



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação genotóxica de herbicidas imidazolinonas em células
somáticas de *Drosophila melanogaster*.**

Aluno: Edson José Fragiorge

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

UBERLÂNDIA – MG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Avaliação genotóxica de herbicidas imidazolinonas em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

Aluno: Edson José Fragiorge

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA – MG

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

F811a Fragiorge, Edson José, 1962-
Avaliação genotóxica de herbicidas imidazolinonas em células somáticas de *Drosophila melanogaster* / Edson José Fragiorge. – 2 006.
91 f. : il.
Orientador: Mário Antônio Spanó.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Mutagênese - Teses. 2. *Drosophila melanogaster* - Teses. I. Spanó, Mário Antônio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575.224.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Avaliação genotóxica de herbicidas imidazolinonas em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

Aluno: Edson José Fragiorge

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Examinadores:

Profa. Dra. Francisca da Luz Dias

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes

Data da Defesa: 25/08/2006

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

À minha esposa **Maria Lúcia**, pela
constante presença no trabalho que realizo.

Aos meus filhos, **Breno, Victória, Gregor e Izabel**,
pelos momentos que tive que me ausentar.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu pai, José Fragiorge e à minha mãe, Maria de Lourdes Ferreira Fragiorge, pelas observações e palavras de estímulo, incentivando-me a cada encontro.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Mário A. Spanó**, pela oportunidade de um trabalho conjunto sob sua orientação geral.

Ao **Prof. Dr. Ulrich Graf** do Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Sciences, ETH Zurich, Switzerland, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* e material necessário para a realização dos testes para detecção de mutação e recombinação somáticas em células de asas de *Drosophila melanogaster*.

Ao **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno** do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pela disponibilidade em participar da Banca Examinadora desta Tese de Doutorado e pelas valiosas sugestões apresentadas, atenção e incentivo.

Às **Profas. Dras. Francisca da Luz Dias, Ilce Mara de Syllos Cólus e Lusânia Maria Greggi Antunes**, pela disponibilidade em participarem da Banca Examinadora desta Tese de Doutorado e pelas valiosas sugestões apresentadas.

Ao **Prof. Dr. Milton Vieira Coelho**, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pelo apoio e incentivo para a conclusão deste trabalho.

Aos professores e auxiliares do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, que contribuíram para minha formação.

Aos estudantes de mestrado e doutorado do Laboratório de Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia, **Ac. Alexandre Azenha Alves de Rezende, MSc. Bruno Lassmar Bueno Valadares, MSc. Denise Gonçalves Pereira, MSc. Neila Coelho de Sousa, MSc. Zaira da Rosa Guterres** pela convivência e colaboração durante o Curso de Pós-graduação.

À **Profa. Dra. Silmara de Moraes Pantaleão**, pelas experiências compartilhadas, durante a realização deste trabalho.

Ao **MSc. Wender Ferreira Costa**, pelas informações que forneceu sobre o uso do programa informatizado da análise estatística e pela convivência durante o Curso de Pós-graduação.

Aos auxiliares do Laboratório de Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia – MG, **Sra. Maria Aparecida Vilela Gomes e Sr. Paulo Roberto Moderno**, pela amizade e colaboração.

Ao **Sr. José Rodrigues**, funcionário da empresa “AGROTESTE, pesquisa e desenvolvimento”, que auxiliou na obtenção dos herbicidas testados neste trabalho.

Aos **Diretores, Professores e Funcionários** da Escola Agrotécnica Federal de Uberlândia (Uberlândia – MG), pelo apoio e permissão para a realização do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pelas experiências compartilhadas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia – MG) e recebeu o apoio financeiro das seguintes Entidades e Instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Lista de Abreviaturas

AC – Active Chemical.

ALS – Acetolactate Synthase.

AHAS – Acetohydroxyacid Synthase.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BH – Balancer Heterozygous.

°C. – Graus Centígrados.

CA – Aberrações cromossômicas.

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

CD-1 – Linhagem de rato para teste padrão de carcinogenicidade.

CHL – Chinese Hamster Lung Cells.

CHO – Chinese Hamster Ovary Cells.

CHO/HGPRT – Chinese Hamster Ovary Cells/Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase.

CL – ¹⁴C-labelled.

CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

CPK – Creatine Phosphokinase.

DG – Disperseble Granulated.

DNA – Ácido Desoxirribonucléico.

EC – Enzyme Commission.

EPA – Environmental Protection Agency.

FAD – Flavin Adenine Dinucleotide.

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.

***flr*³** – *Flare 3*.

HB – High Bioactivation.

HDT – Highest Dose Tested.

HGPRT – Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase.

IARC – International Agency for Research on Cancer.

IMZB – Imazamethabenz.

IMZC – Imazapic.

IMZQ – Imazaquin.

IMZR – Imazapyr.

IMZT – Imazethapyr.

IMZX – Imazamox.

LC₅₀ – Lethal Concentration 50%.

LD₅₀ – Lethal Dose 50%.

LEL – Lowest-effect-level.

LOAEL – Lowest-observed-adverse-effect-level.

LOEL – Lowest-observed-effect-level.

LDT – Low Dose Tested.

µg – micrograma.

µg/MI – micrograma por Mililitro.

mg/Kg – miligrama por Quilo.

mg/L – miligrama por Litro.

MH – Marker Trans-heterozygous.

MN – Micronúcleos.

mwh – *multiple wing hairs*.

Nº – Número

NOAEL – No-observed-adverse-effect-level.

NOEL – No-observed-effect-level.

ORR; flare-3 – Linhagem de *Drosophila melanogaster* “Oregon” caracterizada por um aumento na atividade de enzimas citocromo P-450.

P-450 – Família de citocromos com mais de 60 enzimas que detoxicam o organismo.

P:V – Peso por Volume.

pH – Potencial Hidrogeniônico.

pK_a – Constante de Dissociação Ácida.

pK₁; pK₂; pK₃ – Ordenação dos vários pK's (Constante de Dissociação Ácida), de um produto.

ppm – partes por milhão.

RDL – Rodentia Dominant Lethal.

S653N – Mutação no gene AHAS de *Arabidopsis thaliana* construído e expresso em *Escherichia coli*.

SGOT – Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase.

SGPT – Serum Glutamic Pyruvic Transaminase.

SMART – Somatic Mutation and Recombination Test.

ST – Standard Cross.

TA98, TA100, TA1535 e TA1537 – Linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas em teste padrão de mutagenicidade.

TCIs – Trocas entre Cromátides Irmãs.

ThDP – Thiamine Diphosphate.

UDS – Unscheduled DNA Synthesis.

UFU – Universidade Federal de Uberlândia.

V79 – Linhagem de células de pulmão de hamster chinês macho, aplicada em estudos de mutagênese.

Vol. – Volume.

WP2uvra – Linhagem de *Escherichia coli* utilizada em testes de mutagenicidade.

RESUMO

No presente estudo, cinco herbicidas análogos, denominados Imazapyr (IMZR), Imazapic (IMZC), Imazethapyr (IMZT), Imazamox (IMZX) e Imazaquin (IMZQ), foram avaliados para genotoxicidade (atividades mutagênica e recombinogênica) por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) de *Drosophila melanogaster*. Eles são classificados como pesticidas imidazolinonas (IMIs) e seu modo de ação é por inibição da enzima acetohidroxiácido sintase (AHAS), uma enzima envolvida com a biossíntese dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina. Para tanto, dois cruzamentos foram usados: cruzamento padrão (ST) e cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB). Este último é caracterizado pela alta capacidade de ativação metabólica dependente de citocromo P-450 conferindo sensibilidade aumentada a promutágenos e a procarcinógenos. Larvas de três dias de idade foram expostas a alimentação crônica (48 h) a quatro concentrações diferentes desses herbicidas (2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 mM). Para a avaliação dos efeitos genotóxicos, as frequências de manchas por indivíduo nas séries tratadas, foram comparadas aos correspondentes controles negativos (água ultra pura). No cruzamento ST, Imazamox mostrou resultados positivos somente para manchas grandes simples (20 mM IMZX) e resultados fraco positivos para o total de manchas (10,0 e 20,0 mM IMZX), enquanto que o Imazaquin mostrou resultados positivos somente para manchas simples grandes (5,0 e 20,0 mM IMZQ) e resultados fraco positivos para o total de manchas (20,0 mM IMZQ). No cruzamento HB, somente Imazamox (5,0 mM IMZX) mostrou um resultado fraco positivo para manchas pequenas simples, o que sugere o envolvimento do radical $-CH_2OCH_3$ e do anel quinolínico na

genotoxicidade, respectivamente, dos herbicidas Imazamox e Imazaquin. Os herbicidas Imazapyr, Imazapic e Imazethapyr apresentaram resultados negativos em ambos cruzamentos do teste da mancha da asa. O controle positivo uretano induziu um aumento no número de todos os tipos de manchas, em ambos cruzamentos (ST e HB). Em conclusão, os resultados de tratamentos crônicos realizados com altas doses (toxicidade foi observada em doses maiores) indicaram que, sob estas condições experimentais, os poucos resultados positivos observados sugerem o envolvimento do radical $-CH_2OCH_3$ e do anel quinolínico na genotoxicidade, respectivamente, dos herbicidas Imazamox e Imazaquin e o envolvimento de enzimas citocromo P-450 na detoxificação de herbicidas IMIs. No entanto, pesquisas adicionais são necessárias para discernir o potencial genotóxico de ingredientes ativos desses herbicidas e suas formulações e o envolvimento do radical $-CH_2OCH_3$ e do anel quinolínico na fraca genotoxicidade do Imazamox e Imazaquin.

Palavras-chave

Genotoxicidade, SMART, *Drosophila melanogaster*, Imidazolinona.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Agrotóxicos: classificação e mecanismo de ação.....	1
1.2. Herbicidas.....	2
1.3. Herbicidas Imidazolinonas (IMIs).....	3
1.3.1. Imazapyr (IMZR)	5
1.3.2. Imazapic (IMZC)	7
1.3.3. Imazethapyr (IMZT)	10
1.3.4. Imazamox (IMZX)	13
1.3.5. Imazaquin (IMZQ)	15
1.4. Mutação e câncer.....	17
1.5. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células de asas de <i>D. melanogaster</i>	19
2. OBJETIVOS	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO ÚNICO: Genotoxic evaluation of imidazolinone herbicides in the wing spot test of <i>Drosophila melanogaster</i>	41
4. CONCLUSÕES	73
5. APÊNDICE	75

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Agrotóxicos: classificação e mecanismo de ação

De acordo com o Art. 2º da Lei nº 7.802/pr, de 11 de julho de 1989, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – do Ministério da Saúde, Brasil “*são considerados agrotóxicos e afins:*

- a) *os produtos e os agentes de processos físicos químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas nas pastagens na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;*
- b) *substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento;”*

De acordo com o Decreto nº 98.816 de 11 de janeiro de 1990, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – do Ministério da Saúde, Brasil, publicado no Diário Oficial da União de 12 de janeiro de 1990, os agrotóxicos são classificados em:

Classe I – Extremamente tóxicos (Faixa vermelha).

Classe II – Altamente tóxicos (Faixa amarela).

Classe III – Medianamente tóxicos (Faixa azul).

Classe IV – Pouco ou muito pouco tóxicos (Faixa verde).

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE – divulgou em agosto de 2004 o relatório de indicadores de Desenvolvimento Sustentável, revelando que o uso de agrotóxicos no Brasil aumentou de 2,3 kg/ha. para 2,8 kg/ha. Estes números indicam que o Brasil está entre os maiores usuários do produto, perdendo apenas para a Holanda, Bélgica, Itália, Grécia, Alemanha, França e Reino Unido, segundo dados do Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas – SINDAG (FELICONIO, 2006).

De acordo com o grupo de organismos-alvo, os agrotóxicos são classificados nos seguintes tipos: inseticidas (insetos), fungicidas (fungos), raticidas (ratos), nematicidas (nematóides), acaricidas (ácaros), bactericidas (bactérias), herbicidas (plantas) (FELICONIO, 2006).

Os agrotóxicos orgânicos são de baixa toxicidade e de curta permanência no ambiente. Neste grupo estão as rotenonas, piretrinas e ácidos crisantênicos (FORNARI, 2002). De acordo com Branco (1990), o mecanismo de ação dos pesticidas orgânicos pode ser:

- 1] Ação de contato – age através do contato com a superfície do inseto.
- 2] Ação por ingestão – quando o agrotóxico penetra no organismo por via oral.

De acordo com Fornari (2002) os agrotóxicos organo-sintéticos possuem os seguintes mecanismos de ação:

- 1] Ação de contato: quando a substância quimicamente ativa do agrotóxico (chamado princípio ativo) é absorvida pela pele (tegumento) do inseto.
- 2] Ação por ingestão: quando o agrotóxico penetra no organismo por via oral.
- 3] Ação de profundidade: caracteriza o modo de atuação de um inseticida que tem ação translaminar, ou seja, que aplicado na face de uma folha, exerce sua toxicidade contra insetos alojados inclusive na outra face da folha. Esta ação também pode ser observada nos frutos, quando o pesticida atinge o interior dos mesmos por translocação (transporte pela seiva da planta parasitada), destruindo as larvas do inseto, como ocorre com as moscas-da-fruta.
- 4] Ação fumigante: caracteriza o modo de ação de um pesticida que age penetrando no inseto na forma de vapor através de suas vias respiratórias.

De acordo com Branco (1990) e Fornari (2002), os agrotóxicos organo-sintéticos subdividem-se em clorados, cloro-fosforados, carbamatos e fumigantes.

1.2. Herbicidas

Os herbicidas são compostos químicos usados para combater as ervas invasoras, chamadas de daninhas pelos agricultores, porque atrapalham o desenvolvimento da lavoura comercial que é introduzida no local. Estas ervas

são, quase sempre, espécies nativas daquele ambiente, extremamente adaptadas ao solo e climas locais e que existiam muito antes das pastagens e cultivos agrícolas. Contudo, como o agricultor não tem interesse comercial nestas plantas, mas nas espécies que ele semeia, são utilizados vários métodos de controle do desenvolvimento destas ervas invasoras, que vão desde a capina manual com a enxada até o uso dos mata-matos ou herbicidas sintetizados pela indústria química. Os herbicidas foram sintetizados pela indústria a partir de 1944 e agiam de forma semelhante a certos hormônios de crescimento produzidos pelos vegetais, causando uma espécie de caos hormonal que atrapalhava o crescimento e o desenvolvimento das plantas daninhas. Posteriormente vieram os compostos sintéticos à base de uréia, que bloqueavam o processo de fotossíntese destas plantas, mas que eram também pouco seletivos. Seguiram-se as triazinas (simazina, atrazina), depois vieram as amidas, os carbamatos, os fenóis, etc., cada qual agindo em grupos específicos de plantas (BRANCO, 1990).

Os herbicidas têm sido avaliados genotoxicamente por meio de diferentes sistemas testes, tais como teste cometa (alkaline single-cell gel DNA electrophoresis) para avaliação da indução de danos no DNA; micronúcleos (MN) em camundongos e peixes; aberrações cromossômicas (chromosomal aberration - CA) e trocas entre cromátides irmãs (TCIs) em células de mamíferos em cultura, CA em células vegetais (*Allium cepa* L); CA, mutação e recombinação em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, etc., e muitos deles têm demonstrado possuir propriedades genotóxicas (TORRES et al., 1992; CLEMENTS et al., 1997; SINHA et al., 1998; GRISOLIA, 2002; BOLLE et al., 2004; MASTRANGELO et al., 2006).

1.3. Herbicidas Imidazolinonas (IMIs)

A classe Imidazolinona (IMI) é constituída por seis herbicidas análogos: Imazapyr (IMZR), Imazapic (IMZC), Imazethapyr (IMZT), Imazamox (IMZX), Imazamethabenz (IMZB) e Imazaquin (IMZQ), os quais têm sido usados no controle de plantas daninhas por inibirem a enzima acetolactato sintase (ALS) (TAN et al., 2005).

A ALS é a enzima chave na biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada em plantas e microrganismos (LE et al., 2005). É também conhecida como α -acetohidroxi ácido sintetase; α -acetohidroxiácido sintase (AHAS); α -acetolactato sintase; α -acetolactato sintetase; acetohidroxi ácido sintetase; acetohidroxi ácido sintase; acetolactato piruvato-liase (carboxilativo) ou acetolático sintetase. Apresenta o nome sistemático piruvato:piruvato acetaldeído transferase (decarboxilativo). Foi designada em 1972, como EC 4.1.3.18 e a partir de 2002, de EC 2.2.1.6 (NC-IUBMB, 2006). Esta enzima catalisa a condensação de duas moléculas de piruvato, para formar acetolactato (AL) no caminho metabólico da leucina e valina, ou catalisa a condensação de uma molécula de piruvato com uma molécula de 2-cetobutirato, para formar 2-aceto-2-hidroxi butirato (AHB) como primeiro passo na biossíntese da isoleucina (**Figura 1**) (TITTMANN et al., 2005).

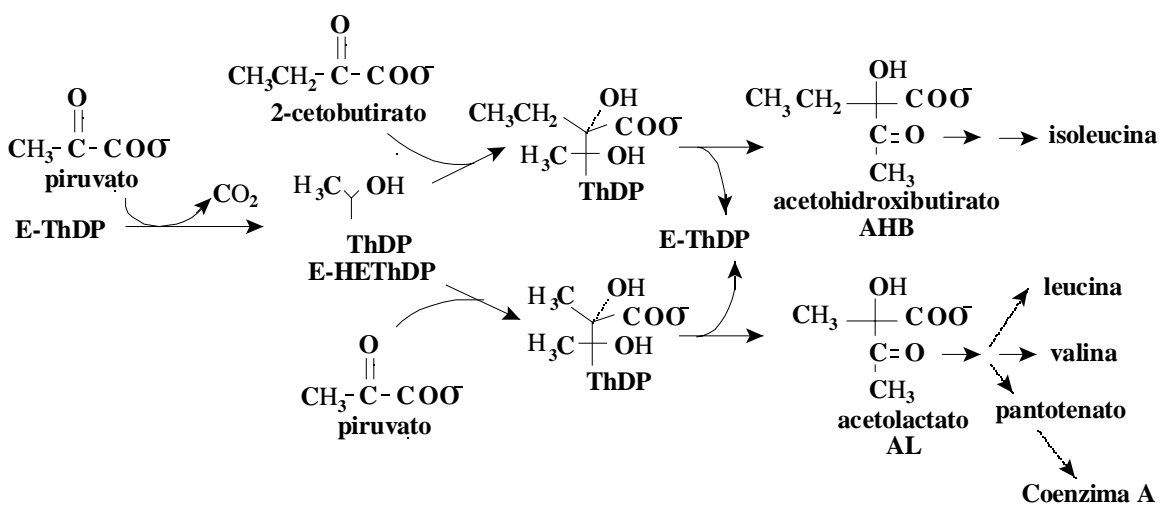


Figura 1. Reações metabólicas catalisadas pela ALS e seus produtos (adaptado de Tittmann et al., 2005).

ALS pertence à superfamília das enzimas difosfato de tiamina enzima dependente - (ThDP), capazes de catalisar uma variedade de reações, incluindo descarboxilação oxidativa e não oxidativa de 2-cetoácidos. ALS também se liga à molécula de flavina adenina dinucleotídeo (FAD), embora este cofator não

participe das reações principais. Em plantas, a ALS tem duas subunidades de regulação, com tamanhos diferentes (McCOURT et al., 2006).

ALS é regulada pelos produtos finais destes caminhos metabólicos (ELISÁKOVÁ et al., 2005) como acontece em trigo (*Triticum aestivum* L) (BULL CFIA, 2004). A ALS modificada mostra uma inibição similar por feedback pela valina e leucina, quando comparada com a ALS não modificada (BULL CFIA, 2004).

Os animais não sintetizam aminoácidos de cadeia alifática, mas obtêm comendo plantas e outros animais (APAP, 2005). Animais não têm ALS e seu caminho metabólico biossintético. Isso contribui para a baixa toxicidade dos compostos imidazolinonas em animais (USEPA, 2003a).

ALS tem sido identificada como um sítio de ação de quatro distintas classes de herbicidas: imidazolinonas, sulfoniluréias, triazolopirimidinas e pirimidinil oxibenzoatos (BERNASCONI et al., 1995).

Os herbicidas IMIs interrompem o crescimento da planta e, eventualmente, matam a planta em aplicações pré ou pós-emergentes, na proporção de 1/50 ou abaixo da taxa de outros herbicidas (BATTAGLIN et al., 2000). Os IMIs estão entre os herbicidas de maior escolha pelos produtores do mundo, porque eles não são tóxicos para animais e são altamente seletivos para as plantas (McCOURT et al., 2006).

A seguir, serão descritos cinco herbicidas análogos, da classe das imidazolinonas, que foram objeto de estudo neste trabalho.

1.3.1. Imazapyr (IMZR)

Imazapyr (IMZR) (active chemical (AC) 243.997), [2-[4,5-dihidro-4-metietil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il]-3-ácido piridinacarboxílico] (USEPA, 1996^a), é usado no controle de vegetação florestal (McMaHON & BUSH, 1992), em trilhos de trens-de-ferro (BORJESSON et al., 2004) e, no Brasil, em lavoura de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L) (DIAS et al., 2005). É comercializado como Arsenal®, Assault®, Chopper®, Contain® e Pivot® (LEE et al., 1999).

Imazapyr pode persistir no solo por mais de um ano (BORJESSON et al., 2004), embora seja muito móvel no solo (TORSTENSSON & BORJESSON,

2004). Foram encontradas diferentes concentrações deste herbicida em amostras de água de rios, lençóis freáticos, água para consumo (D'ASCENZO et al., 1998) e em lagos (LAGANA et al., 1998). A contaminação da superfície da água e do solo pode ser por meio de aplicações aéreas (COX, 1996) ou material particulado suspenso no ar, oriundo de incêndios florestais (McMAHON & BUSH, 1992).

Fowlkes et al. (2003) mostraram que a comunidade de macroinvertebrados de um lago não é afetada por gradientes extremos de concentração do IMZR.

Algumas plantas têm apresentado resistência aos herbicidas IMIs. O capim-colchão *Digitaria nuda* S apresentou resistência ao IMZR em lavouras de *S. officinarum* L (DIAS et al., 2005) e *Arabidopsis thaliana* L Heynh var. Columbia tornou-se resistente por um único ponto de mutação no gene ALS (SATHASIVAN et al., 1990).

Wang et al. (2005) mostraram que a meia-vida do IMZR em solo não estéril pode ser de 30 a 45 dias, enquanto que no solo estéril, de 81 a 133 dias, indicando que microrganismos no solo apresentam um importante papel na degradação do IMZR. O ozônio, usado no tratamento de água potável, remove aproximadamente metade do IMZR presente na água (COX, 1996).

A intoxicação com IMZR pode levar ao acúmulo de fluído nos pulmões, formação anormal de sangue no baço, aumento no número de tumores e cânceres nas glândulas adrenais, cérebro e tireóide, e cistos renais em ratos (COX, 1996), lesões na pele, conjuntivite, infecções gastrointestinais e respiratórias (IDROVO, 2004), prejuízo da consciência, distress respiratório, acidose metabólica, hipotensão, leucocitose, febre, pequena elevação da transaminase hepática e creatinina, hiperbilirubinemia não conjugada, ulceração oral, faringolaringite e queimadura química da córnea (LEE et al., 1999), sendo que a causa da irritação dos olhos, do sistema respiratório e pele (COX, 1996) e da ação neurotóxica em ratos, com capacidade de causar lesões no nervo e sintomas similares à Doença de Huntington, é o ácido quinolínico, um dos produtos de sua degradação (SCHWARCZ et al., 1983).

Lee et al. (1999) estudaram seis casos humanos de envenenamento agudo causado com a marca registrada Arsenal®, embora, não haja informações na literatura concernente à toxicidade aguda em humanos depois da ingestão de IMZR.

De acordo com agências federais dos EUA, IMZR possui baixa toxicidade aguda (insignificante) em pássaros, peixes e pulga d'água. Não há estudos com toxicidade crônica nesses animais. Não é considerado carcinogênico ou mutagênico, não causa efeitos na fertilidade ou na reprodução, de acordo com protocolos padronizados pela United States Environmental Protection Agency (USEPA) (COX, 1996).

Efeitos genotóxicos encontrados em animais de laboratório depois de exposição crônica com IMZR incluem: indução de MN em peixes *Tilapia rendalli*, somente na máxima dose tolerada (80 mg/kg), enquanto que o teste de MN em camundongos apresentou resultados negativos para todas as concentrações testadas (300; 600 e 1.200 mg/kg) (GRISOLIA, 2002).

O IMZR apresentou resultados negativos nos testes de Ames, para detecção de mutação reversa em bactérias; mutação gênica de células de mamíferos *in vivo* e CA em células de ovário de hamster chinês (CHO) e no teste do letal dominante em ratos (USEPA, 2003^b).

A natureza dos efeitos tóxicos e as características físico-químicas do IMZR são apresentadas nas **Tabelas 1 e 6** (Apêndice), respectivamente.

1.3.2. Imazapic (IMZC)

Imazapic (IMZC) (AC 263.284), ácido (\pm)-2-[4,5-dihidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il]-5-metil-3-piridincarboxílico (USEPA, 2001^a), é um herbicida classificado como de “risco reduzido” (USEPA, 2005^a) e é usado no controle de gramíneas forrageiras e fenos (USEPA, 2002^c). No comércio, é encontrado com as marcas registradas de Plateau®, Plateau DG® (USDA, 2004) e Cadre® (EIZENBERG et al., 2005).

O IMZC contido na marca Cadre® é usado para controle de plantas daninhas em cultura de amendoim (*Arachis hypogaea* L), enquanto que as marcas Plateau® e Plateau DG® são usadas no controle de capins, gramas, plantas de folha larga, trepadeiras, em pastos, na manutenção de linhas de trem e outras áreas não cultiváveis (COX, 2003; USDA, 2004).

A meia-vida no solo é de 31-410 dias de acordo com testes submetidos pela USEPA, sendo que seu metabólito conjugado é o (AC 189.215), ácido (\pm)-2-

[4,5-dihidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il]-5-hidroximetil-3-piridinecarboxílico (USEPA, 2001^a; COX, 2003).

Dados sobre a toxicidade aquática aguda e contaminação da água de superfície, pelo IMZC, são insuficientes (ORME & KEGLEY, 2006^a).

Azania et al. (2004) observaram a seletividade do herbicida IMZC em *A. hypogaea* L. Outras culturas também apresentam resistência ao grupo das imidazolinonas como o milho (*Zea mays* L), o trigo (*Triticum aestivum* L), o arroz (*Oryza sativa* L), o girassol (*Helianthus annuus* L), por meio da tecnologia denominada “Clearfield®” (TAN et al., 2005), as culturas “Clearfields®” são obtidas por meio da biotecnologia que envolve cultura de células em que houve seleção de um gene de tolerância para o grupo de herbicidas (ALMEIDA et al., 2004). A identificação dos inertes nas formulações de IMZC é considerada informação de propriedade e a falta de informação no rótulo indica que os ingredientes inertes não são perigosos à saúde (USDA, 2004). O único ingrediente inerte identificado foi a sílica cristalina, nas marcas Cadre® e Plateau DG® (COX, 2003), e repetidas exposições resultam em silicose (BASF, 2000).

De acordo com a carcinogenicidade em humanos, a International Agency for Research on Cancer (IARC) classifica os agentes químicos nos diferentes grupos a seguir:

Grupo 1 – Carcinogênico.

Grupo 2a – Provável carcinogênico.

Grupo 2b – Possível carcinogênico.

Grupo 3 – Não classificável como carcinogênico.

Grupo 4 – Provável não carcinogênico.

Em 1997, a IARC, classificou a sílica cristalina no Grupo 1 (COCCO, 2001) e a sílica amorfa no Grupo 3 (WARHEIT, 2001).

Testes em mamíferos grandes (cães e coelhos), mamíferos pequenos (camundongos e ratos), e em pássaros e abelhas indicaram uma baixa taxa de toxicidade aguda para IMZC. No entanto, os mamíferos grandes podem ter maior sensibilidade, em relação aos pássaros e abelhas (USDA, 2004).

Em 1986, a USEPA, estabeleceu uma diretriz para avaliação de risco carcinogênico e os agentes químicos passaram a ser classificados em:

Grupo A – Carcinógeno humano – Há suficiente evidência para concluir que este pode causar câncer em humanos.

Grupo B1 – Provável carcinógeno humano – Há limitada evidência que este pode causar câncer em humanos, mas até o presente isto não é conclusivo.

Grupo B2 – Provável carcinógeno humano – Há inadequada evidência que este pode causar câncer em humanos, mas até o presente isto está longe de ser conclusivo.

Grupo C – Possível carcinógeno humano – Há limitada evidência que este pode causar câncer em animais na ausência de dados humanos, mas até o presente isto não é conclusivo.

Grupo D – Não classificável para carcinogenicidade humana – Não há evidência, até o presente momento, que causa câncer em humanos.

Grupo E – Evidência de não carcinogenicidade para humanos – Há uma grande evidência que este não causa câncer em humanos.

Testes realizados com animais de laboratório, de acordo com protocolos experimentais da USEPA, mostraram que o IMZC, e as marcas que contêm o herbicida IMZC, causam irritação moderada nos olhos, deterioração muscular, anemia, aumento dos níveis de colesterol no sangue, com conseqüente arteriosclerose, aumento no volume do fígado, mas, não tem efeitos reprodutivos, nem carcinogênicos. A USEPA classifica o Imazapic no Grupo E, embora há um estudo que mostra aumento de incidência de anormalidades no esqueleto (COX, 2003).

Avaliações genotóxicas demonstraram que o herbicida IMZC foi negativo até 5.000 µg/placa na presença ou ausência de ativação metabólica, em *Salmonella typhimurium* linhagem TA98, TA100, TA1535 e TA1537 e *Escherichia coli* linhagem WP2uvra; não mutagênico no teste para detecção de mutação de ponto em células de ovário de hamster chinês / hipoxantina guanina fosforibosil transferase (CHO/HGPRT) testado até a concentração citotóxica ou limite de solubilidade, na presença ou ausência de ativação; não induziu CA estrutural em

CHO em cultura, na presença ou ausência de ativação; e não foi mutagênico no teste de CA em medula óssea de ratos até 5.000 mg/kg (USEPA, 2001^a).

A natureza dos efeitos tóxicos e as características físico-químicas do IMZC são apresentadas nas **Tabelas 2 e 6** (Apêndice), respectivamente.

1.3.3. Imazethapyr (IMZT)

Imazethapyr (IMZT) (AC 263.499), ácido 2-[4,5-diidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il]-5-(1-hidroetil)-3-piridinecarboxílico (USEPA, 2005^b), é um herbicida que apresenta resultados consistentes no controle de ervas daninhas de folhas largas, quando aplicado dez dias após emergência (GRICHAR et al., 2004). Nomes comerciais para produtos que contêm o herbicida IMZT incluem Contour®, Hammer®, Overtop®, Passport®, Pivot®, Pursuit®, Pursuit Plus® e Resolve® (OSU, 1996^a).

Produtos Pursuit® e seu ingrediente ativo IMZT foram avaliados em 1994 e 1996, mas a literatura toxicológica não apresenta dados significativos sobre a toxicidade do IMZT (NYS DEC, 2000). Pouco se sabe sobre sua presença, destino ou transporte na água de superfície ou lençóis freáticos, mas foi detectado em grandes concentrações em amostras de água de rios e de pântanos (BATTAGLIN et al., 2000).

A USEPA (1993), estabeleceu valores permanentes residuais para cultura de milho (*Zea mays* L) e forrageiras em 0,1 ppm. O IMZT é registrado no EPA para controle de ervas daninhas em culturas de soja (*Glycine max* L), alfafa (*Mendicago sativa* L) e milho (*Z. mays* L) híbrido em “Clearfield’s”, podendo ser aplicado no solo ou por aspersão.

A sorção do IMZT foi estudada em vários tipos de solos. Os que oferecem maiores riscos de contaminação das águas são aqueles de pH alcalino que apresentam uma sorção lenta (AHMAD et al., 2001). A sorção e a dessorção do IMZT é afetada pelo pH do solo. Em pH ácido, ocorre sorção maior do que em pH básico. No entanto, este herbicida pode dessorver e causar injúrias nas culturas de canola (*Brassica napus* L) e beterraba (*Beta vulgaris* L) três meses após a aplicação (BRESNAHAN et al., 2000). A concentração de IMZT na água de solo declina rapidamente após as primeiras 24 horas do experimento/aplicação, mas,

após este tempo, sua concentração declina lentamente, mostrando que a dessorção é dependente do tempo (JOHNSON et al., 2000). Em água pura, com pH alcalino, é degradado lentamente (ELAZZOUI et al., 2002). O IMZT, no ano seguinte após sua aplicação, causou visível injúrias ao algodão (*Gossypium hirsutum* L), sem afetar o rendimento das fibras, em sistema experimental de rotação de cultura entre *A. hypogaea* L e *G. hirsutum* L (YORK et al., 2000). No entanto, injúrias ao *G. hirsutum* L e às suas fibras foram observadas no campo de rotação de culturas, no qual foi aplicada a marca Pursuit® no *A. hypogaea* L, antes do plantio do *G. hirsutum* L (GRICHAR et al., 2004).

A persistência das IMIs no solo é influenciada pelo grau de adsorção, matéria orgânica, temperatura e exposição à luz solar, sendo que o modo primário de decomposição desta classe química de herbicidas é por degradação microbiana (GRICHAR et al., 2004; WANG et al., 2005). IMZT é estável, e apresenta uma meia vida entre 33 e 37 meses em solo aeróbico ou 2 meses em condições anaeróbicas. O único produto de degradação que foi encontrado é o 5-etil-3-piridina ácido carboxílico, dados que contribuem na avaliação de riscos ecológicos (NYS DEC, 2000). Foram detectados dois metabólitos da fotodegradação do IMZT, em água pura com pH alcalino, rotulados de A e B (ELAZZOUI et al., 2002). Estudos em soja (*G. max* L), amendoim (*A. hypogaea* L), milho (*Z. mays* L), alfafa (*M. sativa* L) e canola (*B. napus* L) indicam os únicos metabólitos significantes: o (alfa)-hidroximetil (AC 288.511) e a glicose conjugada (5-[1-(β-D-glicopiranosiloxi)etil]-2-[4,5-diidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il]-3-piridinecarboxílico), (AC 182.704) (USEPA, 2005^b). O primeiro tem sido encontrado em quantidades pequenas em estudos metabólicos de rato, cabra e galinha (USEPA, 2003^a).

A planta daninha leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L), em lavouras de *G. max* L, apresenta resistência codificada por um gene dominante nuclear, com dominância completa (VARGAS et al., 2001).

Mutações que conferem resistência ao IMZT foram descritas em diferentes organismos: uma mutação de ponto em *Amaranthus hybridus* K (TRUCCO et al., 2006); duas mutações em *Arabidopsis* (JANDER et al., 2003) e três mutações (genes AHAS (AHAS1, AHAS2 e AHAS3) em *Helianthus annuus* L (KOLKMAN et al., 2004).

Pagotto et al. (1998) mostraram que o IMZT não deixou resíduo nas plantas da *M. sativa* L, podendo estas serem consumidas pelos animais, logo após seu tratamento. Para a cultura da *B. napus* L, não há um estudo de níveis de resíduos máximos estabelecidos ou propostos. Em estudos do metabolismo de cabra foi verificado que o ¹⁴C-IMZT e seus resíduos não se acumulam no leite ou nos tecidos comestíveis do animal, mas a dose máxima do herbicida IMZT recomendada na água potável é de 0,25 mg/kg por peso/dia, baseado no nível de efeito adverso não observado (NOAEL) em cães a partir do estudo de toxicidade em dieta durante 1 ano (USEPA, 2003^a).

Ervilhas (*Pisum sativum* L) tratadas com o IMZT apresentaram fermentação aeróbica por acúmulo de carboidratos (solúveis e amido) nas folhas e raízes, seguido de um aumento de enzimas fermentativas piruvato descarboxilase (EC 4.1.1.1), álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1) (GASTON et al., 2002) e perda de indução da lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27) e da atividade da alanina aminotransferase (EC 2.6.1.2) nas raízes ou na fermentação etanólica de leveduras. Isso pode estar envolvido na inibição da biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada, como uma resposta fisiológica geral (ZABALZA et al., 2005). A marca Pivot® causou redução da atividade da enzima nitrogenase em bactérias da família Rhizobiaceae e efeito tóxico na nodulação e crescimento das raízes das plantas trevo (*Trifolium repens* L), alfafa (*Medicago sativa* L) e serradella (*Ornithopus compressus* L) (NIEWIADOMSKA & KLAMA, 2005).

Para mamíferos, a toxicidade do IMZT é baixa para mamíferos (NYS DEC, 2000; USEPA, 2005^b) enquanto que aves, peixes, invertebrados terrestres (*Eisenia foetida* Sav), invertebrados aquáticos (*Daphnia magna* Str) e algas verdes (*Selenastrum capricornutum* Prin) demonstram alta sensibilidade (BATTAGLIN et al., 2000; NYS DEC, 2000), sendo muito tóxico com a espécie aquática vascular, flutuante, *Lemna gibba* L (IECPM, 1994). É um herbicida considerado não tóxico (Toxicidade Categoria IV) baseado em estudo de exposição oral aguda com ratos e irritação da pele em coelhos, independente do sexo, enquanto que os resultados de toxicidade dérmica e ocular aguda em coelhos, indicam que IMZT é um pouco tóxico (Toxicidade Categoria III), não sensibiliza preá (*Cavia aperea* Erx), não possui risco genotóxico e não apresenta efeito teratogênico em ratos Sprague Dawley, sendo que o NOAEL para

toxicidade maternal foi de 375 mg/kg por peso/dia, para oncogenicidade e toxicidade crônica foi de 500 mg/kg por peso/dia, sendo excretado em 96 horas pela urina (89-95%) e pelas fezes (6-11%), na alta concentração testada (USEPA, 2003a).

Resultados a partir de estudos de toxicidade subcrônica e crônica em três espécies diferentes de animais demonstram que IMZT não apresenta efeito estrogênico ou efeito relacionado ao tratamento do IMZT no sistema endócrino (USEPA, 2002^b).

A natureza dos efeitos tóxicos e as características físico-químicas do IMZT são apresentadas nas **Tabelas 3 e 6** (Apêndice), respectivamente.

1.3.4. Imazamox (IMZX)

Imazamox (IMZX) (AC 299.263), ácido 2-[4,5-diidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il]-5-metoximetil-3-piridinecarboxílico (USEPA, 1997^a), é um herbicida IMI desenvolvido para controle de plantas daninhas em várias culturas, incluindo ervilha (*Pisum sativum* L), trigo (*Triticum aestivum* L) herbicida-resistente (Clearfield®) (BALL et al., 2003), soja (*Glycine max* L) (PLAZA et al., 2003), alfafa (*Mendicago sativa* L) e legumes comestíveis (NYS DEC, 2003), capins anuais, capim-bode (*Aegilops cylindrica* Host), bromo-macio (*Bromus tectorum* L), aveia-selvagem (*Avena fatua* L), capim-centeio-italiano (*Lolium multiflorum* Lam) e outros (BALL et al., 2003). As diferentes respostas do IMZX nas plantas daninhas *A. cylindrica* Host e centeio-bravo (*Aneurolepidium ramosum* T), por aplicação foliar, parecem estar relacionadas com as diferenças na translocação (movimento do herbicida na planta) e metabolismo, mas não na absorção (PESTER et al., 2001).

No comércio, IMZX é encontrado desde 1997 com as marcas de nomes Raptor® e Sweeper® ou na forma combinada com outros herbicidas com as marcas Odyssey® e Bolero® (AGRANOVA, 2001).

O IMZX é aplicado nas folhas, no solo ou por aspersão. Pode ser móvel no solo e razoavelmente persistente. Sua meia vida é de 28 dias se degradado aerobicamente por microrganismos, sendo que por fotólise no solo, sua meia vida é de 65 dias, enquanto que em ambiente aquoso é de 6 a 8 horas. Se não for

degradado fotoliticamente, permanecerá muito estável e persistente em sedimentos aquáticos (NYS DEC, 2003), enquanto que em reatores biológicos é menor que 14 dias (VISCHETTI et al., 2004).

O pH do solo influencia a sorção-dessorção do IMZX e isto pode afetar sua persistência e biodisponibilidade. Em solo de pH baixo, após três meses, IMZX foi desorvido e biodisponibilizado causando injúrias à canola (*Brassica napus* L) e beterraba (*Beta vulgaris* L) (BRESNAHAN et al., 2002). A biodisponibilidade do IMZX é maior em solo úmido (COBUCCI et al., 1998) pelo fato da umidade torná-lo menos persistente (COBUCCI & MACHADO, 1999). A sorção do IMZX é reduzida em pH ácido e isso aumenta sua biodisponibilidade e o potencial de injúrias em rotação de culturas como as de cevada (*Hordeum vulgare* L), canola (*B. napus* L) e trigo (*T. aestivum* L) (BALL et al., 2003).

Uma mutação S653N no gene AHAS que resulta em um aumento de tolerância para herbicidas IMIs, foi induzida em batata inglesa (*Solanum tuberosum* L) transformada junto com o gene da beta-glicuronidase. O gene mutado AHAS foi também usado como gene de seleção para produção de fibras ricas de amilopectina em *S. tuberosum* L (ANDERSSON et al., 2003).

A *E. heterophylla* L é uma espécie comum nos campos de *G. max* L, no Brasil. Três biotipos diferentes mostraram resistência ao IMZT e resistência cruzada para o IMZX (PLAZA et al., 2003), enquanto que em populações de *Cyperus difformis* L, apresentou susceptibilidade, ou seja, resistência cruzada negativa (RUIZ-SANTAELLA et al., 2004).

Palha de sorgo híbrido (*Sorghum bicolor* L M), associada ao uso do herbicida IMZX potencializa seu efeito deletério sobre as plantas daninhas das culturas subseqüentes (CORREIA et al., 2005).

Os resíduos produzidos pelo metabolismo do IMZX na planta são relativamente baixos. É considerado não tóxico (categoria de toxicidade IV) quando administrado por via oral em ratos, independente do sexo. Estudo de toxicidade dérmica aguda em coelhos indicam que o IMZX é muito pouco tóxico (categoria de toxicidade III), independente do sexo. É considerado não tóxico (categoria de toxicidade IV) para ratos com exposição respiratória. IMZX mostrou ser não irritante ou muito pouco irritante na pele de coelho (categoria de toxicidade IV) e não é considerado um sensibilizador para preás. IMZX não é

causador de efeitos teratogênicos em fetos e nem promove toxicidade no desenvolvimento de ratos e coelhos. IMZX não desenvolve sensibilidade nos descendentes. Nenhum efeito adverso foi notado em estudos de toxicidade subcrônica em ratos, nem toxicidade sistêmica em cães. Os estudos de toxicidade crônica não revelaram nenhuma evidência macro ou microscópica de lesões ou carcinogenicidade em cães, camundongos ou ratos, tanto em machos como em fêmeas. Estudos do metabolismo animal feitos em cabras, galinhas e ratos revelam que os metabólitos CL 263.284 (hidroximetil) e AC 312.622 (hidroximetil carboxilado), são adequadamente muito baixos, não ocorrendo expressivamente em carne, leite ou ovos. Grãos de trigo (*Triticum aestivum* L) e sementes de alfafa (*Mendicago sativa* L) apresentaram uma quantia muito pequena do resíduo CL 263.284. Não há informações exequíveis que sugerem que IMZX tenha associação com efeitos estrogênicos ou efeitos no sistema endócrino em duas ou mais espécies de animais ou efeitos cumulativos em mamíferos (USEPA, 2002^d).

USEPA (1997^b), classifica o IMZX como pertencente ao “Grupo E”, provável não carcinogênico humano.

O IMZX geralmente exibe muito pouca toxicidade para animais, aves, peixes, ou insetos (NYS DEC, 2003) e não é inibidor de colinesterase (Orme & Kegley, 2006^b).

Estudos de mutagenicidade em bactérias (teste de Ames), teste para CA em CHO, mutação de ponto em CHO/HGPRT (USEPA, 1997^b; 2002^d), teste para CA em ratos (Dominant Lethal Rat Chromosomal Damage Assay), síntese de DNA não programado (USEPA, 1997^b) e MN em ratos (USEPA, 2002^d), foram negativos.

A natureza dos efeitos tóxicos e as características físico-químicas do IMZX são apresentadas nas **Tabelas 4 e 6** (Apêndice), respectivamente.

1.3.5. Imazaquin (IMZQ)

Imazaquin (IMZQ) ácido 2-[4,5-dihidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il]-3-quinolino-carboxílico, é um herbicida sistêmico aplicado em pré-plantio e em pré-emergência, sendo utilizado no controle de um amplo espectro de dicotiledôneas que se desenvolvem em cultura da soja (*Glycine max* L). Tem

molécula com dois grupos funcionais ionizáveis: um grupo carboxílico (ácido fraco, $pK_a = 3,8$) e um grupo quinolina (base fraca, $pK_a = 2,0$), e isto lhe confere um caráter anfótero (REGITANO et al., 2001; BARIZON et al., 2005).

O IMZQ é conhecido no comércio com os nomes de Ala-Scept® , Scepter®, Squadron®, Tri-Scept®, Partner® (OSU, 1996b), Image® (BULL OSU, 1999) e Tone-up® (BULL Cyanamid Japan, 1999).

Estudos de resistência cruzada mostraram alto grau de resistência *in vitro* para IMZQ (WINDER & SPALDING, 1988). O carrapicho (*Xanthium strumarium* L) desenvolveu resistência ao IMZQ com três anos consecutivos de aplicação (SCHMITZER et al., 1993). Burgos et al. (2001) mostraram que duas espécies do gênero *Amaranthus* apresentam tolerância diferencial para o IMZQ. *A. palmeri* SW é 70 vezes mais tolerante ao IMZQ do que *A. hybridus* K.

A inibição do crescimento e a concentração de clorofila na folha é passageira. A planta *Glycine max* L, requer aproximadamente seis semanas para recuperar-se completamente da fitotoxicidade do IMZQ (ALONGE, 2000). O IMZQ foi persistente e causou fitotoxicidade em lavoura de *Z. mays* L var. safrinha, em sucessão à da *G. max* L em solo argiloso com 75% de argila, mas esses sintomas foram diminuindo gradativamente até desaparecerem em 120 dias após a aplicação (ULBRICH et al., 1998).

Em *Z. mays* L, a inibição do crescimento da planta, tratada com o IMZQ não é causada pelo acúmulo de 2-cetobutirato e 2-aminobutirato na planta. Troca no perfil dos aminoácidos, depois do tratamento com IMZQ, sugere que a falta de aminoácidos de cadeia ramificada seja a causa primária do atraso no crescimento (SHANER & SINGH, 1993).

O IMZQ apresenta maior disponibilidade em solos com valores de pH básico e com baixos teores de carbono orgânico e argila (REGITANO et al., 2001). A retenção do IMZQ é maior em áreas com pH ácido e altos teores de matéria orgânica (OLIVEIRA et al., 2004).

As informações sobre a genotoxicidade do IMZQ são escassas. Os testes *in vitro* com CHO e *in vivo* com células da medula óssea de camundongo Swiss (*Mus musculus* L), para detecção de MN mostraram que o IMZQ não apresenta ação clastogênica em ambos os testes (LOSI-GUEMBAROVSKI et al., 2004), e foi negativo em testes de Ames (OSU, 1996^b).

Estudos de oncogenicidade em ratos CD-1, tratados durante 18 meses, com um NOEL de 1000 ppm e um LEL de 4000 ppm, resultaram na diminuição do peso corporal em fêmeas (OSU, 1996^b).

Estudos teratogênicos em ratos, com LOEL de 2.000 mg/Kg por peso/dia, resultaram em baixíssima queda no peso fetal e redução na ossificação. Toxicidade materna com NOEL de 500 mg/kg por peso/dia e com LOEL de 2.000 mg/kg por peso/dia induziram salivação, alopecia, letargia, flacidez e 8% de mortalidade. Não há dados na literatura sobre a toxicidade em órgãos. Estudos de metabolismo em ratos mostraram que uma única dose baixa foi quase que totalmente excretada em 48 horas, sendo 94% na urina e 4% nas fezes. IMZQ é praticamente não tóxico para aves, peixes e abelha, quando usado como recomendado. IMZQ é degradado no solo por via microbiana, é descarboxilado e produz um grande metabólito CL 266.066 e no mínimo seis outros metabólitos menores. IMZQ é estável para hidrólise em pH entre 3 e 5 e tem uma meia vida hidrolítica aquosa de 165 dias em pH básico. É absorvido rapidamente pelas raízes e folhas e movimenta-se pelo xilema e floema. Nenhum efeito adverso foi notado em estudos de toxicidade crônica em coelhos e ratos Sprague-Dawley. Estudo em cães, com um NOEL de 1.000 ppm e um LOEL de 5.000 ppm, mostrou perda de peso, miopatia, anemia moderada, hiperplasia da medula óssea, aumento dos níveis séricos de transaminase sérica glutâmico-oxaloacético (SGOT), transaminase sérica glutâmico-pirúvico (SGPT) e creatina fosfo-quinase (CPK) e aumento relativo do peso do fígado (OSU, 1996^b).

A natureza dos efeitos tóxicos e as características físico-químicas do IMZQ são apresentadas nas **Tabelas 5 e 6** (Apêndice), respectivamente.

1.4. Mutação e câncer

O câncer é fundamentalmente uma doença genética. Quando o processo neoplásico se instala, a célula-mãe transmite às células filhas a característica neoplásica. No entanto, uma só alteração no DNA não causa câncer. São necessárias várias mutações em seqüência, que ao mesmo tempo não sejam mortais para a célula inicial. As lesões estruturais são causadas por fatores químicos, físicos ou biológicos. Estas alterações desregulam o mecanismo de

crescimento e multiplicação, caracterizando um **estágio de iniciação**. As “iniciadas”, sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual (**estágio de promoção**). A multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas evolui (**estágio de progressão**) até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (SASSE, 2006).

Os eventos mutacionais que levam ao desenvolvimento de uma neoplasia podem acarretar: perda dos mecanismos responsáveis pela regulação do ciclo celular; alterações nas funções dos fatores de transcrição; alterações nas interações célula-célula e célula-substrato; inativação dos sinais metabólicos de transdução; perda de sinais apoptóticos e metilações gênicas em regiões normalmente não metiladas (BAYLIN et al., 2001), fazendo com que uma célula se torne habilitada a se dividir mais rapidamente em relação às adjacentes (JONES, 1986; GONZALGO & JONES, 1997).

As múltiplas etapas envolvidas no desenvolvimento de um câncer são influenciadas por diferentes fatores, que dependem da constituição genética do indivíduo, assim como do ambiente e do estilo de vida (GIOVANNUCCI et al., 2005; SALADI & PERSAUD, 2005). Por exemplo, o estresse, o tabagismo, dietas ricas em gordura e/ou açúcar, a inatividade física e agentes biológicos químicos e físicos ambientais estão diretamente relacionadas com a maioria das neoplasias (BARNARD, 2004).

Entre os agentes químicos ambientais, relacionados com a indução de cânceres, estão os agrotóxicos, também conhecidos como pesticidas ou defensivos agrícolas.

No entanto, com raras exceções, os pesticidas não reagem diretamente com o DNA e os mecanismos de sua carcinogenicidade são, em geral, similares àqueles carcinógenos não genotóxicos (epigenéticos), cuja atividade está relacionada a: promoção de iniciação espontânea, citotoxicidade com proliferação sustentada, estresse oxidativo, formação de receptores ativados e outros. Alguns compostos demonstram completa correlação entre genotoxicidade e carcinogenicidade, enquanto outros não apresentam nenhuma correlação. Alguns pesticidas apresentam resultados positivos em alguns testes para genotoxicidade, porém esses resultados são freqüentemente controversos, não reproduzíveis, ou

obtidos somente em níveis tóxicos. A baixa genotoxicidade da maioria dos pesticidas é facilmente explicada pelo fato dos mesmos serem submetidos a testes extremamente rigorosos antes de sua comercialização. Existem exemplos de ausência de correlação entre genotoxicidade e carcinogenicidade: alguns pesticidas são genotóxicos (mas não muito), mas não carcinogênicos. Outros são considerados não genotóxicos mas são extremamente carcinogênicos. Na carcinogênese, o efeito promotor dos pesticidas se dá por indução do citocromo P-450, formação de espécies reativas de oxigênio e proliferação de peroxissomas (RAKITSKY et al., 2000).

1.5. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) em células de asas de *D. melanogaster*

A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* foi um dos primeiros sistemas experimentais utilizados para avaliar os efeitos mutagênicos e recombinogênicos de agentes físicos e químicos, sendo que esses efeitos podem ser observados tanto em células da linhagem germinativa, como em células somáticas (WÜRGLER, 1991).

A *D. melanogaster* é considerada um organismo teste ideal para os estudos de genotoxicidade e de antigenotoxicidade de vários compostos e misturas (GRAF et al., 1998), i) apresenta um sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos, que permite o metabolismo de agentes xenobióticos (HÄLLSTRÖM et al., 1984; ZIJLSTRA & VOGEL, 1988), é um organismo pequeno, de fácil manutenção, tempo de geração curto, de grande progênie, e baixo número de cromossomos (GRAF et al., 1984); é um ensaio sensível e barato capaz de detectar uma grande variedade de genotoxinas (WÜRGLER & VOGEL, 1986).

Graf et al. (1984) desenvolveram um teste de curta duração (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) para a detecção de diferentes tipos de manchas mutantes (simples ou gêmeas) que podem ser resultantes tanto de mutação, deleção ou recombinação somática, ocorridas no cromossomo nº 3 de *D. melanogaster*.

O teste da mancha da asa é baseado na indução de manchas mutantes (clones) que surgem a partir da perda da heterozigose de células em desenvolvimento, as quais são heterozigotas para um gene recessivo marcador, presente nas células das asas das moscas (GUZMÁN-RINCÓN & GRAF, 1995; FREI & WÜRGLER, 1996).

O ensaio *in vivo* com a mosca da fruta *D. melanogaster* pode ser visto como uma ponte de ligação entre sistemas testes de genotoxicidade em microrganismos *in vitro* e mamíferos *in vivo* (FREI & WÜRGLER, 1996).

Para a realização deste teste são utilizadas três linhagens mutantes de *D. melanogaster*: 1) *multiple wing hairs*, portadora dos marcadores genéticos recessivos *mwh* no cromossomo nº. 3 (*mwh*, 3-0,3), com constituição genética *y; mwh jv*, na qual em homozigose expressa um fenótipo em que cada célula da asa apresenta três ou mais pêlos ao invés de apenas um por célula; 2) *flare-3*, que possui um gene mutante marcador recessivo em hemizigose (*flr³*) no cromossomo nº. 3 (*flr³*, 3-38,8), com constituição genética *flr³ / In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s*, que afeta os pêlos das células da asa, modificando-os, parecendo uma chama e 3) *ORR; flare-3 (ORR; flr³)*, com constituição genética *ORR; flr³ / In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s*. A linhagem “*ORR; flare-3*” é caracterizada por um aumento na atividade de enzimas citocromo P-450 (HÄLLSTRÖM & BLANCK, 1985; GUZMÁN-RINCÓN & GRAF, 1995). A ativação de promutágenos e de procarcinógenos é realizada pelas enzimas citocromo P-450, que têm a capacidade de metabolizar uma variedade de substratos formando eletrófilos altamente reativos que se ligam covalentemente ao DNA (GONZALEZ & GELBOIN, 1992).

O gene *flr³* das linhagens “*flare-3*” e “*ORR; flare-3*” é letal em homozigose. Assim sendo, ambas linhagens possuem o gene *flr³* em hemizigose, sendo que o cromossomo homólogo, balanceador (*TM3, Bd^s*), apresenta inversões múltiplas (GRAF et al., 1984).

O SMART para detecção de manchas mutantes nas asas de *D. melanogaster* é realizado por meio de dois cruzamentos:

1. Cruzamento padrão (ST - Standard cross): Fêmeas virgens da linhagem “*flare-3*” são cruzadas com machos “*multiple wing hairs*” (GRAF et al., 1989).

2. Cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB - High bioactivation cross): Fêmeas virgens da linhagem “ORR-flare-3” são cruzadas com machos “*multiple wing hairs*” (GRAF & VAN SCHAICK, 1992).

Destes cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: marcador trans-heterozigoto (MH), e balanceador heterozigoto (BH). As larvas, de ambos genótipos, são tratadas com diferentes concentrações do agente químico a ser testado.

A **Figura 2** mostra uma infografia dos cruzamentos padrão e de alta bioativação; os dois tipos de descendentes: MH e BH, assim como os eventos genotóxicos detectáveis em cada descendente.

A escolha das condições ótimas de tratamento (concentração dos compostos, duração do tratamento e a idade das larvas no tratamento) é essencial (Graf et al., 1990).

Nos adultos emergentes MH as manchas mutantes aparecem como manchas simples, apresentando o fenótipo “*mwh*” ou “*flare*” ou manchas gêmeas (“*mwh/flare*”). Essas manchas nas asas podem ser por recombinação mitótica ou por diferentes mecanismos de mutação. Nos adultos emergentes BH as manchas mutantes aparecem apenas como manchas simples do tipo “*mwh*”, devido à presença do cromossomo balanceador, que apresenta inversões múltiplas, o que faz com que todos os eventos recombinacionais sejam eliminados, fazendo com que a frequência de manchas seja consideravelmente reduzida. Assim sendo, nos descendentes BH apenas os eventos mutacionais levam à formação de manchas mutantes (SPANÓ et al., 2001).

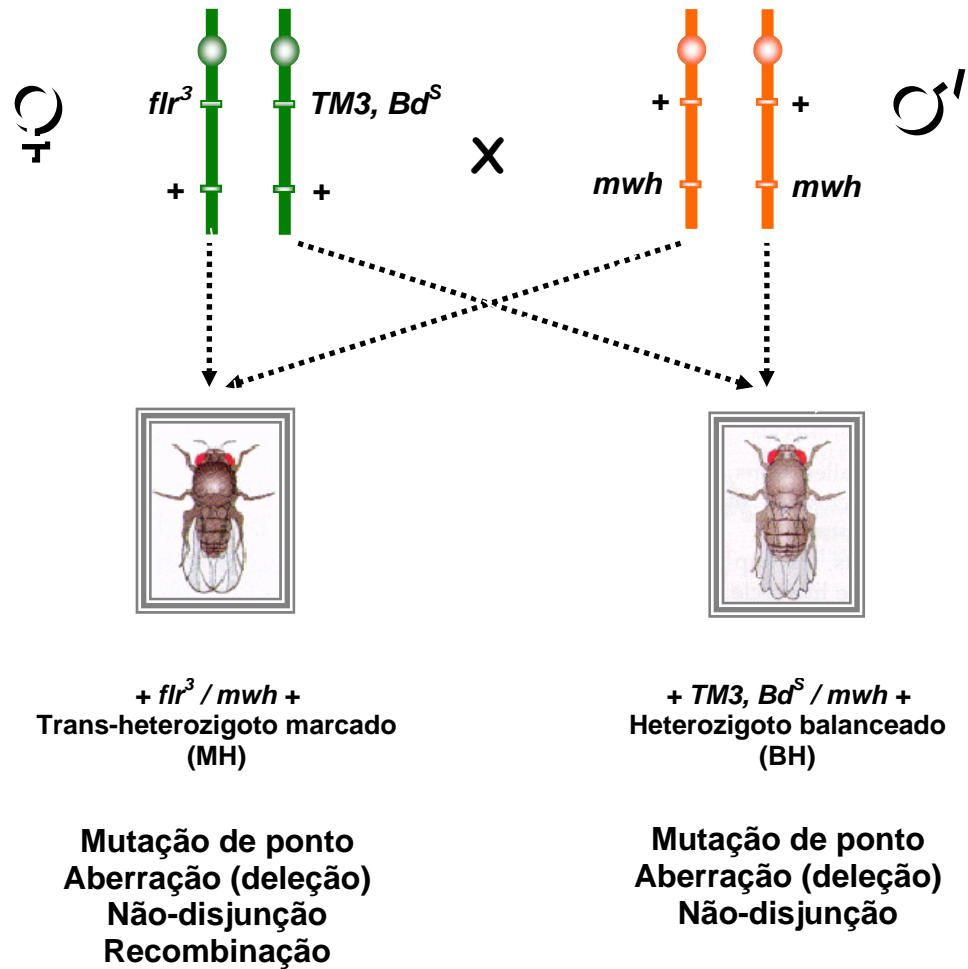


Figura 2. Infograma dos cruzamentos padrão e de alta bioativação, e os eventos genotóxicos detectáveis em cada descendente.

Durante a análise é registrado o número de manchas, assim como o tipo e o número de pêlos mutantes existentes em cada mancha.

A **Figura 3** mostra uma fotomicrografia de pêlos normais (A), pêlos múltiplos (B) e pêlos *flare* (C), obtidas em microscópio de luz com objetiva de 40X e ocular de 10X.

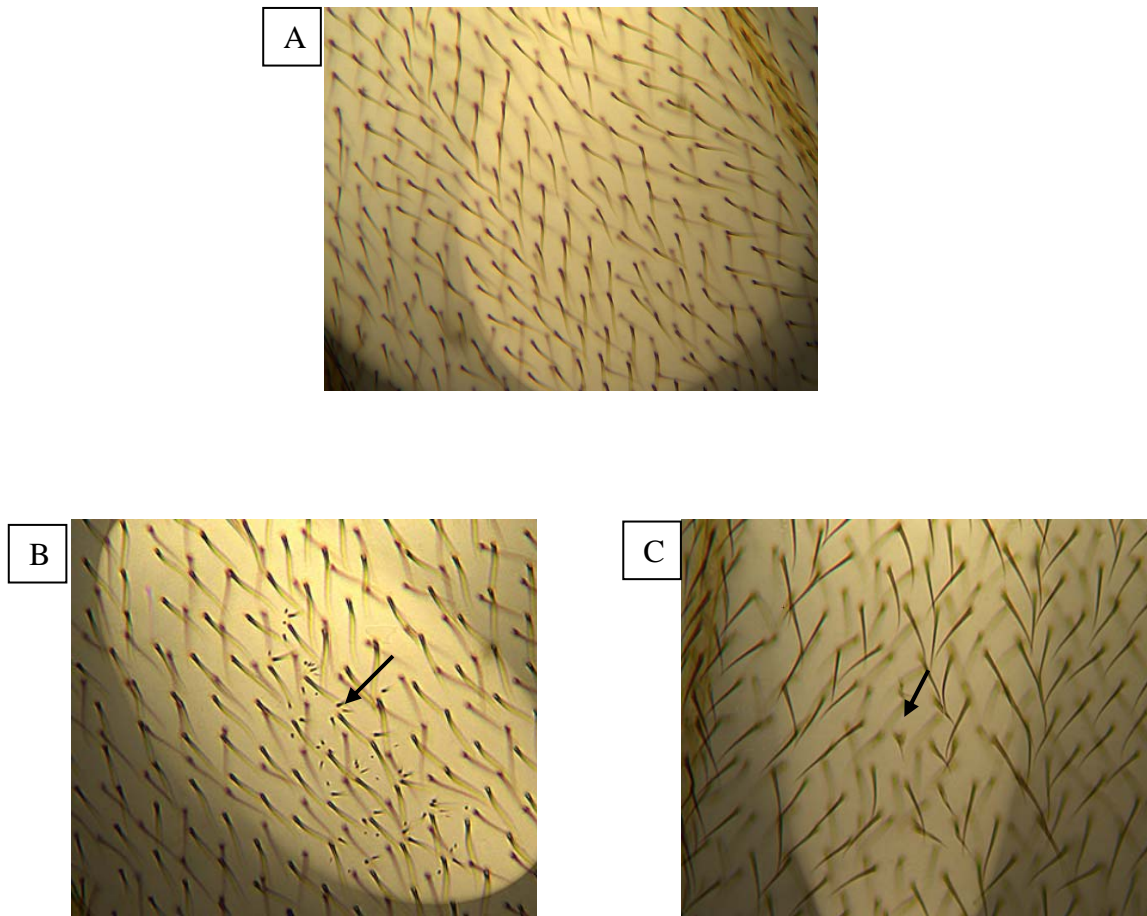


Figura 3. Fotomicrografia de pêlos normais (A), pêlos múltiplos (B) e pêlos *flare* (C), em células de asas de *Drosophila melanogaster*, obtidas em microscópio de luz com objetiva de 40X e ocular de 10X.

2. OBJETIVOS

Imazapyr (IMZR), Imazapic (IMZC), Imazethapyr (IMZT), Imazamox (IMZX) e Imazaquin (IMZQ), são herbicidas análogos da classe das imidazolinonas (IMIs), considerados de baixa toxicidade, utilizados principalmente no controle de ervas daninhas em culturas de soja (*Glycine max* L), alfafa (*Mendicago sativa* L), amendoim (*Arachis hypogaea* L), milho (*Zea mays* L), sorgo (*Sorghum bicolor* L M); aos arredores de florestas e ao longo de cercas e trilhos de linhas de trens. Os estudos de sua toxicidade em células eucariontes são escassos e alguns resultados de genotoxicidade são considerados insuficientes.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos:

- Avaliar se herbicidas imidazolinonas (IMZR, IMZC, IMZT, IMZX e IMZQ), quando testados isoladamente, possuem efeitos genotóxicos em células de asas de *D. melanogaster*.
- Avaliar se a estrutura molecular (radicais) dos herbicidas imidazolinonas (IMZR, IMZC, IMZT, IMZX e IMZQ), tem influência na atividade desses compostos.
- Verificar se há correlação entre a concentração de enzimas citocromo P-450 (cruzamentos ST e HB) e a genotoxicidade de herbicidas imidazolinonas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRANOVA. Global Herbicide Directory Index (from the Global Herbicide Directory, 3rd. Edn., CD-ROM version). Disponível em: <<http://www.agranova.co.uk/herblist.html>>. Acessado em 30 de março de 2006.
2. AHMAD, R.; KOOKANA, R.S.; ALSTON, A.M. Sorption of ametryn and imazethapyr in twenty-five soils from Pakistan and Australia. **JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH Part B – Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.B36, p.143-160, 2001.
3. ALMEIDA, J.C.V.; ULBRICH, A.V.; LEITE, C.R.F.; SOUZA, J.R.P. Efficacy of imazapic + imazapyr to control purple nutsedge (*Cyperus rotundus*) in corn (*Zea mays*) tolerant to imidazolinones. **Planta Daninha**, v.22, p.151-156, 2004.
4. ALONGE, S.O. Effect of imazaquin applications on the growth, leaf chlorophyll and yield of soybean in the Guinea savanna of Nigeria. **JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH Part B – Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.35, p.321-336, 2000.
5. ANDERSSON, M.; TRIFONOVA, A.; ANDERSSON A.B.; JOHANSSON, M.; BULOW, L.; HOFVANDER, P. A novel selection system for potato transformation using a mutated AHAS gene. **Plant Cell Reports**, v.22, p.261-267, 2003.
6. APAP. Aquatic Pesticide Application Plan for the San Francisco Estuary Invasive Spartina Project. Disponível em: <http://www.spartina.org/project_documents/2005_spartina_APAP.pdf>. Acessado em 20 de março de 2006.
7. AZANIA, C.A.M.; AZANIA, A.A.P.M.; CENTURION, M.A.P.C.; ALVES, P.L.C.A. Imazapic selectivity on initial development of peanut (*Arachis hypogaea*) with and without sugarcane straw. **Planta Daninha**, v.22, p.145-150, 2004.

8. BALL, D.A.; YENISH, J.P.; ALBY, T. Effect of imazamox soil persistence on dryland rotational crops. **Weed Technology**, v.17, p.161-165, 2003.
9. BARIZON, R.R.M.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J.B.; TORNISIELO, V.L. Imazaquin sorption and desorption in soils with different mineralogical, physical and chemical characteristics. **R. Bras. Ci. Solo**, v.29, p.695-703, 2005.
10. BARNARD, R.J. Prevention of Cancer Through Lifestyle Changes. **Evidenced-based Complementary and Alternative Medicine**, v.1, p.233-239, 2004.
11. BASF Corporation. Material Safety Data Sheet, Cadre[®] 70 DG peanut herbicide ECO-PAK[®]. March 8, 2000.
12. BASF Corporation. Material Safety Data Sheet, Product N^o: 579651, Imazapic. December 4, 2001.
13. BATTAGLIN, W.A.; FURLONG, E.T.; BURKHARDT, M.R.; PETER, C.J. Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. **The Science of the Total Environment**, v.248, p.123-133, 2000.
14. BAYLIN, S.B.; ESTELLER, M.; ROUNTREE, M.R.; BACHMAN, K.E.; SCHUEBEL, K.; HERMAN, J.G. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. **Human Molecular Genetics**, V.10, p.687-692, 2001.
15. BERNASCONI, P.; WOODWORTH, A.R.; ROSEN, B.A.; SUBRAMANIAN, M.V.; SIEHL, D.L. A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.17381-17385, 1995.
16. BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; TUCCI, P.EVANDRI, M.G. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.43, p.137-141, 2004.

17. BRANCO, S.M. *Natureza e Agroquímicos*. São Paulo: Ed. Moderna, 1990.
18. BORJESSON, E.; TORSTENSSON, L.; STENSTROM, J. The fate of imazapyr in a Swedish railway embankment. **Pest Management Science**, v.60, p.544-549, 2004.
19. BRESNAHAN, G.A.; KOSKINEN, W.C.; DEXTER, A.G.; LUESCHEN W.E. Influence of soil pH-sorption interactions on imazethapyr carry-over. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1929-1934, 2000.
20. BRESNAHAN, G.; DEXTER, A.; KOSKINEN, W.; LUESCHEN W. Influence of soil pH-sorption interactions on the carry-over of fresh and aged soil residues of imazamox. **Weed Research**, v.42, p.45, 2002.
21. BULL OSU. BULLETIN THE OHIO STATE UNIVERSITY. Controlling Weeds in Nuersery and Landscape Plantings, nº867, 1999. Disponível em: <<http://www.ohioline.osu.edu/b867/index.html>>. Acessado em 2 de abril de 2006.
22. BULL CYANAMID JAPAN LTD. Summary of Toxicity Studies on Imazaquin and it's Ammonium Salt, 1999. Disponível em: <http://www.soc.nii.ac.jp/pssj2/gakkaisi/tec_info/imazaquin.pdf>. Acessado em 7 de abril de 2006.
23. BULL CFIA. Plant Products Directorate – Plant Biosafety Office. Decision document DD2004-47. Determination of the Safety of BASF's Imazamox tolerant (Clearfield™) wheat AP205CL. 2004. **Bulletin Canadian Food Inspection Agency**. Disponível em: <<http://www.inspection.gc.ca/english/pla veg/bio/dd/dd0447e.s.html>>. Acessado em 21 de março de 2006.
24. BURGOS, N.R.; KUK, Y.I.; TALBERT, R.E. *Amaranthus palmeri* resistance and differential tolerance of *Amaranthus palmeri* and *Amaranthus hybridus* to ALS-inhibitor herbicides. **Pest Management Science**, v.57, p.449-457, 2001.
25. CLEMENTS, C.; RALPH, S.; PETRAS, M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.29, p. 277-288, 1997.

-
26. COBUCCI, T.; PRATES, H.T.; FALCÃO, C.L.M.; REZENDE, M.M.V. Effect of imazamox, fomesafen, and acifluorfen soil residue on rotational crops. **Weed Science**, v.46, p.258-263, 1998.
 27. COBUCCI, T. & MACHADO, E. Selectivity, efficacy and soil persistence of imazamox applied to edible bean. **Planta Daninha**, v.17, p.419-432, 1999.
 28. COCCO, P. Multifactorial aetiology of lung cancer among silica-exposed workers. **Annals of the Academy of Medicine, Singapore**, v.30, p.468-474, 2001.
 29. CORREIA, N.M.; SOUZA, I.F.; KLINK, U.P. Sorghum mulch combined with imazamox for weed control in *Soybeans* planted in succession. **Planta Daninha**, v.23, p.483-489, 2005.
 30. COX, C. Imazapyr fact sheet. **Journal of Pesticide Reform**, v.16, p.16-20, 1996.
 31. COX, C. Imazapic fact sheet. **Journal of Pesticide Reform**, v.23, p.10-14, 2003.
 32. D'ASCENZO, G.; GENTILI, A.; MARCHESE, S.; PERRET, D. Development of a method based on liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for analysing imidazolinone herbicides in environmental water at part-per-trillion levels. **Journal of Chromatography. A.**, v.800 p.109-119, 1998.
 33. DIAS, M.N.P.; PEREIRA, M.R.D.B.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; BARELA, J.F.; TORNISIELO, V.L. Population dynamics of *Digitaria spp* submitted to selection pressure by herbicides in sugarcane crop. **JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH Part B – Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.B40, p.21-28, 2005.
 34. EIZENBERG, H.; SHTIENBERG, D.; SILBERBUSH, M.; EPHRATH, J.E. A new method for in-situ monitoring of the underground development of

- Orobanche cumana* in sunflower (*Helianthus annuus*) with a mini-rhizotron. **Annals of Botany**, v.96, p.1137-1140, 2005.
35. ELAZZOUZI, M.; MEKKAOUI, M.; ZAZA, S.; EL MADANI, M.; ZRINEH, A.; CHOVELON, J.M. Abiotic degradation of imazethapyr in aqueous solution. **JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH Part B – Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.B37, p.445-451, 2002.
36. ELISÁKOVÁ, V.; PÁTEK, M.; HOLÁTKO, J.; NESVERA, J.; LEYVAL, D.; GOERGEN, J.L.; DELAUNAY, S. Feedback-resistant acetohydroxy acid synthase increases valine production in *Corynebacterium glutamicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.207-213, 2005.
37. FELICONIO E. Agrotóxicos: riscos para a saúde e o meio ambiente. Disponível em: <http://www.sitiodomoinho.com/jornal/Powervoice/DefaultNewsShow.asp?Editoria=6&Noticia=35> Acessado em 06 de agosto de 2006.
38. FORNARI, E. Manual prático de agroecologia. São Paulo: Aquariana, 2002.
39. FOWLKES, M.D.; MICHAEL, J.L.; CRISMAN, T.L.; PRENGER, J.P. Effects of the herbicide imazapyr on benthic macroinvertebrates in a logged pond cypress dome. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.22, p.900-907, 2003.
40. FREI, H. & WÜRGLER, F.E. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutagenesis**, v.11, p.315-325, 1996.
41. GASTON, S.; ZABALZA, A.; GONZÁLEZ, E.M.; ARRESE-IGOR, C.; APARICIO-TEJO, P.M.; ROYUELA, M. Imazethapyr, an inhibitor of the branched-chain amino acid biosynthesis, induces aerobic fermentation in pea plants. **Physiologia Plantarum**, v.114, p.524, 2002.

42. GIOVANNUCCI, E.L.; LIU Y.; LEITZMANN, M.F.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C. A prospective study of physical activity and incident and fatal prostate cancer. **Archives of Internal Medicine**, v.165, p.1005-1010, 2005.
43. GONZALEZ, F.J. & GELBOIN, H.V. Human cytochromes P450: evolution and cDNA-directed expression. **Environmental Health Perspectives**, v.98, p.81-85, 1992.
44. GONZALGO, M.L. & JONES, P.A. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. **Mutation Research**, v.386, p.107-118, 1997.
45. GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v.6, p.153-188, 1984.
46. GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A. J.; WÜRGLER, F.E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v.222, p.359-373, 1989.
47. GRAF, U.; HALL, C. B.; VAN SCHAİK, N. On the use of excision repair defective cells in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.16, p.225-237, 1990.
48. GRAF, U. & VAN SCHAİK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.271, p.59-67, 1992.
49. GRAF, U.; ABRAHAM, S.K.; GUZMÁN-RINCÓN, J.; WÜRGLER, F.E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.402, p.203-209, 1998.
50. GRICHAR, W.J.; BESLER, B.A.; BAUGHMAN, T.A.; DOTRAY, P.A.; LEMON, R.G.; SENSEMAN, S.A. Cotton response to imazapic and imazethapyr residues following peanut. **The Texas Journal of Agriculture and Natural Resource**, v.17, p.1-8, 2004.

51. GRISOLIA, C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, v.518, p.145-150, 2002.
52. GUZMÁN-RINCÓN, J. & GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth, F.M.; Corkum, L.D. and Guzmán-Rincón, J. (eds) *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, New York, N.Y. pp. 169-81. (1995).
53. HÄLLSTRÖM, I.; BLANCK, A.; ATUMA, S. Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Pharmacology**, v.33, p.13-20, 1984.
54. HÄLLSTRÖM, I. & BLANCK, A. Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P-450-dependent reactions. **Chemico-biological Interactions**, v.56, p.157-171, 1985.
55. IDROVO, A.J. Human health and pesticides used in the spraying of illicit crops: an issue of science or politics? **Revista de Salud Publica (Bogota, Colombia)**, v.6, p.199-211, 2004.
56. IECPM. INTERDEPARTMENTAL EXECUTIVE COMMITTEE ON PEST MANAGEMENT. Decision document E94-03. Imazethapyr. March 30, 1994. . Disponível em: <http://www.pmra-arla.gc.ca/english/pdf/rdd/rdd_e9403-e.pdf>. Acessado em 01 de abril de 2006.
57. JANDER, G.; BAERSON, S.R.; HUDAK, J.A.; GONZALEZ, K.A.; GRUYS, K.J.; LAST, R.L. Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. **Plant Physiology**, v.131, p.139-146, 2003.
58. JOHNSON, D.H.; SHANER, D.L.; DEANE, J.; MACKERSIE, L.A.; TUXHORN, G. Time-dependent adsorption of imazethapyr to soil. **Weed Science**, v.48, p.769-775, 2000.

-
59. JONES, P.A. DNA methylation and cancer. **Cancer Research**, v.46, p.461-466, 1986.
 60. KOLKMAN, J.M.; SLABAUGH, M.B.; BRUNIARD, J.M.; BERRY, S.; BUSHMAN, B.S.; OLUNGU, C.; MAES, N.; ABRATTI, G.; ZAMBELLI, A.; MILLER, J.F.; LEON, A.; KNAPP, S.J. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonyleurea herbicides in sunflower. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.1147-1159, 2004.
 61. LAGANA, A.; FAGO, G.; MARINO, A. Simultaneous determination of imidazolinone herbicides from soil and natural waters using soil column extraction and off-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with UV detection or liquid chromatography/electrospray mass spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v.70, p.121-130, 1998.
 62. LE, D.T.; YOON, M.Y.; KIM, Y.T.; CHOI, J.D. Roles of three well-conserved arginine residues in mediating the catalytic activity of tobacco acetohydroxy acid synthase. **Journal of Biochemistry (Tokyo)**, v.138, p.35-40, 2005.
 63. LEE, H.L.; CHEN, K.W.; WU, M.H. Acute poisoning with a herbicide containing imazapyr (Arsenal): a report of six cases. **Clinical Toxicology**, v.37, p.83-89, 1999.
 64. LOSI-GUEMBAROVSKI, R.; SANTOS, F.V.; DIAS, F.L.; FREDERICO, R.G.; CÓLUS, I.M.S. Assessment of the ability of Imazaquin herbicide to induce chromosomal aberrations *in vitro* in cultured Chinese hamster ovary cells and micronuclei *in vivo* in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.1245-1249, 2004.
 65. MASTRANGELO, S.; TOMASSETTI, M.; CARRATU, M.R.; EVANDRI, M.G.; BOLLE, P. Quercetin reduces chromosome aberrations induced by atrazine in the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.47, p.254-259, 2006.
 66. McCOURT, J.A.; PANG, S.S.; KING-SCOTT, J.; GUDDAT, L.W.; DUGGLEBY, R.G. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant

- acetohydroxyacid synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, v.103, p.569-573, 2006.
67. McMAHON, C.K. & BUSH, P.B. Forest worker exposure to airborne herbicide residues in smoke from prescribed fires in the southern United States. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v.53, p.265-272, 1992.
68. NC-IUBMB. NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. Enzyme Nomenclature. Recommendations. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/2/1/6.html>>. Acessado em 02 de abril de 2006.
69. NIEWIADOMSKA, A. & KLAMA, J. Pesticide side effect on the symbiotic efficiency and nitrogenase activity of Rhizobiaceae bacteria family. **Polish Journal of Microbiology**, v.54, p.43-48, 2005.
70. NYS DEC. NEW YORK STATE DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL CONSERVATION. Application to Register a Major Change in Label 8/00. August 14, 2000. Disponível em: <<http://www.dec.state.ny.us/website/dshm/pesticidpesticid/pesticid.htm>> Acessado em 27 de março de 2006.
71. NYS DEC. NEW YORK STATE DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL CONSERVATION. Imazamox (Raptor) – Active Ingredient Registration 3/03. March 13, 2003. Disponível em: <<http://www.dec.state.ny.us.htm>>. Acessado em 28 de março de 2006.
72. OLIVEIRA, M.F.; COLONNA, I.; PRATES, H.T.; MANTOVANI, E.C.; GOMIDE, R.L.; JÚNIOR, R.S.O. Imazaquin herbicide sorption by an Oxisol with till and no-till management. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.787-793, 2004.
73. ORME, S. & KEGLEY, S. PAN Pesticide Action Network, North America (San Francisco). Toxicity Information for Imazapic. Pesticide Database, 2006^a. Disponível em: <<http://www.pesticideinfo.org>>. Acessado em 01 de abril de 2006.

-
74. ORME, S. & KEGLEY, S. PAN Pesticide Action Network, North America (San Francisco). Toxicity Information for Imazamox. Pesticide Database, 2006^b. Disponível em: <<http://www.pesticideinfo.org>>. Acessado em 23 de abril de 2006.
 75. OSU. OREGON STATE UNIVERSITY. Extoxnet. Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles. Imazethapyr, 1996^a. Disponível em: <<http://ace.orst.edu/info/exteeoxnet/pips/imazetha.htm>>. Acessado em 22 de março de 2006.
 76. OSU. OREGON STATE UNIVERSITY. Extoxnet. Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles. Imazaquin, 1996^b. Disponível em: <<http://www.Exttoxnet.Orst.Edu/orst.edu/pipsinfo/imazaqui.htm>>. Acessado em 28 de março de 2006.
 77. PAGOTTO, J.Z.; REIS, R.A.; DURIGAN, J.C. Effect of imazethapyr residue and weed interference in alfalfa. **Planta Daninha**, v.16, p.209-216, 1998.
 78. PESTER, T.A.; NISSEN, S.J.; WESTRA, P. Absorption, translocation, and metabolism of imazamox in jointed goatgrass and feral rye. **Weed Science**, v.49, p.607-612, 2001.
 79. PLAZA, G.; OSUNA, M.D.; DE PRADO, R. Cross resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Euphorbia heterophylla* L. biotypes resistant to imazethapyr. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v.68, p.335-339, 2003.
 80. REGITANO, J.B.; ALLEONI, L.R.F.; TORNISIELO, V.L. Tropical soil attributes and the sorption of imazaquin. **Scientia Agricola**, v.58, p.801-807, 2001.
 81. RUIZ-SANTAELLA, J.P.; BAKKALIU, Y.; OSUNA, M.D.; DE PRADO, R. Evaluation of resistance in *Cyperus difformis* populations to ALS inhibiting herbicides. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v.69, p.91-96, 2004.

-
82. SALADI, R.N. & PERSAUD, A.N. The causes of skin cancer: a comprehensive review. **Drugs Today (Barc)**, v.41, p.37-53, 2005.
 83. SASSE, A. E-cancer. Informações para uma vida melhor. Disponível em: <<http://andre.sasse.com/autor.htm>> Acessado em 08 de agosto de 2006.
 84. SATHASIVAN, K.; HAUGHN, G.; MURAI, N. Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.2188, 1990.
 85. SCHMITZER, P.R.; EILERS, R.J.; CSÉKE, C. Lack of cross-resistance of imazaquin-resistant *Xanthium strumarium* acetolactate synthase to flumetsulam and chlorimuron. **Plant Physiology**, v.103, p.281-283, 1993.
 86. SCHWARCZ, R.; WHETSELL, W.O.; MANGANO, R.M. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. **Science**, v.219, p.316-318, 1983.
 87. SHANER, D.L. & SINGH, B.K. Phytotoxicity of acetohydroxyacid synthase inhibitors is not due to accumulation of 2-ketobutyrate and/or 2-aminobutyrate. **Plant Physiology**, v.103, p.1221-1226, 1993.
 88. Sinha, S.; Panneerselvam, N.; Shanmugam, G. Fluchloralin is cytotoxic and genotoxic and induces apoptosis in mammalian cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.31, p. 257-262, 1998.
 89. SPANÓ, M.A.; FREI, H.; WÜRGLER, F.E.; GRAF, U. Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. **Mutagenesis**, v.16, p.385-394, 2001.
 90. TAN, S.; EVANS, R.R.; DAHMER, M.L.; SINGH, B.K.; SHANER, D.L. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. **Pest Management Science**, v.61, p.246-257, 2005.

91. TITTMANN, K.; VYAZMENSKY, M.; HÜBNER, G.; BARAK, Z.; CHIPMAN, D.M. The carboligation reaction of acetohydroxyacid synthase II: Steady-state intermediate distributions in wild type and mutants by NMR. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, v.102, p.553-558, 2005.
92. TORRES, C.; RIBAS, G.; XAMENA, N.; CREUS, A.; MARCOS R. Genotoxicity of four herbicides in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v.280, p.291-295, 1992.
93. TORSTENSSON, L. & BORJESSON, E. Use of imazapyr against *Equisetum arvense* on Swedish railway tracks. **Pest Management Science**, v.60, p.565-9, 2004.
94. TRUCCO, F.; HAGER, A.G.; TRANEL, P.J. Acetolactate synthase mutation conferring imidazolinone-specific herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.475-479, 2006.
95. ULBRICH, A.V.; RODRIGUES, B.N.; LIMA, J. Carryover effects of imazaquin and imazethapyr on corn planted right after soybean. *Planta Daninha*, v.16, p.137-147, 1998.
96. USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, Forest Service. Imazapic – Human health and ecological risk asses – Final report. December 23, Arlington, 2004.
97. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances – Pesticide Fact Sheet – Imazapyr – September 5, Washington, D.C., 1985.
98. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Chemical Fact Sheet For: Imazaquin. Nº 83. Herbicide Profile – March 20. Washington, D.C., 1986.

99. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances – Pesticide Fact Sheet – Imazethapyr – March 8, Washington, D.C., 1989.
100. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Pesticide Tolerance for Imazethapyr. Final rule. December 8, Washington, D.C., 1993.
101. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. American Cyanamid Company; Pesticide Tolerance Petition Filing. Federal Register. Notice of filing. December 18, v.61, nº244, Washington, D.C., 1996^a.
102. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Pesticide Tolerance for Cadre. Final rule. March 20, Washington, D.C., 1996^b.
103. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances – Pesticide Fact Sheet – Imazamox – May 22, Washington, D.C., 1997^a.
104. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Imazamox, Pesticide Tolerance. Federal Register. Rules e Regulations. June 2, v.62, nº105, Washington, D.C., 1997^b.
105. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Imazapic; Pesticide Tolerance. Federal Register. Final Rule. December 26, v.66, nº247, Washington, D.C., 2001^a.
106. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Imazamox; Pesticide Tolerance. Federal Register. Final Rule. December 27, v.66, nº248, Washington, D.C., 2001^b.
107. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Imazethapyr, Pesticide Tolerance. Federal Register. Rules e Regulations. August 29, v.67, nº168, Washington, D.C., 2002^a.

-
108. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Imazethapyr; Notice of Filing a Pesticide Petition to Establish a Tolerance for a Certain Pesticide Chemical in or on Food. Federal Register. Notices. December 6, v.67, nº235, Washington, D.C., 2002^b.
 109. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Work Plan for the Registration of Conventional Pesticide. Organophosphate Alternative Decisions for Conventional Pesticides. December 13, Washington, D.C., 2002^c.
 110. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Imazamox, Notice of Filing a Pesticide Petition to Establish a Tolerance for a Certain Pesticide Chemical in or on Food. Federal Register. Notices. December 23, v.67, nº246, Washington, D.C., 2002^d.
 111. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Imazethapyr; Notice of Filing a Pesticide Petition to Establish a Tolerance for a Certain Pesticide Chemical in or on Food. Federal Register. Notice. January 3, v.68, nº2, Washington, D.C., 2003^a.
 112. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Pesticide Tolerance for Imazapyr. Federal Register. Rules and Regulations. September 26, v.68, nº187, Washington, D.C., 2003^b.
 113. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Pesticide Programs; Reduced Risk/Organophosphate Alternative Decisions for Conventional Pesticides. September 15, Washington, D.C., 2005^a.
 114. USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Imazethapyr: Notice of Filing a Pesticide Petition to Establish a Tolerance for a Certain Pesticide Chemical in or on Food. Federal Register. Notice. June 29, v.70, nº124, Washington, D.C., 2005^b.

115. VARGAS, L.; BORÉM, A.; SILVA, A.A. Inheritance of ALS inhibitor resistance in *Euphorbia heterophylla* weed biotypes. **Planta Daninha**, v.19, p.331-336, 2001.
116. VISCHETTI, C.; CAPRI, E.; TREVISAN, M; CASUCCI, C.; PERUCCI, P. Biomassbed: a biological system to reduce pesticide point contamination at farm level. **Chemosphere**, v.55, p.823-828, 2004.
117. YORK, A.C.; JORDAN, D.L.; BATTS, R.B.; CULPEPPER, A.S. Cotton response to imazapic and imazethapyr applied to a preceding peanut crop. **Weed Science**, v.4, p.210-216, 2000.
118. WANG, X.D.; ZHOU, S.M.; WANG, H.L.; FAN, D.F. Biodegradation of imazapyr in typical soils in Zhejiang Province, China. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v.17, p.593-597, 2005.
119. WARHEIT, D.B. Inhaled amorphous silica particulates: what do we know about their toxicological profiles? **Journal and Environmental, Pathology, Toxicology and Oncology**, v.20, p.133-141, 2001.
120. WINDER, T. & SPALDING. M.H. Imazaquin and chlorsulfuron resistance and cross resistance in mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Molecular & General Genetics**, v.213, p.394-399, 1988.
121. WÜRGLER, F.E. & VOGEL, E.W. *In vivo* mutagenicity testing using cells of *Drosophila melanogaster*. In De Serres, F.J. (ed.), *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*. Plenum Press, New York, v.10 p.1-72, 1986.
122. WÜRGLER, F.E. Effects of chemical and physical agents on recombination events in cells of the germ line of male and female *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.250, p.275-290, 1991.
123. ZABALZA, A.; GONZALEZ, E.M.; ARRESE-IGOR, C.; ROYUELA, M. Fermentative metabolism is induced by inhibiting different enzymes of the

branched-chain amino acid biosynthesis pathway in pea plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.7486-7493, 2005.

124. ZIJLSTRA, J.A. & VOGEL, E.W. Influence of inhibition of the metabolic activation on the mutagenicity of some nitrosamines, triazenes, hydrazines and seniciphylline in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.202, p.251-267, 1988.

CAPÍTULO ÚNICO

**Genotoxic evaluation of imidazolinone herbicides in the wing spot test of
*Drosophila melanogaster***

(Manuscript for Food and Chemical Toxicology)

**Genotoxic evaluation of imidazolinone herbicides in the wing spot test of
*Drosophila melanogaster***

Edson José Fragiorge^a; Alexandre Azenha Alves de Rezende^a; Luiz Alfredo Pavanin^b; Ulrich Graf^c and Mário Antônio Spanó^{a*}

^a*Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Uberlândia, MG, Brazil*

^b*Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, Uberlândia, MG, Brazil*

^c*Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Sciences, ETH Zurich, CH-8603 Schwerzenbach, Switzerland*

Running title: Genotoxic evaluation of imidazolinone herbicides on *D. melanogaster*

*Corresponding author: Tel. +55-34-3218-2505.

E-mail address: maspano@ufu.br (Mário Antônio Spanó)

Abstract

In the present study, five analogue herbicides, namely Imazapyr (IMZR), Imazapic (IMZC), Imazethapyr (IMZT), Imazamox (IMZX) and Imazaquin (IMZQ), were evaluated for genotoxicity (mutagenic and recombinogenic activity) in the wing somatic mutation and recombination test (SMART) of *Drosophila melanogaster*. They are classified as imidazolinone (IMI) pesticides and their mode of action is to inhibit acetohydroxyacid synthesis (AHAS) an enzyme involved with the biosynthesis of the amino acids leucine, isoleucine and valine. For this purpose, two crosses were used: the standard (ST) cross and the high-bioactivation (HB) cross. The latter is characterized by high CYP450-dependent activation capacity awarding increased sensitivity to promutagens and procarcinogens. Three-day-old larvae were exposed to chronic feeding (48 h) to four different concentrations of these herbicides (2.5; 5.0; 10.0 and 20.0 mM). For the evaluation of genotoxic effects, the frequencies of spots per individual in the treated series were compared to the concurrent negative control series (ultra pure water). In the ST-cross, imazamox showed positive result only for large single spots (20.0 mM IMZX) and weak positive results for total spots (10.0 and 20.0 mM IMZX), while Imazaquin showed positive results only for large single spots (5.0 and 20.0 mM IMZQ) and a weak positive result for total spots (20.0 mM IMZQ). In the HB-cross, only Imazamox (5.0 mM IMZX) showed a weak positive result for small single spots, what suggest the involvement of $-CH_2OCH_3$ radical and quinolinic ring in the genotoxicity, respectively, of Imazamox and Imazaquin herbicides. Imazapyr, Imazapic and Imazethapyr gave negative results with both crosses of the wing spot test. The positive control urethane caused an increase in the number of all types of spots in both ST- and HB- crosses. In conclusion, the results of chronic

treatments performed at high doses (toxicity was observed at higher doses) indicate that, under these experimental conditions, the few positive results observed suggest the involvement of $-CH_2OCH_3$ radical and quinolinic ring in the genotoxicity, respectively, of Imazamox and Imazaquin herbicides and the involvement of CYP450 enzymes in IMI herbicide detoxification. Nevertheless, further research is needed to discern the genotoxic potential of IMI herbicides active ingredients and their formulations and the involvement of $-CH_2OCH_3$ radical and quinolinic ring in the genotoxicity of Imazamox and Imazaquin herbicides.

Keywords: SMART, *D. melanogaster*, imidazolinone herbicides, genotoxicity

1. Introduction

Pesticides constitute a heterogeneous category of chemicals, specifically designed for the control of pests, weeds or plant diseases, indispensable in modern agriculture, but considered harmful pollutants due to numerous publications concerning to its genotoxicity (Grisolia, 2002; Bolognesi, 2003). The steady increase in the use of pesticides in agriculture and in domestic households has drawn special attention in environmental pollution research (Kong and Ma, 1999). Biological monitoring provides a useful tool to estimate the genetic risk deriving from an integrated exposure to a complex mixture of chemicals (Bolognesi, 2003),

Imidazolinone (IMI) herbicides are widely used for broad-spectrum weed control. This class of herbicides currently consists of six commercially available members: Imazapyr, Imazapic, Imazethapyr, Imazamox, Imazaquin and imazamethabenz-methyl (Lao and Gan, 2006). IMI control weeds by inhibiting the action of plant enzyme, stopping plant growth, and eventually killing the plant. They are among the most popular choices for farmers worldwide, because they are nontoxic to animals and highly selective. These herbicides have as target the acetohydroxyacid synthase (AHAS, EC 2.2.1.6), also called acetolactate synthase (ALS; EC 4.1.3.18), which catalyzes the key reactions in the biosynthesis pathways of branched-chain amino acids (valine, isoleucine, and leucine) in plants and is regulated by the end products of these pathways (Gaston et al., 2002; Elisˇa´kova´ et al., 2005; Tan et al., 2005; McCourt et al., 2006). As animals do not synthesize these amino acids via this pathway, IMI herbicides generally exhibit very little toxicity to animals, birds, fish or insects (NYS DEC, 2003). Nevertheless, plants demonstrate a wide range in sensitivity to IMI herbicides with over a 10 000-fold difference in

observed toxicity levels for some compounds. IMI herbicides are applied either pre- or post-emergence to crops commonly at 1/50th or less of the rate of other herbicides (Battaglin et al., 2000).

Many different herbicides have been tested for genotoxicity through different test systems such as induction of DNA damage in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Clements et al., 1997); micronuclei in mice and fish (Grisolia, 2002); chromosomal damage and sister chromatid exchange in cultured mammalian cells (Sinha et al., 1998) chromosome breaks in *Allium cepa* (Bolle et al., 2004; Mastrangelo et al., 2006).

Graf et al. (1984) developed a test system (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART), based on two wing cell markers: *multiple wing hairs* (*mwh*) and *flare* (*flr*), for the detection of mutagenic and recombinagenic activity of chemicals in *Drosophila melanogaster*. Larvae trans-heterozygous for the mutations *mwh* and *flr* are exposed to the test compounds and induced mutations are detected as single mosaic spot on the wing blade of surviving adults, while induced recombination leads to *mwh* and *flr* twin spots and *mwh* single spots. Two different crosses are currently used in the SMART: the standard (ST) cross (*flr³/TM3, Bd^S* females mated with *mwh/mwh* males) (Graf et al., 1989) and High Bioactivation (HB) cross (*ORR; flr³/TM3, Bd^S* females mated with *mwh* males) (Graf and van Schaik, 1992). The latter cross is characterized by a high sensitivity to promutagens and procarcinogens, since the *ORR; flr³/TM3, Bd^S* strain carries chromosomes 1 and 2 from a DDT-resistant *Oregon R(R)* line (Dapkus and Merrell, 1977), which is characterized by an increased level of CYP450 (Hällström et al., 1984; Saner et al., 1996).

The SMART of *D. melanogaster* has been successfully employed in a number of studies for detection of genotoxicity of different pesticides (Torres et al., 1992; Kaya et al., 1999; 2000a; 2000b; 2004), and in comparative studies on genotoxic potency of analogue compounds (Cunha et al., 2002a; b; Osaba et al., 2002; Rahden-Staron, 2002; Tiburi et al., 2002; Lehmann et al., 2003; Munerato et al., 2005).

The aim of the present study was to evaluate comparatively the genotoxic potential of five analogue IMI herbicides, employing the ST and HB crosses of *D. melanogaster*.

2. Material and methods

2.1. Herbicides

The IMI herbicides Imazapyr (BASF Corporation, Hannibal Plant Route 168 & J.J. Spur, South River, Palmyra, Missouri - 63461, USA), Imazapic, Imazethapyr, Imazamox and Imazaquin (BASF S.A., Rodovia Presidente Dutra km 300.5, Resende, RJ, Brazil) were provided by the Escola Agrotécnica Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil. Ethyl carbamate (urethane) (CAS N° 51-79-6) was obtained from Fluka AG (Buchs, Switzerland). These substances were diluted/dissolved in ultra pure water (18.2 M Ω) obtained from a MilliQ system (Millipore, Vimodrone, Milan, Italy) just before use.

The common and trade names; the chemical names and structures; the United States Environmental Protection Agency (USEPA) Pesticide Chemical (PC) Code and the Chemical Abstract Service (CAS) Registry Number of the five IMI herbicides tested in the present study are shown in **Table I**. The differences observed between chemical structure of these IMIs are: Imazapyr (R = H); Imazapic (R = -CH₃); Imazethapyr (R = -CH₂CH₃); Imazamox (R = -CH₂OCH₃); while Imazaquin presents a quinolinic ring.

2.2. Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)

2.2.1. *Drosophila* Strains and Crosses

For evaluation of genotoxic activities of these five IMI herbicides, two different crosses were employed: the ST-cross (*flr³/In(3LR)TM3, ri p^o sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* females mated with *mwh/mwh* males) (Graf et al., 1989) and HB-cross (*ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^o sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* females mated with *mwh* males) (Graf and van Schaik, 1992). From both crosses, two types of progeny are phenotypically distinguished by the *Bd^S* marker: (i) marker-heterozygous (MH) flies (*mwh +/+ flr³*), with phenotypically wild-type wings; and (ii) balancer-heterozygous (BH) flies (*mwh/TM3, Bd^S*), with phenotypically serrate wings.

2.2.2. Larval Feeding

Third instar larvae were collected from both crosses and transferred to glass vials containing 1 g mashed potato flakes (Yoki; Yoki Alimentos S. A., São Bernardo do Campo, SP, Brazil) hydrated with 5 ml of different concentrations (2.5, 5.0, 10.0 and 20.0 mM) of each IMI herbicide (Imazapyr, Imazapic, Imazethapyr, Imazamox and Imazaquin) as described by Graf et al. (1989), Graf and van Schaik (1992) and Spanó et al. (2001). Negative (ultra pure water) and positive (10.0 mM urethane) controls were included in the two experiments. Larvae were allowed to feed on the medium for the remainder of their larval life (~ 48 h). The experiments were carried out at 25±1°C and 60-70% relative humidity.

The hatched adult flies were collected and stored in 70% ethanol. The wings of MH flies were mounted on slides in Faure's solution (30.0 g gum arabic, 20.0 ml glycerol, 50.0 g chloral hydrate, 50.0 ml water) and analyzed under a compound microscope at 400X magnification.

In MH individuals, small (1-2 cells) single spots and large (> 2 cells) single spots (*mwh* or *flr³*) can result from point mutations, chromosomal aberration (CA) or recombination. Twin spots (*mwh* and *flr³*) appear by mitotic recombination between the proximal marker *flr³* and the centromere of chromosome 3. On the wings of BH flies, only *mwh* single spots can be recovered. These spots are all due to mutational events because recombinational events are suppressed in inversion-heterozygous cells with the multiply-inverted *TM3* balancer chromosome (Graf et al., 1984; Guzmán-Rincón and Graf, 1995). So, as a rule, the frequencies of *mwh* clones observed on the wings of BH flies are always lower than those observed on the wings of MH flies (Graf et al., 1984; Frei and Würgler, 1995). For this reason, the wings of BH flies are mounted and analyzed only if a previous positive response was obtained in the MH progeny.

2.2.3. Data Evaluation and Statistical Analysis

The data were evaluated according to the procedure described by Frei and Würgler (1988). The frequencies of each type of mutant clones per fly were compared with the concurrent negative control series using the conditional binomial test of Kastenbaum and Bowman (1970), with significance levels set at $\alpha = \beta = 0.05$.

3. Results and discussion

The five analogues IMI herbicides (Imazapyr, Imazapic, Imazethapyr, Imazamox and Imazaquin) investigated here were chosen based on institutional interest in agronomic practices and its environmental consequences.

To comparatively evaluate the genotoxic potential of these herbicides, two versions of the *Drosophila* wing SMART (ST and HB crosses) were used in two independent experiments. The experimental design and sample size was performed according to Frei and Würzler (1995). After verify that there were no statistically significant differences between the results of the independent experiments, the data were pooled as shown in **Tables II** and **III**, respectively, for ST and HB crosses.

For each IMI herbicide, the treated series (four different concentrations) were always compared with the concurrent negative controls (ultra pure water) to test for statistical differences in spot frequencies.

In the ST-cross, Imazamox showed positive results only for large single spots (20.0 mM IMZX) and weak positive results for total spots (10.0 and 20.0 mM IMZX), while Imazaquin showed positive results only for large single spots (5.0 and 20.0 mM IMZQ) and a weak positive result for total spots (20.0 mM IMZQ). In the HB-cross, only Imazamox (5.0 mM IMZX) showed a weak positive result for small single spots, what suggest the involvement of $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ radical and quinolinic ring in the genotoxicity, respectively, of Imazamox and Imazaquin herbicides, and the involvement of CYP450 enzymes in their detoxification.

In the scientific literature, informations about IMI herbicides genotoxicity are scarce. Nevertheless, previous reports in different genetic systems have shown that Imazamox does not pose mutagenic or genotoxic risk. It was negative in different assays (bacterial mutagenicity – Ames test; in vitro structural CA (CHO); in vitro Chinese hamster ovary/hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (CHO/HGPRT) point mutation; and in vivo micronucleus aberration assays) (USEPA, 1997; 2002a; 2003a) and Imazaquin was negative for mutagenicity (Ames test), dominant lethal test (in rats), in vitro cytogenetics (in CHO), unscheduled DNA synthesis (rat hepatocytes) and CHO/HGPRT point mutation (USEPA, 1986) and did not induce significant increase of chromosome aberration (CA) in CHO cell lines CHO-K1 (wild) and CHO xrs-5 (mutant) treated at the three phases of the cell cycle (G1, S and G2) in vitro, nor micronucleus on Swiss mice (*Mus musculus*) treated in vivo, indicating that the metabolism of Imazaquin does not generate any clastogenic product to the organism (Losi-Guembarovski et al., 2004). The authors concluded that under these experimental conditions the Imazaquin herbicide does not produce direct or indirect clastogenic activity in the eukaryotic cells tested.

Imazapyr, Imazapic and Imazethapyr were clearly non-genotoxic with both crosses at the same millimolar concentrations giving negative results. These results are in agreement with the data of previous observations that Imazapyr was negative up to 5,000 [μ g]/plate for bacterial reverse mutation (Ames Assay), and negative up to toxic doses (5,000 [μ g]/ml) with and without activation in in vitro mammalian cell gene mutation and mammalian CA (CHO) (USEPA, 2003b). Imazapyr did not cause CA in *Allium cepa* nor increase the frequency of micronuclei in Swiss mice (Grisolia et al., 2004). On the contrary, Imazapyr induced statistically significant erythrocyte

micronuclei frequencies in fish *Tilapia rendalli* at the maximum tolerated dose (MTD) (1,200.0 mg/Kg) tested. Nevertheless, as Imazapyr was clastogenic only at the MTD, the author considered that the result should not be considered a positive result, once the changes occurred only under extreme conditions of exposure, which were sufficiently toxic to produce secondary effects rather than direct genotoxicity (Grisolia, 2002).

Imazapic was non-mutagenic in *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535 and TA1537 and *Escherichia coli* strain WP2uvra when tested up to 5,000 µg/plate and at the CHO/HGPRT up to cytotoxic concentrations or limit of solubility, and did not induce structural CA in CHO cell cultures, in the presence and absence of activation, and in rat bone marrow cells up to 5,000 mg/kg (USEPA, 2001).

When tested in a battery of in vitro and in vivo genotoxicity assays measuring several different endpoints of potential genotoxicity, Imazethapyr showed do not pose mutagenic or genotoxic risk (USEPA, 2003c). It was non-mutagenic, in the presence or absence metabolic activation, in *S. typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, TA1537, and TA 1538; *E. coli* strain WP2uvra; negative for induction of forward mutation at the CHO/HGPRT, in the presence or absence of S9-activation; and did not induce structural CA in Chinese hamster lung (V79) cell cultures in the presence and absence of activation (USEPA, 2002b). Imazethapyr was non-clastogenic in rat bone marrow cells in vivo, but increased CA when tested in an in vitro cytogenetics assay in CHO cells without metabolic activation at dosage levels toxic to cells. On the contrary, did not increase CA with metabolic activation (USEPA, 1989).

The positive control urethane caused an increase in the number of all types of spots in both ST- and HB- crosses and demonstrated the high bioactivation effect

(1.76 spots with mwh clone per fly in the ST-cross vs. 5.86 spots with mwh clone per fly in the HB-cross). These results are in agreement with those achieved at in previous reports showing that urethane has a clear genotoxic potential in *Drosophila* inducing spots in a dose-dependent manner and strong dependence on metabolic activation (Frölich and Würigler, 1990).

In **Figure 1**, the total frequencies of spots per fly recorded in the ST- and the HB- crosses are plotted. Because all the treatments were performed simultaneously, the negative and positive controls are the same for all compounds in both crosses.

Similar studies using IMI herbicides in the wing spot test of *D. melanogaster* were not found in the literature, but other different classes of herbicides were investigated. Exposure to maleic hydrazide resulted in a significant increase in the frequency of the three categories of spots recorded (small single, large single and twin spots) in a dose-related fashion. Exposure to alachlor induced significant increases in both small and total spots at the four concentrations assayed and in the frequency of twin spots at the highest concentration tested (10.0 mM). Atrazine and paraquat also induced significant increases in both small and total spots at three of the four concentrations tested, without indication of a direct dose-effect relationship (Torres et al., 1992).

The phenoxyacetate 2,4-D, at the highest concentration evaluated (10.0 mM), induced a weak but significant increase in the frequency of large single and total spots; in contrast, the phenoxyacetate 4-CPA treatments failed to induce any significant increase in the frequency of evaluated spots (Kaya et al., 1999).

The triazine herbicides: amitrole clearly increased the frequency of small single, large single and total spots, while terbutryn, at the concentration of 5.0 mM,

induced a slight increase in the frequency of small single and total spots, but this result could be false positive. Metribuzin, prometryn and diquat dibromide did not show any genotoxic effect (Kaya et al., 2000a).

The herbicides maleic hydrazide and glyphosate proved to be more genotoxic in the ST-cross, whereas propanil appeared to be slightly more genotoxic in the HB-cross. On the other hand, the herbicide 2,4,5-T increased the mutation frequency for only the small single spots in the ST-cross (Kaya et al., 2000b).

The herbicides bentazone, usually considered as a non-mutagen, gave positive results in the wing spot test with the high-bioactivation cross. Molinate, about which information on mutagenic effects is inconclusive, gave positive responses in both the ST- and the HB- crosses. Thiobencarb gave positive results only in the ST-cross and at the highest concentration tested (10.0 mM). Trifluralin gave positive results with both crosses (Kaya et al., 2004).

Conclusions

Based on the results obtained in the present study and those reported by different authors, related to IMI and other herbicides genotoxicity in different genetic systems (USEPA, 1989; Kaya et al., 2000a; Grisolia, 2002; Losi-Guembarovski et al., 2004), we suggested that, under these experimental conditions, the few positive and weak positive results observed suggest the involvement of $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ radical and quinolinic ring in the genotoxicity, respectively, of Imazamox and Imazaquin herbicides. Besides, the results observed in the MH flies from the HB cross suggest the involvement of CYP450 enzymes in IMI herbicide detoxification. Nevertheless,

further research is needed to discern the genotoxic potential of IMI herbicides active ingredients and their formulations and the involvement of $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ radical and quinolinic ring in the weak genotoxicity of Imazamox and Imazaquin herbicides.

Acknowledgements

This work was supported by the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Universidade Federal de Uberlândia. The authors are grateful to Escola Agrotécnica Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil, for supplying the IMI herbicides.

References

- Battaglin WA, Furlong ET, Burkhardt MR and Peter CJ (2000) Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. *Sci Total Environ* 248:123-133.
- Bolle P, Mastrangelo S, Tucci P and Evandri MG (2004) Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. *Environ Mol Mutagen* 43:137-141.
- Bolognesi C (2003) Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res* 543:251-272.
- Clements C, Ralph S and Petras M (1997) Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environ Mol Mutagen* 29:277-288.
- Cunha KS, Reguly ML, Graf U and Andrade HHR (2002a) Somatic recombination: a major genotoxic effect of two pyrimidine antimetabolite chemotherapeutic drugs in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 514:95-103.
- Cunha KS, Reguly ML, Graf U and Andrade HHR (2002b) Comparison of camptothecin derivatives presently in clinical trials: genotoxic potency and mitotic recombination. *Mutagenesis* 17:141-147.
- Dapkus D and Merrell DJ (1977) Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 87:685-697.

- Elisřáková V, Pátek M, Holátko J, Nesřvera J, Leyval D, Goergen J-L and Delaunay S (2005) Feedback-resistant acetohydroxy acid synthase increases valine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* 71:207–213.
- Frei H and Würgler FE (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat Res* 203:297-308.
- Frei H and Würgler FE (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res* 334:247-258.
- Frölich A and Würgler FE (1990) Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat Res* 244:201-208.
- Gaston S, Zabalza A, Gonzalez EM, Arrese-Igor C, Aparicio-Tejo PM and Royuela M (2002) Imazethapyr, an inhibitor of the branched-chain amino acid biosynthesis, induces aerobic fermentation in pea plants. *Physiol Plant* 114:524-532.
- Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB and Kale PG (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6: 153-188.
- Graf U, Frei H, Kägi A, Katz AJ and Würgler FE (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 222: 359-373.

- Graf U and van Schaik N (1992) Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 271:59-67.
- Grisolia CK (2002) A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutat Res* 518:145-150.
- Grisolia CK, Bilich MR and Formigli LM (2004) A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient Imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate. *Ecotoxicol Environ Saf* 59:123-126.
- Guzmán-Rincón J and Graf U (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth FM, Corkum LD, Guzmán-Rincón J (eds). *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, New York, NY. pp. 169-181.
- Hällström I, Blanck A and Atuma S (1984) Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Pharmacol* 33: 13-20.
- Kastenbaum MA, Bowman KO. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 9:527-549.
- Kaya B, Yanikoglu A, Marcos R (1999) Genotoxicity studies on the phenoxyacetates 2,4-D and 4-CPA in the *Drosophila* wing spot test. *Teratog Carcinog Mutagen* 19:305-312.

- Kaya B, Yanikoglu A, Creus A and Marcos R (2000a) Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 465:77-84.
- Kaya B, Creus A, Yanikoglu A, Cabré O and Marcos R (2000b) Use of the *Drosophila* wing spot test in the genotoxicity testing of different herbicides. *Environ Mol Mutagen* 36:40-46.
- Kaya B, Marcos R, Yanikoglu A and Creus A (2004) Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutat Res* 557:53-62.
- Kong MS and Ma TH (1999) Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. *Mutat Res* 426:221-228.
- Lao W and Gan J (2006) High-performance liquid chromatographic separation of imidazolinone herbicide enantiomers and their methyl derivatives on polysaccharide-coated chiral stationary phases. *J Chromatogr A*, 1117:184–193.
- Lehmann M, Franco A, Vilar KSP, Reguly ML and Andrade HHR (2003) Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 539: 167–175.
- Losi-Guembarovski R, Santos FV, Dias FL, Frederico RG and Colus IMS (2004) Assessment of the ability of Imazaquin herbicide to induce chromosomal aberrations in vitro in cultured chinese hamster ovary cells and micronuclei in vivo in mice. *Food Chem Toxicol* 42:1245-1249.

- Mastrangelo S, Tomassetti M, Carratu MR, Evandri MG and Bolle P (2006) Quercetin reduces chromosome aberrations induced by atrazine in the *Allium cepa* test. *Environ Mol Mutagen* 47:254-259.
- McCourt JA, Pang SS, King-Scott J, Guddat LW and Duggleby RG (2006) Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:569-573.
- Munerato MC, Sinigaglia M, Reguly ML and Andrade HHR (2005) Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 582:87-94.
- NYS DEC (2003) Imazamox (Raptor) NYS DEC Letter - Active Ingredient Registration 3/03. New York State Department of Environmental Conservation. March 13, 2003. New York. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/herb-growthreg/fatty-alcohol-monuron/imazamox/imazamox_reg_303.html> accessed in August 03, 2006.
- Osaba L, Rey MJ, Aguirre A, Alonso A and Graf U (2002) Evaluation of genotoxicity of captan, maneb and zineb in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*: role of nitrosation. *Mutat Res* 518:95-106.
- Rahden-Staron I (2002) The inhibitory effect of the fungicides captan and captafol on eukaryotic topoisomerases in vitro and lack of recombinagenic activity in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 518:205-213.
- Saner C, Weibel B, Würgler FE and Sengstag C (1996) Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen* 27:46-58.

- Sinha S, Panneerselvam N and Shanmugam G (1998) Fluchloralin is cytotoxic and genotoxic and induces apoptosis in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen* 31:257-262.
- Spanó MA, Frei H, Würigler FE and Graf U (2001) Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*. 16:385-394.
- Tan S, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK and Shaner DL (2005) Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag Sci* 61:246-257.
- Tiburi M, Reguly ML, Schwartsmann G, Cunha KS, Lehmann M and Andrade HHR (2002) Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 519:141-149.
- Torres C, Ribas G, Xamena N, Creus A and Marcos R (1992) Genotoxicity of four herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 280:291-295.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (1986) Imazaquin (Scepter) Herbicide Profile 3/86. Chemical Fact Sheet for: Imazaquin. Fact Sheet N° 83. March 20, 1986. Washington. D.C. <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/herb-growthreg/fatty-alcohol-monuron/imazaquin/herb-prof-imazaquin.html>> accessed in August 02, 2006.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (1989) Imazethapyr Herbicide Profile 3/89. Chemical Fact Sheet for: Imazethapyr. Fact Sheet N° 196. March 08, 1989. Washington, D.C. <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/herb-growthreg/fatty->

alcohol-monuron/imazethapyr/imazethapyr-epa-fact.html> accessed in August 02, 2006.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (1997) Fact Sheets on New Active Ingredients. <<http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/factsht2.htm>> accessed in August 02, 2006.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (2001) Pesticide Tolerance for Imazapic. Federal Register (Vol. 66, N° 247). Rules and Regulations. December 26. Washington, D.C. <<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2001/December/Day-26/p31493.htm>> accessed in July 24, 2006.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (2002a) Imazamox; Notice of Filing a Pesticide Petition to Establish a Tolerance for a Certain Pesticide Chemical in or on Food. Federal Register. December 23, 2002 (Vol. 67, N° 246). Notices. Washington, D.C. <<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2002/December/Day-23/p32260.htm>> accessed in August 03, 2006.

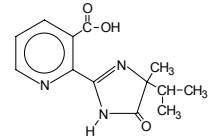
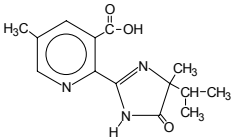
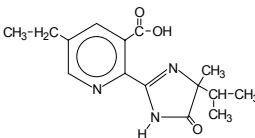
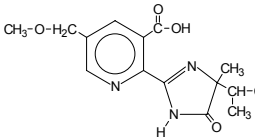
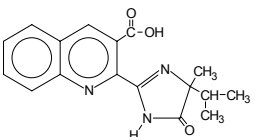
USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (2002b) Imazethapyr; Pesticide Tolerance. Federal Register. August 29, 2002 (Vol. 67, N° 168). Rules and Regulations. Washington, D.C. <<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2002/August/Day-29/p22093.htm>> accessed in August 02, 2006.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (2003a) Imazamox; Exemption from the Requirement of a Tolerance. Federal Register (Vol. 68, N° 31). Rules and Regulations. February 14, Washington, D.C. <<http://www.epa.gov/EPA-PEST/2003/February/Day-14/p3699.htm>> accessed in July 24, 2006.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (2003b) Imazapyr; Pesticide Tolerance. Federal Register: September 26, 2003 (Vol. 68, N° 187). [Rules and Regulations]. Washington, D.C. <<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2003/September/Day-26/p24123.htm>> accessed in July 24, 2006.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (2003c) Imazethapyr; Notice of Filing a Pesticide Petition to Establish a Tolerance for a Certain Pesticide Chemical in or on Food. Federal Register: January 3, 2003 (Vol. 68, N° 2). Washington, D.C. <<http://www.epa.gov/EPA-PEST/2000/September/Day-27/p24680.htm>> accessed in August 02, 2006.

Table I. Imidazolinone herbicides tested in the ST and HB crosses of *D. melanogaster*

Common name ¹	Trade name ¹	Chemical name ¹	Chemical structure ¹	U.S. EPA PC Code ²	CAS number ²
Imazapyr	Contain	2-(4-Isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic acid		128821	81334-34-1
Imazapic	Plateau	2-[4,5-dihydro-4-methyl-4-(1-methylethyl)-5-oxo-1H-imidazol-2-yl]-5-methyl-3-pyridinecarboxylic acid		129041	104098-48-8, 81334-60-3
Imazethapyr	Pivot	(2-[4,5-dihydro-4-methyl-4-(1-methylethyl)-5-oxo-1H-imidazol-2-yl]-5-ethyl-3-pyridinecarboxylic acid		128922	81335-77-5
Imazamox	Sweeper	(2-[4,5-dihydro-4-methyl-4-(1-methylethyl)-5-oxo-1H-imidazol-2-yl]-5-(methoxymethyl)-3-pyridinecarboxylic acid		129171	114311-32-9
Imazaquin	Scepter	(2-[4,5-dihydro-4-methyl-4-(1-methylethyl)-5-oxo-1H-imidazol-2-yl]-3-quinolinecarboxylic		128848	81335-37-7

¹Weed Science Society of America (<http://www.wssa.net/herb&control/chemframelist.html>); ²Pesticide Action Network

(http://www.pesticideinfo.org/List_Chemicals.jsp?ChemClassList=Imidazolinone&dUseList=y&dDPR_Chem_Code=y&dEP)

A_PCCode=y&dCAS_No=y&dClassList=y&ChemRegList=&ChemUseList=&dS_BA=y&dEPA_Reg=y) accessed in July 6, 2006.

TABLE II. Summary of Results Obtained with the *Drosophila* Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) Progeny in the Standard (ST) Cross After Chronic Treatment of Larvae with Imidazolinone Herbicides: Imazapyr (IMZR), Imazapic (IMZC), Imazethapyr (IMZT), Imazamox (IMZX) and Imazaquin (IMZQ)

Treatments and concentrations (mM)	Number of flies	Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis*												
		Small single spots (1-2 cells) <i>m=2</i>			Large single spots (> 2 cells) <i>m=5</i>		Twin spots <i>m=5</i>		Total spots <i>m=2</i>		Spots with <i>mwh</i> clone			
Negative control	120	0.63	(76)		0.09	(11)		0.06	(07)		0.78	(94)		0.75 (90)
Urethane 10.0	120	1.40	(168)	+	0.22	(26)	+	0.17	(20)	+	1.78	(214)	+	1.76 (211)
IMZR 2.5	60	0.32	(19)	-	0.13	(08)	i	0.02	(01)	-	0.47	(28)	-	0.47 (28)
IMZR 5.0	60	0.37	(22)	-	0.13	(08)	i	0.03	(02)	i	0.53	(32)	-	0.53 (32)
IMZR 10.0	60	0.38	(23)	-	0.08	(05)	i	0.03	(02)	i	0.50	(30)	-	0.50 (30)
IMZR 20.0	60	0.57	(34)	-	0.07	(04)	i	0.07	(04)	i	0.70	(42)	-	0.70 (42)
IMZC 2.5	60	0.65	(39)	-	0.08	(05)	i	0.00	(00)	-	0.73	(44)	-	0.73 (44)
IMZC 5.0	60	0.53	(32)	-	0.05	(03)	-	0.02	(01)	-	0.60	(36)	-	0.60 (36)
IMZC 10.0	60	0.50	(30)	-	0.07	(04)	i	0.02	(01)	-	0.58	(35)	-	0.58 (35)
IMZC 20.0	60	0.47	(28)	-	0.07	(04)	i	0.03	(02)	i	0.57	(34)	-	0.57 (34)
IMZT 2.5	60	0.42	(25)	-	0.12	(07)	i	0.05	(03)	i	0.58	(35)	-	0.58 (35)
IMZT 5.0	60	0.65	(39)	-	0.08	(05)	i	0.00	(00)	-	0.73	(44)	-	0.73 (44)
IMZT 10.0	60	0.55	(33)	-	0.05	(03)	-	0.03	(02)	i	0.63	(38)	-	0.60 (36)
IMZT 20.0	60	0.53	(32)	-	0.07	(04)	i	0.02	(01)	-	0.62	(37)	-	0.62 (37)

TABLE II. Cont.

Treatments and concentrations (mM)	Number of flies	Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis*													
		Small single spots (1-2 cells) <i>m=2</i>			Large single spots (> 2 cells) <i>m=5</i>			Twin spots <i>m=5</i>		Total spots <i>m=2</i>		Spots with <i>mwh</i> clone			
IMZX 2.5	60	0.47	(28)	-	0.17	(10)	i	0.03	(02)	i	0.67	(40)	-	0.65	(39)
IMZX 5.0	60	0.43	(26)	-	0.08	(05)	i	0.03	(02)	i	0.55	(33)	-	0.52	(31)
IMZX 10.0	60	0.80	(48)	-	0.17	(10)	i	0.10	(06)	i	1.07	(64)	w+	1.05	(63)
IMZX 20.0	60	0.77	(46)	-	0.30	(18)	+	0.05	(03)	i	1.12	(67)	w+	1.08	(65)
IMZQ 2.5	60	0.43	(26)	-	0.12	(07)	i	0.00	(00)	-	0.55	(33)	-	0.55	(33)
IMZQ 5.0	60	0.53	(32)	-	0.33	(20)	+	0.05	(03)	i	0.92	(55)	-	0.90	(54)
IMZQ 10.0	60	0.43	(26)	-	0.15	(09)	i	0.03	(02)	i	0.62	(37)	-	0.62	(37)
IMZQ 20.0	60	0.68	(41)	-	0.33	(20)	+	0.08	(05)	i	1.10	(66)	w+	1.08	(65)

*Statistical diagnoses according to Frei and Würigler (1988) for comparison with corresponding control: -, negative; i, inconclusive; +, positive; w+, weak positive ($P < 0.05$); *m*, minimal risk multiplication factor for the assessment of negative results.

TABLE III. Summary of Results Obtained with the *Drosophila* Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) Progeny in the High Bioactivation (HB) Cross After Chronic Treatment of Larvae with Imidazolinone Herbicides: Imazapyr (IMZR), Imazapic (IMZC), Imazethapyr (IMZT), Imazamox (IMZX) and Imazaquin (IMZQ)

Treatments and concentrations (mM)	Number of flies	Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis*												
		Small single spots (1-2 cells) <i>m=2</i>			Large single spots (> 2 cells) <i>m=5</i>		Twin spots <i>m=5</i>		Total spots <i>m=2</i>		Spots with <i>mwh</i> clone			
Negative control	120	0.93	(112)		0.20	(24)		0.03	(04)		1.17	(140)		1.13 (136)
Urethane 10.0	120	4.78	(573)	+	0.68	(81)	+	0.43	(52)	+	5.88	(706)	+	5.86 (703)
IMZR 2.5	60	0.43	(26)	-	0.10	(06)	-	0.03	(02)	i	0.57	(34)	-	0.57 (34)
IMZR 5.0	60	1.07	(64)	-	0.07	(04)	-	0.03	(02)	i	1.17	(70)	-	1.17 (70)
IMZR 10.0	60	0.62	(37)	-	0.05	(03)	-	0.07	(04)	i	0.73	(44)	-	0.73 (44)
IMZR 20.0	60	0.55	(33)	-	0.07	(04)	-	0.03	(02)	i	0.65	(39)	-	0.65 (39)
IMZC 2.5	60	0.97	(58)	-	0.12	(07)	-	0.05	(03)	i	1.13	(68)	-	1.13 (68)
IMZC 5.0	60	0.92	(55)	-	0.05	(03)	-	0.02	(01)	i	0.98	(59)	-	0.98 (59)
IMZC 10.0	60	0.65	(39)	-	0.07	(04)	-	0.05	(03)	i	0.77	(46)	-	0.77 (46)
IMZC 20.0	60	0.68	(41)	-	0.12	(07)	-	0.02	(01)	i	0.82	(49)	-	0.82 (49)
IMZT 2.5	60	1.05	(63)	-	0.17	(10)	-	0.08	(05)	i	1.30	(78)	-	1.30 (78)
IMZT 5.0	60	1.15	(69)	-	0.18	(11)	-	0.05	(03)	i	1.38	(83)	-	1.33 (80)
IMZT 10.0	60	0.98	(59)	-	0.15	(09)	-	0.08	(05)	i	1.22	(73)	-	1.16 (70)
IMZT 20.0	60	1.05	(63)	-	0.12	(07)	-	0.03	(02)	i	1.20	(72)	-	1.18 (71)

TABLE III. Cont.

Treatments and concentrations (mM)	Number of flies	<i>Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis*</i>													
		Small single spots (1-2 cells) <i>m=2</i>			Large single spots (> 2 cells) <i>m=5</i>		Twin spots <i>m=5</i>		Total spots <i>m=2</i>		Spots with <i>mwh</i> clone				
IMZX 2.5	60	1.02	(61)	-	0.13	(08)	-	0.03	(02)	i	1.18	(71)	-	1.15	(69)
IMZX 5.0	60	1.22	(73)	w+	0.10	(06)	-	0.03	(02)	i	1.35	(81)	-	1.33	(80)
IMZX 10.0	60	0.95	(57)	-	0.07	(04)	-	0.07	(04)	i	1.08	(65)	-	1.07	(64)
IMZX 20.0	60	0.83	(50)	-	0.17	(10)	-	0.07	(04)	i	1.07	(64)	-	1.07	(64)
IMZQ 2.5	60	0.87	(52)	-	0.18	(11)	-	0.02	(01)	i	1.07	(64)	-	1.03	(62)
IMZQ 5.0	60	0.78	(47)	-	0.13	(08)	-	0.07	(04)	i	0.98	(59)	-	0.95	(57)
IMZQ 10.0	60	1.02	(61)	-	0.13	(08)	-	0.08	(05)	i	1.23	(74)	-	1.20	(72)
IMZQ 20.0	60	1.00	(60)	-	0.18	(11)	-	0.08	(05)	i	1.27	(76)	-	1.25	(75)

*Statistical diagnoses according to Frei and Würigler (1988) for comparison with corresponding control: -, negative; i, inconclusive; +, positive; w +, weak positive (P<0.05); *m*, minimal risk multiplication factor for the assessment of negative results.

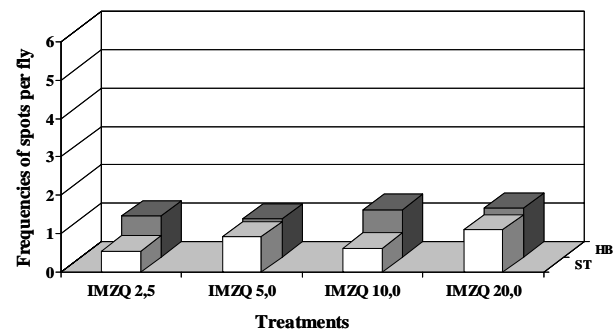
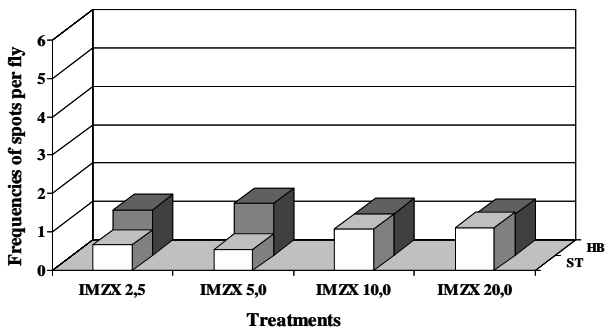
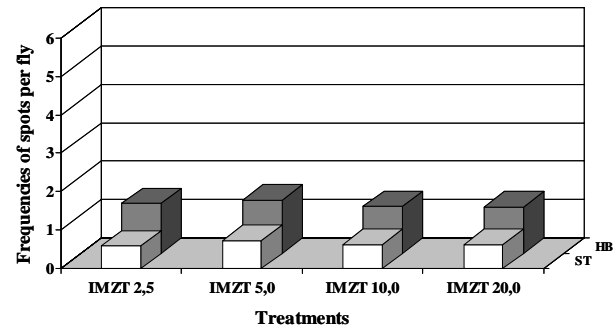
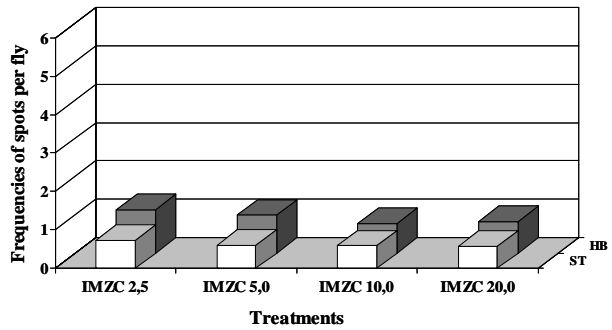
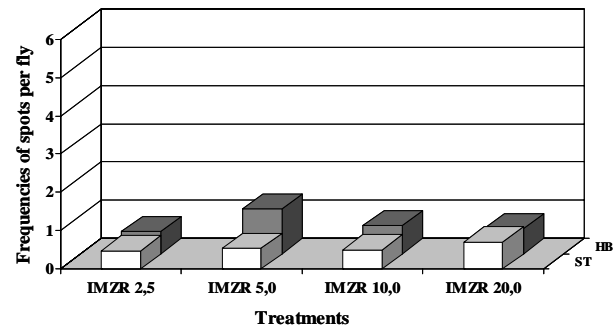
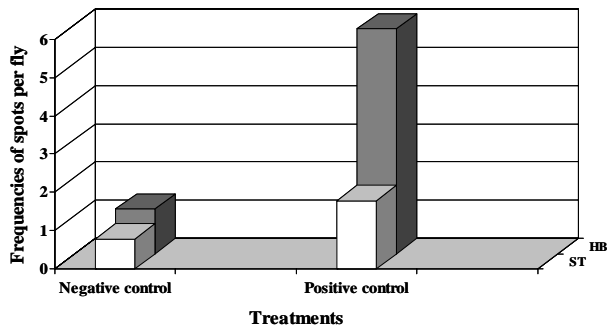


Fig. 1. Total frequencies of spots per fly after chronic treatments with different concentrations of imidazolinone herbicides Imazapyr (IMZR), Imazapic (IMZC), Imazethapyr (IMZR), Imazamox (IMZX), Imazaquin (IMZQ) and respective negative and positive controls.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, concluímos que, nessas condições experimentais:

- 1) Os herbicidas imidazolinonas IMZR, IMZC e IMZT, quando testados isoladamente, não possuem efeitos genotóxicos diretos ou indiretos em células de asas de *Drosophila melanogaster*.
- 2) O herbicida imidazolinona IMZX, quando testado isoladamente, possui efeitos genotóxicos diretos e indiretos em células de asas de *Drosophila melanogaster*.
- 3) O herbicida imidazolinona IMZQ quando testado isoladamente, possui apenas efeitos genotóxicos diretos em células de asas de *Drosophila melanogaster*.
- 4) O radical $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ e anel quinolínico devem atuar, respectivamente, na genotoxicidade dos herbicidas IMZX e IMZQ.
- 5) Os resultados observados em moscas MH do cruzamento HB sugerem o envolvimento de enzimas citocromo P-450 na detoxificação de herbicidas imidazolinonas.

- 6) Pesquisas adicionais são necessárias para discernir o potencial genotóxico do radical $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ e do anel quinolínico na genotoxicidade do IMZX e IMZQ.

- 7) Pesquisas adicionais são necessárias para discernir o potencial genotóxico de ingredientes ativos dos herbicidas imidazolinonas e suas formulações.

APÊNDICE

Tabela 1: Perfil toxicológico do herbicida imazapyr.

Tipo de Estudo	Resultados
Toxicidade aguda oral (ratos)	Dose Letal 50% (LD ₅₀) > 5.000 mg/kg. Categoria Toxicológica IV ^{1,2} .
Toxicidade aguda dermal (coelhos)	LD ₅₀ > 2.000 mg/kg. Categoria Toxicológica III ^{1,2} .
Inalação (ratos)	Concentração Letal 50% (LC ₅₀) > 1,3 mg/L (gravimétrico). Categoria Toxicológica III ^{1,2} .
Irritação primária dos olhos (coelhos)	Opacidade da córnea; conjuntivite; vermelhidão; queimaduras; vascularização da córnea; corrosão; danos irreversíveis ao olho. Categoria Toxicológica I ^{1,2} .
Irritação primária da pele (coelhos)	Não irritante para fracamente irritante; eritema e edema. Categoria Toxicológica IV ^{1,2} .
Sensibilização da derme (preás)	Negativo ^{1,2} .
Toxicidade sub-crônica 90 dias de alimentação oral (ratos)	No-observed-adverse-effect-level (NOAEL) Dermal e sistêmico = 1.695 mg/kg/dia para machos e 1.784 mg/kg/dia para fêmeas na highest dose tested (HDT). Este foi na HDT; por isso, não há o lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) ² .
Toxicidade sub-crônica 21/28 dias na derme (coelhos)	NOAEL Dermal e sistêmico = 400 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ² .
Toxicidade no desenvolvimento pré-natal (ratos)	NOAEL Maternal = 300 mg/kg/dia. LOAEL = 1.000 mg/kg/dia, baseado na salivação. NOAEL no desenvolvimento = 1.000 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ² .
Toxicidade no desenvolvimento pré-natal (coelhos)	NOAEL Maternal = 400 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL. NOAEL no desenvolvimento = 400 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ² .

Tabela 1. Cont.

Tipo de Estudo	Resultados
Efeitos na reprodução e fertilidade (ratos)	NOAEL Parental, sistêmico, reprodutivo e descendência = 10.000 ppm (738 mg/kg/dia em machos e 933,3 mg/kg/dia em fêmeas). Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ² .
Toxicidade crônica (ratos)	NOEL = 10.000 ppm (~ 500 mg/kg/dia em machos e ~ 640 mg/kg/dia em fêmeas), para 24 meses. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ¹ .
Toxicidade crônica (cães)	NOAEL = 10.000 ppm (250 mg/kg/dia), para 1 ano. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ² .
Carcinogenicidade (ratos)	Não avaliado ² .
Carcinogenicidade (camundongos)	NOAEL = 10.000 ppm (1.301 mg/kg/dia em machos e 1.639 mg/kg/dia em fêmeas). Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ² .
Combinado Crônico/carcinogenicidade (ratos)	Aumento nos astrocitomas do cérebro em ratos machos, os quais tiveram uma tendência estatisticamente significativa para positivo, mas não foi estatisticamente significativa em comparação pareada com os controles. A dose considerada adequada foi baseada na HDT de 10.000 ppm, o qual, excede a dose limite de 7.000 ppm para camundongo ² .
Mutação reversa em bactérias (Teste de Ames)	Negativo até 5.000 µg/placa ^{1,2} .
Mutação de gene de células de mamíferos <i>in vitro</i> (CHO/HGPRT)	Negativo até dose tóxica (5.000 µg/ml) com ou sem ativação ^{1,2} .
Aberração cromossômica em células de mamíferos <i>in vitro</i> (CHO)	Negativo até dose tóxica (5.000 µg/ml) com ou sem ativação ^{1,2} .

Tabela 1. Cont.

Tipo de Estudo	Resultados
Letal dominante em rodentia (RDL)	Reportado como negativo (no entanto, não aceitável) ² .
Síntese de DNA desprogramado (UDS)	Reportado como negativo (no entanto, não aceitável) ² .
Aberração cromossômica em células de mamíferos <i>in vivo</i> (medula óssea) (ratos)	-
Metabolismo e farmacocinética (ratos)	Nenhuma diferença relacionada ao sexo foi aparente. Dentro das 48 horas de tratamento, >90% da dose administrada foi recuperada na urina, sugerindo que a eliminação do material marcado no teste foi rápida. Nada específico nos tecidos ou órgãos foi identificado. Sete dias depois do tratamento, todo o material do teste foi eliminado. Ratos que receberam material de teste por injeção intravenosa, excretaram 87-95% da dose administrada na urina e aproximadamente 6% nas fezes. Dois metabólitos pequenos CL 252.974 e CL 60.032 foram detectados na urina ou nas fezes dos ratos tratados; no entanto, sua contribuição combinada foi <0,5% da dose administrada. Baseado nos resultados, o estudo sugere que ocorreu um metabolismo limitado do CL 243.997. Por meio de hidrólise forma o 2-carbonil derivados: CL 252.974 e CL 60.032 ² .
Penetração na derme	Não avaliado ² .

Fonte:

¹USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 1996^a. Pesticide Tolerance Petition Filing. Federal Register. Vol.61, No. 244. Notice of filing. December 18, Washington, D.C.

²USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 2003^b. Pesticide Tolerance for Imazapyr. Federal Register. Vol. 68, No. 187. Rules and Regulations. September 26, Washington, D.C.

Tabela 2: Perfil toxicológico do herbicida imazapic.

Tipo de Estudo	Resultados
Toxicidade aguda oral (ratos)	Dose Letal 50% (LD ₅₀) > 5.000 mg/kg (ratos machos e fêmeas). Categoria Toxicológica IV ¹ .
Toxicidade aguda dermal (coelhos)	LD ₅₀ > 2.000 mg/kg (machos e fêmeas). Categoria Toxicológica III ¹ .
Inalação (ratos)	LC ₅₀ > 5,52 mg/L (machos e fêmeas) ¹ .
Irritação primária dos olhos (coelhos)	-
Irritação primária da pele (coelhos)	-
Sensibilização da derme (preás)	-
Toxicidade sub-crônica 90 dias de alimentação oral (ratos)	NOAEL Dermal e sistêmico = 1.552 mg/kg/dia em machos e 1.728 mg/kg/dia para fêmeas na highest dose tested (HDT). Este foi na HDT; por isso, não há o lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) ² .
Toxicidade sub-crônica 21 dias na derme (coelhos)	NOAEL Dermal e sistêmico = 1.000 mg/kg/dia, em machos e fêmeas. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ² .
Toxicidade no desenvolvimento pré-natal (ratos)	NOAEL Maternal = 1.000 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ² . NOAEL no desenvolvimento = 1.000 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ² .

Tabela 2. Cont.

Tipo de Estudo	Resultados
Toxicidade no desenvolvimento pré-natal (coelhos)	NOAEL Maternal = 350 mg/kg/dia. LOAEL = 500 mg/kg/dia, baseado na diminuição do peso corporal obtido e consumo de alimento. No 700 mg/kg/dia (HDT), houve excessiva mortalidade resultando um total de somente 7 sobreviventes ² . NOAEL no desenvolvimento = 500 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL. No 700 mg/kg/dia (HDT), houve excessiva mortalidade e somente 47 fetos foram avaliados. Isto impediu de se fazer uma avaliação significativa no desenvolvimento nesta dose ² .
Efeitos na reprodução e fertilidade (ratos)	NOAEL Parental e sistêmico = 1.205 mg/kg/dia em machos e 1.484 mg/kg/dia em fêmeas. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL. NOAEL reprodutivo = 1.205 mg/kg/dia em machos e 1.484 mg/kg/dia em fêmeas. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL. NOAEL na descendência = 1.205 mg/kg/dia em machos e 1.484 mg/kg/dia em fêmeas. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ² .
Toxicidade crônica (ratos)	-
Toxicidade crônica (cães)	NOAEL = não estabelecido. LOAEL = 137 mg/kg/dia em machos e 180 mg/kg/dia em fêmeas, baseado na incidência de degeneração mínima e/ ou necrose e linfócitos e/ ou macrófago e infiltração no músculo esquelético em ambos os sexos e pequena diminuição dos níveis de creatinina no sangue em fêmeas na low dose tested (LDT) ² .
Carcinogenicidade (ratos)	-
Carcinogenicidade (camundongos)	NOAEL = 1.134 mg/kg/dia em machos e 1.422 mg/kg/dia em fêmeas. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL. Sem evidência de carcinogenicidade ² .
Combinado Crônico/carcinogenicidade (ratos)	NOAEL = 1.029 mg/kg/dia em machos e 1.237 mg/kg/dia em fêmeas. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL. Sem evidência de carcinogenicidade ² .
Mutação reversa em bactérias (Teste de Ames)	Negativo até 5.000 µg/placa na presença ou ausência de ativação, em <i>Salmonella typhimurium</i> linhagem TA98, TA100, TA1535 e TA1537 e <i>Escherichia coli</i> linhagem WP2uvra ² .

Tabela 2. Cont.

Tipo de Estudo	Resultados
Mutação de gene de células de mamíferos <i>in vitro</i> (CHO/HGPRT)	Não mutagênico no locus HGPRT em células de ovário de hamster chinês (CHO) testado até a concentração citotóxica ou limite de solubilidade, na presença ou ausência de ativação ² .
Aberração cromossômica em células de mamíferos <i>in vitro</i> (CHO)	Não induziu aberração cromossômica estrutural em células de cultura CHO na presença ou ausência de ativação ² .
Letal dominante em rodentia (RDL)	-
Síntese de DNA desprogramado (UDS)	-
Aberração cromossômica em células de mamíferos <i>in vivo</i> (medula óssea) (ratos)	Não mutagênico no teste de aberração cromossômica em medula óssea de rato até 5.000 mg/kg ² .
Metabolismo e farmacocinética (ratos)	A principal via de eliminação do produto ativo não alterado, é a excreção urinária. Não há evidência de bioacumulação nos tecidos; é eliminado em 7 dias. Não há diferença entre a relação dose e sexo por administração oral ou intravenosa ² .
Penetração na derme	Taxa de absorção dermal = 50% ² .

Fonte:

¹USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 1996^b. Pesticide Tolerance for Imazapic (Cadre). Final Rule. March 20, Washington, D.C.

²USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 2001^a. Pesticide Tolerance for Imazapic. Federal Register. Vol. 66, No. 247. Rules and Regulations. December 26, Washington, D.C.

Tabela 3: Perfil toxicológico do herbicida imazethapyr.

Tipo de Estudo	Resultados
Toxicidade aguda oral (ratos)	Dose Letal 50% (LD ₅₀) > 5.000 mg/kg (macho e fêmea). Categoria toxicológica IV ¹ .
Toxicidade aguda dermal (coelhos)	LD ₅₀ > 2.000 mg/kg (macho e fêmea). Categoria toxicológica III ¹ .
Inalação (ratos)	Concentração Letal 50% (LC ₅₀) > 3,27 mg/L (macho e fêmea). Categoria toxicológica III ¹ .
Irritação primária dos olhos (coelhos)	Fracamente irritante até 24 horas. Categoria toxicológica III ² .
Irritação primária da pele (coelhos)	Não irritante. Categoria toxicológica IV ² .
Sensibilização da derme (preás)	Negativo ² .
Toxicidade sub-crônica 90 dias de alimentação oral (ratos)	No-observed-adverse-effect-level (NOAEL) = 500 mg/kg/dia na highest dose tested (HDT). Este foi na HDT; por isso, não há o lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) ¹ .
Toxicidade sub-crônica 90 dias de alimentação oral (cães)	NOAEL = 250 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ¹ .
Toxicidade sub-crônica 21 dias na derme (coelhos)	NOAEL = 1.096 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ¹ .
Toxicidade no desenvolvimento pré-natal (ratos)	NOAEL Maternal = 375 mg/kg/dia. LOAEL = 1.125 mg/kg/dia, baseado no aumento de incidência de sinais clínicos durante a gestação ¹ . NOAEL no desenvolvimento = 1.125 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ¹ .

Tabela 3. Cont.

Tipo de Estudo	Resultados
Toxicidade no desenvolvimento pré-natal (coelhos)	NOAEL Maternal = 300 mg/kg/dia. LOAEL = 1.000 mg/kg/dia, baseado no aumento de incidência de sinais clínicos durante a gestação, ulcerações nas camadas das células do estômago e bexiga uinária, aumento de abortos e mortes maternas ¹ . NOAEL no desenvolvimento = 1.000 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ¹ .
Efeitos na reprodução e fertilidade (ratos)	NOAEL Parental e sistêmico = 500 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL. NOAEL na descendência = 500 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ¹ .
Toxicidade crônica (cães)	NOAEL = 250 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ¹ .
Carcinogenicidade (ratos)	Negativo ² .
Carcinogenicidade (camundongos)	NOAEL = 750 mg/kg/dia. LOAEL = 1.500 mg/kg/dia. Baseado na diminuição do peso corporal obtido. Sem evidência de carcinogenicidade até a dose testada ¹ .
Combinado Crônico/carcinogenicidade (ratos)	NOAEL = 500 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL. Sem evidência de carcinogenicidade ¹ .
Mutação reversa em bactérias (Teste de Ames)	Negativo até 5.000 µg/placa na presença e ausência de ativação metabólica, em <i>Salmonella typhimurium</i> linhagens TA98, TA100, TA1535, TA1537 e TA1538 e <i>Escherichia coli</i> linhagem WP2uvra ¹ .
Mutação de gene de células de mamíferos <i>in vitro</i> (CHO/HGPRT)	Negativo, na presença ou ausência da ativação do citocromo S9, até a dose no limite da solubilidade 3.333 µg/ml e além de 4.000 µg/ml ¹ .
Aberração cromossômica em células de mamíferos <i>in vitro</i> (CHL)	Negativo em cultura de células de pulmão (V79) de hamster chinês na presença ou ausência de ativação até na concentração citotóxica ¹ .

Tabela 3. Cont.

Tipo de Estudo	Resultados
Letal dominante em rodentia (RDL)	Negativo (danos no cromossomo) na dose até 2.000 mg/kg ¹ .
Síntese de DNA desprogramado (UDS)	Sem evidência ¹ .
Aberração cromossômica em células de mamíferos <i>in vivo</i> (medula óssea) (rato)	-
Metabolismo e farmacocinética (ratos)	Dentro das 96 horas de tratamento, 89-95% da dose administrada foi recuperada na urina e 6-11% nas fezes. Nas primeiras 31 horas, 95% da dose oral foi excretada. Aproximadamente 2% da dose oral foi metabolizada e excretada como CL 288.511 (1-hidroxi etil derivado do imazethapyr (AC 263.499). Uma alta porcentagem do material administrado foi excretada na urina como composto original não modificado (>97%) e em pouca quantidade o CL288.511. No grupo de alta dose, o composto original não modificado foi excretado como o maior componente nas fezes em ambos os sexos, particularmente em 12 horas ou menos. O CL 288.511 foi o maior metabólito. Um metabólito não conhecido também foi encontrado em quantidade significativa. No grupo de baixa dose, seis componentes foram encontrados nas fezes: o composto original , o CL 288.511, o não conhecido previamente citado e vários outros menores não conhecidos ¹ .
Penetração na Derme	-

Fonte:

¹USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 2002^a. Pesticide Tolerance for Imazethapyr. Federal Register. Vol. 67, No. 168. Rules and Regulations. August 29, Washington, D.C.

²USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 2002^b. Imazethapyr; Notice of Filing a Pesticide Petition to Establish a Tolerance for a Certain Pesticide Chemical in or on Food. Federal Register. Vol. 67, No. 235. Notices. December 6, Washington, D.C.

Tabela 4: Perfil toxicológico do herbicida imazamox.

Tipo de Estudo	Resultados
Toxicidade aguda oral (ratos)	Dose Letal 50% (LD ₅₀) > 5.000 mg/kg (dose limite). Categoria toxicológica IV ³ .
Toxicidade aguda dermal (coelhos)	LD ₅₀ > 4.000 mg/kg (duas vezes a dose limite). Categoria toxicológica III ³ .
Inalação (ratos)	Concentração Letal 50% (LC ₅₀) > 6,3 mg/L (macho e fêmea). Categoria toxicológica IV ³ .
Irritação primária dos olhos (ratos e cães)	Moderadamente irritante. Categoria toxicológica III ^{1,2} .
Irritação primária da pele (coelhos)	Não irritante. Categoria toxicológica IV ³ .
Sensibilização da derme (preás)	Negativo ³ .
Toxicidade sub-crônica 90 dias de alimentação oral (ratos)	No-observed-adverse-effect-level (NOAEL) = 1.661 mg/kg/dia na highest dose tested (HDT). Este foi no HDT; por isso, não há o lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) ² .
Toxicidade sub-crônica 90 dias de alimentação oral (cães)	NOEL = 1.3 mg/kg/dia para machos e 1.4 mg/kg/dia para fêmeas. Este foi na HDT; por isso, não há LOEL ¹ .
Toxicidade sub-crônica 21/28 dias na derme (coelhos)	NOAEL = 1.000 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ¹ .
Toxicidade no desenvolvimento pré-natal (ratos)	NOAEL Maternal e desenvolvimento = 1.000 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ³ .

Tabela 4. Cont:

Tipo de Estudo	Resultados
Toxicidade no desenvolvimento pré-natal (coelhos)	NOAEL Maternal e desenvolvimento = 900 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ³ .
Efeitos na reprodução e fertilidade (ratos)	NOAEL Parental, sistêmico, reprodução e descendência = 1.469 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ³ .
Toxicidade crônica (cães)	NOAEL = 1.165 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL ² .
Carcinogenicidade (ratos)	Ausência de carcinogenicidade macro e microscópica ³ .
Carcinogenicidade (camundongos)	NOAEL = 1.053 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL. Sem evidência de carcinogenicidade ² .
Combinado Crônico/carcinogenicidade (ratos)	NOAEL = 1.068 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOAEL. Sem evidência de carcinogenicidade ^{2,3} .
Mutação reversa em bactérias (Teste de Ames)	Negativo ^{1,3} .
Mutação de gene de células de mamíferos <i>in vitro</i> (CHO/HGPRT)	Negativo ^{1,3} .
Aberração cromossômica em células de mamíferos <i>in vitro</i> (CHO)	Negativo ^{1,3} .
Letal dominante em rodentia (RDL)	Negativo ¹ .

Tabela 4. Cont:

Tipo de Estudo	Resultados
Síntese de DNA desprogramado (UDS)	Negativo ¹ .
Aberração cromossômica em células de mamíferos <i>in vivo</i> (medula óssea) (ratos)	Negativo ³ .
Metabolismo e farmacocinética (ratos)	Na administração intravenosa, o imazamox é excretado rapidamente e primariamente na urina, e na administração oral é excretado pela urina e pelas fezes, principalmente como produto não modificado ² .
Penetração na Derme	-

Fonte:

¹USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 1997^b. Pesticide Tolerance for Imazamox. Federal Register. Vol. 62, No. 105. Rules and Regulations. June 2, Washington, D.C.

²USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 2001^b. Pesticide Tolerance for Imazamox. Federal Register. Vol. 66, No. 248. Final Rule. December 27, Washington, D.C.

³USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 2002^d. Imazamox; Notice of Filing a Pesticide Petition to Establish a Tolerance for a Certain Pesticide Chemical in or on Food. Federal Register. Vol. 67, No. 246. Notices. December 23, Washington, D.C.

Tabela 5: Perfil toxicológico do herbicida imazaquin.

Tipo de Estudo	Resultados
Toxicidade aguda oral (ratos)	Dose Letal 50% (LD ₅₀) > 5.000 mg/kg (macho e fêmea). Categoria toxicológica IV.
Toxicidade aguda dermal (coelhos)	LD ₅₀ > 2.000 mg/kg (macho e fêmea). Categoria toxicológica III.
Inalação (ratos)	Concentração Letal 50% (LC ₅₀) > 5,7 mg/L (macho e fêmea). Categoria toxicológica III.
Irritação primária dos olhos (coelhos)	Não irritante. Categoria toxicológica IV.
Irritação primária da pele (coelhos)	Suavemente irritante. Categoria toxicológica IV.
Sensibilização da derme (preás)	Negativo.
Toxicidade sub-crônica 90 dias de alimentação oral (ratos)	No-observed-effect-level (NOEL) = 10.000 ppm ou 800 mg/kg/dia na highest dose tested (HDT). Este foi na HDT; por isso, não há o lowest-observed-effect-level (LOEL).
Toxicidade sub-crônica 90 dias de alimentação oral (cães)	-
Toxicidade sub-crônica 21 dias na derme (coelhos)	NOEL = 1.000 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOEL.
Toxicidade no desenvolvimento pré-natal (ratos)	NOEL Teratogênico > 2.000 mg/kg/dia. NOEL Fetotóxico = 500 mg/kg/dia, LOEL = 2.000 mg/kg/dia. NOEL Toxicidade Maternal = 500 mg/kg/dia, LOEL = 2.000 mg/kg/dia.
Toxicidade no desenvolvimento pré-natal (coelhos)	NOEL Teratogênico = 500 mg/kg/dia. NOEL Embriotóxico = 500 mg/kg/dia. NOEL Maternal = 250 mg/kg/dia. Low-effect-level (LEL) Maternal = 500 mg/kg/dia.

Tabela 5. Cont.

Tipo de Estudo	Resultados
Efeitos na reprodução e fertilidade (ratos)	NOEL 3 gerações = 10.000 ppm ou 1.000 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOEL.
Toxicidade crônica (cães)	Estudo toxicológico na dieta por 1 ano: NOEL = 1.000 ppm e LOEL = 5.000 ppm.
Carcinogenicidade (ratos)	2 anos de avaliação na dieta oral: NOEL = 10.000 ppm ou 500 mg/kg/dia. Este foi na HDT; por isso, não há LOEL.
Carcinogenicidade (camundongos)	18 meses de avaliação: NOEL = 1.000 ppm ou 150 mg/kg/dia. LEL = 4.000 ppm.
Combinado Crônico/carcinogenicidade (ratos)	-
Mutação reversa em bactérias (Teste de Ames)	Negativo.
Mutação de gene de células de mamíferos <i>in vitro</i> (CHO/HGPRT)	Negativo.
Aberração cromossômica em células de mamíferos <i>in vitro</i> (CHO)	Negativo.
Letal dominante em rodentia (RDL)	Negativo.
Síntese de DNA desprogramado (UDS)	Negativo.

Tabela 5. Cont.

Tipo de Estudo	Resultados
Aberração cromossômica em células de mamíferos <i>in vivo</i> (medula óssea) (ratos)	-
Metabolismo e farmacocinética (ratos)	Estudo do metabolismo em dose única baixa: Imazaquin foi excretado em 48 horas, sendo 94% na urina e 4% nas fezes.
Penetração na Derme	Juntamente com a via de inalação, representam a maior rota de exposição.

Fonte:
USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 1986. Chemical Fact Sheet For: Imazaquin. No. 83. Herbicide Profile. March 20, Washington, D.C.

Tabela 6: Características físicas e químicas de cinco herbicidas análogos da classe das Imidazolinonas: imazapyr, imazapic, imazethapyr, imazamox e imazaquin.

Características	Imazapyr ¹	Imazapic ²	Imazethapyr ³	Imazamox ⁴	Imazaquin ⁵
Estado físico	Granulado	Líquido	Granulado	Granulado	Granulado
Cor	Branco para branco livre	Amarelo pálido para Verde	Branco livre para crestado	Branco livre; Munsell 5 Y (9/1)	Crestado claro
Odor	Levemente ácido acético	Não determinado	Ácido; pungente	Sem odor	Sem odor
Ponto de Fusão	169,0 – 173,0°C	Não definido	Não analisado	166,0 – 166,7°C	219,0 – 224,0°C
Solubilidade em água	11.272 ppm ou 1,0 a 1,5% em 25,0°C	2.200 mg/L em 25,0°C	0,14 g/ 100 mL do solvente	4.413 ppm em 20,0°C	60 ppm em 25,0°C
Constante de Dissociação	.pk1 = 1,9 .pk2 = 3,6	.pK1 = 2,0 .pK2 = 3,6 .pK3 = 11,1	pKa = 3,9	.pK1 = 2,3 .pK2 = 3,3 .pK3 = 10,8	–
pH	3 – 3,5; 1% susp aq (p:v) em 25,0°C	6,4 – 7	2,85 em 25.0°C	2,35; 1% susp aq (p:v) em 24,5°C	3,8 em 25,0°C

Continuação da Tabela 6:

Características	Imazapyr ¹	Imazapic ²	Imazethapyr ³	Imazamox ⁴	Imazaquin ⁵
Estabilidade	3 – 3,5; 1% suspensão aquosa (p:v) em 25°C por no mínimo 18 meses	Estável. Não armazenar abaixo de -7°C.	–	2,35; 1% suspensão aquosa (p:v) em 24,5°C	–

Fonte:

¹USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 1985. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances – Pesticide Fact Sheet – Imazapyr – September 5, Washington, D.C.

²BASF Corporation. 2001. Material Safety Data Sheet – Product No.: 579651 – Imazapic – December 4.

³USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 1989. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances – Pesticide Fact Sheet – Imazethapyr – March 8, Washington, D.C.

⁴ USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 1997^a. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances – Pesticide Fact Sheet – Imazamox – May 22, Washington, D.C.

⁵USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 1986. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances – Pesticide Fact Sheet – Imazaquin – March 20, Washington, D.C.