

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

GENOTOXICIDADE OCACIONADA PELAS FOLHAS DO FUMO
(*Nicotiana tabacum*) - EXPOSTAS OU NÃO A AGROTÓXICO - EM
Cantareus aspersus.

Fernanda Rabaioli da Silva

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia Molecular
da UFRGS como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Erdtmann

Co-orientadora: Profa. Dra. Juliana da Silva

Porto Alegre (RS)

Março de 2007

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética do Instituto de Biociências e no Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) & no Laboratório de Genética Toxicológica e Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário, da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), subvencionado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Laboratório de Genética Toxicológica (ULBRA).

Dedico este trabalho a aqueles que mais se dedicaram a mim: a minha família e em especial ao meu amado e saudoso pai, o maior incentivador de minhas escolhas e admirador de minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Bernardo Erdtmann pela confiança, dedicação e pelos ensinamentos que me foi dado;

A minha co-orientadora Juliana da Silva pela amizade, carinho e compreensão despendidos durante toda graduação e mestrado, apoiando-me em todas as decisões e dificuldades;

Ao Nando, à Dona Quintina e à Cíntia, por toda assistência nas coletas realizadas na lavoura de fumo;

Aos professores (as) Marilene Porawski, Mariangela da Costa Algayer, Johnny Ferraz Dias, Alexandre Ferraz e Tales Leandro Costa Martins pela colaboração nesta pesquisa e discussões dos dados;

Aos demais professores, pela formação acadêmica, pela compreensão e pelo conhecimento dado a mim durante as disciplinas de graduação e pós-graduação;

Á Vanessa Andrade e Vanina Heuser por toda a orientação e paciência durante a graduação e pelo incentivo à descoberta da mutagênese;

Aos amigos de Laboratório: Aline Groff, Pedro Della Corte, Valéria Pinhatti, Juliana Viégas, Martus Ianistcki, Vinícius Benvegnú e em especial ao Tiago Dalpiaz e à Emilene Nunes por todo apoio, carinho, amizade e compreensão principalmente nos dias de teste;

Aos colegas de outros laboratórios: Darlan Pase da Rosa, Sílvia Bona, Caroline Ferreira Simon e Estela Busanello pela ajuda;

A todas as minhas grandes amigas e colegas, por compartilharmos as alegrias e por enfrentarem junto comigo as dificuldades, entre elas Gisele, Raquel, Cíntia, Juliana, Vanessa, Fabiana, Rosângela e Tais.

Ao Elmo e à Ellen pelo respeito, carinho e auxílio nas "burocracias";

A toda minha família: tios, primos, avós e cunhada, pelo apoio e carinho;

À minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão que sempre me incentivaram, acreditando em meu esforço. Agradeço pela compreensão e dedicação, fatores indispensáveis para que este trabalho fosse realizado; e principalmente pelo amor, fator indispensável na minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	14
CAPÍTULO I	15
I INTRODUÇÃO	15
1. <i>FUMO</i>	15
2. <i>AGROTÓXICOS</i>	17
3. <i>GENOTOXICIDADE: SINTÉTICO X NATURAL</i>	19
4. <i>ABSORÇÃO TRANSDERMAL DA NICOTINA</i>	21
5. <i>ALGUNS ESTUDOS RELACIONADOS À FOLHA DO FUMO</i>	22
5.1. “Green tobacco sickness” – GTS	22
5.2. Peixes.....	24
5.3. Bactéria.....	25
6. <i>AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE</i>	25
7. <i>BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO</i>	26
7.1. Ensaio Cometa.....	27
7.2. Quantificação dos elementos químicos	28
8. <i>BIOMARCADORES DE EFEITO</i>	30
8.1. Teste de Micronúcleos.....	30
8.2. Citocromo P450.....	31
9. <i>ESPÉCIE EXPOSTA À FOLHA DO FUMO: Cantareus aspersus</i>	32
II OBJETIVOS.....	34
CAPÍTULO II.....	35
GENOTOXICITY EFFECT OF <i>NICOTIANA TABACUM</i> LEAVES ON <i>CANTAREUS ASPERSUS</i>	35
CAPÍTULO III	64
I DISCUSSÃO	64
CAPÍTULO IV.....	72
I REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (CAPÍTULO I E III)	72

LISTA DE ABREVIATURAS

GTS: “green tobacco sickness”
PIXE: “particle-induced X-ray emission”
HPLC: “high performance liquid chromatography”
EUA: Estados Unidos da América
DDT: dicloro-difenil-tricloroetano
EC: Ensaio cometa
DNA: ácido desoxirribonucléico
MN: Teste de micronúcleos
ANOVA: “analysis of variance”
DMSO: dimetil sulfóxido
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
ROS: “reactive oxygen species”
ERO: espécie reativa de oxigênio
S.D.: “standard deviation”
DI: “damage index”
DF: “damage frequency”
SSB: “single-strand break”
ALS: “alkali-labile lesions”
CHO: “Chinese hamster ovary”
SCE: “sister chromatid exchange”
UV: radiação ultravioleta
NPR: NADPH-P450 redutase

LISTA DE SÍMBOLOS

$t^{1/2}$: tempo de meia-vida

LC50: concentração letal em 50% dos animais do grupo teste.

°C: grau Celsius

pH: potencial hidrogeniônico

Kw: constante de ionização da água

%: por cento

Ca: cálcio

Cd: cádmio

Sr: estrôncio

Fe: ferro

Na: sódio

Mg: magnésio

P: fósforo

S: enxofre

Cl: cloro

K: potássio

Ti: titânio

Zn: zinco

Cu: cobre

Al: alumínio

Si: silício

Mn: manganês

As: arsênico

Co: cobalto

Cr: cromo

Ni: níquel

V: vanádio

Ge: germânio

LISTA DE UNIDADES

μg : micrograma

mg: miligrama

kg: quilograma

μl : microlitro

ml: mililitros

l: litro

h: horas

eV: elétron-volt

keV: mil elétron-volt

MeV: 1 milhão de elétron-volt

V: volts

ppm: partes por milhão

mM: milimolar

M: molar

mbar: milibar

nA: nanoampere

mA: miliampere

nm: nanômetro

v/v: volume por volume

w/v: peso por volume

LISTA DE FIGURAS

I Introdução.....	16
Figura 1: <i>Nicotiana tabacum</i>	16
Figura 2: Modelo do biocomportamento da GTS.....	23
Figura 3: Cultivo do tabaco: a) capação, b) aplicação de veneno, c) colheita, (d e e) mãos dos trabalhadores, f) maços carregados.....	24
Figura 4: Classes de danos.....	29
Figura 5: Técnica de PIXE – Emissão de partículas por Raios-X.....	30
Figura 6: Micronúcleo em células de hemolinfa.....	31
Figura 7: <i>Cantareus aspersus</i>	33
Capítulo II.....	36
Figure 1: Detection of micronuclei mean (\pm S.D.) in hemolymph cells of <i>Cantareus aspersus</i> individuals exposed to tobacco leaves, without pesticide (TL) and with pesticide (TLP).....	64

LISTA DE TABELAS

Capítulo II.....	36
Table 1: Comet assay parameters (mean±S.D.) of animals exposed to lettuce (control) and animals exposed to tobacco leaves without (TL) and with pesticide (TLP). In each group: n=10.....	59
Table 2: Inorganic element detection by PIXE analyses in the tobacco leaves.....	60
Table 3: Inorganic element detection by PIXE analyses in the entire body of <i>Cantareus aspersus</i> exposed to tobacco leaves without and with pesticide.....	61
Table 4: Protein and enzyme analysis from haemolymph of <i>Cantareus aspersus</i> individuals exposed to tobacco leaves, without pesticide (TL) and with pesticide (TLP), expressed as mean ± S.D.....	62
Table 5: Phytochemical analysis of the tobacco leaves.....	63

RESUMO

A produção de fumo na região sul do Brasil, mais precisamente no Estado do Rio Grande do Sul (RS), exerce grande importância na atividade econômica e social. Na área econômica, o fumo é responsável pela arrecadação de grandes somas em impostos. No campo social, a atividade fumageira é grande geradora de empregos diretos e indiretos. Os agricultores que trabalham nas lavouras de fumo estão em constante contato com a planta. Conseqüentemente, estes trabalhadores se expõem tanto aos compostos orgânicos e inorgânicos presentes nas folhas, como aos pesticidas naturais e sintéticos relacionados. “Green tobacco sickness” (GTS) é conhecida como risco ocupacional à saúde de trabalhadores do campo no plantio de tabaco. Os sintomas têm sido atribuídos ao envenenamento agudo por nicotina seguido por contato dermal com as folhas do fumo. Contudo autores salientam que os efeitos sinérgicos da nicotina e dos pesticidas devem ser examinados.

Neste trabalho utilizou-se *Cantareus aspersus* com o objetivo de identificar a ação genotóxica e/ou mutagênica das folhas de *Nicotiana tabacum* através da exposição dermal. O caracol terrestre tem sido utilizado nos últimos anos devido a sua fácil aclimação e manipulação em laboratório e por sua sensibilidade e resistência aos testes de genotoxicidade. Nestes animais foram realizados testes de biomonitoramento de exposição: Ensaio Cometa e quantificação dos elementos químicos pela técnica PIXE; bem como, testes de biomonitoramento de efeito: Teste de Micronúcleo e quantificação do Citocromo P450. Nosso estudo dosou a quantidade de nicotina na água, exposta à superfície da folha, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e realizou “screening” fitoquímico de *N. tabacum*.

Trinta moluscos terrestres foram expostos a diferentes tratamentos: dez expostos a folhas de tabaco sem pesticida; dez expostos a folhas de tabaco com pesticida e dez expostos a folhas de *Lactuca sativa* L. (grupo controle). Células da hemolinfa foram coletadas após 0, 24, 48 e 72 horas de exposição, o dano ao DNA foi avaliado pelo Ensaio Cometa em todos os períodos e a frequência de micronúcleos somente em 72 horas. Resultados significativos foram encontrados nos grupos expostos a folhas de fumo, através do Ensaio Cometa, no período de 24, 48 e 72 horas de exposição e em 72 horas através do

Teste de Micronúcleos, quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre caracóis expostos a folhas de fumo com e sem pesticida, portanto, podemos afirmar que o pesticida flumetralin não contribuiu com os danos ao DNA observados. “Screening” fitoquímico revelou presença de alcalóide, cumarina, traços de saponina e flavonóides. Inibição da atividade da enzima do Citocromo P450 ocorreu somente no grupo exposto a folhas de fumo sem pesticida. Doze elementos inorgânicos diferentes foram quantificados nas folhas de tabaco e nos caracóis expostos a folhas sem pesticida e, dez nos caracóis expostos a folhas com pesticida. Por cromatografia foram dosados 0,02% de nicotina por folha.

A presença de alcalóides (nicotina), cumarinas, saponinas, flavonóides e diferentes metais provavelmente influenciaram o efeito mutagênico e genotóxico em *C. aspersus* expostos ao fumo. Estes efeitos possivelmente tenham sido causados pela complexa mistura presente nas folhas que podem interagir produzindo efeitos sinérgicos, antagônicos ou influenciando a absorção de um dado composto. As enzimas do sistema Citocromo P450 em *C. aspersus* expostos a folhas de fumo sem veneno podem ter sido inibidas pela nicotina, pelos flavonóides e pelo cobre. Por fim, nosso estudo providencia dados biológicos e químicos sobre *C. aspersus* expostos à folha de fumo e confirma a sensibilidade do Ensaio Cometa e do Teste de Micronúcleos na avaliação de misturas complexas, indicando associação entre nicotina, cumarina e interação flavonóide/metalo (principalmente cobre e ferro) como principais causadores de dano ao DNA em células de hemolinfa do molusco terrestre *C. aspersus* por folhas de *N. tabacum*.

ABSTRACT

Tobacco production in southern Brazil, precisely in Rio Grande do Sul state (RS) play a major role in economic and social activity. Tobacco farmers are routinely exposed to complex mixtures present in tobacco leaves including organic and inorganic compounds. Green tobacco sickness (GTS) is a form of nicotine poisoning that affects workers who have direct dermal contact with tobacco plants during cultivation and harvesting. However, some authors suggest that the synergistic effects of nicotine and pesticide should be examined.

The purpose of this study was to evaluate the genotoxic and mutagenic effect of tobacco leaves, with and without exposure to flumetralin in *Cantareus aspersus* through dermal exposure. The land mollusk was utilized because of its easy acclimatization and manipulation in the laboratory and for its sensibility and resistance in genotoxicity tests. Biomonitoring exposure test was performed on these animals: Comet Assay and chemical elements quantification by PIXE; biomonitoring tests for effects were also carried out: Micronuclei Test and cytochrome P450 quantification. Nicotine dosage was performed in water exposed to the surface of tobacco leaves, by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and screening phytochemistry in *Nicotiana tabacum*.

Thirty land mollusks were exposed to different treatments; ten snails to tobacco leaves with pesticide; ten to tobacco leaves without pesticide and ten snails exposed to lettuce leaves (control group). Hemolymph cells were collected after 0, 24, 48 and 72 hours, the DNA damage was evaluated by single cell gel assay for all these periods, and the frequency of micronuclei only in 72h. Significant results were found in groups exposed to tobacco leaves during 24, 48 and 72 hours of exposure by Comet Assay and by Micronucleus Test when compared to the control group. No difference was observed between different periods or between exposure to leaves with and without pesticide. This result shows that no genotoxic effect can be attributed to pesticide.

Chemical results found alkaloid, coumarin, saponin traces, flavonoids and different metals. Inhibition of cytochrome P450 enzymes occurs only in the group without pesticide. Twelve inorganic elements were found in tobacco leaves and in snails exposed to tobacco leaves without pesticide. Ten inorganic elements were found in tobacco leaves with pesticide. Nicotine dosage found 0.02% of this alkaloid per leaf.

The presence of coumarin, saponin traces, flavonoids, alkaloid (nicotine) and different metals probably causes genotoxic effects on land mollusks exposed to tobacco leaves with and without pesticide. This induction of DNA damage by dermal exposure to tobacco leaves was caused by a complex mixture present in the leaves. The enzymes of cytochrome P450 systems were inhibited by nicotine, flavonoids and copper. Our study provided chemical and biological data on *C. aspersus* exposed to tobacco leaves. The results of our study confirm the sensibility of the Comet Assay and Micronucleus Test for the evaluation of the complex mixture, indicating an association between nicotine, coumarin and flavonoid/metal interaction (mainly copper and iron) as the main causes of DNA damage in hemolymph cells from the land mollusk *C. aspersus* by *N. tabacum*.

CAPÍTULO I

I INTRODUÇÃO

1. FUMO

O tabaco pertence à família Solanaceae e ao gênero *Nicotiana*. O gênero foi nomeado por Jean Nicot, em 1560 (Hinds, 1882). A maioria dos fumos cultivados no Rio Grande do Sul pertence à espécie *Nicotiana tabacum* L. (Figura 1), um alotetraplóide que apresenta $2n = 4x = 48$ cromossomos, distribuídos nos genomas S e T. Grande parte dos estudos de genética e citologia indica que a espécie *N. tabacum* se originou da hibridização de duas espécies diplóides, *Nicotiana sylvestres* ($2n=24$) com genoma S (maternal), e *Nicotiana tomentosiformia* ($2n=24$), que apresenta o genoma T (paternal) (Gerstel, 1960; Santos, 2002).



Figura 1: *Nicotiana tabacum*

O fumo é uma planta herbácea anual, séssil, autógama, com grandes folhas densamente glandulares, ovada-lanceoladas, de coloração verde, porém quando maduras tornam-se marrom amarelada. As folhas, perto do solo, são mais largas e diminuem de tamanho em direção ao topo (Hinds, 1882). A posição das folhas é um importante indicador de certas propriedades físicas e químicas. Por exemplo, folhas posicionadas mais

abaixo em comparação a folhas superiores são geralmente mais finas, com menos tricomas, com um período maior de queima, maior quantidade de potássio, magnésio (Mg), celulose, ácidos orgânicos totais (málico e cítrico), sucrose e frutose; menor quantidade de açúcar total, nitrogênio total, nitrato de nitrogênio, alcalóides (nicotina, nornicotina, anabasina, anatabina), bases voláteis, aminoácidos livres (alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, fenilalanina, prolina, valina), aminas secundárias voláteis e polifenóis (Tso, 1977). Durbin (1979) através de numerosos estudos de sítios de formação dos alcalóides indica que nicotina é formada na raiz e translocada apicalmente através do xilema.

No Brasil, o fumo é conhecido antes mesmo do seu descobrimento, quando os indígenas o utilizavam para fins medicinais e em rituais mágico-religiosos. Por volta do ano de 1890 já havia uma pequena produção de fumos "negros" para atender a demanda interna e a exportação à Europa (AFUBRA, 2005).

Um dos importantes acontecimentos do setor fumageiro brasileiro ocorreu em 1903, quando teve início a industrialização de cigarros no Rio de Janeiro. A partir daí, com o crescimento da demanda interna, houve a necessidade de organizar o sistema produtivo brasileiro. Por esta razão, no ano de 1918 houve a implantação do Sistema Integrado de Produção de Fumo na região Sul do Brasil, mais precisamente no Estado do Rio Grande do Sul (RS), estendendo-se, posteriormente, aos Estados de Santa Catarina e do Paraná. A partir de 1950, teve início a produção dos fumos claros tipo "Virginia" (curados com fonte de calor) e "Burley" (curados naturalmente) no Sul. Porém, foi a partir de 1970 que a fumicultura teve um aumento significativo na região Sul do Brasil, com a ampliação do parque industrial e com o incremento da produção e da exportação. Atualmente, o Brasil produz mais de 650.000 toneladas de tabaco por ano e é um dos maiores produtores do mundo. Desde 1993, o Brasil é o maior exportador mundial de fumo, em volume (AFUBRA, 2005).

O setor fumageiro exerce grande importância na atividade econômica e social do Brasil. Na área econômica, o fumo é responsável pela arrecadação de grandes somas em impostos, que somente no ano de 2003 totalizaram cerca de 1,9 bilhões de dólares recolhidos ao País. Em 2003, as exportações brasileiras de fumo e seus derivados totalizaram um bilhão de dólares, o que representou 1,7% do total das exportações. No campo social, a atividade fumageira é grande geradora de empregos diretos e indiretos. Somente no meio rural, o fumo ocupa a mão-de-obra de mais de 906.000 agricultores.

Além disso, as usinas de beneficiamento e as fábricas de cigarros empregam mais de 40.000 pessoas. No total, considerando a soma dos empregos diretos e indiretos gerados pelo fumo desde o seu plantio até a comercialização do cigarro, há o envolvimento de aproximadamente 2,4 milhões de pessoas que de alguma forma estão vinculadas ao setor. Importante salientar que para a maioria das famílias de agricultores o fumo se constitui na principal fonte de renda (AFUBRA, 2005).

A cultura do fumo é desenvolvida em 700 municípios dos três Estados do Sul. Na atual safra são 190.000 famílias de agricultores, que em geral possuem propriedades inferiores a 18 hectares, todos fazendo uso de agrotóxicos.

2. AGROTÓXICOS

O uso de substâncias químicas orgânicas ou inorgânicas na agricultura não é uma prática atual, mas remonta à Antigüidade Clássica. Escritos Romanos e Gregos mencionavam o uso de certos produtos, como o arsênico e o enxofre, para o controle de insetos nos primórdios da agricultura. A partir do século XVI até fins do século XIX, o emprego de substâncias orgânicas como a nicotina e piretros extraídos de plantas eram comumente utilizadas na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA) para o controle de insetos (OPAS, 1997).

No início do século XX iniciaram-se os estudos sistemáticos buscando o emprego de substâncias inorgânicas para a proteção de plantas, deste modo, produtos à base de cobre, chumbo, mercúrio, cádmio, etc., foram desenvolvidos comercialmente e empregados contra uma grande variedade de pragas, porém com limitada eficácia. Todavia, a partir da Segunda Guerra Mundial, com a descoberta do grande poder do inseticida organoclorado DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) e outros produtos, inicialmente utilizados como arma de guerra, deu-se a grande disseminação dessas substâncias na agricultura (OPAS, 1997). Assim, com a “revolução verde”, foi observada profunda mudança no processo tradicional de trabalho na agricultura bem como em seus impactos sobre o ambiente e a saúde humana. Novas tecnologias, muitas delas baseadas no uso extensivo de agentes químicos, foram disponibilizadas para o controle de doenças, aumento da produtividade e proteção contra insetos e outras pragas. Entretanto, essas novas facilidades não foram acompanhadas pela implementação de programas de qualificação da força de trabalho,

sobretudo nos países em desenvolvimento, expondo as comunidades ambientais a um conjunto de riscos ainda desconhecidos (Moreira *et al.*, 2002).

Os termos praguicidas, defensivos, pesticidas e agrotóxicos são expressões atualmente utilizadas para se referir aos produtos químicos xenobióticos, ou seja, substâncias estranhas aos seres vivos, e também a alguns compostos de origem animal ou vegetal utilizados no controle de populações de pragas ou vetores de doenças (Targa & Rabelo-Gay, 1983).

Os agrotóxicos inorgânicos são produtos compostos por elementos tóxicos como arsênico, cobre, chumbo e mercúrio. Estes compostos, feitos a base destes elementos, não degradam facilmente e podem persistir por muito tempo no ambiente. Os agrotóxicos orgânicos são de diversas origens, sendo classificados como: (1) orgânicos naturais, extraídos de diversas espécies de plantas, p.ex. nicotina, (2) orgânicos metálicos sintéticos, p.ex. mercuriais, (3) fenólicos, p.ex. pentaclorofenol, (4) hidrocarbonetos clorados, que incluem o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), lindane, ciclodiene, (5) orgânicos fosforados, (6) carbamatos, (7) triazinas, (8) piretróides (Freedman, 1995).

Os agrotóxicos utilizados na agricultura apresentam toxicidade variável e podem sofrer volatilização sob elevadas temperaturas e serem causadores de poluição aérea. Embora alguns agrotóxicos se decomponham, este processo não os torna inócuos. Conforme o tempo de redução de 75 a 100%, de sua toxicidade, são divididos em três grupos: (1) persistentes (2 a 5 anos); (2) moderadamente persistentes (1 a 18 meses); (3) não persistentes (1 a 12 semanas) (Carson, 1962).

De acordo com o agrônomo Jorge Kampf, da Associação dos Fumicultores do Brasil, os produtos mais utilizados nesta cultura são: Oxicloreto de cobre (fungicida inorgânico a base de cobre - cúprico, classe toxicológica IV, altamente persistente no ambiente), Mancozeb (fungicida ditiocarbamato, classe toxicológica II), Metalaxyl (fungicida metil ester, classe toxicológica III), Ipridione (fungicida dicarboximide, classe toxicológica III), Acephato (inseticida organofosforado, classe toxicológica III), Thiamethoxam (inseticida nitroguanidina, classe toxicológica III), Imidacloprid (inseticida nitroguanidina e piridimetilamina, classe toxicológica IV), Clomazone (herbicida isoxazolidinona, classe toxicológica III), Sulfentazone (herbicida pré-emergente) e Sethoxydim (herbicida pós-emergente, classe toxicológica II). Devido ao Sistema “Float” - produção de mudas em bandejas - apenas o herbicida pós-emergente é aplicado na lavoura, os demais são

aplicados nas mudas que levam cerca de 60 dias para atingir o tamanho ideal ao plantio (AFUBRA, 2005). O herbicida pós-emergente mais comumente aplicado nas lavouras de fumo é o flumetralin (2-Chloro-N-(2,6-dinitro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-N-ethyl-6-fluorobenzenemethanamine) (Coresta, 2007). O flumetralin é aplicado no broto, absorvido pela planta em poucas horas e atua como regulador do crescimento. Pesquisas mostram que resíduos de flumetralin são encontrados nas folhas de fumo, podendo persistir por mais de um ano (Johnson & Connell, 2001; Coresta, 2007).

Além das substâncias antropogênicas persistentes, citadas acima, outros compostos orgânicos com potencial pesticida estão presentes nas folhas do fumo. Portanto, o agricultor poderá estar exposto a uma complexa mistura de agentes exógenos. Onuki *et al.* (2003) salienta que os efeitos sinérgicos da nicotina e dos pesticidas devem ser examinados. Porém, apesar dos progressos no desenvolvimento de modelos ao acesso da toxicidade dos compostos químicos, modelos à toxicidade das misturas químicas ainda não foram realizados. Em parte, isto se deve a enorme complexidade destes efeitos nos sistemas vivos (Butterworth, 1995). A genotoxicidade das misturas tem sido encontrada por estar sinergicamente aumentada, quando comparada aos componentes testados individualmente (Pandey *et al.*, 1995). Assim, há uma necessidade crítica à avaliação dos efeitos biológicos das misturas químicas.

3. GENOTOXICIDADE: SINTÉTICO X NATURAL

O potencial mutagênico de um produto pode ser alterado por fatores exógenos, como por exemplo, aditivos químicos e agrotóxicos, mas também por fatores endógenos, como algumas vitaminas, compostos fenólicos, alguns alcalóides e por pesticidas naturais (Franke *et al.*, 2003). Segundo Bruce Ames, que desenvolveu o teste de Ames, 99,99% da ingestão diária de pesticidas na dieta americana são naturais, enquanto que apenas 0,01% são de origem sintética (Ames *et al.*, 1990)

Há uma tendência em acreditar que produtos químicos são somente aqueles industrializados e sintetizados, existindo firme crença que aquilo que “vem da natureza não faz mal”. Porém as plantas são capazes de produzir diferentes substâncias tóxicas em grandes quantidades, aparentemente para sua defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores. Tais substâncias estão sendo estudadas e caracterizadas.

Muitos alcalóides naturais, como a berberina, têm sido testados quanto ao seu efeito na prevenção de determinadas doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e câncer. Outros têm sido avaliados quanto à genotoxicidade em *Salmonella*, em leveduras e em culturas de células de mamífero. Dois alcalóides β -carbólicos (harmano e harmina), presente nas Passifloras, mostraram-se mutagênicos. Glicoalcalóides (solaninas e chaconinas) são teratogênicos e fortes inibidores da acetilcolinesterase (Franke *et al.*, 2003).

A nicotina é um alcalóide encontrado principalmente nas plantas da família Solanaceae e amplamente distribuído em 12 famílias e 24 gêneros (Leete, 1983).

A principal discussão a cerca dos efeitos tóxicos da nicotina no fumo está relacionada ao hábito de fumar. Entretanto, o contato com esta pequena molécula pode ocorrer através de tratamentos anti-tabagismo (adesivos, goma de mascar, “spray” nasal), sob doses controladas, ou através da exposição de trabalhadores nas lavouras de fumo, via esta, presente em raros estudos. Estima-se que as folhas úmidas do tabaco contenham de seis a oito por cento de nicotina (Hinds, 1882) e que durante o tempo de colheita os trabalhadores do campo podem ser expostos a mais de 600 mililitros de orvalho ou chuva, da superfície das folhas do fumo, equivalente a nicotina contida em 36 cigarros (NIOSH, 1996).

Estudos do potencial genotóxico da nicotina geralmente demonstram resultados negativos, mesmo assim resultados positivos têm sido obtidos (Doolittle *et al.*, 1995). Por exemplo, nicotina não foi genotóxica em *Salmonella typhimurium* (Riebe *et al.*, 1982; De Flora *et al.*, 1984). Resultados negativos (De Flora *et al.*, 1984) e positivos (Riebe *et al.*, 1982) têm sido registrados em *Escherichia coli*.

A nicotina, em dose de 5mg/kg, aumentou a frequência média de aberrações cromossômicas em células da medula óssea de hamster chinês (Munzner & Renner, 1989), mas não foi clastogênica em doses orais de 1 e 2 mg/kg em camundongos (Adler & Attia, 2003). Em altas concentrações aumentou as trocas entre cromátides irmãs (SCEs) e as aberrações cromossômicas de células de ovário de hamster chinês (CHO) sem ativação metabólica (ação direta) (Trivedi *et al.*, 1990). Para o Teste *Salmonella* (Teste de Ames) a nicotina e seus quatro maiores metabólitos não foram genotóxicos (Doolittle *et al.*, 1995).

Em humanos, a nicotina é facilmente absorvida pela pele. Assim, quando os trabalhadores rurais entram em contato com a folha do fumo, alta quantidade de nicotina

transdermal é observada (Arcury *et al.*, 2003), porém os possíveis danos genotóxicos ocasionados são ainda desconhecidos.

4. ABSORÇÃO TRANSDERMAL DA NICOTINA

O principal composto relacionado à absorção transdermal nos fumicultores, no campo, é a nicotina.

A pele atua como barreira e como primeira rota de circulação para químicos. As propriedades físico-químicas da nicotina facilitam sua absorção: pequena molécula solúvel tanto em água como em lipídio. Quando em contato com a pele humana a nicotina difunde-se facilmente ao longo do estrato córneo, penetrando nas camadas abaixo da pele onde se encontram os vasos sanguíneos (Guy & Hadgraft, 1989).

Estudos de cinética de absorção dermal têm demonstrado variação nas regiões anatômicas, alguns locais absorvem menos (palma da mão, 83%; planta do pé, 14%), enquanto outros locais absorvem mais (costas, 170%; axila, 360%; testa, 600%) comparado à parte ventral do antebraço (Feldman & Maibach, 1967).

Em relação aos tipos de administração de nicotina (cigarro, adesivo transdermal, “spray” nasal) foi demonstrado que a absorção através da pele produz uma quantidade maior de níveis no plasma (Benowitz *et al.*, 1997). Há evidências que a pele funcione como um reservatório onde níveis de nicotina no plasma diminuem em média 50% durante 4 horas após a exposição (Keller-Stanislawski *et al.*, 1993).

A absorção aumenta com o aumento da superfície exposta e com a presença de machucadura e umidade na pele. Variáveis que influenciam a vasodilatação (calor, temperatura alta ou baixa, consumo de álcool, uso de cigarro) também podem afetar a absorção de nicotina (Quandt *et al.*, 2000).

A nicotina é absorvida pelo homem e então metabolizada, primeiramente, pelo citocromo P450. Os principais metabólitos são: cotinina, óxido-N'-nicotina, óxido-N-cotinina e trans-3'-hidroxicotinina. Estudos do potencial genotóxico destes metabólitos são limitados (Doolittle *et al.*, 1995).

Tipicamente, 70-80% de nicotina é convertida em cotinina. A meia-vida relativamente curta da nicotina ($t_{1/2} \sim 2,6h$) exclui seu uso como marcador preciso da quantidade absorvida. Assim, a cotinina que é o metabólito principal da nicotina e tem uma

meia-vida de aproximadamente 15-17 horas, tem sido assumida como medida bioquímica apropriada. (Tricker, 2003).

5. ALGUNS ESTUDOS RELACIONADOS À FOLHA DO FUMO

5.1. “Green tobacco sickness” – GTS

“Green tobacco sickness” (GTS) é conhecida como risco ocupacional à saúde de trabalhadores do campo relacionados ao plantio de fumo (Quandt *et al.*, 2000). Os critérios para o diagnóstico de GTS têm sido estabelecidos. Os sintomas incluem: náusea, vômito, tontura, dor de cabeça, diarreia, fraqueza, perda do apetite, dor e cólicas abdominais, visão embaçada, lacrimejar constante, abatimento, dificuldade em respirar e algumas vezes variação na pressão sanguínea e na frequência cardíaca (Arcury *et al.*, 2003; Onuki *et al.*, 2003). Os sintomas iniciam em 3 a 17 horas depois do início da exposição (McBride *et al.*, 1998) e os trabalhadores com GTS se recuperam em 2 a 3 dias. Contudo, sintomas mais severos resultam em desidratação e necessidade urgente de cuidado médico (Arcury *et al.*, 2003). Em casos mais extremos é administrado anti-eméticos, anti-histaminícos e feita hidratação intravenosa (McBride *et al.*, 1998). Apesar da ampla produção de tabaco e do risco de GTS, a literatura médica é excessivamente fraca. Segundo Quandt *et al.* (2000) há um pouco mais do que 30 artigos publicados de GTS na pesquisa científica.

Quandt *et al.* (2000) tem apresentado um modelo do biocomportamento da GTS (Figura 2) baseado nas pesquisas existentes e na fisiologia da absorção percutânea de nicotina.

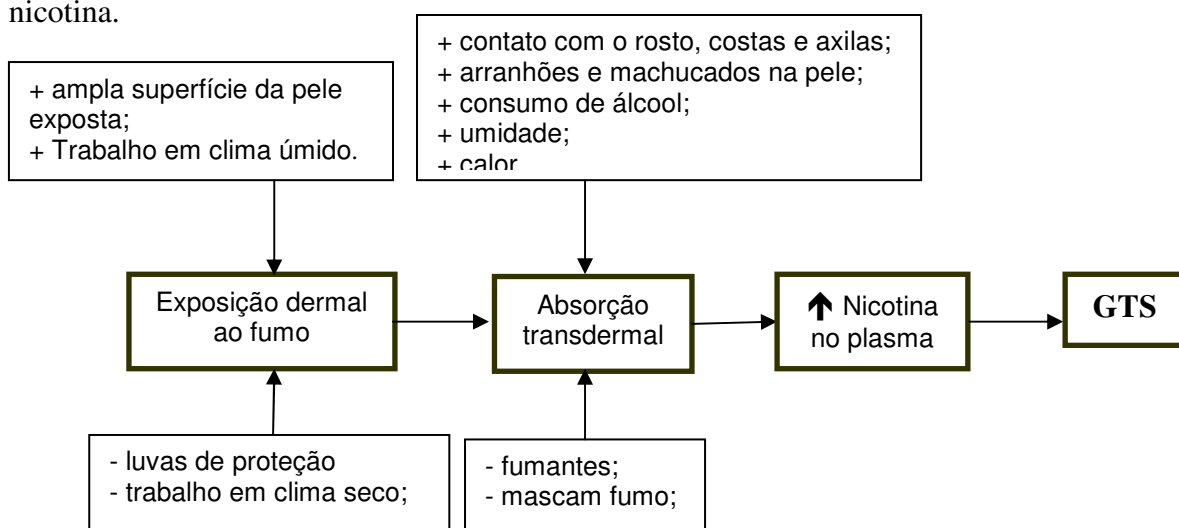


Figura 2: Modelo do biocomportamento da GTS.

GTS foi descrita pela primeira vez em 1970 entre os trabalhadores da lavoura de fumo na Flórida, USA. Desde então seus sintomas têm sido atribuído ao envenenamento agudo por nicotina seguido por contato dermal com as folhas do fumo (Gehlbach *et al.*, 1975).

Nível de cotinina nos fumicultores foi significativamente maior do que os não expostos (Onuki *et al.*, 2003) e se observou relação entre a quantidade de cotinina salivar e a prevalência de GTS (Arcury *et al.*, 2003), corroborando a hipótese de que GTS esteja associada à exposição de nicotina.

Foi observada por Parikh *et al.* (2005) uma prevalência geral de GTS em 47% dos trabalhadores rurais com fumo, esta quantidade foi quase similar ao registrado por Quandt *et al.* (2000) cinco anos antes.

Os agricultores, durante o cultivo, estão expostos diretamente a folhas do fumo (Figura 3) nas seguintes condições: na plantação das mudas; na capação (retirada das flores para que as folhas se desenvolvam mais, com mais peso e qualidade e com maior quantidade de nicotina); na aplicação de veneno (antibrotante); na colheita; no carregamento dos maços até os galpões; na separação e classificação das folhas; na amarração em forma de cordão para secagem.



Figura 3: Cultivo do tabaco: a) capação, b) aplicação de veneno, c) colheita, (d e e) mãos dos trabalhadores, f) maços carregados.

O preparo e a colheita ocorrem no início da manhã quando as plantas estão úmidas com orvalho, encharcando as roupas dos trabalhadores. É sabido que 9mg de nicotina pode ser encontrada em 100ml de orvalho (McBride *et al.*, 1998). A resina, da planta, forma uma camada grossa de goma (principalmente na retirada dos botões e na colheita das folhas) que solidifica nas roupas e na pele dos trabalhadores. No calor os trabalhadores retiram suas camisas expondo diretamente a pele (Parikh *et al.*, 2005).

O processo de colheita resulta em arranhões e descascamento da pele ao redor da unha, por não terem o hábito de usar luvas de proteção, pois se torna um impedimento quando estas ficam duras e pegajosas, os trabalhadores facilitam a absorção da nicotina através da rota dermal (Parikh *et al.*, 2005). O calor e a umidade nos campos fazem com que luvas e roupas de proteção sejam extremamente desconfortáveis (Quandt *et al.*, 2000). Entre os trabalhadores da lavoura de fumo no sul do Brasil, 55% não usam as roupas de proteção recomendada, assim como luvas e botas. Os fumicultores reclamam que as roupas não são projetadas para o clima quente da época do plantio e colheita, que vai de outubro a março (NIOSH, 1996).

Não há informação dos efeitos crônicos à saúde devido à exposição dermal da nicotina. Para trabalhadores rurais que já correm riscos de terem doenças relacionadas ao trabalho (dermatite, câncer, infertilidade) ou outros riscos (envenenamento por pesticidas) em proporção maior do que a população geral, exposição à nicotina e GTS podem contribuir com problemas de saúde a longo prazo (Quandt *et al.*, 2000).

5.2. Peixes

Omoniyi *et al.* (2002) afirma que o efeito de toxinas em peixes pode ser analisado através de índices hematológicos (taxa de hemoglobina, taxa de hemáceas, volume celular médio, volume celular da hemoglobina e concentração média de hemoglobina corpuscular) utilizado em pesquisas toxicológicas e monitoramento ambiental. O autor avaliou o efeito do pó preparado com folhas de fumo em *Clarias gariepinus* e encontrou a toxicidade aguda como sendo LC50 em 48h de 626mg por litro de água. Este valor foi bem maior do que o estimado no estudo (Agbon *et al.*, 2002) com *Oreochromis niloticus*, registrado em 109,6mg/l, indicando assim, que *C. gariepinus* foi mais resistente à toxicidade do tabaco do que *O. niloticus*. Uma das possíveis causas da mortalidade observada no estudo com *C.*

gariepinus foi devido ao acúmulo de muco nas brânquias dos peixes moribundos que ocasionou redução na atividade respiratória (Omoniyi *et al.*, 2002).

Durante a exposição sub-letal um progressivo decréscimo do peso foi observado com o aumento da concentração do extrato. Houve, portanto, um retardo no crescimento comparado aos peixes do grupo controle, devido talvez, a interações da nicotina com o metabolismo normal dos peixes (Omoniyi *et al.*, 2002).

Um decréscimo significativo ($p < 0,05$) foi observado nos índices hematológicos em doses sub-letais. A redução destes parâmetros é um indicativo de anemia causada pela exposição ao extrato da folha do fumo, podendo ser resultado da destruição ou inibição da produção de eritrócitos (Omoniyi *et al.*, 2002). Por fim, o autor concluiu que o extrato em pó, da folha do tabaco, exerceu ação piscicida.

5.3. Bactéria

Extrato da folha de *N. tabacum* em metanol (60%) exibiu atividade antibacteriana em seis de nove culturas a concentrações de 25mg/ml.

Isolados de *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* foram inibidas e *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris* não foram inibidas (Akinpelu & Obuotor, 2000).

6. AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE

Muitos agentes exógenos, naturais ou sintéticos, afetam o DNA podendo induzir mutações genéticas e/ou tumores (Lin, 1990). As alterações no material genético podem ocorrer de várias formas - desde a substituição de um nucleotídeo até a alteração na quantidade de todo um conjunto cromossômico.

A identificação e a caracterização destas mutações vêm melhorando e se desenvolvendo continuamente. Dependendo do tipo de lesão que se quer detectar são necessários diferentes testes. São conhecidos centenas destes testes, mas dificilmente são viáveis ou mesmo necessários em grande número para se fazer uma avaliação do potencial mutagênico de um composto.

Ramel (1983) afirma que devido à similaridade do código genético e da síntese de proteínas entre os organismos, o uso de testes de mutagenicidade de curta duração pode servir na obtenção de informação sobre um mutágeno, talvez podendo ser extrapolada a outras espécies, pois se agentes químicos causam danos ao DNA, este terá potencial genotóxico em qualquer tipo celular. Porém é necessária muita cautela, pois organismos diferentes possuem suscetibilidade, mecanismos de reparo, de detoxificação e metabolismos diferentes.

Para suprir a necessidade do conhecimento sobre exposição ambiental, foram criadas estratégias de avaliação utilizando tanto testes *in vitro* como *in vivo*, sendo constante o cuidado na aplicação dos resultados em outros organismos e no aprimoramento das estratégias de avaliação a serem empregadas (Villela *et al.*, 2003). Assim, os testes de curta duração, aliando biomarcadores de exposição e biomarcadores de efeito, são importantes ferramentas para traçar os riscos de exposição à xenobióticos e para providenciar informações adicionais ao comportamento da(s) substância(s) no organismo vivo, nos seus diferentes órgãos e tecidos.

7. BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO

O termo “exposição” denota o contato com qualquer atributo que possa ser relevante para a saúde do organismo, atuando isoladamente ou em interação com fatores genéticos (Armstrong e *cols.*, 1992). Indicadores biológicos de exposição ou biomarcadores podem ser substâncias tóxicas não reativas, os seus metabólitos ou os produtos de reação desses tóxicos com substâncias que ocorrem naturalmente no corpo, como as quebras no DNA. A presença destas substâncias em fluidos biológicos (sangue, urina, saliva) ou tecidos indica se ocorreu ou não exposição a um determinado tóxico (Coutrim *et al.*, 2000), assim como a presença de dano ao DNA, este podendo ser ou não reparado. A exposição pode ser avaliada por medida da concentração do agente químico em amostras ambientais, como o ar (monitorização ambiental), ou através da medida de parâmetros biológicos (monitorização biológica), denominados indicadores biológicos ou biomarcadores. A monitorização biológica da exposição aos agentes químicos, propriamente dita, significa a medida da substância ou seus metabólitos em vários meios biológicos, como sangue, urina, saliva, ar exalado e outros (Amorin, 2003).

7.1. Ensaio Cometa

O teste alcalino eletroforético de célula-única ou Ensaio Cometa (EC) é uma técnica que permite a detecção de diferenças intercelulares de dano e reparo ao DNA em qualquer população de célula eucariótica, permitindo desta forma, análise em diferentes tecidos com pequena amostra de células e alta sensibilidade (1 a 10000 células), podendo o resultado ser obtido em um dia. Além disso, o custo do teste é razoavelmente econômico (Ribas *et al.*, 1995).

O ensaio é simples e sensível: as células são embebidas em agarose e esta mistura é colocada sobre uma lâmina, estas células são então lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares extraídas com sais. Quando o DNA é submetido a uma corrente elétrica, pela eletroforese, os segmentos de DNA livres resultantes de quebras, migram. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano reconhecível no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, como de um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Para alguns autores o tamanho da cauda é proporcional ao dano que foi causado (McKelvey-Martin *et al.*, 1993), mas somente é de consenso que a visualização do "cometa" significa dano ao nível do DNA (Tice, 1995).

O protocolo utilizado na execução do teste foi o baseado na versão alcalina (pH>13), desenvolvida por Singh *et al.* (1988). A versão alcalina pode detectar danos ao DNA tais como quebras de fita única e dupla, sítios alcalilábeis e sítios de reparo por excisão através do aumento na migração do DNA, comparado ao controle negativo e também "crosslinks" entre DNA-DNA e DNA-proteína devido à diminuição da migração do cometa comparado ao controle negativo (Tice *et al.*, 2000; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005).

A identificação do dano ao DNA pode ser feita por diferentes maneiras, uma forma é medir o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular de medidas, outra forma é ordenar visualmente as células em diferentes classes, podendo se obter um valor arbitrário que expresse o dano geral que uma população de células sofreu (Collins *et al.*, 1997). As células "cometa", coradas com nitrato de prata, foram analisadas em microscópio óptico normal e classificadas de acordo com o tamanho da cauda em relação à cabeça: classe 0: sem cauda (sem dano); classe 1: com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça; classe 2: com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o

diâmetro da cabeça; classe 3: com uma cauda longa superior a duas vezes o diâmetro da cabeça; e classe 4: cauda longa e mais espalhada (em forma de leque) do que a classe 3 (Figura 4) (Collins *et al.*, 1997; Da Silva *et al.*, 2000; Villela *et al.*, 2006). Após as análises é gerado um valor único, considerado como índice de danos, que varia de zero (100 células x classe 0) à 400 (100 células x classe 4).


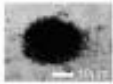
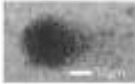

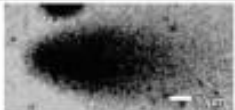
Dano observado	Cabeça/cauda	Classes de dano
	Sem cauda	0
	≤ 1	1
	1 - 2	2
	≥ 2	3
	Sem cabeça	4

Figura 4: Classes de danos.

7.2. Quantificação dos elementos químicos

A identificação e a quantificação dos metais pesados nas amostras de fumo e no tecido do organismo biomonitor foram feitos utilizando a técnica PIXE e o programa GUPIX.

Atualmente a técnica PIXE (Emissão de Partículas por Raios-X) vem sendo utilizada para identificar os metais presentes no solo e outras amostras ambientais (Cruvinel *et al.*, 1999; Heuser *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2004; Nsouli *et al.*, 2004), incluindo detecção de elementos traços em plantas (Mireles *et al.*, 2004). Esta técnica é uma análise multielementar que verifica praticamente todos os elementos mais pesados que o sódio. O limite de detecção desta técnica, para a maioria dos metais no solo amostral, é feito em ppm (Cruvinel *et al.*, 1999; Nsouli *et al.*, 2004, Mireles *et al.*, 2004). Um feixe de íons

(prótons) é aplicado sobre a amostra e provoca a remoção de elétrons de orbitais internos (elétrons de alta energia de ligação) deixando o átomo instável. Para retomar a estabilidade, ocorre a transição de elétrons de um orbital mais externo para um interno.

Este processo, mostrado esquematicamente na Figura 5, libera energia na forma de raios-X característico de cada átomo, que são detectados por detectores apropriados. Os eventos são coletados e digitalizados em computador. A análise quantitativa dos metais é feita usando-se o programa GUPIX, desenvolvido na Universidade de Guelph (Canadá) (Maxwell *et al.*, 1989). Desta forma é possível determinar quais elementos estão presentes na amostra e em quais quantidades.

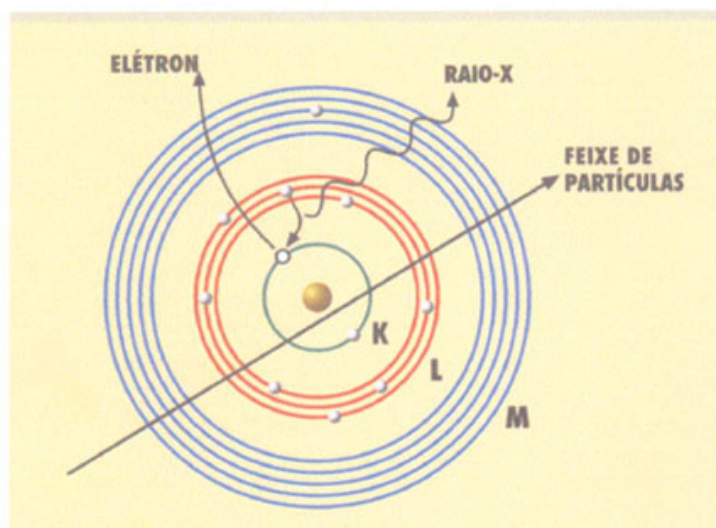


Figura 5: Técnica de PIXE – Emissão de partículas por Raios-X.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Implantação de Íons no Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IF-UFRGS). Foi utilizado o acelerador Tandetron que possui uma tensão terminal de 1MV positivos alcançando uma energia final de 2MeV (milhões de elétron-volt). Os raios-X liberados da amostra foram detectados por um detector de germânio (Ge) hiperpuro com uma resolução de 180 eV em 5,9 keV com alta eficiência entre 3 e 100 keV. O espectro foi analisado pelo programa GUPIX e os dados expressos em partes por milhão (ppm). (Yoneama & Dias, 2004).

8. BIOMARCADORES DE EFEITO

O biomarcador de efeito é um parâmetro biológico medido no organismo que reflete a interação da substância química com os receptores biológicos. Ao propósito de prevenção, um biomarcador de efeito considerado ideal, é aquele que mede uma alteração biológica em um estágio reversível (ou precoce), quando ainda não representa agravo à saúde. Geralmente, as alterações bioquímicas são consideradas como uma fonte potencial de indicadores biológicos de efeito. Se considerarmos que estas alterações precedem um dano estrutural, a detecção destas alterações biológicas permite a identificação precoce de uma exposição (Amorin, 2003). Atualmente, alterações no material genético que persistiram após reparo ao DNA são utilizadas como biomarcadores de efeito a compostos mutagênicos.

8.1. Teste de Micronúcleos

O Teste de micronúcleo é um biomarcador de efeito da genotoxicidade causada pelo xenobiótico, através do dano ao DNA.

Os micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos similares em estrutura ao núcleo, constituídos de uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal, como apresentado na Figura 6. Podem ser formados a partir de perdas de fragmentos acêntricos; por uma variedade de conseqüências mecânicas de quebra e troca cromossômica e por perda de cromossomos inteiros (Heddle *et al.*, 1991). Assim sendo, o micronúcleo representa perda de cromatina em conseqüência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico, sendo o agente genotóxico um dos prováveis causadores destes danos.

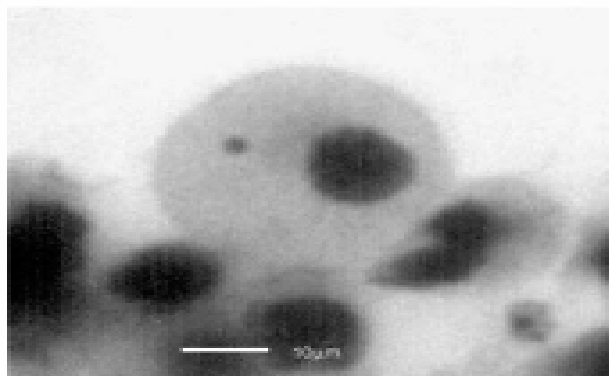


Figura 6: Micronúcleo em células de hemolinfa

O xenobiótico pode agir de duas formas no núcleo, diretamente sobre o cromossomo ou sobre o fuso mitótico, levando a perda de parte dos cromossomos, ou de todo cromossomo, respectivamente. Estes durante a citocinese, quando na formação do envoltório nuclear, se não forem incorporados pelo núcleo principal, formam seu próprio envoltório sendo considerados micronúcleos (Villela *et al.*, 2003)

O Teste de Micronúcleo foi adaptado a *Cantareus aspersus* devido sua ausência na literatura científica: seringa contendo 0,5 ml de 1:1 (v/v) metanol/ácido acético é utilizada pra coletar hemolinfa na mesma quantidade (0,5 ml). A seringa deve ser armazenada (7-10 minutos) no gelo e, após este período, feito esfregaço direto em lâminas de microscopia (duas por indivíduo). As lâminas devem ser fixadas em metanol durante 10 minutos, secas a temperatura ambiente e coradas com Giemsa a 5% com água tamponada (pH 5,8). São analisadas 1000 células por lâmina, totalizando 2.000 células por caracol, observando-se presença/ausência de micronúcleos.

8.2. Citocromo P450

Estudos de monitoramento ocupacional e ambiental utilizam a quantificação do sistema citocromo P450 como marcador bioquímico de exposição à xenobióticos (Porte *et al.*, 2001). As enzimas citocromo P450 constituem uma antiga família protéica, possivelmente a maior encontrada na natureza, com ampla distribuição em bactérias, fungos, plantas e animais. Estas enzimas exercem papel principal no metabolismo de vários xenobióticos, catalisando reações de detoxificação, quanto de bioativação (Guecheva & Henriques, 2003). Muitos compostos podem inibir (Kim *et al.*, 2002; Van Vleet *et al.*, 2001) ou induzir (Schuetz & Guzelian, 1984) as reações catalisadas pelo sistema enzimático citocromo P450. Por estas características, a quantificação destas enzimas se torna uma importante ferramenta no entendimento da interação organismo-xenobiótico.

A glândula digestiva dos caracóis é homogeneizada, centrifugada e o precipitado microsomal utilizado na determinação da concentração das proteínas pelo método de Lowry e *cols.* (1951) e na identificação dos citocromos B5, P450 e P420.

9. ESPÉCIE EXPOSTA À FOLHA DO FUMO: *Cantareus aspersus*

A utilização de animais nos trabalhos experimentais de pesquisa científica tem sido de fundamental importância. Em relação ao estudo da genotoxicidade muitos organismos, como peixes, moluscos, plânarias, aves, roedores têm sido utilizados diretamente no ambiente natural, e outros expostos em experimentos laboratoriais, ambos com o intuito de biomonitorar a ação genotóxica de uma substância específica ou de misturas complexas. Este tipo de estudo permite o conhecimento do grau de ação genotóxica do xenobiótico, no organismo específico, podendo colaborar no processo de diagnóstico e prevenção da exposição.

Neste trabalho utilizou-se *C. aspersus* com o objetivo de identificar a ação genotóxica e/ou mutagênica das folhas de *N. tabacum* através da exposição dermal.

O caracol terrestre tem sido utilizado nos últimos anos devido sua fácil aclimação e manipulação em laboratório e por sua sensibilidade e resistência aos testes de genotoxicidade.

C. aspersus (Muller) (Mollusca: Gastropoda: Stylommatophora: Helicidae) (Figura 7) é nativo da Europa Ocidental e foi introduzido em outros continentes, primeiramente pela Nova Zelândia através da França em 1860, sendo hoje um dos mais abundantes moluscos terrestres (Barker & Watts, 2002).

Nos últimos anos houve um crescente interesse na biologia desta espécie em consequência do consumo humano; da sua importância como organismo de laboratório, sendo utilizado como bioindicador de contaminação ambiental de metais e da preocupação com algumas culturas, onde *C. aspersus* é considerado “praga” (Barker & Watts, 2002).



Figura 7: *Cantareus aspersus*.

O teste estatístico utilizado nos resultados obtidos foi a alternativa não-paramétrica para a ANOVA usando-se um critério de classificação, o teste de Kruskal-Wallis. E para identificar diferenças significativas entre os grupos tomados dois a dois, foi utilizado o teste não-paramétrico de comparações múltiplas, o Teste de Dunn.

II OBJETIVOS

Devido ao desconhecimento dos efeitos genotóxicos dos compostos presentes na folha do fumo, em especial a nicotina, através da exposição dermal, se teve por objetivo neste trabalho:

(1) Avaliar a genotoxicidade em *C. aspersus* expostos a folhas do fumo com e sem agrotóxicos, através do Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleos;

(2) Adaptar o Teste de Micronúcleo ao *C. aspersus*;

(3) Verificar a possível relação dos testes genotóxicos com a análise enzimática do Citocromo P450;

(4) Quantificar e/ou identificar os elementos químicos presentes na folha do fumo (*N. tabacum*) por HPLC, “screening” fitoquímico e PIXE;

(5) Quantificar e/ou identificar a deposição de elementos inorgânicos (metais) no corpo mole de *C. aspersus*, através da técnica PIXE.

CAPÍTULO II

Genotoxicity effect of *Nicotiana tabacum* leaves on *Cantareus aspersus*.

Fernanda Rabaioli da Silva^a; Tiago Dalpiaz^b; Emilene Nunes^b; Alexandre Ferraz^b; Tales Leandro Costa Martins^b; Johnny Ferraz Dias^c; Darlan Pase da Rosa^b; Marilene Porawski^{d,e}; Sílvia Bona^d; Juliana da Silva^b & Bernardo Erdtmann^{a,f}

^a Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500 – Prédio 43323, Campus do Vale, Caixa Postal 15053, CEP 91501970, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Genética Toxicológica – Curso de Biologia/ Curso de Farmácia – Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, RS, Brazil

^c Instituto de Física – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Laboratório de Hepatologia Experimental do HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil

^e Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

^f Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias do Sul, RS, Brazil.

Artigo em preparação, a ser submetido à Mutation Research.

Abstract

Southern Brazil is a major tobacco-leave producing area, employing over 950,000 workers. These tobacco farmers are routinely exposed to complex mixtures present in tobacco leaves including organic and inorganic compounds. The main studies involve nicotine. Research on the genotoxic effect of this agent present positive and negative results. The aim of this study was to evaluate the genotoxic effect of tobacco leaves, with and without exposure to flumetralin, by determining damage using the micronuclei test and comet assay as well the inhibition of cytochrome P450 enzymes in *Cantareus aspersus*. Thirty land mollusks were exposed to different treatments; ten snails exposed to tobacco leaves with pesticide; ten to tobacco leaves without pesticide and ten snails exposed to lettuce leaves (control group). Hemolymph cells were collected after 0, 24, 48 and 72 hours, the DNA damage was evaluated by the single cell gel assay for all these periods, and the frequency of micronuclei only in 72h. Significant results were found in groups exposed to tobacco leaves during 24, 48 and 72 hours of exposure by Comet Assay and by Micronucleus Test when compared to the control group. No difference was observed between different periods or between exposure to leaves with and without pesticide. Inhibition of cytochrome P450 enzymes occurs only in the group without pesticide. Chemistry results show the presence of the alkaloid nicotine, coumarin, saponin traces, flavonoids and different metals. These results revealed the genotoxic action of tobacco leaves in *C. aspersus* and the inhibition of enzyme activity, probably due to complex mixtures of the plant, mainly nicotine.

Key words: *Nicotiana tabacum*, comet assay, micronucleus test, *Cantareus aspersus*, tobacco leaves.

1. Introduction

Brazil is the second largest producer of tobacco leaves worldwide, with 14.1% of the production, right behind China. Located in southern Brazil, Rio Grande do Sul (RS) is the state that presents large production of tobacco leaves (*Nicotiana tabacum*), producing more than 320,000 tons annually and employing over 906,000 farm workers and 40,000 in cigarette factories (SCP, 2006; AFUBRA, 2006).

Research has shown that tobacco farmers are routinely exposed to complex mixtures present in tobacco leaves including organic and inorganic pesticides. Chemical analysis shows that tobacco leaves contain an unusual number of constituents. Nicotine, nicotianine, malic acid are characteristic (Hinds, 1882). Farmers are at risk of Green Tobacco Sickness (GTS), which is caused by dermal absorption of nicotine from wet tobacco leaves. GTS is characterized by nausea, pallor, chills, vomiting, headache, difficulty in breathing, abdominal pain, diarrhea, loss of appetite, runny eyes, blurred vision, weakness, prostration and dizziness, and occasionally by blood pressure or heart rate fluctuation (McBride *et al.*, 1998; Arcury *et al.*, 2003; Onuki *et al.*, 2003; Quandt *et al.*, 2003; Parikh *et al.*, 2005). GTS has been linked to nicotine and symptoms attributed to acute nicotine poisoning following dermal contact with mature tobacco plants.

Nicotine is the major alkaloid in tobacco. Studies on the genotoxic effect of this molecule are limited and contradictory. Some authors reported that nicotine and its four major metabolites were not genotoxic, either in the Ames test or in other bacterial indicator assays (Doolittle *et al.*, 1995) and that tobacco-induced DNA alterations are not related to nicotine content (Mizusaki *et al.*, 1977); others (Munzner and Renner, 1989; Trivedi *et al.*, 1990) have indicated positive responses with increased frequency of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in mammalian cells. A high dose (5mg/kg) of nicotine increased the frequency of chromosome aberrations in the bone marrow cells of Chinese hamsters (Munzner and Renner, 1989).

Although most studies on the genotoxic potential of nicotine show negative results, the risk could be high as consequence of exposure to the complex mixture present in tobacco leaves. According to some authors the synergistic effects of nicotine and pesticides should also be examined (Onuki *et al.*, 2003).

The quantity of nicotine in dried tobacco leaves varies around 4-8% (Hinds, 1882; IPCS-INCHEM, 2007). Farmworkers during harvest time may be exposed to up to 600 milliliters of dew or rain on the tobacco plants, the rough equivalent of the nicotine content of 36 cigarettes (NIOSH, 1996).

Since we lack knowledge on DNA damage caused by the dermal absorption of nicotine and other substances on the surface of tobacco leaves, it is necessary to use biomonitoring to assess genotoxicity. Biomonitoring can be useful organisms to evaluate genetic alterations caused by exposure to substance.

In the last few years, *Cantareus aspersus*, a land mollusk has been used as biomonitoring mainly for metals. This species is resistant enough and easily acclimatized in the laboratory. In this study, we adapted the Micronucleus Test to this species and investigated the response of *C. aspersus* to tobacco leaves exposure (with and without pesticides), taking into account the DNA damage induction assessed by the Micronucleus Test (MN) and Comet Assay in hemolymph cells and inhibition of cytochrome P450 enzymes. Besides, metal analysis, screening phytochemistry and nicotine dosage were evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Plant Material

Nicotiana tabacum leaves were collected on Cristal farm in October 2005. The farm is located in the center-south region of Rio Grande do Sul State, Brazil. Both tobacco leaves with and without pesticides were sampled. The only pesticide utilized for tobacco on farms is to control sucker growth, flumetralin (2-Chloro-N-(2,6-dinitro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-N-ethyl-6-fluorobenzenemethanamine). Leaves were packed and stored in a freezer at -30°C.

2.2. Mollusks

Land mollusks (n=30), *Cantareus aspersus*, adult individuals weighing 8.96 ± 1.62 g were obtained from a snail breeder at the Lutheran University of Brazil, Canoas, RS, Brazil. The mollusks were acclimatized to laboratory conditions ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) for 7 days, during which they received *Lactuca sativa* L. leaves from organic cultures and water *ad libitum*. After acclimatization, the snails were clustered and identified as control and test groups.

2.3. Treatments and hemolymph sampling

Two groups were exposed in the cage to tobacco leaves without pesticides (TL) and tobacco leaves with pesticides (TLP). The control group was exposed to *Lactuca sativa* L. leaves without pesticides (control). The leaves were sprayed with water daily.

Hemolymph samples were obtained from individuals in the TL, TLP and control groups during exposure: 0 hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours for Comet Assay and for the Micronucleus Test only at 72 hours. During these periods the animals were weighed every day. All hemolymph samples were collected using a syringe with heparin and processed within 30 minutes of collection. After 72 hours of exposure the animals were stored in a freezer at -30°C for metal analysis and determination of cytochrome P450.

2.4. Comet Assay

The alkaline Comet assay was performed as described by Singh *et al.* (1988) with several modifications adapted to hemolymph. In brief, 10µl of each heparinized

hemolymph sample were added to 95µl of 0.75% (w/v) low melting point agarose and the mixture added to a microscope slide pre-coated with 1.5% (w/v) of normal melting point agarose and covered with a coverslip. The slide was briefly placed on ice for the agarose to solidify and the coverslip carefully removed and the slide immersed in lysis solution (2.5M NaCl, 100mM EDTA and 10mM Tris, pH 10.0–10.5) containing freshly added 1% triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) for at least 1 h at 4 °C.

Subsequently, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300mM NaOH and 1mM EDTA, pH > 13) for 20 min for DNA unwinding, and electrophoresed in the same buffer. The electrophoresis conditions were 15 min at 300mA and 25V (0.7 V/cm). All of these steps were carried out under dim indirect light.

The electrophoresis slides were neutralized in 400mM Tris (pH 7.5) and fixed (15% w/v trichloroacetic acid, 5% w/v zinc sulfate, 5% glycerol), washed in distilled water and *over night* dried. The gels were re-hydrated for 5 min in distilled water, and then stained for 15 min (37°C) with a solution containing the following sequence: 34 mL of Solution B (0.2% w/v ammonium nitrate, 0.2% w/v silver nitrate, 0.5% w/v tungstosilicic acid, 0.15% v/v formaldehyde, 5% w/v sodium carbonate) and 66 mL of Solution A (5% sodium carbonate). The staining was stopped with 1% acetic acid and the gels were air-dried (Nadim *et al.*, 2001).

To calculate a damage index (DI), cells were visually allocated into five classes, using optical microscopy, according to tail size (0 = no tails and 4 = maximum-length tails) which resulted in a single DNA damage score for each individual and consequently for each group studied. Thus, the damage index (DI) of the individual could range from 0 (completely undamaged = 100 cells X 0) to 400 (maximum damage = 100 cells X 4) (Collins *et al.*, 1997; Da Silva *et al.*, 2000). The damage frequency (DF in %) was calculated for each sample based on the number of cells with tail versus those without.

2.5. Micronucleus test

The MN test was performed on hemolymph as a second monitoring system for comparison with the alkaline Comet assay. The MN test was initially adapted to *C. aspersus*. A syringe containing 0.5 ml of 1:1 (v/v) methanol/acetic acid was used to collect the same quantity (0.5 ml) of hemolymph. The syringe was briefly (7-10 minutes) placed on ice, then hemolymph samples were smeared onto microscope slides, fixed in methanol

during 10 min, air-dried, and stained for 7 min with a mixture of 10 ml Giemsa and 90 ml phosphate buffer (pH 5.8). The slides were examined using optical microscopy. Two hemolymph smears were prepared from each snail. A total of 2,000 cells were examined for each snail, observing the presence or absence of the micronucleus in the cells.

2.6. Enzyme analysis

2.6.1. Microsome preparation

The tissue (digestive gland) was homogenized in Ultra-Turrax for 15 seconds with 1:4 (w/v) of buffer (potassium phosphate 0,1M and pH 7.5; 0.15M KCl and 1mM EDTA). The homogenate was submitted to centrifugation at 12.000 x g during 20 minutes. The supernatant was submitted to two 105,000 x g centrifugations during 60 minutes and the microsomes were resuspended in 1:3 buffer 0.2M pH 7.5 and glycerol and stored at -70 °C (Vrolijk *et al.* 1994).

2.6.2. Protein dosage

The protein concentration of microsomes was determined by the Lowry *et al.* (1951) method, utilizing bovine albumen as a standard. The values were expressed in mg/ml. The samples were analyzed in duplicates at 625 nm in a spectrophotometer.

2.6.3. Cytochrome B5, P420 and P450 spectral characterization

For cytochrome B5, P420 and P450 spectral characterization, the microsomal suspension was diluted at 1mg/ml and sodium dithionite crystal from cytochrome B5 analysis added. The sample was analyzed against a microsome solution.

The P450 and P420 cytochrome were identified through the compound formed between reduced microsomes with sodium dithionite and 80µl of carbon monoxide. This mixture was analyzed against a microsome suspension reduced with sodium dithionite (Omura and Sato, 1964a; Omura and Sato, 1964b). The measures were performed in a Beckman DU70 spectrophotometer with a 400-700 nm absorption.

2.7. Chemistry analysis of tobacco leaves

2.7.1. Preparation of tobacco leaves

The leaves were oven-dried during 4 hours at a temperature of 60° C. They were ground with Coors ceramics crucibles and ceramic pestle. The tobacco leaves dust was used to prepare pastilles for metal analysis with PIXE and screening phytochemical.

The leaves with and without pesticides were used in HPLC for nicotine dosage.

2.7.2. Analysis by PIXE

Analysis by particle-induced X-ray emission (PIXE) technique (Johansson *et al.*, 1995) has been successfully employed to detect trace elements in plants and organisms because of its multielemental character, high sensitivity, simplicity and high sample throughput (Mireles *et al.*, 2004). The metal content of the tobacco leaf samples with and without pesticides and the entire body of the *Cantareus aspersus* were analyzed. Briefly, dried and powdered leaf samples of leaves as well as the entire body pool of the dried snails were well-homogenized and pressed into thick pellets which were placed in the target holder inside the reaction chamber. During the experiments, the pressure inside the reaction chamber was about 10^{-5} mbar. The experiments were carried out at the Ion Implantation Laboratory of the Physics Institute of the Federal University of Rio Grande do Sul (IF-UFRGS). A 3 MV Tandatron accelerator provided a 2.0 MeV proton beam with an average current of 5 nA at the target. The X-rays produced in the samples were detected by a germanium (Ge) detector with an energy resolution of about 180 eV in 5.9 keV with high efficiency between 3 and 100 keV. The spectra were analyzed with the GUPIX software package and the data are expressed in parts per million (ppm) (Maxwell *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 2000).

2.7.3. Screening phytochemistry

The phytochemical analysis (flavonoids, tannins, anthraquinones, alkaloids, saponins, volatile coumarins and cardiac glycosides) of the tobacco leaves was performed using methods described by Harborne (1984) and Matos (1988).

2.7.4. Nicotine dosage

The nicotine dosage was determined by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC). Chromatographic parameters for the determination of nicotine in

tobacco leaves extracted with water were: (a) method: reverse phase high performance liquid chromatography; (b) column: C₁₈ 250 x 4.6mm, and 5 µm particle size; (c) flow rate: 1.2 mL/minute; (d) detection: UV detector, 259 nm detector; (e) column temperature: 35 °C; (f) injection volume: 20 µL; (g) mobile phase: Phosphate buffer (pH 6.8; 10 mM): methanol (35:65% v/v). All reagents used were of HPLC grade. Standard nicotine (±) was purchased from Sigma, (lot. N^o. 093K4121). The chromatographic system consisted of a Perkin piston pump and a photodiode-array detector. Analysis was performed on a C₁₈ reversed-phase cartridge column (cartridge, 5 µm, 250 x 4.6 mm). The separation was carried out at 35 °C. The isocratic mobile phase used was a mixture of aqueous phase (phosphate buffer (pH 6.8)) and methanol in the respective proportions 35:65% (v/v). The solution was sonicated before use, and the flow rate was 1.2 mL/min.

The HPLC method used was based on the work developed by Tambwekar *et al.* (2003). A stock solution of nicotine (1mg/mL) was prepared by dissolving 100 mg in 100 mL of phosphate buffer (pH 6.8). Various dilutions (five points in graph) were prepared in the concentration range of 2.5 - 50 µg/mL. Areas for four injections were determined and the graph prepared. Retention time for the nicotine was ~3.93 minutes. The method linearity was observed in the expected concentration range, demonstrating its suitability for this analysis. The equation of the regression curve was $y = 0.02475 + 0.00005x$ and the goodness of fit (R^2) was found to be 0.996. Sixty-five grams of tobacco leaves were washed with 70 mL of distilled water. The resulting solution was lyophilized, yielding 705 mg of residue. The crude extract (100 mg) was dissolved (and labeled as solution "A") in 100 mL of phosphate buffer (pH 6.8) and a 20 µL aliquot was injected (in triplicate) and eluted with the mobile phase phosphate buffer (pH 6.8; 10 mM): methanol (35:65% v/v). No interferences in the analysis peak were found in the chromatogram.

2.8. Statistical analysis

The statistical differences between the three groups (control, TLP and TL) were analyzed using the non-parametric two tailed Kruskal–Wallis test with the Dunn Test for multiple comparisons to perform a non-parametric analysis of variances. The critical level for rejection of the null hypothesis was considered to be a P value of 5%.

3. Results

The Comet assay data, expressed as Damage Index (DI) and Damage Frequency (DF), for the land mollusk's hemolymph cells exposed to tobacco leaves and in the control group, at different exposure times (0, 24, 48 and 72h), are summarized in Table 1. The control groups, animals exposed to lettuce, did not show a difference when different exposure times were used, although 48h and 72h presented slightly increased damage. The same was observed at 0h for the different exposure groups (control, TL and TLP). Both groups, TL and TLP, show higher values than the control group for all exposure times. When subjected to the Kruskal-Wallis test, the mean DI and DF values of snail hemolymph cells for 24, 48 and 72 hours of exposure were significantly higher than the values from the control at the same exposure time, and than 0h from the same exposure group (see the Table for P values). No difference was observed between the TL and TLP groups.

Results observed by the Micronucleus Test (MN), for hemolymph cells of land mollusks collected at 72 hours are shown in Figure 1. The mean micronuclei in snail haemolymph exposed to tobacco leaves without and with pesticide, when subjected to the Kruskal-Wallis test, were significantly higher than the values from the control group ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively). No difference was observed between TL and TLP groups. At the end of the 72h toxicity was observed for the mollusks (swelling and death).

An inorganic element contained in the tobacco leaves without pesticide, in the tobacco leaves with pesticide, in the entire body of the *Cantareus aspersus* exposed to tobacco leaves with pesticide and without pesticide was analyzed by PIXE (Table 2 and 3). Twelve different elements were detected in the tobacco leaf samples. All these elements are present in tobacco leaves with and without pesticide. In *Cantareus aspersus* exposed to tobacco leaves without pesticide, 12 different elements were detected, and in snails exposed to tobacco leaves with pesticide 10 elements were detected. No copper and strontium were found in snails exposed to tobacco leaves with pesticide.

Enzyme analyses were performed in a pool of digestive glands of snails and a significant reduction of protein quantity in TLP was detected in the control group. However, a significant reduction of B5, P450 and P420 enzyme activity was observed in TL, shown in Table 4.

In relation to nicotine dosage, we found 22.36 $\mu\text{g/mL}$ in the extract solution (Solution A). The solution obtained from washed tobacco leaves was lyophilized yielding 705 mg of residue. This residue was lyophilized and 15.76 mg of nicotine were extracted from 65g of tobacco leaf with 70 mL of water, which represents about 0.02% of nicotine per leaf.

Phytochemical analysis was performed on the tobacco leaves. The substances found were coumarin, saponin trace, alkaloid and flavonoid as presented in the Table 5.

4. Discussion

Penetration through the skin and subsequent systemic absorption is the most significant extrapulmonary uptake route in occupational exposure to chemicals (Zorin, 1999). The genotoxic effects of tobacco through dermal exposure are unknown. Substances present in tobacco are a complex mixture of organic and inorganic compounds that may interact to produce additive, synergistic or antagonistic effects (Fent, 2003). Butterworth (1995) calls attention to the great complexity of the effects of mixture on organisms. The mixture genotoxicity has been found to be synergistically higher compared to individually tested substances (Pandey *et al.* 1995). Since nicotine is the main alkaloid in tobacco, studies focus on the genotoxic potential of nicotine, which generally shows negative results although a few isolated positive results have been reported.

Our findings from Comet Assay (Table 1) and the Micronucleus Test (Figure 1) present values for the hemolymph of snails exposed to tobacco leaves with and without pesticide that are significantly higher than the values for the control group. Results observed for Comet assay in this study detected recent lesions that can be repaired, such as breaks and alkali-labile sites, while the observed micronuclei detected non-repairable damage, such as clastogenic and aneugenic lesions. According to these results, the compounds present in the tobacco leaves were genotoxic and mutagenic from *Cantareus aspersus*. Increased DNA damage baseline levels (by Comet assay) in untreated mollusks for the different exposure times can be explained by animal stress. Other authors demonstrated similar results for the controls (Villela *et al.*, 2007), but the MN frequency shows acceptable values, conferring reliability on the results. However an increased damage level by Comet assay and Micronucleus test were observed for TL and TLP. No difference was observed between land mollusks exposed to tobacco leaves with and without flumetralin. This result shows that no genotoxic effect can be attributed to pesticide.

According to the Cooperation Center for Scientific Research Relative to Tobacco (Coresta, 2007), residues of this nitro-pesticide are present on untreated leaves. They may persist for longer than a year (Johnson and Connell, 2001). Flumetralin is a suspected endocrine disruptor which can produce adverse effects on early development, reproduction, and other hormonal processes and may be active at minuscule levels (Lyons, 2000; Wattiez

and Veillerette, 2004), however none of the solvent components have been shown to be carcinogenic in humans or in experimental animals. Flumetralin did not affect reproduction capabilities in rats over two generations. It was not fetotoxic or teratogenic in rats or rabbits, and showed no genotoxic potential in mutagenicity studies up to 200 mg/kg, the maximum tolerated dose (Sherertz, 1995). This pesticide is unlikely to present acute hazard in normal use (WHO, 2004).

Phytochemical analysis (Table 5) shows the presence of the alkaloids in tobacco leaves. Hinds (1882) states that nicotine is the main tobacco alkaloid. In our results we found about 0.02% of nicotine per leaf. This lower value of nicotine than those found by other authors (IPCS-INCHEM, 2007) can be explained by the extraction method. Argentin and Cicchetti (2004) obtained positive results from the Micronucleus Test in mammalian culture cells treated with nicotine with the rapid induction of DNA damage, occurring at maximum levels at 24h exposure and prolonged, lasting throughout the 72 h of treatment. Our results showed a maximum frequency of damage at 72h, but similarly increased damage was observed after 24h. Nicotine showed a dose-dependent increase in DNA fragmentation, accessed by Comet Assay, in mini-organ cultures of human nasal epithelia reflecting direct genotoxic effects (Sassen *et al.*, 2005), confirming recent results in lymphatic tissue of the palatine tonsils and peripheral lymphocytes (Kleinsasser *et al.*, 2005). Nicotine has also been implicated in free radical generation in rodent and human cells of various types, directly addressing the relationship between reactive oxygen species (ROS) induction and the observed DNA damage (Wetscher *et al.*, 1995; Yildiz, 1999; Argentin and Cicchetti, 2004). This alkaloid has been shown to induce or inhibit the process of programmed cell death, depending on the type of nicotine receptor(s) present in target cells (Wright, 1993; Heeschen, 2001; Argentin and Cicchetti, 2004). The clastogenic activity of the alkaloid could potentially aid in the development of genetic instability and thus, favor conversion to the fully malignant phenotype (Campain, 2004).

Another chemical group that was observed and deserves attention is coumarin. Coumarin has been identified as a natural constituent in Burley and Virginia tobacco. The levels of coumarin, in different types of tobacco, vary between 0.05 and 4.7 µg/g. (Christakopoulos *et al.*, 1992). Gasparoto and Arquimedes (2005) shows that coumarin presented significant molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*. Our results showed the presence of coumarin, and we believe that this is the reason for the toxic effect

observed at 72h in *Cantareus aspersus* where 50% of snails died in the group exposed (data not shown).

Coumarin exhibits marked species differences in both metabolism and toxicity. A number of studies have examined the mutagenic and genotoxic potential of coumarin. Overall, the data suggest that coumarin is not a genotoxic agent. Both negative and positive responses have been reported for coumarin in Ames tests, sister chromatid exchange and chromosomal aberration tests conducted on Chinese hamster ovary cells (Lake, 1999). Coumarin does not induce micronuclei formation in bone marrow cells after a single oral dose in Swiss mice (Api, 2001).

Flavonoids are phenolic compounds that are widely distributed in all foods of plant origin. Several beneficial properties have been attributed to these compounds, including antioxidant, anti-inflammatory, and anticarcinogenic effects (Da Silva *et al.*, 2002; Galati and O'Brien, 2004). These chemopreventive and anticancer properties are associated with their pro-oxidant activity and ability to induce mitochondrial dysfunction, leading to apoptosis of tumor cells and to the inhibition of enzymes responsible for carcinogen activation, and therefore the prevention of tumor formation (Galati and O'Brien, 2004). However, these properties may lead to toxicity as the inhibition of carcinogen-activating enzymes may also cause potentially toxic flavonoid–drug interactions, inducing and inhibiting drug-metabolizing enzymes (Galati and O'Brien, 2004). Flavonoids are potentially harmful chemicals, since some have been shown to be mutagenic in bacteria and mammalian test systems (MacGregor, 1986; Sahu and Gray, 1996; Skibola and Smith, 2000; Da Silva *et al.*, 2002). Nevertheless, the data on flavonoid genotoxicity are incomplete, and equivocal results have been obtained with respect to mutagenicity observed with mammalian cell tests (Das *et al.*, 1994; Skibola and Smith, 2000).

According to data obtained in the phytochemical analysis, saponin traces were found in tobacco leaves. This compound is described as presenting anti-genotoxic and anti-mutagenic (Scarpato *et al.*, 1998), anti-tumoral (Lee *et al.*, 1999) and anti-inflammatory activity (Navarro *et al.*, 2001), and probably did not help to increase the DNA damage observed in TLP and TL.

As to inorganic compounds, metals were detected by PIXE analysis in higher amounts in the TL than in the TLP group, both in plants and mollusks (see Table 2 and 3). Villela *et al.* (2006; 2007) weight the influence of the element accumulated in the

accumulation process of the other element. The authors observed the presence of lead and rubidium in mussels where the amount of calcium (Ca) was reduced. Studying juvenile rainbow trout, Franklin *et al.* (2005) suggested that Ca and Cd share common pathway(s)/transport mechanism(s) and that nutrient metals other than Ca may also influence Cd (and other metals) uptake. Probably the snails exposed to tobacco leaves with pesticide increased Ca absorption and consequently reduced the absorption of the other elements, as seems to be the case with Cu and Sr. It is well-known that a wide variety of metals act as mutagenic and carcinogenic agents in both human and animal studies (Leonard, 2004) and although snails of the TL and TLP group presented different metal contents, no significant difference was found for DNA damage assessed by Comet Assay and Micronucleus Test. Both the presence of iron (Fe) and copper (Cu) in *C. aspersus* (Table 3) possibly contributed to ROS generation because dietary phenolics have been shown to act as pro-oxidants in systems containing redox-active metals. In the presence of O₂, transition metals such as Cu and Fe catalyze the redox cycling of phenolics, leading to the formation of reactive oxygen species (ROS) and phenoxyl radicals that can damage DNA, lipids, and other biological molecules (Li and Trush, 1994).

When digestive gland proteins and enzymes were analyzed (Table 4) P450 and P420 activity was reduced in TLP and TL compared to the control group, but the difference was significant only in TL. The reduction observed in the exposed snails is probably because nicotine and flavonoid inhibits cytochrome P450 activity as observed in studies by Van Vleet *et al.* (2001) and Galati and O'Brien (2004), however the significant inhibition in cytochrome P450 in TL can also be explained by the presence of copper in snails exposed to tobacco leaves without pesticides. According to Kim *et al.* (2002), copper decreases the rates of the P450-catalyzed reaction different from other ions, like zinc, magnesium, manganese and cobalt. Galati and O'Brien (2004) also demonstrated drug-metabolizing enzyme inhibition by flavonoids. The susceptibility of cytochrome P450 to chemically mediated damage relates directly to the central role of this hemoprotein in the chemical activation/detoxification of a wide variety of lipophilic drug substrates (Kim *et al.*, 1998). Inhibition of P450 in *C. aspersus*, by tobacco leaves, mainly in the group without pesticide, indicated that the mollusks can accumulate concentrations of different genotoxic agents in their digestive gland. This also justifies the similar DNA damage between TL and TLP.

In conclusion, our study demonstrates the presence of genotoxic effects in *Cantareus aspersus* exposed to tobacco leaves with and without pesticide. This induction of DNA damage by dermal exposure to tobacco leaves was caused by a complex mixture present in the leaves. This study shows the presence of the alkaloid nicotine, coumarin, saponin traces, flavonoids and different metals, as well as the probable persistence of flumetralin, influencing genotoxic, mutagenic and enzymatic inhibition in *C. aspersus*. Our study provided chemical and biological data about *C. aspersus* exposed to tobacco leaves. The results of our study confirm the sensibility of the Comet Assay and Micronucleus Test for the evaluation of the complex mixture, indicating an association between nicotine, coumarin and flavonoid/metal interaction (mainly Cu and Fe) as the main causes of DNA damage in hemolymph cells from the land mollusk *C. aspersus* by tobacco leaves.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to farmer for granting us permission to collect tobacco leaves samples on his farm and to the Brazilian agency Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CAPES), University Federal of Rio Grande do Sul (UFRGS) and Lutheran University of Brazil (ULBRA) for their financial and technical support.

References

- Api AM (2001) Lack of effect of coumarin on the formation of micronuclei in an in vivo mouse micronucleus assay. *Food Chem Toxicol* 39: 837–841.
- Arcury TA, Quandt SA, Preisser JS, Bernert JT, Norton D and Wang J (2003) High levels of transdermal nicotine exposure produce green tobacco sickness in Latino farmworkers. *Nicotine Tob Res* 5: 315-321.
- Argentin G and Cichetti R (2004) Genotoxic and Antiapoptotic Effect of Nicotine on Human Gingival Fibroblasts. *Toxicol Sci* 79: 75–81.
- Associação dos Fumicultores do Brasil (Afubra), <http://www.afubra.com.br/> (September, 2006).
- Butterworth FM (1995) Introduction to biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change. In: Butterworth BE, Corkum LD and Guzmán-Rincón J (eds) *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, New York, pp 1-8.
- Campain JA (2004) Nicotine: Potentially a Multifunctional Carcinogen? *Toxicol Sci* 79: 1-3.
- Campbell JL, Hopman TL, Maxwell JA and Nejedly Z (2000) The Guelph PIXE software package III: alternative proton database. *Nucl Instr Meth B* 170: 193–204.
- Collins A, Dusinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K and Vaughan N (1997) Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen* 30:139-146.
- Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco (Coresta), <http://www.coresta.org> (January, 2007).
- Christakopoulos A, Feldhusen K, Norin H, Palmqvist A and Wahlberg I (1992) Determination of Natural Levels of Coumarin in Different Types of Tobacco Using a Mass Fragmentographic Method. *J Agric Food Chem* 40: 1358-1361.
- Da Silva J, Freitas TRO, Marinho JR, Speit G and Erdtmann B (2000) An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet Mol Biol* 23: 241–245.

- Da Silva J, Herrmann SM, Heuser V, Peres W, Possa Marroni N, Gonzalez-Gallego J and Erdtmann B (2002) Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 40(7): 941-947.
- Das A, Wang JH and Lien EJ (1994) Carcinogenicity, mutagenicity and cancer preventing activities of flavonoids: a structure–systemactivity relationship (SSAR) analysis. *Prog Drug Res* 42: 133–167.
- Doolittle DJ, Winegar R and Lee CK (1995) The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutat Res* 344: 95–102.
- Fent K (2003) Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol Lett* 141:353–365.
- Franklin NM, Glover CM and Wood CM (2005) Calcium/cadmium interactions at uptake surfaces in rainbow trout: waterborne versus dietary routes of exposure. *Environ Toxicol Chem* 24(11): 2954-2964.
- Galati G and O'Brien PJ (2004) Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 37(3): 287 – 303.
- Gasparoto JR and Arquimedes (2005) Phytochemical study and evaluation of the molluscicidal activity of *Calophyllum brasiliense* Camb (Clusiaceae). *Quím Nova* 28: 575-578.
- Harborne JB (1984) *Phytochemical Methods*. Academic Press, London.
- Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, Tsao PS, Johnson FJ and Cooke JP (2001) Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* 7: 833–839.
- Hinds JID (1882) *The Use of Tobacco*. Cumberland Presbyterian Publishing House, pp. 1-138. <http://medicolegal.tripod.com/hinds1882.htm>.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS-INCHEM), <http://www.inchem.org/> (October, 2006).
- Johansson SA, Campbell JL and Malmqvist KG (1995) Particle-induced X-ray emission spectrometry (PIXE). New York: John Wiley and Sons.
- Johnson GCC and Connell JF (2001) Shallow Ground-Water Quality Adjacent to Burley Tobacco Fields in Northeastern Tennessee and Southwestern Virginia, Spring 1997. U.S. Geological Survey. 43p.

- Kim J-S, Ahn T, Yim S-K and Yun C-H (2002) Differential Effect of Copper (II) on the Cytochrome P450 Enzymes and NADPH-Cytochrome P450 Reductase: Inhibition of Cytochrome P450-Catalyzed Reactions by Copper (II) Ion. *Biochemistry* 41: 9438-9447.
- Kleinsasser NH, Sassen AW, Semmler MP, Harréus UA, Licht A-K and Richter E (2005) The Tobacco Alkaloid Nicotine Demonstrates Genotoxicity in Human Tonsillar Tissue and Lymphocytes. *Toxicol Sci* 86(2): 309-317.
- Lake BG (1999) Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food Chem Toxicol* 37: 423-453.
- Lee S-J, Sungb J-H, Leeb S-J, Moonc C-K and Lee B-H (1999) Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin. *Cancer Lett* 144: 39-43.
- Leonard SS, Bower JJ and Shi X (2004) Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Mol Cell Biochem* 255: 3–10.
- Li Y and Trush MA (1994) Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res* 54: 1895s – 1898s.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lyons G (2000) Pesticide Action Network UK. pp 1-6.
- Matos FJA (1988) *Introdução à Fitoquímica Experimental*. Editora da UFC, 126 p. Fortaleza.
- Maxwell JA, Teesdale WJ and Campbell JL (1995) The Guelph PIXE software package II. *Nucl Instr Meth Phys Res B* 95: 407–421.
- McBride JS, Altman DG, Klein M and White W (1998) Green tobacco sickness. *Tob Control* 7: 294-298.
- MacGregor JT (1986) Mutagenic and carcinogenic effects of flavonoids. In: Cody V, Middlenton E and Harbone JB (eds) *Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Biochemical Pharmacological and Structure–Activity Relationships*, New York, pp 411–424.

- Mireles A, Solís C, Andrade E, Lagunas-Solar M, Pina C and Flocchini RG (2004) Heavy metal accumulation in plants and soil irrigated with wastewater from Mexico city. *Nucl Instr Meth B* 219–220.
- Mizusaki SH, Okamoto H, Akiyama A and Fukuhara Y (1977) Relation between chemical constituents of tobacco and mutagenic activity of cigarette smoke condensate. *Mutat Res* 48: 319–325.
- Munzner R and Renner HW (1989) Genotoxic investigations of tobacco protein using microbial and mammalian test systems, *Z. Ern~ih rungswiss* 28: 300-309.
- Nadin SB, Vargas-Roig LM and Ciocca DR (2001) A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 49: 1183–1186.
- Navarro P, Giner RM, Recio MC, Máñez S, Cerdá-Nicolás M and Rios J-L (2001) In vivo anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*. *Life Sci* 68: 1199–1206.
- NIOSH Agricultural Health & Safety Center News (1996). Southeast Center Studies Ways to Prevent Green Tobacco Sickness, <http://www.cdc.gov/niosh/nora/symp06/pdfs>.
- Omura T and Sato R (1964a) The carbon Monoxide-binding pigment of liver microsomes. I - Evidence for its heme protein nature. *J Biol Chem* 239:2370-2378.
- Omura T and Sato R (1964b). The carbon Monoxide-binding pigment of liver microsomes. II – Solubilization, purification and properties. *J Biol Chem* 239: 2379-2385.
- Onuki M, Yokoyama K, Kimura K, Sato H, Nordin RB, Naing L, Morita Y, Sakai T, Kobayashi Y and Araki S (2003) Assessment of Urinary Cotinine as a Marker of Nicotine Absorption from Tobacco Leaves: A Study on Tobacco Farmers in Malaysia. *J Occup Health* 45: 140-145.
- Pandey P, McGowen RM, Vogel EW and Butterworth F.M (1995) Genotoxicity of polychlorinated biphenyl (PCB) and polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures in the white/white+ eye-mosaic assay. In: Butterworth BE, Corkum LD and Guzmán-Rincón J (eds) *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, New York, pp 183 – 191.
- Parikh JR, Gokani VN, Kulkarni PK, Shah AR and Saiyed HN (2005) Acute and Chronic Health Effects Due to Green Tobacco Exposure in Agricultural Workers. *Am J Ind Med* 47:494–499.

- Quandt SA, Arcury TA, Preisser JS, Norton D and Austin C (2003) Migrant Farmworkers and Green Tobacco Sickness: New Issues for an Understudied Disease. *Am J Ind Med* 37: 307-315.
- Sahu SC and Gray GC (1996) Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett* 104: 193–196.
- Sassen AW, Richter E, Semmler MP, Harréus UA, Gamarra F and Kleinsasser NH (2005) Genotoxicity of Nicotine in Mini-Organ Cultures of Human Upper Aerodigestive Tract Epithelia. *Toxicol Sci* 88(1): 134-141.
- Scarpato R, Bertoli A, Naccarati A, Migliore L, Cocchi L, Barale R and Pistelli L (1998) Different effects of newly isolated saponins on the mutagenicity and cytotoxicity of the anticancer drugs mitomycin C and bleomycin in human lymphocytes. *Mutat Res* 420: 49–54.
- Secretaria da Coordenação e Planejamento do Rio Grande do Sul (SCP), <http://www.scp.rs.gov.br/atlas> (August, 2006).
- Sherertz PC (1995) PRIME +®. Virginia Department of Health: Division of Health Hazards Control. Richmond 804:786-1763, http://www.vdh.virginia.gov/epi/public_health_toxicology/Prime.PDF
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184–191.
- Skibola CF and Smith MT (2000) Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* 29: 375–383.
- Tambwekar KR, Kakariya RB and Garg S (2003) A validated high performance liquid chromatographic method for analysis of nicotine in pure form and from formulations. *J Pharm Biomed Anal* 32(3): 441-450.
- Trivedi AH, Dave BJ and Adhvaryu SG (1990) Assessment of genotoxicity of nicotine employing in vitro mammalian test systems. *Cancer Lett* 54: 89–94.
- Van Vleet TR, Bombick DW and Coulombe RAJr (2001) Inhibition of Human Cytochrome P450 2E1 by Nicotine, Cotinine, and Aqueous Cigarette Tar Extract in Vitro. *Toxicol Sci* 64: 185–191.

- Villela IV, Oliveira IM, Da Silva J and Henriques JA (2006) DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat Res* 605: 78-86.
- Villela IV, Oliveira IM, Silveira J, Dias JF, Henriques JAP and Silva J (2007) Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions (*in press*). *Mutat Res* v. 00, p 00.
- Vrolijk NH, Targett NM, Woodin BR and Stegeman JJ (1994) Toxicological and ecological implication of biotransformation enzymes in tropical teleost *Chaetodon capistratus*. *Mar Biol* 119:151-158.
- Wattiez C and Veillerette F (2004) *Pestic News* 65: 11.
- Wetscher GJ, Bagchi M, Bagchi D, Perdakis G, Hinder PR, Glaser K and Hinder RA (1995) Free Radical Production in Nicotine Treated Pancreatic Tissue. *Free Radic Biol Med* 18(5): 877-882.
- WHO Library Cataloguing-in-Publication Data World Health Organization. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004.
- Wright SC, Zhong J, Zheng H and Larrick JW (1993) Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor promotion. *FASEB J* 7: 1045–1051.
- Yildiz D, Liu Y-S, Ercal N and Armstrong DW (1999) Comparison of Pure Nicotine and Smokeless Tobacco Extract-Induced Toxicities and Oxidative Stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 37: 434–439.
- Zorin S, Kuylenstierna F and Thulin H (1999) In vitro test of nicotine's permeability through human skin. Risk evaluation and safety aspects. *Ann Occup Hyg* 43: 405–13.

Table 1: Comet assay parameters (mean \pm S.D.) of animals exposed to lettuce (control) and animals exposed to tobacco leaves without (TL) and with pesticide (TLP). In each group: n=10.

Comet assay parameters				
Exposure time	0h	24 h	48 h	72h
Damage Index (DI)				
Control	56.80 \pm 34.53	53.60 \pm 36.76	96.60 \pm 41.18	97.50 \pm 38.55
TL	60.00 \pm 22.98	166.80 \pm 45.29 ^{**} , ^a	207.60 \pm 48.52 ^{**} , ^a	224.10 \pm 42.95 ^{***} , ^a
TLP	78.10 \pm 54.19	194.80 \pm 49.43 ^{***} , ^b	217.20 \pm 54.46 ^{***} , ^b	190.60 \pm 50.89 ^{**} , ^b
Damage Frequency (DF)				
Control	29.90 \pm 14.16	28.30 \pm 17.34	44.50 \pm 18.11	45.60 \pm 17.78
TL	29.00 \pm 10.88	73.90 \pm 14.22 ^{**} , ^a	83.00 \pm 16.05 ^{**} , ^a	88.40 \pm 7.32 ^{***} , ^a
TLP	37.60 \pm 19.33	77.30 \pm 17.17 ^{***} , ^a	82.70 \pm 15.9 ^{**} , ^a	85.10 \pm 7.71 ^{**} , ^a

^{**} Significant in relation to the Control at the same time group at P < 0.01 and ^{***} P < 0.001; in all cases significance was tested to control using the Kruskal-Wallis test

^a Significant in relation to the 0h of the same exposed group at P < 0.05 to 24h and at P < 0.001 to 48h and 72h, using the Kruskal-Wallis test

^b Significant in relation to the 0h of the same exposed group at P < 0.01 to 24h, at P < 0.001 to 48h, and at P < 0.05 to 72h, tested by the Kruskal-Wallis test.

Table 2: Inorganic element detection by PIXE analyses in the tobacco leaves.

Concentration in tobacco leaves (ppm \pm S.D.)		
Element	Without pesticide	With pesticide
Na	458964.80 \pm 38828.42	500306.60 \pm 37523.00
K	33448.80 \pm 508.42	34394.80 \pm 515.92
Mg	4138.50 \pm 224.31	2230.00 \pm 168.36
P	1659.10 \pm 94.40	1485.10 \pm 87.18
S	1822.40 \pm 75.45	1747.40 \pm 69.72
Cl	3425.40 \pm 112.35	1821.70 \pm 76.51
Al	1271.90 \pm 342.50	710.80 \pm 266.83
Si	1470.20 \pm 90.12	847.70 \pm 63.49
Ti	140.20 \pm 9.73	34.70 \pm 6.20
Mn	85.50 \pm 5.03	111.80 \pm 5.15
Zn	30.90 \pm 4.37	41.00 \pm 4.93
Sr	87.00 \pm 17.48	133.60 \pm 19.55

Table 3: Inorganic element detection by PIXE analyses in the entire body of *Cantareus aspersus* exposed to tobacco leaves without and with pesticide.

Concentration in <i>Cantareus aspersus</i> (ppm \pm S.D.)		
Element	Without pesticide	With pesticide
Na	3814.60 \pm 389.85	2414.00 \pm 385.99
Mg	2366.40 \pm 193.81	2735.10 \pm 211.42
P	7153.60 \pm 186.71	7104.20 \pm 185.42
S	7938.20 \pm 212.74	6994.00 \pm 193.73
Cl	5546.40 \pm 149.20	3416.30 \pm 112.39
K	9732.90 \pm 210.23	7044.70 \pm 176.82
Ca	15981.10 \pm 260.49	21933.60 \pm 331.19
Ti	57.30 \pm 7.63	130.10 \pm 9.67
Fe	150.50 \pm 8.31	134.60 \pm 8.95
Cu	48.70 \pm 7.28	No detected
Zn	87.30 \pm 7.75	78.70 \pm 8.43
Sr	254.30 \pm 46.56	No detected

Table 4: Protein and enzyme analysis from digestive glands of *Cantareus aspersus* individuals exposed to tobacco leaves, without pesticide (TL) and with pesticide (TLP), expressed as mean \pm S.D.

	Control (n=6)	TL (n=6)	TLP (n=6)
Protein	8.33 \pm 0.49	6.59 \pm 2.23	6.33 \pm 0.37*
B5	35.47 \pm 4.26	26.92 \pm 2.86**	31.21 \pm 3.72
P450	126.09 \pm 6.99	84.6 \pm 15.48***	108.83 \pm 7.25
P420	231.72 \pm 12.41	149.55 \pm 31.98***	201.14 \pm 8.70

* Significant in relation to the Control at P<0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001.

Table 5: Phytochemical analysis of the tobacco leaves.

SUBSTANCE	PRESENCE/ RESULTS
Alkaloid	Positive
Phenolics Substances	Positive
Coumarin	Positive
Flavonoids	Positive (flavone)
Saponin	Trace
Tannins	Negative
Cardiotonic Heterosides	Negative
Anthraquinone	Negative

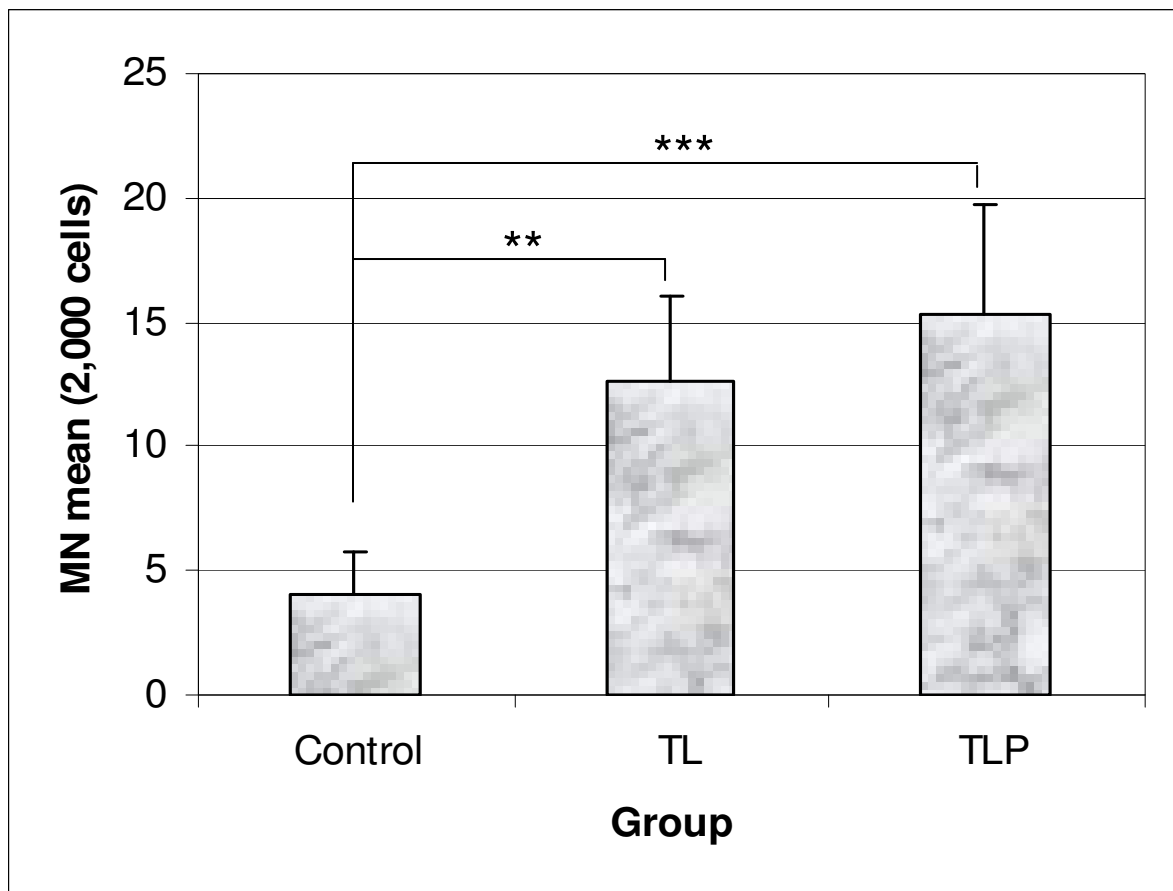


Figure 1: Detection of micronuclei mean (\pm S.D.) in hemolymph cells of *Cantareus aspersus* individuals exposed to tobacco leaves, without pesticide (TL) and with pesticide (TLP). Significant at $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$. Significance was tested with respect to control using the Kruskal-Wallis test.

CAPÍTULO III

I DISCUSSÃO

Exposição a substâncias perigosas pode ocorrer por inalação, ingestão e contato dermal (Schneider *et al.*, 2000). Dentre estas, exposição via oral e via respiratória são bem documentadas. Por outro lado, o conhecimento em relação exposição via dermal é limitado, talvez pela interpretação errônea que ocorria até a metade de 1960, de que a pele era uma barreira impermeável a químicos (Sartorelli, 2002). Atualmente, o interesse nas causas e efeitos da absorção percutânea a substâncias químicas tem aumentado.

Nas últimas três décadas, absorção percutânea tem sido demonstrada por numerosos estudos sobre tóxicos ocupacionais e sobre contaminantes ambientais. Em certos casos, a exposição dermal pode ser maior que a exposição respiratória (Sartorelli, 2002). Contudo, comparado com outras rotas, o acesso à exposição dermal é mais complexo, pois é possível que substâncias sejam depositadas na pele diretamente do ar, sejam transferidas no contato com superfície contaminada ou por submersão de partes do corpo. Em adição, o contaminante pode ou não ser absorvido pelo organismo dependendo de fatores tais como: duração da exposição; uso de roupas de proteção (em humanos); área da pele exposta; concentração, peso molecular, solubilidade e estrutura da substância química; presença de outra substância; higiene, tipo (dependendo da região anatômica) e condição da pele; temperatura e umidade do ambiente e da pele (Semple, 2004).

O estudo de exposição à nicotina tem tradicionalmente focado a quantidade absorvida através do tabagismo e das terapias anti-tabagismo, porém, grande quantidade de nicotina transdermal é encontrada em trabalhadores de lavouras de fumo (Arcury *et al.*, 2003). De acordo com os fatores que influenciam a absorção de substâncias químicas citados acima, a nicotina tem sua absorção favorecida: por sua alta solubilidade tanto em solvente polar e não-polar ($\log K_w=1,17$); por seu baixo peso molecular (162,2 g/mol) (Zorin *et al.*, 1999); pela presença de receptores nicotínicos na pele, nos queratinócitos, nos fibroblastos e nos vasos sanguíneos (Misery, 2004); pela longa duração de exposição, temperatura e umidade elevados, descuido nas roupas de proteção, grande área da pele exposta, presença de outras

substâncias na folha de fumo e pela má condição da pele (fatores relacionados à colheita do tabaco) (NIOSH, 1996; McBride *et al.*, 1998; Quandt, *et al.*, 2000; Parikh *et al.*, 2005).

Estudos envolvendo efeitos da absorção da nicotina pela pele incluem aqueles relacionados aos efeitos do uso de adesivo (terapia anti-tabagismo) e aqueles relacionados ao “Green Tobacco Sickness” (Misery, 2004). Pesquisas referentes ao efeito genotóxico da nicotina, presente na folha de fumo *in natura*, associada a outras substâncias são limitadas. Devido a isto, efeito mutagênico e genotóxico da folha de *Nicotiana tabacum* em *Cantareus aspersus* foi avaliado para o melhor entendimento da ação desta planta, através da rota dermal, no organismo vivo. Hemolinfa é sugerido por ser o tecido mais apropriado para o biomonitoramento, devido seu papel fisiológico no transporte de materiais tóxicos e no mecanismo de defesa (Mersch *et al.*, 1996).

Com o intuito de monitorar o comportamento genotóxico dos compostos das folhas de fumo foram utilizados o Ensaio Cometa e o Teste de Micronúcleos. Estes testes são ferramentas à análise do dano ao DNA. O teste de Micronúcleo providencia evidência de quebra na cromatina ou disfunção no fuso, causados por clastógenos ou por agentes que corrompem o fuso, respectivamente. Diferente da resposta encontrada no Teste de Micronúcleos, pelo Ensaio Cometa é possível visualizar dano recente ao DNA, pois as células ainda não sofreram reparo. O Ensaio Cometa (pH > 13) é capaz de detectar quebra simples (SSB), sítios alcali-lábeis (ALS), “crosslinks” DNA/DNA e DNA/proteína.

Aumento de dano ao DNA foi observado em *Cantareus aspersus* expostos a folhas de fumo com e sem agrotóxico comparado ao grupo controle, tanto no Teste de Micronúcleo como no Ensaio Cometa. Este efeito provavelmente foi causado pela complexa mistura, incluindo os pesticidas naturais encontrados nas folhas do tabaco. Ames *et al.* (1990) afirma que pesticidas naturais são um importante conjunto de químicos e que compostos fenólicos, flavonóides e saponinas podem contribuir, cada um, com aproximadamente 100 mg de toxinas por pessoa/dia. A produção de tais pesticidas pode aumentar sob condições de estresse mecânico (herbivoria, poda) e/ou biológico (fator ambiental). O estresse mecânico é observado na produção de *Nicotiana tabacum* onde as flores do topo da planta são retiradas para que as folhas concentrem maior quantidade de nicotina no intuito de aumentar a produtividade da lavoura (Arcury *et al.*, 2003).

Pelo “screening” fitoquímico em nossas amostras de folha de fumo foram encontrados diferentes compostos: alcalóides, flavonóides, saponinas, substâncias fenólicas

e cumarina, similar aos dados da literatura (Hinds, 1882; Christakopoulos *et al.*, 1992; IPCS-INCHEM, 2007). Pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi dosado nicotina na concentração de 0,02% por folha. Este valor é muito menor daqueles encontrados por outros autores (Hinds, 1882; IPCS-INCHEM, 2007), provavelmente porque nossa dosagem foi realizada na água borrifada na superfície das folhas, a mesma água que permaneceu em contato com os caracóis. Autores afirmam que nicotina pura e nicotina em etanol têm taxa menor de penetração do que nicotina em água (Zorin *et al.*, 1999), portanto a água facilita a absorção da nicotina, assim como o orvalho na superfície das folhas de fumo na lavoura (McBride *et al.*, 1998).

Estudos envolvendo nicotina demonstram tanto efeito não-genotóxico, como efeito genotóxico na promoção de tumor, entre os efeitos genotóxicos tanto resultados negativos quanto positivos são encontrados na literatura científica. Pelo Teste de Ames, com cinco linhagens diferentes de *Salmonella typhimurium*, e pelo Teste de trocas de cromátide-irmãs em células de ovário de hamster Chinês (CHO), Doolittle *et al.* (1995) concluiu que nicotina e seus quatro maiores metabólitos, cotinina, óxido-N'-nicotina, óxido-N'-cotinina e trans-3'-hidroxicotinina não causaram efeitos genotóxicos com e sem ativação metabólica. Nicotina não foi clastogênica em doses orais de 1 ou 2mg/kg pelo Teste de micronúcleos em camundongo (Adler & Attia, 2003).

Em contraste, potencial genotóxico da nicotina foi demonstrado em linfócitos periférico humano e em tecido linfático de tonsilas palatinas, demonstrando significativo aumento na migração do DNA pelo Ensaio cometa (Kleinsasser *et al.*, 2005), assim como em células do epitélio nasal (Sassen *et al.*, 2005). Neste trabalho foi observado que após 24h a migração do DNA diminui, indicando a atuação do mecanismo de reparo. Argentin & Cicchetti (2004) encontraram em fibroblastos humano frequência máxima de micronúcleos em 24h de exposição à nicotina com um significativo declínio em 36h, prolongando-se até 72h. Os autores sugerem que nicotina é rapidamente transportada através da membrana plasmática e rapidamente associada com componentes intracelulares ou, a perda parcial da atividade do alcalóide e do processo metabólico pode ocorrer. Em nosso estudo encontramos resultados positivos na migração do DNA a partir de 24hs, mas com pico máximo em 72h. Os animais expostos ao fumo com pesticida apresentaram maior quantidade de apoptose em 72hs, talvez subestimando o índice de dano. Neste período 50% dos animais morreram, confirmando a toxicidade do fumo. O teste de

micronúcleo foi realizado em 72h, onde resultado positivo em animais expostos ao fumo com e sem agrotóxico foi encontrado. Este prolongamento no efeito genotóxico deve ser consequência da presença de mistura complexa na folha de fumo. Onuki *et al.* (2003) sugere que efeitos sinérgicos entre nicotina e outros compostos do tabaco devem ser analisados. Outro estudo que corrobora com isto é o de Yildiz *et al.* (1999). Os autores, comparando a toxicidade de nicotina pura e de extrato de tabaco no ensaio de formação de colônia usando células CHO, observaram que a nicotina pura foi menos tóxica do que o extrato contendo a mesma quantidade de nicotina, sendo que nicotina pura foi menos eficiente na indução de estresse oxidativo. O autor afirma que esta diferença pode ser resultado da ação de outros compostos presentes no tabaco, discordando da idéia de que nicotina nas folhas de fumo atue isoladamente nos organismos.

Nicotina é implicada na geração de radicais livres em vários tipos de células (Wetscher *et al.*, 1995; Yildiz *et al.*, 1999; Argentin & Cicchetti, 2004), induzindo uma significativa quantidade de espécies reativas em oxigênio (ERO). É sabido que a produção excessiva de ERO ou a diminuição das defesas oxidantes provoca o desequilíbrio no estado redox celular conhecido como estresse oxidativo. Este distúrbio pode causar danos a todos os tipos de biomoléculas. As ERO podem alterar a estrutura de proteínas, danificar processos enzimáticos e membranas lipídicas (peroxidação lipídica) e provocar lesões no DNA (Picada *et al.*, 2003). Além dos efeitos genotóxicos, a nicotina pode estimular o desenvolvimento de tumor por mecanismos não-genotóxicos tais como inibição do processo de morte celular programada (Wright *et al.*, 1993; Argentin & Cicchetti, 2004), angiogênese (Heeschen *et al.*, 2001) e estímulo do crescimento tumoral (Heeschen *et al.*, 2001).

Cumarina também é um constituinte natural do tabaco e possivelmente contribua com as respostas encontradas neste trabalho. A concentração deste composto varia entre 0,05 a 4,7 µg/g nos diferentes tipos de fumo (Christakopoulos *et al.*, 1992). Estudos demonstram que cumarina é extensivamente absorvida depois de aplicação dermal e sua meia-vida varia de 1 a 4 horas (Beckley-Kartey *et al.* 1997). Cumarina exhibe marcada diferença no metabolismo e na toxicidade nos organismos. Doses únicas de cumarina têm causado hepatotoxicidade em ratos, efeito atribuído ao metabólito 3,4-epoxicumarina (Christakopoulos *et al.*, 1992). Carlton *et al.* (1996) registrou que cumarina não aumentou a incidência de tumor no fígado e no pulmão em camundongo CD1, mas aumentou em

ratos. Gasparoto & Arquimedes (2005) demonstraram que cumarina apresentou atividade moluscicida em *Biomphalaria glabrata*. A análise fitoquímica realizada nesta pesquisa confirmou a presença de cumarina nas folhas de fumo, acreditamos que esta pode ser uma das razões do efeito tóxico encontrado em 72h de exposição em *Cantareus aspersus*.

Estudos têm examinado o potencial mutagênico de cumarina. Geralmente os dados sugerem que cumarina não apresenta efeito genotóxico. Tanto resultados positivos e negativos foram encontrados em teste de Ames, em Teste de trocas entre cromátides irmãs e de aberrações cromossômicas (Lake, 1999). A cumarina não induziu formação de micronúcleo em células de medula óssea depois de dose única oral em camundongos (Api, 2001) e na administração por 7 dias (Morris & Ward, 1992).

Traços de saponina foram encontrados nas folhas de tabaco e provavelmente não contribuíram com o aumento do dano causado ao DNA em caracóis terrestres expostos à folha de fumo. Saponinas isoladas da raiz de *Bupleurum fruticosum* não apresentaram efeito clastogênico em linfócitos humano pelo Teste de micronúcleo (Scarpato *et al.*, 1998). De acordo com alguns autores, este composto é descrito por apresentar efeito anti-genotóxico e anti-mutagênico (Scarpato *et al.*, 1998), anti-tumoral (Lee *et al.*, 1999) e atividade anti-inflamatória (Navarro *et al.*, 2001).

Outros compostos fenólicos encontrados em *Nicotiana tabacum* além da cumarina foram os flavonóides. Propriedades benéficas são atribuídas a este composto, incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-carcinogênica (Galati & O'Brien, 2004; Da Silva *et al.*, 2002). Flavonóides podem interferir em algumas etapas que levam ao desenvolvimento do câncer, incluindo proteção ao DNA contra dano oxidativo, inibição de enzimas responsáveis pela ativação de carcinógenos e ativação de sistema de detoxificação de carcinógenos. Sua atividade pró-oxidante e habilidade para induzir disfunção mitocondrial levando à apoptose de células tumorais também podem prevenir a formação de tumor (Galati & O'Brien, 2004). Contudo, a inibição de enzimas responsáveis pela ativação dos carcinógenos, como enzimas do Citocromo P450, pode fazer com que esta propriedade dos flavonóides cause toxicidade ou declínio dos efeitos terapêuticos de drogas concomitantemente administradas com este composto fenólico (Galati & O'Brien, 2004).

Alguns estudos mencionam flavonóides como substâncias químicas potencialmente danosas, sendo demonstrado por ser mutagênico em bactéria e testes em mamíferos

(MacGregor, 1986; Sahu & Gray, 1996; Skibola & Smith, 2000; Da Silva *et al.*, 2002). No entanto, os dados de genotoxicidade são incompletos, e resultados equivocados têm sido obtidos com respeito à mutagenicidade observado em testes em células de mamíferos (Das *et al.*, 1994; Skibola & Smith, 2000). Alguns flavonóides são conhecidos por atuar como pró-oxidantes em sistemas contendo metais redox-ativo (Li & Trush, 1994; Galati & O'Brien, 2004). Na presença de O₂, metais de transição tais como o cobre (Cu) e o ferro (Fe) catalisam o ciclo redox de compostos fenólicos, levando a formação de ERO e radicais orgânicos que podem danificar o DNA. Urbina-Cano *et al.* (2006) demonstrou que flavonóide (curcumina) causou quebra simples no DNA, pelo Ensaio Cometa, na presença de Cu.

Na quantificação dos elementos químicos realizado em nossa pesquisa observou-se a presença de Cu e Fe nas folhas de fumo sem pesticida e Fe nas folhas de fumo com pesticida. Com este resultado, podemos considerar a interação flavonóide/metal como possível contribuinte ao dano no DNA detectado nos caracóis terrestres.

Uma ampla variedade de metais, incluindo arsênico (As), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), Cu, níquel (Ni) e vanádio (V), tem sido indicado como agente carcinógeno em animais e humanos (Leonard *et al.*, 2004). Em relação ao conteúdo de metais nas folhas de fumo, detectado pelo PIXE, foi encontrado um número pouco maior de metais nas folhas de fumo sem pesticida em relação às folhas de fumo com pesticida, como Cu e estrôncio (Sr). Villela *et al.* (2006) ponderou a influência do acúmulo de um elemento químico no processo de acumulação de outros elementos. Os autores observaram a presença de rubídio e chumbo em mexilhões que apresentavam quantidade de cálcio (Ca) reduzida. Estudando peixes, Franklin *et al.* (2005) sugeriu que Ca influi na absorção de cádmio (Cd), provavelmente por competição nas vias de absorção. Assim, podemos inferir que caracóis expostos a folhas de tabaco com pesticida, apresentando maior quantidade de Ca, reduziram a absorção de Cu e Sr.

Apesar da diferença entre o conteúdo de metal e a presença/ausência de flumetralin, não houve diferença entre o índice de danos encontrado em animais expostos as folhas com e sem veneno. Desse modo, podemos afirmar que flumetralin não contribuiu com o aumento de dano no ensaio Cometa e no teste de micronúcleos em *Cantareus aspersus*, apesar de resíduos deste nitro-pesticida estar presente nas folhas de fumo tratadas (Coresta, 2007), podendo persistir por mais de um ano (Johnson & Connell, 200; Coresta, 2007).

Flumetralin é suspeito de interromper o sistema endócrino, podendo produzir efeitos adversos no início do desenvolvimento, reprodução e outros processos hormonais (Wattiez & Veillerette, 2004; Lyons, 2000), contudo não tem sido demonstrado como carcinógeno em experimentos animais e humanos. Flumetralin não afetou a capacidade reprodutiva em ratos em duas gerações, não foi teratogênica em ratos e coelhos e não demonstrou potencial genotóxico com doses de 200 mg/kg (Sherertz, 1995). Portanto, efeito genotóxico em *Cantareus aspersus* não pode ser atribuído a flumetralin.

Quando análise da atividade das enzimas e proteínas da glândula digestiva destes moluscos terrestre foi realizada, observou-se redução na atividade de P450 e P420 em caracóis expostos a folhas de fumo, porém diferença significativa em relação ao grupo controle ocorreu somente nos caracóis expostos a folha de fumo sem agrotóxico. A redução da atividade do citocromo P450 observada em caracóis expostos a folhas de fumo pode ser causada tanto pela inibição da nicotina (Van Vleet *et al.*, 2001) como pela inibição de flavonóides (Galati & O'Brien, 2004). Contudo a diminuição significativa encontrada em animais expostos a folhas de fumo sem pesticida pode ser atribuída à presença de cobre. Kim *et al.* (2002) demonstrou que Cu pode individualmente interagir com P450 e NADPH-P450 redutase (NPR), diminuindo a taxa de reações catalisada por este sistema enzimático. O autor demonstra que outros íons, como zinco, Mg, manganês e Co não apresentaram efeito semelhante. Inibição de P450 em *Cantareus aspersus*, por folhas de fumo, principalmente no grupo sem pesticida, indicou que moluscos podem acumular concentrações de diferentes agentes genotóxicos em sua glândula digestiva. Este fato pode justificar a similaridade no dano encontrado no DNA dos animais expostos à folha de tabaco com e sem pesticida.

Neste estudo podemos concluir que a presença de efeitos genotóxicos em *Cantareus aspersus* exposto a folhas de fumo com e sem agrotóxico demonstrou diferença em relação ao grupo controle. Esta indução de dano ao DNA por via dermal foi causada pela presença de diferentes compostos nas folhas de *Nicotiana tabacum*. Substâncias presentes no tabaco formam mistura complexa de compostos orgânicos e não-orgânicos. Misturas podem interagir produzindo efeitos aditivos, sinérgico ou antagônico (Fent, 2003) ou influenciando a absorção de um dado composto. Semple (2004) afirma que uma substância pode irritar a superfície da pele levando ao aumento da penetração percutânea de outra substância. Os resultados demonstraram a presença de alcalóide (nicotina), cumarina,

flavonóide e diferentes metais influenciando o efeito mutagênico, genotóxico e a inibição enzimática em *Cantareus aspersus*. Nosso estudo providencia dados biológicos e químicos deste caracol terrestre exposto à folha de fumo e confirma a sensibilidade do Ensaio Cometa e do Teste de Micronúcleos na avaliação de misturas complexas, indicando associação entre nicotina, cumarina e interação flavonóide/metál (principalmente Cu e Fe) como principais causadores de dano ao DNA em células de hemolinfa do molusco terrestre *Cantareus aspersus* por folhas de *Nicotiana tabacum*.

CAPÍTULO IV

I REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Capítulo I e III)

- Adler ID and Attia SM (2003) Nicotine is not clastogenic at doses of 1 or 2 mg/kg body weight given orally to male mice. *Mutat Res* 542: 139-142.
- Agbon AO, Omoniyi IT and Teko AA (2002) Acute toxicity of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf dust on *Oreochromis niloticus* and haematological changes resulting from sublethal exposure. *J Aquat Sci* 17(1): 5 – 8.
- Akinpelu DA and Obuotor EM (2000) Antibacterial activity of *Nicotiana tabacum* leaves. *Fitoterapia* 71: 199-200.
- Ames BN, Profet M and Gold LS (1990) Dietary pesticides (99.99% all natural). *Proc Natl Acad Sci* 87: 7777-7781.
- Amorin LCA (2003) Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. *Rev bras epidemiol* 6: 158-170.
- Andrade VM, Da Silva J, Silva FR, Heuser VD, Dias JF, Yoneama ML and Freitas TRO (2004) Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet Assay and Micronucleus Test. *Environ Mol Mutagen* 5: 459-468.
- Api AM (2001) Lack of effect of coumarin on the formation of micronuclei in an in vivo mouse micronucleus assay. *Food Chem Toxicol* 39: 837–841.
- Arcury TA, Quandt SA, Preisser JS, Bernert JT, Norton D and Wang J (2003) High levels of transdermal nicotine exposure produce green tobacco sickness in Latino farmworkers. *Nicotine Tob Res* 5: 315-321.
- Argentin G and Cichetti R (2004) Genotoxic and Antiapoptotic Effect of Nicotine on Human Gingival Fibroblasts, *Toxicol Sci* 79: 75–81.
- Armstrong BK, White E and Saracci R (1992) Principles of exposure measurements in epidemiology. New York: Oxford University Press.
- Associação dos Fumicultores do Brasil (AFUBRA), <http://www.afubra.com.br>, (August, 2005).

- Barker GM and Watts C (2002) Management of the invasive alien snail *Cantareus aspersus* on conservation land. DOC Science Internal Series 31. Department of Conservation, Wellington. 30 p, <http://www.doc.govt.nz/templates/page>.
- Beckley-Kartey SAJ, Hotchkiss SAM and Capel M (1997) Comparative in vitro skin absorption and metabolism of coumarin (1,2-benzopyrone) in human, rat, and mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 145: 34-42.
- Benowitz NL, Zevin S and Jacob P (1997). Sources of variability in nicotine and cotinine levels with use of nicotine nasal spray, transdermal nicotine, and cigarette smoking. *Br J Clin Pharmacol* 43:259-267.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S and Speit G (2005) The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20: 245-254.
- Butterworth FM (1995) Introduction to biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change. In: Butterworth BE, Corkum LD and Guzmán-Rincón J (eds) *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, New York, pp 1-8.
- Carlton BD, Auburn JC and Simon GS (1996) Effect of coumarin following perinatal and chronic exposure in Sprague-Dawley rats and CD-1 mice. *Fundam Appl Toxicol* 30: 145–151.
- Carson R (1962) *Silent Spring*. Boston: Houghton Mifflin. 304p.
- Collins A, Dusinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K and Vaughan N (1997) Comet assay in human biomonitoring studies: Reability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen* 30:139-146.
- Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco (Coresta), <http://www.coresta.org> (January, 2007).
- Coutrim MX, Carvalho LRF & Arcuri ASA (2000) Avaliação dos métodos analíticos para a determinação de metabólitos do benzeno como potenciais biomarcadores de exposição humana ao benzeno no ar. *Quím. Nova* 23: 653-663.
- Christakopoulos A, Feldhusen K, Norin H, Palmqvist A and Wahlberg I (1992) Determination of Natural Levels of Coumarin in Different Types of Tobacco Using a Mass Fragmentographic Method. *J Agric Food Chem* 40: 1358-1361.

- Cruvinel PE, Flocchini RG, Artaxo P, Crestana S and Herrmann PSP (1999) Elemental analysis of agricultural soil samples by particle induced X-ray emission (PIXE) technique, *Nucl. Instr. and Meth. In: Phys Res B* 150: 478-483.
- Da Silva J, Freitas TRO, Marinho JR, Speit G and Erdtmann B (2000) An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet Mol Biol* 23: 241–245.
- Da Silva J, Herrmann SM, Heuser V, Peres W, Possa Marroni N, Gonzalez-Gallego J and Erdtmann B (2002) Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 40(7): 941-947
- Das A, Wang JH and Lien EJ (1994) Carcinogenicity, mutagenicity and cancer preventing activities of flavonoids: a structure–systemactivity relationship (SSAR) analysis. *Prog Drug Res* 42, 133–167.
- De Flora S, Zanicchi P, Camoirano A, Bennicelli C and Badolati GS (1984) Genotoxic activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test. *Mutat Res* 133: 161-198.
- Doolittle DJ, Winegar R and Lee CK (1995) The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites, *Mutat Res* 344: 95–102.
- Durbin RD (1979) *Nicotiana: procedures for experimental use*. Washington: USDA, Department of Agriculture, Technical Bulletin, number 1586, 124 p.
- Feldman RJ and Maibach HI (1967) Regional variation in percutaneous penetration of ¹⁴C cortisol in man. *J Invest Dermatol* 48:181-183.
- Fent K (2003) Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol Lett* 141: 353–365.
- Franke SIR, Boeira JM, Erdtmann B & Henriques JAP (2003) Genotoxicidade de Agentes Sintéticos e Naturais. In: Da Silva J, Erdtmann B & Henriques JAP (eds) *Genética Toxicológica*, Editora Alcance. pp 307 – 321.
- Franklin NM, Glover CM and Wood CM (2005) Calcium/cadmium interactions at uptake surfaces in rainbow trout: waterborne versus dietary routes of exposure. *Environ Toxicol Chem* 24(11): 2954-2964.
- Freedman B (1995) *Environmental Ecology - the Ecological Effects of Pollution, Disturbance and Other Stresses*. (2nd Ed.) Academic Press. CANADA.

- Galati G and O'Brien PJ (2004) Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 37(3): 287 – 303.
- Gasparoto JR and Arquimedes (2005) Phytochemical study and evaluation of the molluscicidal activity of *Calophyllum brasiliense* Camb (Clusiaceae). *Quím Nova* 28: 575-578.
- Gehlbach SH, Williams WA, Perry LD, Freeman JI, Langone JJ, Peta LV and Van Vunakis H. (1975) Nicotine absorption by workers harvesting green tobacco. *Lancet* 1: 478-480.
- Gerstel DU (1960) Segregation in new allopolyploids of nicotiana. I. Comparison of 6x (*N. tabacum* x *N. tomentosiformis*) and 6x (*N. tabacum* x *N. otophora*). *Journal Series of the North Carolina Agricultural Experiment Station* 1195: 1-12.
- Guecheva TN & Henriques JAP (2003) Metabolismo de xenobióticos: Citocromo P-450. In: Da Silva J, Erdtmann B & Henriques JAP (eds) *Genética Toxicológica*, Editora Alcance, pp 223-247.
- Guy RH and Hadgraft J (1989) Mathematical models of percutaneous absorption. In: Bronaugh RL and Maibach HI (eds) *Percutaneous absorption: mechanisms - methodology - drug delivery*. New York: Marcel Dekker, pp 13-26.
- Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vamparus Ph and MacGregor JT (1991) Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. *Environ Mol Mutagen* 18: 277-291.
- Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, Tsao PS, Johnson FJ and Cooke JP (2001) Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* 7: 833–839.
- Heuser V, Da Silva J, Moriske HJ, Dias JF, Yonema ML and Freitas TRO (2002) Genotoxicity biomonitoring in regions exposed to vehicle emissions using the comet assay and the micronucleus test in native rodent *Ctenomys minutus*. *Environ Mol Mutagen* 40:227-235.
- Hinds JID (1882) *The Use of Tobacco*. Cumberland Presbyterian Publishing House, pp. 1-138. <http://medicolegal.tripod.com/hinds1882.htm>.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS-INCHEM), <http://www.inchem.org/> (October, 2006).

- Johnson GCC and Connell JF (2001) Shallow Ground-Water Quality Adjacent to Burley Tobacco Fields in Northeastern Tennessee and Southwestern Virginia, Spring 1997. U.S. Geological Survey. 43p.
- Keller-Stanislawski B, Capary S, Merz P-G, Bonn R, Wolff M and Rietbrock N (1993) Transdermal nicotine substitution: pharmacokinetics of nicotine and cotinine. *Int J Clin Pharmacol* 31:417-421.
- Kim J-S, Ahn T, Yim S-K and Yun C-H (2002) Differential Effect of Copper (II) on the Cytochrome P450 Enzymes and NADPH-Cytochrome P450 Reductase: Inhibition of Cytochrome P450-Catalyzed Reactions by Copper (II) Ion. *Biochemistry* 41: 9438-9447.
- Kleinsasser NH, Sassen AW, Semmler MP, Harréus UA, Licht A-K and Richter E (2005) The Tobacco Alkaloid Nicotine Demonstrates Genotoxicity in Human Tonsillar Tissue and Lymphocytes. *Toxicol Sci* 86(2): 309-317.
- Lake BG (1999) Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food Chem Toxicol* 37: 423-453.
- Leete E (1983) Biosynthesis and metabolism of the tobacco alkaloids. In: Pelletier SW (eds.). *Alkaloids Chemical and Biological Perspectives*, Vol. 1, John Wiley and Sons, New York, NY, pp 86-139.
- Lee S-J, Sungb J-H, Leeb S-J, Moonc C-K and Lee B-H (1999) Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin. *Cancer Lett* 144: 39-43.
- Leonard SS, Bower JJ and Shi X (2004) Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Mol Cell Biochem* 255: 3-10.
- Li Y and Trush MA (1994) Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res* 54: 1895s – 1898s.
- Lin JK (1990) Nitrosamines as potential environmental carcinogens in man. *Clin Biochem* 23: 67-71.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lyons G (2000) Pesticide Action Network UK. pp 1-6.

- Maxwell JA, Campbell JL and Teesdale WJ (1989) The Guelph PIXE software package. Nuclear Instruments and Methods. Physics Research B 43: 218-230.
- McBride JS, Altman DG, Klein M and White W (1998) Green tobacco sickness. Tob Contro 7: 294-298.
- MacGregor JT (1986) Mutagenic and carcinogenic effects of flavonoids. In: Cody V, Middlenton E and Harbone JB (eds.) Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Biochemical Pharmacological and Structure–Activity Relationships, New York, pp 411–424.
- McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP and Collins A (1993) The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review. Mutat Res 288: 47-63.
- Mersch J, Beauvais P and Nagel P (1996) Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. Mutat Res 371: 47-55.
- Mireles A, Solís C, Andrade E, Lagunas-Solar M, Piña C and Flocchini RG (2004) Heavy metal accumulation in plants and soil irrigated with wastewater from Mexico city. Nuclear Inst. Methods in Physics Res. B 219-220.
- Misery L (2004) Nicotine effects on skin: Are they positive or negative? Exp Dermatol 13: 665-670.
- Moreira JC, Jacob SC & Peres F (2002) Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo. Ciênc. saúde coletiva 7: 299-311.
- Morris DL and Ward JBJr (1992) Coumarin inhibits micronuclei formation induced by benzo(a)pyrene in male but not female ICR mice. Environ Mol Mutagen 19: 132-138.
- Munzner R and Renner HW (1989) Genotoxic investigations of tobacco protein using microbial and mammalian test systems. Z. Ern~ih rungswiss 28: 300-309.
- Navarro P, Giner RM, Recio MC, Máñez S, Cerdá-Nicolás M and Rios J-L (2001) In vivo anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*. Life Sci 68: 1199–1206.
- NIOSH Agricultural Health & Safety Center News (1996). Southeast Center Studies Ways to Prevent Green Tobacco Sickness, <http://www.cdc.gov/niosh/nora/symp06/pdfs>.

- Nsouli B, Darwish T, Thomas J-P, Zahraman K and Roumie M (2004) Ni, Cu, Zn and Pb background values determination in representative Lebanese soil using the thick target PIXE technique. Nucl Instr and Meth. In: Phys. Res. B 219-220: 181-186.
- Omoniyi I, Agbon AO and Sodunke SA (2002) Effect of Lethal and Sub-lethal Concentrations of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Leaf Dust Extract on Weight and Hematological Changes in *Clarias gariepinus* (Burchell). J Applied Sci & Environ Management 6: 37-41
- Onuki M, Yokoyama K, Kimura K, Sato H, Nordin RB, Naing L, Morita Y, Sakai T, Kobayashi Y and Araki S (2003) Assessment of Urinary Cotinine as a Marker of Nicotine Absorption from Tobacco Leaves: A Study on Tobacco Farmers in Malaysia. J Occup Health 45: 140-145.
- OPAS (1997) Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Divisão de Meio Ambiente e Ecologia Humana. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília: Opas. 69 pp.
- Pandey P, McGowen RM, Vogel EW and Butterworth F.M (1995) Genotoxicity of polychlorinated biphenyl (PCB) and polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures in the white/white+ eye-mosaic assay. In: Butterworth BE, Corkum LD and Guzmán-Rincón J (eds) Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. Plenum Press, New York, pp 183 – 191.
- Parikh JR, Gokani VN, Kulkarni PK, Shah AR and Saiyed HN (2005) Acute and Chronic Health Effects Due to Green Tobacco Exposure in Agricultural Workers. Am J Ind Med 47:494–499.
- Picada JN, Kern AL, Ramos ALLP & Saffi J (2003) O Estresse Oxidativo e as Defesas Antioxidantes. In: Da Silva J, Erdtmann B & Henriques JAP (eds) Genética Toxicológica, Editora Alcance pp 250 – 268.
- Porte C, Biosca X, Solé M and Albaigé J (2001) The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). Environ Pollut 112: 261-268.
- Quandt SA, Arcury TA, Preisser JS, Norton D and Austin C (2003) Migrant Farmworkers and Green Tobacco Sickness: New Issues for an Understudied Disease. Am J Ind Med 37: 307-315.

- Ramel C (1983) Advantages of and problems with short-term mutagenicity tests for the assessment of mutagenic and carcinogenic risk. *Environ Health Perspect* 47: 153-159.
- Ribas G, Frenzilli G, Barale R and Marcos R (1995) Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutat Res* 344: 41-54.
- Riebe M, Westphal K and Fortnagel P (1982) Mutagenicity testing, in bacterial test systems, of some constituents of tobacco. *Mutat Res* 101: 39-43.
- Sahu SC and Gray GC (1996) Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett* 104: 193–196.
- Santos M (2002) Caracterização fenotípica e molecular de genótipos de fumo utilizados no sul do Brasil. Dissertação de mestrado. UFRGS
- Sartorelli P (2002) Dermal exposure assessment in occupational medicine. *Occup Méd* 52(3): 151-156.
- Sassen AW, Richter E, Semmler MP, Harréus UA, Gamarra F and Kleinsasser NH (2005) Genotoxicity of Nicotine in Mini-Organ Cultures of Human Upper Aerodigestive Tract Epithelia. *Toxicol Sci* 88(1): 134-141.
- Scarpato R, Bertoli A, Naccarati A, Migliore L, Cocchi L, Barale R and Pistelli L (1998) Different effects of newly isolated saponins on the mutagenicity and cytotoxicity of the anticancer drugs mitomycin C and bleomycin in human lymphocytes. *Mutat Res* 420: 49–54.
- Sherertz PC (1995) PRIME +®. Virginia Department of Health: Division of Health Hazards Control. Richmond 804:786-1763, http://www.vdh.virginia.gov/epi/public_health_toxicology/Prime.PDF
- Schneider T, Cherrie JW, Vermeulen R and Kromhout H (2000) Dermal Exposure Assessment. *Ann Occup Hyg* 44 (7): 493–499.
- Schuetz EG and Guzelian PS (1984) Induction of cytochrome P-450 by glucocorticoids in rat liver. II - Evidence that glucocorticoids regulate induction of cytochrome P-450 by a nonclassical receptor mechanism. *J Biol Chem.* 259: 2007-2012.
- Semple S (2004) Dermal exposure to chemicals in the workplace: just how important is skin absorption? *Occup Environ Med* 61: 376-382.

- Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experim Cell Res* 175: 184-191.
- Skibola CF and Smith MT (2000) Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* 29: 375–383.
- Targa HJ and Rabelo-Gay N (1983) Mutagênese, teratogênese e o uso de alguns praguicidas. *Rev Serv Públ* 40: 193-200.
- Tice RR (1995) Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. In: Butterworth BE, Corkum LD and Guzmán-Rincón J (eds) *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, New York, pp 69-79.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC and Sasaki YF (2000) Single Cell Gel/Cometa Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-221.
- Tricker AR (2003) Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphisms, and smoking behaviour. *Toxicology* 183: 151-173.
- Trivedi AH, Dave BJ and Adhvaryu SG (1990) Assessment of genotoxicity of nicotine employing in vitro mammalian test systems. *Cancer Lett* 54: 89–94.
- Tso TC (1977) Simple correlation and multiple regression among leaf characteristics, smoke components, and biological responses of bright tobaccos. Washington: USDA, Department of Agriculture, Technical Bulletin 1551: 135 p.
- Urbina-Cano, P.; Bobadilla-Morales, L.; Ramírez-Herrera, M.A.; Corona-Rivera1, J.R.; Mendoza-Magana, M.L.; Troyo-Sanromán, R. & Corona-Rivera, A. (2006) DNA damage in mouse lymphocytes exposed to curcumin and copper. *J. Appl. Genet.* 47(4): 377–382.
- Van Vleet TR, Bombick DW and Coulombe RAJr (2001) Inhibition of Human Cytochrome P450 2E1 by Nicotine, Cotinine, and Aqueous Cigarette Tar Extract in Vitro. *Toxicol Sci* 64: 185–191.
- Villela IV, Lau A, Silveira J, Prá D, Rolla HC & Silveira JD (2003) Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: Da Silva J, Erdtmann B & Henriques JAP (eds) *Genética Toxicológica*. Editora Alcance. p 307 – 321.

- Villela IV, Oliveira IM, Da Silva J and Henriques JA (2006) DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat Res* 605: 78-86.
- Wattiez C and Veillerette F (2004) *Pestic News* 65: 11.
- Wetscher GJ, Bagchi M, Bagchi D, Perdakis G, Hinder PR, Glaser K and Hinder RA (1995) Free Radical Production in Nicotine Treated Pancreatic Tissue. *Free Radic Biol Med* 18(5): 877-882.
- Wright SC, Zhong J, Zheng H and Larrick JW (1993) Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor promotion. *FASEB J.* 7: 1045–1051.
- Yildiz D, Liu Y-S, Ercal N and Armstrong DW (1999) Comparison of Pure Nicotine and Smokeless Tobacco Extract-Induced Toxicities and Oxidative Stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 37: 434–439.
- Yoneama ML & Dias JF (2004) Espectroscopia por emissão de raios-x induzida por partículas (PIXE). In: Teixeira EC & Rodrigues MJ (eds) *Estudos Ambientais em Candiota: Carvão e seus impactos*. Poa: FINEP/ PDACT/ CIAMB/ FAPERGS/ FEPAM, 232 p.: il - Cadernos de planejamento e gestão ambiental.
- Zorin S, Kuylenstierna F and Thulin H (1999) In vitro test of nicotine's permeability through human skin. Risk evaluation and safety aspects. *Ann Occup Hyg* 43: 405–13.