancozeb, em linfócitos de ratos tratados *in vitro*. VASUDEV e KRISHNAMURTHY (9) não observaram efeitos mutagênicos do Dithane M-45, através do teste de indução de mutação recessiva letal ligada ao sexo em *Drosophila melanogaster*. Estes mesmos autores (10) realizando análises citogenéticas *in vivo* em espermatozônias e células de medula óssea de camundongos, também não observaram induções de aneuplóides ou poliplóides, aberrações cromossômicas e aumento nas freqüências de micronúcleos. TAMBASCO e colaboradores (21) estudaram os efeitos citogenéticos do Mancozeb em ratas e suas crias; fêmeas de *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, que foram submetidas a quatro diferentes dosagens: 0, 2.000, 3.000 e 4.000 ppm em três períodos de gestação: 1º ao 6º dia (G1), 6º ao 15º (G2) e 1º ao 21º (G3). Foram analisadas metafases das células de medula óssea de 57 mães e 185 filhotes. Os autores verificaram que em G1, G2 e G3 ocorreram efeitos lineares crescentes de metafases com aberrações cromossômicas estruturais e numéricas tanto em mães como em filhotes.

### 3 CARCINOGENICIDADE

MEHROTRA e colaboradores (11) com três aplicações tópicas por semana de Mancozeb em camundongos, por um período de três semanas consecutivas, demonstraram a indução de papilomas escamosos, uma alteração neoplásica desenvolvida em dois estágios (iniciação e promoção). A aplicação isolada de Mancozeb não induziu tumores, mas quando associado com o acetato de tetradecanoilforbol (TPA), a carcinogênese foi evidente. O Mancozeb foi utilizado como iniciador e o TPA como promotor (modelo de dois estágios). Neste trabalho os autores afirmam que o Mancozeb tem a propriedade de iniciar a formação de tumores de pele em camundongos. A Agência de Proteção Ambiental Americana (US-EPA), classifica os fungicidas EBDC como carcinogênicos do tipo B2, isto é, comprovadamente carcinogênicos para animais de laboratório e suspeito para o homem. A administração crônica de Mancozeb em ratos induz hiperplasia de tireóide, a qual pode evoluir para adenomas e carcinomas, entretanto tal efeito é atribuído à etilenotioréia, principal produto de degradação dos fungicidas EBDC tanto por via biótica como abiótica (12).

No teste de carcinogenicidade com camundongos, tratados com Mancozeb nas concentrações de 0; 25; 100 e 1000 ppm por 78 semanas, via dieta, não foi detectado evidência de efeitos carcinogênicos, e neste experimento

foi calculado um NOAEL (non observable adverse effect level) de 100 ppm (2).

### 4 TERATOGENICIDADE

BECKER (13) propõe nova metodologia para se estudar a teratogênese de compostos químicos, isto é, através da análise fina de malformações, como o "Skeletal Variant Assay System" (SVAS), tendo detectado efeitos teratogênicos em camundongos induzidos pelo Maneb. Por meio desta técnica foram analisadas cerca de 88 variantes esqueléticas finas (sutis) em camundongos da linhagem CD-1. Nestes testes o Maneb provocou aborto ou morte dos fetos nas doses mais altas, provavelmente devido a toxidez do produto; entretanto, nas doses baixas não induziu malformações macroscópicas, mais sim aquelas sutis.

### 5 ETILENOTIOUREA (ETU)

A ETU é um produto de degradação do Mancozeb bastante ativo biologicamente, torna-se necessário incorporá-la nesta revisão, uma vez que alguns autores atribuem os efeitos adversos observados tanto aos fungicidas EBDC como a ETU. Esta forma-se a partir da degradação do Mancozeb, tanto por vias bióticas como abióticas, sendo este processo

bastante acelerado na presença de água, chegando a atingir níveis de 20%.

A ETU pode sofrer lixiviação atingindo o lençol freático. De acordo com FREAKES (14), na amostragem de 24 poços no Estado do Maine (EUA), três deles apresentaram contaminação com ETU em níveis de 3,1, 4,1 e 4,6 ppb, sendo que a concentração máxima permitida é 3,0 ppb. De acordo com o USA: Drinking Water Guideline for ETU (14), doses acima de 3,0 ppb aumentam muito o risco de desenvolvimento de hiperplasia da tireóide (bócio) e o risco de câncer de fígado. Uma vez que a principal via de degradação da ETU é a fotolítica, pergunta-se: qual seria a meia-vida da ETU no lençol freático na ausência de fotólise por luz solar?

DEARFIELD apresenta ampla revisão sobre os efeitos mutagênicos da ETU, demonstrando que muitos resultados negativos são devidos à vícios de metodologia empregada, tais como utilização da cepa inadequada de *Salmonella typhimurium* no teste de mutação gênica em microorganismos (teste de Ames), tempo de coleta das células precoce e uso de veículo de administração inadequado em sistemas-testes eucarióticos, afirmando finalmente que a ETU possui fraco potencial mutagênico (15). A ETU em presença de nitrito de sódio sofre nitrosação, tornando-a num potente mutágeno, que apresenta resultados positivos de mutação gênica em *Salmonella*, de micronúcleos em camundongos e aberrações cromossômicas em células de medula óssea de hamster chinês. Tal reação de nitrosação é passível de ocorrer no estômago dos mamíferos. Em nível de carcinogenicidade, a ETU também

é classificada pela Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (US-EPA), como carcinógeno tipo B2. Seus órgãos alvos são a tireóide e o fígado (13). Quanto à teratogenicidade, verifica-se que a ETU produz hidrocefalia em ratos após exposição materna a 30 mg/kg peso, a qual é 18 vezes menor que a DL 50%. É um potente neuroteratógeno, provoca malformações esqueléticas, no trato digestivo e no sistema urogenital de ratos, principalmente quando administrado durante a organogênese. Entretanto, tal potencial teratogênico é específico para ratos, pois os testes conduzidos em camundongos, hamsters, cobaias e gatos não apresentaram os mesmos efeitos. Tal especificidade pode ser atribuída à diferenças na farmacocinética da ETU entre estas espécies (16).

## 6 CARCINOGENESE NÃO GENOTÓXICA

Os tumores na glândula tireoidiana podem ser induzidos por uma variedade de agentes químicos naturais e sintéticos. A ausência de iodo no organismo provoca desequilíbrio hormonal tireoidiano, isto é, queda nos níveis dos hormônios T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>. Com isso, a glândula pituitária aumenta sua liberação de hormônio estimulante da tireóide (TSH), por mecanismo de retroalimentação. Desse modo, a glândula tireóide, excessivamente estimulada, sofre hipertrofia e hiperplasia. De acordo com BUTTERWORTH (17), a estimulação constante da glândula tireoidiana a conduz do

estado de hiperplasia para o de neoplasia. Entretanto, o reestabelecimento dos níveis normais dos hormônios T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, antes que o tecido tireoidiano atinja o estado neoplásico, é suficiente para reverter o processo. Isto sugere mecanismo de ação não genotóxico. Tais efeitos são semelhantes àqueles provocados por medicamentos antitireoidianos como o tiouracil, propiltiouracil e metimazol, os quais são potentes inibidores da função tireoidiana; e de acordo com WILLIS (18) e WOO et al (19) produzem tumores de tireóide. Os autores acima, afirmam que os tumores nas células foliculares da tireóide originam-se da ação de níveis elevados do TSH e por períodos prolongados de hiperestimulação. Desse modo, existiria então um nível limiar para desencadear este processo, o qual deveria ser levado em consideração ao se desenvolver modelos de avaliação de risco, particularmente quando da extração de tais resultados obtidos em animais para o homem (17). Posteriormente, DOERGE e TAKAZAWA (20) elucidaram o mecanismo de inibição dos hormônios T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> pela ETU. Verificaram que a ETU bloqueia totalmente a iodoação da tirosina, que é um processo importante na síntese destes hormônios, pois inibe uma enzima chave na catálise desta reação, a tirosina peroxidase (TPX). Seus resultados confirmam bioquímica e a existência de um NOAEL para a toxicidade da ETU, pois devido a mecanismo de inibição competitiva, baixos níveis ou exposição intermitente a ETU seriam destoxificados pela TPX.

## 7 CONCLUSÃO

Nos países não-industrializados, nos quais encontram-se cerca de 35 a 50% da população humana e a maior diversidade de espécies do planeta, a produção de alimentos é um grande desafio para a resolução de seus problemas sócio-econômicos. Neste sentido, a real preocupação é o risco para os trabalhadores diretamente associados à produção, industrialização, transporte e armazenamento destes produtos químicos. Deve-se então conhecer quais os riscos às populações que podem ser atingidas através de acidentes, que contaminam águas e solos; as práticas agrícolas inadequadas que provocam contaminação dos alimentos e finalmente, os riscos aos ecossistemas. Dentre os dados contidos nesta revisão, grande parte foi gerada em países industrializados, cuja realidade social, econômica e cultural é muito diferente da do Brasil. Com o peso das evidências de mutagenicidade em diferentes sistemas biológicos, da comprovação de carcinogenicidade em animais de laboratório e de teratogenicidade para algumas espécies de roedores, como proceder a avaliação de periculosidade destes fungicidas a luz da legislação brasileira, que regulamenta o uso de agrotóxicos no Brasil, lei 7.802?

## Abstract

Fungicides Ethylene bisdithiocarbamate (EBDC) have been widely spread in the countryside for 40 years, causing environmental problems, especially food contamination. The adverse effects of EBDC fungicides are related to mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity. Several biological test-systems have been reporting the mutagenicity of EBDC as well as some negative results are related. Concerning to carcinogenicity, the mean data are its effects on thyroid causing adenomas and carcinomas in rats through a non-genotoxic mechanism. On the other hand, this effect can be attributed to Ethylenethiourea (ETU), a known rat thyroid carcinogen. Teratogenic positive results were also attributed to ETU, the most active degradation EBDC product. EBDC metabolic degradation process can generate up to 20% of ETU. In this short review these three aspects of adverse effects of EBDC are discussed.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 FORGET, G. Pesticides and third world. *J. Environ. Health*, v. 32, p. 11-31, 1991.
- 2 REPORT of the Joint Meeting on Pesticides Residues. Geneva : FAO/WHO, Sept. 1993. p. 20-29
- 3 SANDHU, A.D., JEORGESON, T., JONES, D., VALENCIA, R., STACK, F. Evaluation of the genotoxic potential of certain pesticides used in Pakistan. *Basic and Applied Mutagenesis*, v. 34, p. 185-219, 1985.
- 4 MARTINEZ-ROSSI, N.M., AZEVEDO, J.L. Detection of point-mutation mutagens in *Aspergillus nidulans*: comparison of methionine suppressors and arginine resistance by fungicides. *Mutation Research*, v. 176, p. 29-35, 1987.
- 5 ARIAS, E. Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in chick embryos after treatment with the fungicide maneb. *Mutation Research*, v. 206, p. 271-273, 1988.
- 6 GEORGIAN, L., MORAU, I., DRAGHICESCU, T., DINU, I., GHIZELA, G. Cytogenetic effects of alachlor and mancozeb. *Mutation Research*, v. 116, p. 341-348, 1983.
- 7 JABLONICKÀ, A. et al. Analysis of chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges in peripheral blood lymphocytes of workers with occupational exposure to mancozeb-containing fungicide Novozir Mn 80. *Mutation Research*, v. 224, p. 43-146, 1989.
- 8 NEWTON, M.F., LILLY, L.J. The effect of Dithane M-45 on rat lymphocyte chromosomes exposed *in vivo*. *Mutation Research*, v. 64, p. 149, 1979.
- 9 VASUDEV, V., KRISHNAMURTHY, N.B. Non-mutagenicity of the fungicide Dithane M-45 as inducer of recessive lethals after larval feeding in *Drosophila melanogaster*. *Experientia*, v. 35, p. 528-29, 1989.
- 10 VASUDEV, V., KRISHNAMURTHY, N.B. In vivo cytogenetic analyses of the carbamate pesticides Dithane M-45 and Baygon in mice. *Mutation Research*, v. 323, p. 133-135, 1994.
- 11 MEHROTRA, N.K., KUMAR, S., SHUKLA, Y. Tumor initiating activity of mancozeb: a carbamate fungicide in mouse skin. *Cancer Letters*, v. 36, p. 283-287, 1987.
- 12 DITHIOCARBAMATE pesticides, ethylenethiourea and propilenethiourea: a general introduction. In: INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY. Geneva : WHO, 1988. 140 p. *Environ. Health Criteria*, 78.
- 13 BECKER, S.L. Prenatal and postnatal assessment of maneb-exposed CD-1 mice. *Reproductive Toxicology*, v. 4, p. 283-290, 1990.
- 14 FREAKES, R.A. Drinking water guideline for thiourea, a metabolite of ethylene bisdithiocarbamate fungicides. *Regulatory Toxicol. and Pharmacology*, v. 8, p. 207-218, 1988.
- 15 DEARFIELD, L.K. Ethylene thiourea (ETU): a review of the genetic toxicity studies. *Mutation Research*, v. 317, p. 111-132, 1994.
- 16 LENTZA-RIOS, C. Ethylenethiourea (ETU) in relation to use of ethylenebisdithiocarbamate (EBDC) fungicides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 115, p. 3-37, 1990.
- 17 BUTTERWORTH, B.E. Considerations of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential. *Mutation Research*, v. 239, p. 117-132, 1990.

- 18 WILLIS, J. The induction of malignant neoplasms in the thyroid gland of the rat. J.Pathol.Bacteriol., v. 82, p. 23-27, 1961.
- 19 WOO, Y., LAI, D.Y., ARCOS, J.C., ARGUS, M.F. Chemical induction of cancer: structural basis and biological mechanisms. In: ALIPHATIC and polyhalogenated carcinogens. New York : Academic Press, 1985. v. 3B, p. 357-394
- 20 DOERGE, D.R., TAKAZAWA, R.S. Mechanism of thyroid inhibition by ethylenethiourea. Chemical Research in Toxicology, v. 3, n. 2, p. 99-101, 1990.
- 21 TAMBASCO, A.J., CASTRO, V.L.S., FREITAS, A.R. Efeitos do Mancozeb em cromossomos de células da medula óssea de *Rattus norvegicus*. Revista Brasileira de Genética, v. 18, n. 3, p. 485, 1995.