SETI / PTG
Fl. 04
Rubrica

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO
Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior

PROJETO ESTRATÉGICO DA UGF – FUNDO PARANÁ

UNIDADE GESTORA DO FUNDO PARANÁ – **UGF**

1. ÁREA PRIORITÁRIA

Selecione **uma** das áreas listadas, entre aquelas aprovadas pelo CCT – PARANÁ, na qual o projeto se enquadre, acessando o link : http://www.seti.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=15 e informe abaixo:

Área Prioritária: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E BIOTECNOLOGIA

2. TÍTULO DO PROJETO

BIOMONITORAMENTO HUMANO E AMBIENTAL DOS HERBICIDAS GLIFOSATO, ATRAZINA E 2,4-D: CITOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE, GENOTOXICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA, *IN VITRO* E *IN VIVO*

3. VALOR TOTAL DOS RECURSOS SOLICITADOS AO FUNDO PARANÁ		
Outras despesas de CUSTEIO	INVESTIMENTOS	Total
R$ 33.764,00	**R$ 68.000,00**	**R$ 101.764,00**

4. ESTIMATIVA DE PRAZOS PARA EXECUÇÃO DO PROJETO
Duração: ( ) 12 meses ( ) 32 meses (X) 36 meses
Início: A partir da data da assinatura do Termo Jurídico.

5. INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CNPJ: 79.151.312/0001-56
Natureza Jurídica: Autarquia Estadual
Endereço: Av. Colombo, 5.790
CEP: 87.020.900
Cidade/Estado: Maringá - Paraná
Telefone e Fax: (44) 3011-4200
e_mail: sec-gre@uem.br

6. REPRESENTANTE LEGAL DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Nome: MAURO LUCIANO BAESSO
Cédula de Identidade (Instituto/Estado da Federação): 1.883.579
CPF: 387.386.519-04
Endereço residencial: Av. Parigot de Souza, 198
CEP: 87010-440
Cidade/Estado: Maringá - Paraná
Telefone residencial: (44) 3301-8013
e_mail particular: mlbaesso@uem.br

7. COORDENADOR TÉCNICO/CIENTÍFICO DO PROJETO

Nome: VERONICA ELISA PIMENTA VICENTINI
Cédula de Identidade (Instituto/Estado da Federação): 12.832.253-1 - SSP-PR
CPF: 019.773.978-40
Formação profissional: Ciências Biológicas
Titulação (graduação e pós-graduação): Doutora em Ciências Biológicas/Genética
Telefone(s), celular e Fax: (44) 99101-2777, 3011-4687
Endereço residencial: Rua Duartina, 235
CEP: 87.080-440
Cidade/Estado: Maringá/ PR
e-mail : arbvepv@wnet.com.br

8. ENGENHEIRO CIVIL RESPONSÁVEL PELA OBRA
(Caso seja previsto no projeto execução da obra e/ou reforma)

SETI / PTG
Fl. 05
Rubrica

Instituição:
Nome do Engenheiro Civil:
CREA:
CPF:
Formação profissional:
Titulação (graduação e pós-graduação):
Telefone(s), celular e Fax:
Endereço residencial:
CEP:
Cidade/Estado:
e_mail:

9. RESPONSÁVEL ADMINISTRATIVO E FINANCEIRO DO PROJETO

Nome: Maria Helena Ambrosio Dias
Cédula de Identidade (Instituto/Estado da Federação): 3.519.994-2 - SSP-PR
CPF: 522.331.209-06
Formação Profissional: Ciências Econômicas
Titulação (graduação e pós-graduação): Doutorado em Economia - Ph.D
Telefone(s), celular e FAX: 9119-7374 / 3011-4220 / 3011-1313
Endereço residencial: Avenida Américo Belay, 1103 - Casa 64
CEP: 87.023-000
Cidade/Estado: Maringá - Paraná
e-mail: mhadias@uem.br

10. RESPONSÁVEL PELO CONTROLE INTERNO DO ÓRGÃO (Quando for o caso)

Nome: Maria Regina da Fonseca
Cédula de Identidade (Instituto/Estado da Federação): 3671652-5
CPF: 517 493 789 - 49
Formação profissional: Contadora
Titulação (graduação e pós-graduação): especialista em contabilidade gerencial
Telefone(s), celular e Fax: 44 - 99916 1762
Endereço residencial: Rua 10 de maio 175, Apto 604
CEP: 87030 - 230
Cidade/Estado: Maringá - Pr
e_mail: mrfonseca@uem.br

11. IDENTIFICAÇÃO DA INSTITUIÇÃO PARCEIRA DO PROJETO
(Criar mais quadros, se necessário)

11.1INSTITUIÇÃO PARCEIRA

Sigla/denominação:
CNPJ:
Natureza Jurídica:
Endereço Comercial:
CEP:
Cidade/Estado:
Telefone e Fax:
e_mail:

11.2 REPRESENTANTE LEGAL DA INSTITUIÇÃO PARCEIRA

Nome:
Cédula de Identidade (Instituto/Estado da Federação):
CPF:
Formação profissional:
Titulação (graduação e pós-graduação):
Telefone(s), celular e Fax:
Endereço residencial:
CEP:
Cidade/Estado:
e_mail:

SETI / PTG
06
Rubrica

12.Equipe do projeto (recursos humanos).

Nº	Nome	Instituição	Formação	Função no projeto	e-mail	Telefone (fixo e celular)
1	VERONICA ELISA PIMENTA VICENTINI (01977397840) CV: http://lattes.cnpq.br/5917283612908520	UEM	Doutor	Coordenadora	arbvepv@wnet.com.br	(44) 3011-4687
2	IGOR VIVIAN DE ALMEIDA (05826635983) CV: http://lattes.cnpq.br/1706404060988942	UEM	Doutor	Participante/ Pesquisador	igoralmeida.bio@ gmail.com	(44) 3011-4687
3	JOÃO ALENCAR PAMPHILE (93125046734) CV: http://lattes.cnpq.br/0419573494358567	UEM	Doutor	Participante	japamphile@uem.br	(44) 3011-4687
4	NILSON BENEDITO LOPES (06967809920) CV: http://lattes.cnpq.br/1259353288531966	UEM	Doutorando	Participante/ Pesquisador	nilsonblopes@ gmail.com	(44) 3011-4687
5	MICHELE CRISTINA HECK (04250156966) CV: http://lattes.cnpq.br/6636191753520370	UEM	Doutor	Participante	michelecris_heck@ yahoo.com.br	(44) 3011-4687
6	ROSINETE GONÇALVES MARIUCCI (50644254904) CV: http://lattes.cnpq.br/6618009888794174	UEM	Especialista	Técnica de laboratório	rmariucci@bol.com.br	(44) 3011-4687
7	MARIANA YOSHIMOTO (08181367901) CV: http://lattes.cnpq.br/2761220903643861	UEM	Doutoranda	Participante	mariana.yoshimoto@ gmail.com	(44) 3011-4687
8	LILIAN CAPELARI SOARES (04178291912) CV: http://lattes.cnpq.br/4869268403196123	UEM	Doutoranda	Participante	licapelaribio@ gmail.com	(44) 3011-4687
9	JAQUELINE DE SANTANA DA SILVA (06591317902) CV: http://lattes.cnpq.br/4773242515852393	UEM	Doutoranda	Participante	jaquesssantanna@ gmail.com	(44) 3011-4687
10	DIANE MARQUES MAGNONI (07028672921) CV: http://lattes.cnpq.br/9950107836657640	UEM	Mestranda	Participante	dianemagnoni@ hotmail.com	(44) 3011-4687
11	ANA CLARA CANESIN DE ALMEIDA (07711201923) CV: http://lattes.cnpq.br/6281836265283910	UEM	Mestranda	Participante	anaclara_013@ yahoo.com.br	(44) 3011-4687
12	MATHEUS GIMENES BUZO (08836114903) CV: http://lattes.cnpq.br/2118244972136875	UEM	Mestrando	Participante	matheusgbuzo@ gmail.com	(44) 3011-4687
13	FABIOLA TERRA LUCIO (06587074936) CV: http://lattes.cnpq.br/7692704790526712	UEM	Mestranda	Participante	94.fabiola@gmail.com	(44) 3011-4687
14	JONATAS ALÉCIO DOS PRAZERES (10430279981) CV: http://lattes.cnpq.br/5411779048151155	UEM	Graduando	Participante	jonatasap2008@ gmail.com	(44) 3011-4687

13.DESCRIÇÃO DO PROJETO.

13.1 PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

O setor agrícola é o responsável pelo abastecimento de alimentos da sociedade e uma das principais fontes geradoras de renda (PEREIRA et al., 2016). No último século, esse setor se caracterizou pelo aumento e adoção de práticas agrícolas que elevassem a produtividade das culturas, sob o forte argumento da crescente demanda de alimentos pela população mundial devido a sua constante expansão (CHAVES, 2007).

De acordo com o Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) (2014) o Brasil é um dos líderes mundiais na produção de produtos agropecuários, liderando o ranking mundial da produção e venda de açúcar, café, suco de laranja e soja, com fortes resultados positivos na balança comercial brasileira, correspondendo à 22,5% para o Produto Interno Bruto (1 trilhão de reais). Embora o comércio internacional de commodities esteja provocando continuamente uma dinâmica positiva para o agronegócio brasileiro, o mercado interno ainda é o principal demandante da produção agrícola do Brasil, todavia a busca incessante pela produtividade tem levado o homem a cometer erros e exageros, e um reflexo disto é a irracionalidade na utilização de agrotóxicos (PINHEIRO, 2012; CGEE, 2014).

De acordo com a Lei Federal Nº 7802/1989 e Decreto Nº 4.074/2002 os agrotóxicos são definidos como produtos e 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 plantadas, e de outros

ecossistemas e 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, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (OPAS/OMS, 1996).

Segundo dados do (IBGE 2015), desde 2008 o Brasil ocupa a posição de maior usuário de agrotóxicos no mundo, os valores de comercialização de agrotóxicos e afins por área plantada registram aumento contínuo a partir de 2009, alcançando 6,9 kg/ha em 2012. Isto representa um acréscimo de 4,2 kg/ha num período de dez anos, tendo em vista que em 2002 esse valor foi de 2,7 kg/ha.

Corroborando com esses dados, está a lista de produtos mais vendidos no Brasil, onde os agrotóxicos são destaque nas vendas, especificadamente os de origem química e bioquímica, correspondendo a 508,6 mil toneladas de ingredientes ativos vendidos no ano de 2014, sendo o ranking desses produtos compostos pelo Glifosato [N-(fosfonometil)glicina] em primeiro lugar, seguido pelo 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e o Acefato (S-dimetil-acetilfosforoamidotioato) (IBAMA, 2014). De acordo com a Lei Federal Nº 7802/1989 e Decreto Nº 4.074/2002 os agrotóxicos são definidos como produtos e 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 plantadas, e de outros ecossistemas e 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, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (OPAS/OMS, 1996).

Segundo dados do (IBGE 2015), desde 2008 o Brasil ocupa a posição de maior usuário de agrotóxicos no mundo, os valores de comercialização de agrotóxicos e afins por área plantada registram aumento contínuo a partir de 2009, alcançando 6,9 kg/ha em 2012. Isto representa um acréscimo de 4,2 kg/ha num período de dez anos, tendo em vista que em 2002 esse valor foi de 2,7 kg/ha.

Corroborando com esses dados, está a lista de produtos mais vendidos no Brasil, onde os agrotóxicos são destaque nas vendas, especificadamente os de origem química e bioquímica, correspondendo a 508,6 mil toneladas de ingredientes ativos vendidos no ano de 2014, sendo o ranking desses produtos compostos pelo Glifosato [N-(fosfonometil)glicina] em primeiro lugar, seguido pelo 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e o Acefato (S-dimetil-acetilfosforoamidotioato) (IBAMA, 2014).

Dentre os herbicidas amplamente empregados no cultivo da soja, do milho, do trigo e da cana-de-açúcar, entre outras, no Estado do Paraná, podemos citar o glifosado, a atrazina e o 2,4-D. O glifosato é um herbicida pós-emergente, pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. Apresenta largo espectro de ação, o que possibilita um excelente controle de plantas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como estreitas (EMBRAPA, 2005). O herbicida 2,4-D é um regulador de crescimento que possui efeito análogo ao hormônio auxina, pertencente à família dos compostos fenóxicos, que é utilizado como herbicida por apresentar seletividade para plantas de folhas estreitas, tendo maior fitotoxicidade para espécies latifoliadas, sendo bastante utilizado em plantio direto, principalmente em mistura com outros herbicidas, como o glifosato, na dessecação de plantas daninhas antes da semeadura de diversas culturas (SILVA et al., 2011). A atrazina é um herbicida com ação residual que pertence ao grupo químico das clorotriazinas. O mecanismo de ação é a inibição da fotossíntese através do bloqueio do fluxo de elétrons. É indicado em pré ou pós-emergência das plantas daninhas, para controlar principalmente espécies com folhas largas. Em pré-emergência, a aplicação é realizada imediatamente antes, simultaneamente ou logo após a semeadura da cultura. No preparo convencional do solo, deve ser aplicado no máximo três dias após a última gradagem, com elevada umidade de solo. Quando aplicado em solo seco, a eficácia do produto é reduzida, se não chover em até seis dias (EMBRAPA, 2006).

O uso indiscriminado dos agrotóxicos figura entre os principais problemas ambientais brasileiros desde as primeiras manifestações do movimento ambientalista. Os efeitos dos agrotóxicos passaram a ser amplamente reconhecidos como uma grave ameaça, principalmente após a divulgação do livro de Rachel Carson "Primavera Silenciosa", publicado no ano de 1962, onde é relatada a longa permanência destes químicos nos solos e organismos, transmitindo-se de um a outro em uma "cadeia de morte" (BELO et al., 2014).

A dinamização e modernização da produção agrícola no Brasil iniciou-se no Sul do Brasil na década de 1950 e rapidamente atingiu outras regiões do país. Este avanço da atividade agropecuária teve por objetivo somente a modernização da produção agrícola, sem levar em conta todas as repercussões no âmbito social e ambiental advindas desse modelo

(MATOS e PESSOA, 2011).

Em relação à classificação toxicológica, o agrotóxico pode ser de: classe I, aqueles tidos como extremamente tóxicos com faixa indicativa de cor vermelha na embalagem do produto; classe II, agrotóxicos muito tóxicos e identificados pela cor amarela; classe III, que são os moderadamente tóxicos e indicados pela cor de azul intenso na embalagem; classe IV agrotóxicos pouco tóxicos e indicados pela cor verde intenso. A toxicidade é expressa em termos do valor da dose média letal (DL50), por via oral, representada por miligramas do produto tóxico por quilo de peso vivo, necessários para matar 50% de ratos e outros animais teste (EMBRAPA, 2003).

Todas as pessoas estão inevitavelmente expostas aos agrotóxicos, seja por manuseio ocupacional, ingestão acidental, tentativa de suicídio ou até por consumir os alimentos e águas com resíduos desses (GERAGE et al.,2017; LINI et al. 2016).

Para Moreira et al. (2002) existem três vias de intoxicação por agrotóxicos que podem causar impacto direto nos seres humanos:

- A via ambiental, caracterizada pela dispersão/distribuição dos agrotóxicos ao longo dos diversos componentes do meio ambiente: a contaminação das águas, através da migração de resíduos de agrotóxicos para lençóis freáticos, leitos de rios, córregos, lagos e lagunas próximos; a contaminação atmosférica, resultante da dispersão de partículas durante o processo de pulverização ou de manipulação de produtos finamente granulados (durante o processo de formulação) e evaporação de produtos mal estocados; e a contaminação dos solos;
- A via ocupacional, caracterizada pela manipulação dos trabalhadores que usam essas substâncias, podendo se intoxicar durante o processo de formulação (mistura/diluição dos produtos), utilização (pulverização, auxílio na condução das mangueiras dos pulverizadores - a "puxada" - descarte de resíduos e embalagens contaminadas, etc.) e na colheita (onde os trabalhadores manipulam/entram em contato com o produto contaminado);
- A via alimentar, relacionada à ingestão de produtos contaminados por agrotóxicos, cujo impacto sobre a saúde provocado por esta via é, comparativamente menor do que as outras, devido a diversas razões, tais como: a concentração dos resíduos que permanece nos produtos; a possibilidade de eliminação dos agrotóxicos por processos de beneficiamento do produto (cozimento, fritura, etc.) e o respeito ao período de carência. Esta via atinge uma parcela ampla da população urbana, os consumidores.

Segundo a WHO/FAO (2016) os agrotóxicos estão entre os 18 mais importantes fatores de risco para a saúde da população em geral, especialmente para os agricultores e para os ecossistemas próximos as áreas agrícolas.

O elevado uso de agrotóxicos tem contribuído não só para a contaminação ambiental, mas também para o aumento do número de intoxicações, principalmente em relação aos agricultores considerados o principal grupo de risco expostos aos efeitos adversos de vários pesticidas, uma vez que utilizam vários produtos e misturas, sendo expostos a herbicidas, fungicidas e inseticidas simultaneamente (SILVA, 2012).

A intoxicação crônica por agrotóxicos pode gerar mutações no DNA, aberrações cromossômicas e instabilidade genética, que contribuem para o surgimento de doenças, entre elas o câncer, as malformações congênitas e o envelhecimento, além de perturbar uma série de vias biológicas, incluindo o estresse oxidativo (ABDOLLAHI et al., 2004) e imunotoxicidade (GALLOWAY e HANDY, 2003), que também foram associadas à carcinogênese (KUMAR e DAS, 2009), sendo que a combinação destes fatores pode levar ao desequilíbrio da saúde do indivíduo exposto, bem como ao desequilíbrio ambiental.

Os biomarcadores de monitoramento são parâmetros bioquímicos, fisiológicos, comportamentais e outras medidas de alterações no organismo, que refletem a interação de uma substância a receptores biológicos, e que podem representar risco para o desenvolvimento de determinadas doenças, da mesma forma que avaliam os impactos destas interações sobre o meio ambiente (LOWRY, 1995; CEBULSKA-WASILEWSKA, 2003).

Os biomarcadores mais utilizados no biomonitoramento humano são os que refletem a ocorrência de danos no DNA, tais como: alteração de bases, aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e micronúcleos (MN), uma vez que este último é um dos mais utilizados como padrão de aberrações cromossômicas em eucariotos, sendo o mais eficaz para o monitoramento humano. Sua formação ocorre durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células-filhas (FENECH e CROTT, 2002). Os micronúcleos são resultantes de dois fenômenos básicos nas células mitóticas: quebra cromossômica (clastogênese) sendo formado pelos cromossomos acêntricos ou fragmentos cromatídicos, e disfunção do aparelho mitótico (aneugênese), sendo formado pelos cromossomos

inteiros ou cromátides que se atrasam na anáfase e são excluídos do núcleo-filho na telófase (FENECH, 2000; HOLLAND et al., 2008).

O teste de MN evoluiu rapidamente no campo da Genética Toxicológica por ser um método simples, que permite o uso de diferentes tipos de células, como linfócitos e células do epitélio (PASTOR et al., 2003). Este teste foi aplicado pela primeira vez em células esfoliadas da cavidade oral por Stich et al. (1983). A escolha das células da mucosa oral é considerada vantajosa, pois as células apresentam alto grau de divisão, dispensando a realização de culturas in vitro, e por não ser um método invasivo para os pacientes (HEUSER et al., 2007; THOMAS et al., 2008; STICH et al.,1983).

Ainda, as culturas de células humanas podem ser eficientemente empregadas no biomonitoramento, já que as células respondem rapidamente ao estresse tóxico alterando as taxas metabólicas, o crescimento celular ou a transcrição genética para controlar suas funções celulares básicas. Assim, a citotoxicidade pode ser considerada como o potencial de um composto para induzir a citostase ou até mesmo a morte celular, que pode ser facilemnte detectada por meio de testes colorimétricos, como o ensaio do MTT. Desta forma, testes de citotoxicidade in vitro são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, ou seja, a capacidade intrínseca de um composto para provocar a morte de células como consequência dos danos nas funções celulares básicas. Testes de citotoxicidade também são necessários para definir a faixa de concentração a ser testada com relação aos parâmetros de genotoxicidade e mutagenicidade (EISENBRAND et al., 2002).

Já o teste do cometa, também conhecido como eletroforese de célula única em gel (Single Cell Gel Eletrophoresis, SCGE), é um método simples, sensível e confiável para o estudo de danos ao DNA induzidos por agentes físicos, químicos e biológicos (OSTLING e JOHANSON, 1984; OLIVE e BANÁTH, 2006). A técnica se baseia na incorporação de células em agarose e lisadas, seguida por eletroforese. Durante a eletroforese, fragmentos de DNA que apresentam carga negativa, formados em decorrência do tratamento genotóxico, migram através de um gel de agarose em resposta a um campo elétrico. A extensão da migração do DNA depende diretamente do dano presente nas células (TICE et al., 2000).

O emprego de mamíferos, como ratos Wistar (Rattus norvegicus), em sistemas-teste de biomonitoramento também é amplamente aceito, uma vez que são organismos correlacionados evolutivamente com o homem, sendo, portanto, indicado para estudos de alterações no DNA. Além disso, os tecidos dos animais com curto período para completar um ciclo de divisão celular – como células da medula óssea, que levam de 22 a 24 horas – são bons para a identificação de substâncias que ataquem o DNA, provocando quebras cromossômicas (RABELLO-GAY et al., 1991). De acordo com a metodologia empregada, tais quebras cromossômicas podem ser observadas na forma de aberrações cromossômicas ou micronúcleos, facilmente observados em eritrócitos do sangue destes animais.

Entre os organismos utilizados para avaliar impactos ambientais aquáticos está o gênero Astyanax (Baird & Girrard, 1854), pertencente à família Characidae, popularmente conhecidos por lambaris ou piabas, são os mais complexos e numerosos da ordem Characiformes e podem ser encontrados em quase toda a costa do continente americano (OYAKAWA et al., 2006). A espécie Astyanax altiparanae, conhecida anteriormente como Astyanax bimaculatus (Linnaeus, 1758), é um grupo predominante entre os peixes de água doce da América do Sul (BRITSKI et al., 2007), que apresenta capacidade de se adaptar a várias situações ambientais, é ecologicamente versátil e ainda dispõe de algumas estratégias quando em populações (ORSI et al., 2004). Ele coloniza habitats variados de água doce, como lóticos e lênticos, inclusive ambientes em estágio parcial de degradação (ORSI et al., 2002).

O uso do A. altiparanae em estudos de biomonitoramento ambiental é indicado por ser uma espécie comum, de fácil captura e por apresentar sistemas suficientemente sensíveis (SCHULZ e MARTINS-JUNIOR, 2001 apud MARQUES, 2011). O mesmo participa da cadeia alimentar de diversas espécies de peixes e também é consumido por seres humanos (GALVAN, 2011).

Quanto aos vegetais, a espécie Allium cepa L. tem sido repetidamente empregada por apresentar resultados positivos na detecção de impactos de ecossistemas aquáticos, além de grande eficiência na identificação de várias substâncias com potencial causador de danos. Isso se deve devido às características que possui na sua cinética de proliferação, pelo crescimento rápido de suas raízes, pelo grande número de células em divisão, alta tolerância a diferentes condições de cultivo, disponibilidade durante o ano todo, fácil manipulação e por possuir cromossomos em número reduzido (2n = 16) e de grande tamanho, além de serem facilmente corados e analisados (RANK e NIELSEN, 1998; FERNANDES et al., 2007; LEME e MARIN-MORALES, 2008). A. cepa constitui um dos mais antigos sistemas para análise de aberrações

cromossômicas. Seu uso foi introduzido por Levan (1938), ao demonstrar alterações no fuso mitótico pela colchicina e a indução de alterações cromossômicas por diferentes soluções de sais orgânicos. Deste então, inúmeros trabalhos vêm sendo realizados para a avaliação de contaminações em estudos de monitoramento.

SETI / PTG
Fl. 10
Rubrica

13.2 OBJETO DO PROJETO

Avaliar o impacto do uso dos herbicidas glifosato, atrazina e 2,4-D sobre a instabilidade genética de trabalhadores rurais da região metropolitana de Maringá-Paraná, bem como os efeitos citotóxicos, mutagênicos e genotóxicos dos mesmos, além do monitoramento ambiental, por diferentes sistemas-teste, animais e vegetais, in vivo e in vitro.

13.3 METAS FÍSICAS

- **Biomonitoramento humano, *in vivo* e *in vitro*:**

  - Avaliar a frequência dos tipos celulares, células basais e diferenciadas, frequência de anormalidades nucleares e danos celulares, em células esfoliadas da mucosa bucal de dois grupos de indivíduos: trabalhadores rurais expostos ocupacionalmente a herbicidas (pacientes) e controle (de uma população não exposta diretamente);

  - Determinar a citotoxicidade pelo teste do MTT, a genotoxicidade pelo teste do cometa, e o nível de expressão gênica pelo ensaio da RT-PCR, em células de hepatoma humano (HepG2/C3A), cultivadas *in vitro*, tratadas com os herbicidas;

- **Biomonitoramento animal, *in vivo*:**

  - Verificar o efeito citotóxico e mutagênico induzido pelos herbicidas pelo teste do micronúcleo em medula óssea de ratos Wistar, tratados *in vivo*;

  - Detectar a mutagenicidade dos herbicidas pelo ensaio do micronúcleo, em células de eritrócitos de peixes *Astyanax altiparanae, in vivo*;

- **Biomonitoramento vegetal, *in vivo*:**

  - Avaliar o efeito citotóxico e mutagênico dos herbicidas pela análise de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa, in vivo*.

13.4 PLANO DE TRABALHO DO PROJETO

Cronograma de Atividades

Descrição das Atividades			Indicador físico		Duração Prevista (meses)		% Ação no projeto	Total (R$)	% Financeiro
Nº	Ações	Etapa	Unidade	Qtde.	Início*	Término*			
1.	Biomonitoramento humano, *in vivo* e *in vitro*	1.1 Análise da mucosa bucal *in vivo*	Análise	40	1	24	50	5.764	
		1.2 Análise da citotoxicidade *in vitro*	Análise	30	6	24		10.000	
		1.3 Análise da mutagenicidade *in vitro*	Análise	18	6	24		6.000	
		1.4 Análise da expressão gênica *in vitro*	Análise	6	6	24		60.000	
2.	Biomonitoramento animal, *in vivo*	2.1 Análise da medula óssea *in vivo*	Análise	70	12	34	30	5.000	
		2.2 Análise do sangue periférico *in vivo*	Análise	70	12	34		5.000	
3.	Biomonitoramento vegetal, *in vivo*	3.1 Análise físico-química de águas de rios	Análise	3	18	34	20	0	
		3.2 Análise da citotoxicidade *in vivo*	Análise	65	18	34		5.000	
		3.3 Análise da mutagenicidade *in vivo*	Análise	65	18	34		5.000	
		3.4 Produção de relatórios	Relatório-	diversos	10	36			
		3.5 Produção de artigos científicos	Artigos	diversos	10	36			
		3.6 Relatório final	Relatório	01	34	36			
TOTAL							**100%**	**101.764,00**	**100%**

Assinatura do Representante Legal da Instituição Proponente

Assinatura do Coordenador do Projeto

13.5 PUBLICO ALVO

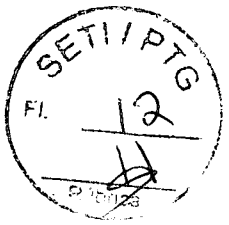
O presente projeto visa atingir os seguintes públicos-alvo da região metropolitana de Maringá-PR:

- Agricultores, expostos ocupacionalmente, pela aplicação e manuseio de herbicidas;

- Famílias de agricultores, residentes próximos às áreas de aplicação dos herbicidas (exposição indireta);

- Indivíduos que consomem alimentos e água contaminados por herbicidas;

- Meio ambiente, em especial os corpos de água, por receberem os lixiviados das lavouras, que impactam diretamente na vida da fauna e flora que dependem das águas, inclusive o próprio ser humano.



13.6 METODOLOGIA PARA EXECUÇÃO DO PROJETO

Os experimentos que seguem serão realizados com soluções diluídas dos herbicidas glifosato, atrazina e 2,4-D, de acordo com as concentrações empregadas nos tratamentos das culturas e definidas em ensaios-piloto e baseadas em revisão da literatura, individualmente. Também será realizado um teste com um mix feito da mistura dos três herbicidas juntos. Em todos os casos, será realizado um grupo controle (controle negativo) e, quando necessário, um controle positivo com uma substância reconhecidamente citotóxica/mutagênica/genotóxica.

SETI / PTO
Fl. 13
Rubrica

13.4.1 Teste do Micronúcleo em Mucosa Bucal Humana, in vivo

13.4.1.1 População de Estudo e Grupo Controle

O estudo será realizado pelo Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental (LMMA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEM (COPEP), mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo participante.

Os indivíduos participantes do estudo deverão responder a um questionário sobre a sua saúde pessoal (Instrumento de Coleta de Dados). Dados sobre características pessoais, saúde, dieta e estilo de vida serão considerados [versão em português de um questionário adaptado, recomendado pela International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens (CARRANO e NATARAJAN, 1988) e mantidos em confidencialidade e sigilo pela equipe de pesquisa. Nas publicações decorrentes deste estudo será preservado o anonimato dos participantes.

Farão parte da população de estudo para o grupo de sujeitos expostos, aproximadamente 40 indivíduos, cujos critérios de inclusão são: residir na região metropolitana de Maringá (PR) trabalhar no campo/lavoura, de ambos os sexos, ter idade acima de 18 anos, não ter realizado exame de raios-X nos últimos 6 meses, não possuir feridas na cavidade oral, e aceitar participar voluntariamente da pesquisa e assinar o TCLE. Um grupo controle de aproximadamente 20 indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos, saudáveis, não fumantes, não expostos ao exame de raios-X nos últimos 6 meses, que não possuam feridas na cavidade oral, sem histórico de doenças crônicas, sem contato com produtos tóxicos e/ou defensivos agrícolas, que residam na área urbana da região de Maringá (PR), que aceitem participar voluntariamente da pesquisa e assinem o TCLE.

13.4.1.2 Teste do Micronúcleo em Mucosa Oral

O teste será realizado junto com a coleta dos dados dos questionários sendo, aproximadamente, um total de 60 indivíduos divididos em dois grupos (Controle - 20 e Pacientes - 40). Os voluntários deverão primeiramente ser instruídos sobre a validade e importância do estudo, ler e assinar o TCLE.

Para a coleta das amostras das células da mucosa bucal, primeiramente os participantes do estudo, antes da coleta das células, deverão fazer bochecho com água.

O procedimento para coletar uma pequena quantidade de células da mucosa oral é feito pelo pesquisador usando luvas descartáveis para cada coleta, visando proteger o coletor e o doador de qualquer possibilidade de contaminação. O procedimento é indolor, não invasivo e rápido, sendo realizado com uma escova de cerdas macias apropriada (cytobrush), estéril e descartável. Durante a coleta o pesquisador com uma leve fricção girará a escova levemente 20 vezes de cada lado da mucosa oral - uma escova para cada bochecha – depois cortará o cabo das escovas (2 escovas/indivíduo/em um tubo) para que estas fiquem no tubo Falcon imersas em 8 mL de etanol 99,8%. Esse procedimento não agride a mucosa oral, não sangra e não oferece nenhum prejuízo para a saúde do voluntário e os riscos envolvidos e o incomodo da coleta são considerados mínimos.

Posteriormente as células da mucosa oral, uma vez coletadas, serão transportadas, em caixas próprias, com os devidos cuidados de medidas de segurança para a UEM, direto para o laboratório onde será realizado o processamento do material, montagem, coloração e análise das laminas.

Para isso primeiramente, o material será homogeneizado com o auxílio do vórtex durante 30 segundos. Posteriormente, as escovas serão retiradas dos tubos; e estes centrifugados por 10 minutos a 1500 rpm. Após, o sobrenadante é removido e adicionado ao sedimento 5 mL de tampão de mucosa (1,6g Tris-HCl, 1,2g EDTA, 37,2g NaCl, água MilliQ [q.s.p. 1L], pH 7,0), para a ressuspensão celular, em seguida as células são fixadas, adicionando-se 4 mL de etanol/ácido acético (3:1) em cada tubo por 10 minutos. Para o preparo das lâminas, o material será centrifugado, o sobrenadante retirado, sendo confeccionadas 2 lâminas/individuo, utilizando o método de gotejamento com auxílio de uma pipeta Pasteur (todo o material

biológico coletado é utilizado nesse processo de preparo das lâminas).

A próxima etapa é a coloração das lâminas, que possui as seguintes etapas: As lâminas, devidamente identificadas com o código de cada voluntário, são colocadas por 1 minuto em uma cuba com solução de etanol 50% (em H2O MilliQ ou destilada); Transferidas para uma cuba com etanol 20%, por 1 minuto; Lavadas por 2 minutos em cuba com H2O MilliQ ou destilada; Tratadas por 30 minutos com HCl 5M; Lavadas com água corrente por 3 minutos; Mergulhadas em uma cuba com reativo de Schiff por 1 hora, em fase escura; Lavadas em água corrente por 5 minutos; Lavadas em H2O MilliQ ou destilada, por 1 minuto; Contracoradas com Fast Green 0,2%, mergulhando as lâminas na solução por aproximadamente 5 segundos e posteriormente enxaguadas com H2O MilliQ ou destilada; Por último elas são secadas gentilmente em papel de filtro sem pressionar e posteriormente deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos para terminar o processo de secagem, então ocorre a montagem da lâmina com lamínula utilizando Permount, e posteriormente analisadas em microscopia de luz (objetiva de 100x, de imersão).

13.4.1.3 Análise das Lâminas

Os critérios para identificação, análise e contagem dos diferentes tipos celulares de células esfoliadas da mucosa bucal, seguirão os padrões recomendados por Bolognesi et al. (2013).

- Células basais e diferenciadas

Células basais

São as menores entre as células esfoliadas da mucosa bucal, o núcleo é maior, o citoplasma é mais arredondado e de coloração mais intensa do que as células diferenciadas. Estas células podem conter MNs e/ou nuclear buds. A frequência desse tipo celular reflete a atividade proliferativa da mucosa bucal, podendo variar em função da intensidade aplicada no momento da coleta da amostra.

Células diferenciadas

Incluem células diferenciadas transicionais e terminais, correspondendo ao maior número de células na amostra, podendo ser contabilizadas juntas ou separadas. Estas células podem conter MNs e/ou nuclear buds.

- Células diferenciadas transicionais

São intermediárias entre as células basais e as diferenciadas terminais, são maiores que as células basais e menores que as diferenciadas terminais, o citoplasma pode ser angular e de coloração mais clara que as células basais.

- Células diferenciadas terminais

Corresponde ao grau máximo de diferenciação do tecido, são as maiores células observadas na amostra, com o citoplasma angular e plano, por vezes dobrado nas bordas, de coloração mais clara que as células basais (Fig. 1C).

Critérios para identificação e contagem de células binucleadas (BN)

Células binucleadas possuem dois núcleos de mesmo tamanho, morfologia, textura e padrão de coloração, normalmente próximos, às vezes podendo se tocar. Os mecanismos prováveis de formação de células BN são: falha na citocinese por não formação do anel de estrangulamento de actina, atraso no ciclo celular por não segregação de cromossomos, disfunção nos telômeros ou não disjunção mitótica. Assim, a razão de células binucleadas: mononucleadas é um biomarcador efetivo para detectar falhas na citocinese e uma maior suscetibilidade à aneuploidia (Fig. 2D).

Critérios para identificação e contagem dos diferentes tipos celulares com anomalias nucleares associadas à morte celular

- Células com cromatina condensada (CC)

Células normalmente diferenciadas, caracterizadas por um padrão estriado no núcleo, em virtude da condensação da cromatina, que apresenta pouca ou nenhuma atividade transcricional e está associada com o processo de apoptose. Neste caso, não são considerados MNs ou nuclear buds.

- Células cariorréticas (CR)

Células normalmente diferenciadas, caracterizadas por uma maior agregação da cromatina em relação às células CC. O padrão salpicado do núcleo é um indicativo da desintegração nuclear típica do estágio tardio de apoptose. Neste caso, não são considerados MNs ou nuclear buds.

- Células picnóticas (PN)

São células diferenciadas terminais com um núcleo pequeno, enrugado e intensamente corado. A picnose representa um estágio de condensação da cromatina irreversível em células que estão em apoptose, que provavelmente precede a cariorrese, embora seu significado biológico e os mecanismos de formação sejam ainda pouco conhecidos.

• Células cariolíticas (CL)

São células diferenciadas terminais, aparentemente sem núcleo (coloração negativa para Feulgen), que pode se diferenciar do citoplasma por um aspecto de fantasma. A cariolise é o estágio de desintegração completa do núcleo que ocorre nos estágios finais de apoptose ou necrose (Fig. 1H).

Critérios para identificação e contagem de células com anomalias nucleares indicativas de instabilidade cromossômica e danos ao DNA

• Células com MN

Estas células apresentam um ou mais MNs além do núcleo principal, com mesma textura e padrão deste; são corpos redondos ou ovais, positivos para a coloração de Feulgen, e não podem estar conectados ao núcleo principal. Podem aparecer em células mono ou binucleadas (Fig. 1I).

• Células com nuclear buds (NBUDs)

Estas células apresentam brotos nucleares conectados diretamente ao núcleo principal (Fig. 1J). Quando a conexão se dá por uma ampla ou estreita ponte nucleoplasmática, podem ser chamados de "broken eggs" (BE, Fig. 1K). NBUDs possuem a mesma textura e padrão de coloração do núcleo principal e acredita-se que sua formação esteja envolvida em processos de eliminação de material nuclear excessivo, como reparos de DNA complexos não resolvidos ou de DNA amplificado e segregado para a periferia do núcleo.

13.4.1.4 Análise Estatística

Para as análises estatísticas serão contabilizadas 1000 células por indivíduo, em teste cego, e os valores absolutos serão submetidos ao programa de análise estatística Instat, para a realização da análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey (α=0,05), para múltiplas comparações entre os grupos controle e dos pacientes

13.4.1.5 Cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa intitulada "Biomonitoramento do uso de Agroquímicos em Trabalhadores Rurais (cultivo convencional e orgânico) da região de Maringá pelo teste de Micronúcleo Bucal" conduzida pela Profª Drª Veronica Elisa Pimenta Vicentini da Universidade Estadual de Maringá. O objetivo da pesquisa é analisar os impactos do uso dos agroquímicos na saúde dos trabalhadores rurais. Os defensivos agrícolas são substâncias que apresentam fatores de risco para a saúde da população podendo causar intoxicações e doenças, tais como o câncer. Para isto a sua participação é muito importante, e ela se daria da seguinte forma: Será necessário responder um questionário individual sobre exposição ocupacional e saúde pessoal, com duração de aproximadamente 10 minutos. Seu anonimato será preservado e seu nome não será divulgado. Em seguida, será realizada a coleta de uma pequena quantidade de células da mucosa bucal/oral com uma escova de cerdas macias, apropriada, estéril, descartável, e com o uso de luvas descartáveis para cada coleta. Este procedimento será feito por profissional habilitado, e é um procedimento indolor, não invasivo e rápido. Esse procedimento não agride a mucosa oral, não sangra e não oferece nenhum prejuízo para a saúde. Os riscos envolvidos e o incomodo da coleta são considerados mínimos. As amostras serão conduzidas ao Laboratório da UEM para preparo de material citológico, a fim de serem analisados parâmetros celulares, ou seja, investigar as células da mucosa oral e seu padrão celular. Após análise todas as amostras serão armazenadas em um setor especifico do laboratório, por 3 anos e posteriormente serão descartadas em local especifico e destruídas por empresa apropriada.

Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo recusar-se a participar, ou mesmo desistir, em qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa, e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade na destinação final dos mesmos.

Benefícios esperados: A sua participação é muito importante, pois os dados coletados por meio dos questionários e dos testes ajudarão a compreender os efeitos do uso dos agroquímicos sobre a saúde humana, além disso você estará contribuindo para a construção do conhecimento.

Caso tenha mais dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos, pode nos contatar nos endereços abaixo ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da UEM, cujo endereço consta deste documento. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor e forma, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada, entregue a você.

Além da assinatura nos campos específicos pelo pesquisador e por você, solicitamos que sejam rubricadas todas as folhas deste documento. Isto deve ser feito por ambos (pelo pesquisador e por você, como sujeito ou responsável pelo sujeito de

SETI/PTC Fl. Rubrica

pesquisa) de tal forma a garantir o acesso ao documento completo.

Eu,.....(nome por extenso do sujeito de pesquisa) declaro que fui devidamente esclarecido e concordo em participar VOLUNTARIAMENTE da pesquisa coordenada pela Profª Drª Veronica Elisa Pimenta Vicentini.

_____ Data:.....

Assinatura ou impressão datiloscópica

Eu,.....(nome do pesquisador ou do membro da equipe que aplicou o TCLE), declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto de pesquisa supra nominado.

_____ Data:.....

Assinatura do pesquisador

Dúvidas com relação à pesquisa esclareça com o pesquisador:

Nome: Profª Drª Veronica Elisa Pimenta Vicentini

Endereço: Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular

Avenida Colombo 5790, bloco H67 sala 11, Jardim Universitário

CEP 87020-900 – Maringá-PR - Brasil

Telefone: (44) 3011-4687 Email: 94.fabiola@gmail.com

Dúvidas com relação aos aspectos éticos da pesquisa poderá ser esclarecida com o Comitê Permanente de Ética em Pesquisa (COPEP) envolvendo Seres Humanos da UEM, no endereço abaixo:

COPEP/UEM - Universidade Estadual de Maringá.

Av. Colombo, 5790. Campus Sede. Bloco da Biblioteca Central (BCE)

CEP 87020-900. Maringá-PR. Tel: (44) 3261-4687 E-mail: copep@uem.br

13.4.2 Testes em culturas de células humanas HepG2/C3A, in vitro

13.4.2.1Culturas celulares

As linhagens celulares tumorais de hepatocarcinoma humano, HepG2/C3A (Cat. No. 0291), serão obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, livres de contaminação por micoplasma. As linhagens serão cultivadas em frascos de cultura de 25cm2 contendo meio de cultura completo (DMEM suplementado com 10% de SBF e 1 mL/L de solução antibiótica/antimicótica), e mantidas em incubadora de CO2 (5%), com umidade de 95%, à 37ºC. Nestas condições, o ciclo celular de ambas as linhagens é de aproximadamente 24 horas. Para os experimentos serão utilizadas células em fase de crescimento logarítmico.

13.4.2.2 Teste de citotoxicidade – MTT

Para o teste de citotoxicidade será realizado o ensaio do MTT. Serão utilizadas placas de cultura celular de 96 poços, onde em cada poço serão semeadas 104 células HepG2/C3A, com exceção dos poços controle sem células (branco). Após estabilização, o meio de cultura será descartado e adicionado 100 µL de meio completo nos grupos controle e tratamentos. Após 24 ou 48 h de incubação, o meio de cultura será substituído por 100 µL de meio de cultura, acrescido de MTT (0,2 mg/mL). A placa será incubada por mais 4 h antes do descarte do meio contendo MTT, seguido da adição de 100 µL de DMSO, para solubilização dos cristais de formazan. A leitura será realizada em leitor de microplacas (Labtech) a 550nm. A viabilidade celular será estimada com base na absorbância do controle (Atratamento/Acontrole x 100). Os experimentos serão realizados em triplicata, em duas repetições técnicas.

13.4.2.3 Ensaio do cometa

Este ensaio consiste na lise de células fixadas em gel de agarose para posterior eletroforese, com objetivo de promover a migração de fragmentos de DNA, permitindo assim, sua identificação. Para este ensaio serão semeadas 5x105 células HepG2/C3A em 5 mL de meio de cultura completo. Após 24 horas, o meio de cultura será substituído por meio completo novo nos grupos controle e tratamentos. Após 3 h de exposição, as células serão lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas (300 µL, 0,1%), centrifugadas (1250 rpm, 5 min) e ressuspendidas em 0,5 mL de meio de cultura. Em um microtubo serão homogeneizados 20 µL de suspensão celular e 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%, 37º C),

depositando este material em uma lâmina pré-gelatinizada com agarose (1,5%), cobrindo com lamínula. Após 20 min, a lamínula será removida, procedendo-se a lise (NaCl 2,5 M, 100 EDTA mM, Tris 10 mM, pH 10; 1% Triton X-100, 10% DMSO), por 90 min. As lâminas serão depositadas em uma solução tampão alcalina de eletroforese (NaOH 10 N e EDTA 200 mM, pH 13, 20 min), antes da eletroforese (25 V, 300 mA, 20 min). Subsequentemente, as lâminas serão neutralizadas (Tris 0,4 M, pH 7,5, 15 min) e coradas com 30 µL de brometo de etídeo (2 µg/mL).

A análise será feita em microscopia de fluorescência (laser de excitação 420-490 nm e filtro de barreira 520 nm). A determinação dos danos será feita por análise visual e a classificação foi dividida em quatro categorias: classe 0 – nucleoides não danificados e que não apresentam cauda; classe 1 – nucleoides com cauda menor que o diâmetro do nucleoide; classe 2 – nucleoides com cauda de tamanho entre uma e duas vezes o diâmetro do nucleoide; classe 3 – nucleoides com cauda duas vezes maior que o diâmetro do nucleoide. Células que apresentarem o nucleoide totalmente fragmentado não serão contabilizadas. No total, serão analisadas 100 células por lâmina de três experimentos independentes. O índice de danos (ID) será baseado no comprimento da migração do DNA e calculado como segue: ID = N1 + (2 x N2) + (3 x N3), onde N1, N2 e N3 representam, respectivamente, células com classes de danos 1, 2 e 3.

13.4.2.4 Expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real

Tratamentos

Para análise da expressão gênica, serão semeadas 2x106 células por frasco de cultura (25cm2). Após 24 horas de estabilização, as células serão tratadas por 24 horas com os herbicidas. Para cada tratamento foram realizadas triplicatas biológicas.

Extração do RNA total

O procedimento de extração de RNA total das células será realizado de acordo com as instruções do fabricante do reagente do TRIZOL LS® (Invitrogen).

Após a extração do RNA, será feito o tratamento com DNAse I (Invitrogen). Em seguida será verificada a integridade do RNA. Para isso, o RNA será quantificado em espectrômetro (Biophotometer – Eppendorf) sendo que a razão A260/280 deve estar entre 1.9 e 2.1, e uma corrida de eletroforese (70-80V, 30mA, 25-30 min) em gel de agorose 1% para verificar o padrão de bandas dos RNAs ribossomais 28S e 18S.

Síntese do cDNA

Para a síntese de cDNA, será realizado o seguinte procedimento: a) preparação de um mix contendo: 9,9 µL de água DEPC (cat. 750023 Invitrogen) ; 2 µL de dNTP 2,5mM mix (cat. 18427-088 Invitrogen) ; 1 µL de oligodT 10pmol/µL ; 4 µL de ampão M-MLV ; 0,1 µL de RNAse OutTM (cat. 10777-019 Invitrogen); 1µL de transcriptase reversa M-MLV (cat. 28025-021 Invitrogen) e 2µL RNA total a 500 ng/mL. b) Incubação no termociclador por 50 min, 37ºC, seguido de 15 seg a 70ºC.

PCR em tempo real

Para análise de expressão gênica foi utilizado o método de PCR quantitativa em tempo real. As reações serão realizadas no termociclador PTC 200 DNA Engine Cycler, usando o sistema de detecção Chromo4 (MJ Research). Será utilizado na reação O Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen) (composto fluorescente que se liga à DNA dupla-fita). As condições da PCR no termociclador serão as seguidas: um passo inicial a 50ºC por 1 min, seguido de 95ºC por 3 min, e 35 ciclos a 95ºC por 20 seg, 60ºC por 30 seg e 72ºC por 20 seg, seguidos de 95ºC por 10 seg e 40ºC 1 min. A análise da curva de melting foi realizada no final da reação com temperatura de 50°C a 95°C a cada 0,5 graus por 5 seg.

Os dados serão normalizados com cDNAs de gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) amplificados em cada conjunto de experimentos de PCRs. Todos os experimentos serão realizados com três culturas independentes.

Os dados de expressão gênica serão anotados como valores de Ct (cycle threshold). O valor de Ct refere-se ao número de ciclos de PCR no qual o sinal de fluorescência é detectado e está acima do valor de limiar da curva de amplificação. Valores de Ct são representativos do número de cópias de moléculas de RNA e servem como base para a comparação entre amostras. O limiar (threshold) é posicionado na região de amplificação exponencial ou geométrica das curvas da amplificação onde a eficiência de PCR é maior.

A expressão relativa dos genes analisados será determinada pelo método de Pfaffl através do programa REST©, que utiliza o modelo Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test© para comparar a diferença de expressão entre os tratamentos.

13.4.2.5 Análise estatística

Os resultados serão apresentados como média e desvio padrão, submetidos à análise de variância (one way ANOVA), seguida do teste de Dunnett, pelo software GrafPad® Prism 5. As diferenças serão consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

SETI / PTG
Fl. 19
Rubrica

13.4.3 Teste do Micronúcleo em Medula Óssea de Ratos Wistar, in vivo

13.4.3.1 Animais

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação, os ratos Wistar, Rattus norvegicus, cinco machos, para cada grupo controle e tratado, com 35 dias e com aproximadamente 100g p.c., serão obtidos do Biotério Central-BIT/UEM. Os animais permanecerão durante o tempo de experimentação no Biotério Setorial de Mutagênese do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/UEM, em caixas de polipropileno em sistemas aberto (open cage) 40x30x20 cm (são encaixadas sobre elas, grades de aço inoxidável com as divisórias para colocação de ração e bebedouro), sob condições controladas de temperatura ±25ºC, umidade ±50%, com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação/UEM.

Para o embasamento e definição da metodologia a ser adotada no protocolo de experimentação, serão usados os parâmetros indicados no Guideline do OECD (2014).

Cada grupo de cinco ratos ficará em caixas de polipropileno separadas, sendo a ração Nuvilab, fornecida pelo BIT/UEM e a água filtrada, fornecidos ad libitum, trocadas diariamente.

Controle negativo: um grupo será administrado com 1mL de água/100g p.c., em dose única, via gavagem, por 24 horas (tratamento agudo).

Tratamento de mutagenicidade: um grupo será tratado com ciclofosfamida, na concentração de 1,5mg/1mL de água/100g p.c., via intraperitoneal (i.p.), em dose única, por 24h. Os grupos tratamentos serão tratados com 1mL de três concentrações da solução dos herbicidas/100g p.c., em dose única, via gavagem, por 24 horas.

As três concentrações que serão utilizadas nos testes de mutagenicidade serão estimadas com base em dados da literatura, e adequação para o peso corpóreo dos animais tratados, e serão definidas após a realização de experimentos preliminares, em sistema teste in vitro, em cultura de células metabolizadoras de hepatocarcinoma humano (HepG2/C3A). Estes resultados obtidos nos testes in vitro servirão de embasamento para a definição das concentrações a serem usadas in vivo, dispensando a realização de testes pilotos e com isto reduzindo o número de animais testados.

Neste trabalho será usada para tratar os ratos com os compostos a serem avaliados, a via oral/gavagem, porque é a via semelhante àquela que o homem faz uso. O tratamento feito por injeção intraperitoneal, usado com a ciclofosfamida é um método muito usado de via de administração pela sua simplicidade e pela facilidade para o cálculo da concentração da droga a ser administrada e porque, para muitos agentes, ela tende a maximizar a exposição química na medula óssea.

Para a eutanásia dos animais será aplicado, via intraperitoneal, 0,5mL de thionembutal (1g tiopental sódico/25mL de água destilada).

13.4.3.2 Coleta dos Eritrócitos

Os eritrócitos serão extraídos da medula óssea dos animais, de acordo com a metodologia de MacGregor e colaboradores (1987), com algumas modificações. Imediatamente após a eutanásia do animal, um fêmur será removido e a medula óssea aspirada com auxílio de 1mL de soro fetal bovino. Após extraída, a medula óssea será emulsionada até obter uma suspensão, a qual será transferida para tubos de centrifugação contendo 2mL de soro fetal bovino. A suspensão de medula óssea será centrifugada a 1000 rpm por 10min, o sobrenadante será descartado e o sedimento ressuspendido em uma gota de soro bovino fetal.

13.4.3.3 Preparação Citológica

Após completa homogeneização da medula no soro, esta será centrifugada a 300rpm por 5 min. O sobrenadante será parcialmente descartado e o precipitado de células homogeneizado com pipeta Pasteur. Uma gota de suspensão celular será transferida para uma lâmina de vidro, onde será feito o esfregaço. Após 24h secando a temperatura ambiente, as lâminas serão fixadas com metanol absoluto por 5min e coradas em corante Giemsa por 15 min. Posteriormente, as lâminas

serão lavadas em água corrente para remoção do excesso de corante e secas em condições ambientais over night. Para cada animal serão confeccionadas duas lâminas, posteriormente utilizadas na contagem.

13.4.3.4 Análise das Lâminas

As lâminas serão montadas e analisadas em microscopia de luz com aumento de 1.000x, e o número de células com micronúcleo será determinado a partir da contagem de 2.000 eritrócitos policromáticos por animal. O critério para contagem de micronúcleos será baseado essencialmente no diâmetro, na forma do micronúcleo e na sua coloração, de acordo com Krishna e Hayashi (2000).

13.4.3.5 Teste de Citotoxicidade

O efeito citotóxico dos tratamentos será determinado pela razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos, com contagem mínima de pelo menos 200 eritrócitos por animal.

13.4.3.6 Análise Estatística

O cálculo estatístico será feito pelo teste do qui-quadrado (a=0,05 e p=0,05), para comparar os resultados dos diferentes grupos, a fim de analisar os efeitos citotóxicos e/ou mutagênicos e/ou antimutagênicos sobre este sistema-teste, avaliando o efeito dos agentes em relação aos resultados obtidos para os controles. As análises serão realizadas com auxílio do programa GrafPadInstat.

O número de células a serem analisadas, bem como, o número de animais testados, foram determinados em função do valor mínimo a ser considerado para ter validade e segurança nos testes, e para possibilitar a aplicação de testes estatísticos, conforme indicado nos Guidelines: OECD 474, 2014.

13.4.4 Teste do Micronúcleo em Astyanax altiparanae, in vivo

13.4.4.1 Animais

No experimento serão utilizados juvenis do peixe A. altiparanae obtidos de piscicultura que ainda será determinada. Essa espécie foi escolhida por ser nativa da bacia do rio Paraná, por ter um tamanho adequado para manuseio e análise e por ser considerado um bom bioindicador. Os peixes serão aclimatados por um período mínimo de cinco dias em tanques com cerca de 30 litros com água desclorada, aeração constante e com fotoperíodo de claro e escuro de 12/12h. Durante a aclimatação e o experimento os peixes serão alimentados com ração comercial uma vez ao dia. Os parâmetros físico-químicos da água serão periodicamente monitorados com um analisador de multiparâmetros.

13.4.4.2 Delineamento experimental

Após o período de aclimatação, os peixes (3 animais por aquário) totalizando 9 animais por grupo, serão colocados em aquário de vidro de 30 litros com água desclorada, submetidos num período de 24h, 48h e 72h. Para a realização dos testes, será formado um grupos para cada período experimental, um grupo controle, com peixes expostos somente à água desclorada e diferentes grupos experimentais com os herbicidas avaliados.

Decorrido o tempo de exposição, os peixes serão anestesiados com benzocaína (0,12 g.L -1) e, com auxílio de seringas heparinizadas, será retirado o sangue pela veia caudal. Após a coleta de sangue, os animais serão eutanasiados por secção medular. O projeto com sua metodologia experimental será encaminhado, para futura aprovação, para a comissão de ética no uso de animais – CEUA/UEM.

13.4.4.3 Teste do Micronúcleo

Para a avaliação da mutagenicidade, será realizado o Teste do Micronúcleo, seguindo o protocolo estabelecido pro Grisolia e Cordeiro (2000). Para o mesmo, serão montadas lâminas de esfregaço sanguíneo com o sangue obtido de A. altiparanae. A montagem será feita pelo método de extensão, seguido de fixação em etanol após a secagem. As lâminas serão coradas com acridina orange (0,03%) e analisadas em microscopia de luz.

Para a análise, serão contabilizadas 1.000 células por animal, sendo 9.000 células por tratamento. Todos os corpúsculos de cromatina que apresentarem até 1/3 do tamanho do núcleo serão considerados micronúcleos. Eles devem estar separados do núcleo principal e apresentar mesma coloração e refringência.

13.4.4.4 Análise estatística

Para testar se os danos causados pelo tratamento diferem do controle, será realizado uma análise de variância (ANOVA), comparando as médias de danos de cada grupo, para ambos os testes. Para tais análises, será utilizado o software STATISTICA 7.0.

SETI/PTG
Fl. 20

13.4.5 Teste com Células do Meristema de Raiz de Allium cepa

13.4.5.1 Obtenção dos bulbos de Allium cepa

Pequenos bulbos de cebolas serão adquiridos de uma fonte comercial e colocados para enraizar, em frascos com água a temperatura ambiente (±25°C), aerada, para obtenção de raízes com cerca de 1 a 1,5 cm de comprimento.

13.4.5.2 Protocolo de Tratamento

Antes de cada tratamento, algumas raízes (3 a 5) serão coletadas e fixadas em solução de 3 metanol: 1 ácido acético, que servirão de controle do próprio bulbo, sendo considerado o tempo inicial de 0h (Co–0h). Em seguida, os bulbos serão colocados nas respectivas soluções tratamento por 24h (Tr-24h). Após o tempo de tratamento, serão retiradas algumas raízes (3 a 5) de cada cebola e fixadas. Os bulbos serão colocados novamente em água filtrada, para recuperação de eventuais danos ocorridos, por mais 24h (Re-24h), e posteriormente, as raízes restantes serão retiradas e fixadas.

No grupo controle, as cebolas permanecerão durante todo o período experimental em água filtrada, ocorrendo também coleta das raízes a cada 24h.

13.4.5.3 Preparação Citológica

A técnica que será aplicada no presente trabalho foi descrita por Kihlman (1971), com modificações, usando a reação de Feulgen e coloração com o reativo de Schiff.

As raízes das cebolas foram preparadas, da seguinte maneira:

- Após o tempo de fixação por 24h, as raízes foram lavadas três vezes com água destilada e a hidrólise das raízes feita em HCl 1N à 60°C por 10 min. Para interromper a hidrólise, as mesmas foram lavadas em água destilada por três vezes.
- As raízes foram transferidas para o reativo de Schiff, reação no escuro, por 45 min. Após, foram passadas em água destilada para retirar o excesso do corante.
- Com auxílio de um microscópio estereoscópico, foram isoladas as porções meristemáticas das raízes, as regiões mais intensamente coradas, com um bisturi, desprezando a coifa e a parte restante das raízes, sendo feito o esmagamento do material, com lamínula, em orceína acética. As lâminas foram armazenadas em câmara úmida em freezer por 24h.
- Após, as lamínulas foram descoladas das lâminas em nitrogênio líquido, e as lâminas secas ao ar e montadas permanentes em bálsamo do Canadá.

13.4.5.4 Análise das Lâminas

A análise das lâminas foi realizada, em teste "cego", em microscópio de luz, com objetiva de 40X.

O cálculo do índice mitótico (IM) foi realizado como segue:

IM(%) = Nº céls. em divisão / Nº céls. em interfase + Nº céls. em divisão x 100

Para avaliar as células com alterações morfológicas, estruturais e determinação do IM foram utilizados cinco bulbos para cada controle, tratamento e recuperação, sendo analisadas 1.000 células por bulbo, totalizando 5.000 células por grupo.

13.4.5.5 Análise Estatística

A análise estatística será feita usando o teste do Qui-quadrado (α=0,05).

13.7 PRODUTOS/SERVIÇOS ESPERADOS

- Apesar das campanhas de conscientização sobre a necessidade de uso seguro e controlado de herbicidas, sabe-se que muitos agricultores ainda apresentam alguma resistência quanto ao uso de equipamentos de proteção individual e também no armazenamento e descarte adequado de embalagens de herbicidas. Assim, a produção de material educativo, de conhecimento e conscientização, como uma cartilha, acerca dos perigos relacionados ao uso/exposição/descarte indevido de agrotóxicos, pode contribuir para o uso adequado e a redução da contaminação do ambiente e daqueles que trabalham diretamente nas lavouras. Objetivando uma diminuição de efeitos colaterais e com isso, economicamente, um custo maior para a sociedade em termos da saúde dos indivíduos expostos.
- Biomonitoramento humano e ambiental: de indivíduos expostos ocupacionalmente aos herbicidas e outros agrotóxicos.
- Biomonitoramento de peixes que podem estar contaminados por herbicidas e outros agrotóxicos, principalmente pelo processo de lixiviação.

SETI/PTG
Fl. 21
Rubrica

13.8 CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E DE INOVAÇÃO

- Embasamento científico: em termos de segurança no uso de herbicidas, e uma garantia para o uso sem prejuízo para a manutenção da saúde.
- Caracterização do presente Projeto, na área de Ciências Biológicas e Biotecnologia (Biotecnologia em Saúde Humana e Monitoramento Ambiental), com futuro enfoque na área de Ciências Aplicadas (Biotecnologia e Saúde Coletiva/Saúde Pública/Monitoramento Ambiental), objetivando obter resultados para embasamento futuro e desenvolvimento de novas pesquisas, no sentido de proteção e conscientização dos indivíduos expostos direta ou indiretamente a herbicidas e outros agrotóxicos, e manutenção da saúde e qualidade de vida dos mesmos, além da preservação do meio ambiente.
- Produção de artigos científicos, a serem publicados em revistas nacionais e em periódicos internacionais divulgando os resultados, com seguro embasamento científico, gerando novos conhecimentos e originando indagações para o desenvolvimento de novas pesquisas e projetos.
- Apresentação dos resultados do presente projeto em congressos nacionais e internacionais, nas áreas de Mutagênese e Monitoramento Ambiental e em outros eventos científicos da área, como a agronômica.
- Implementar o estudo com produtos de amplo e indiscriminado uso na natureza, avaliando a necessidade deste tipo de tratamento, sua quantidade e qualidade de uso efetivos, pois quem perde com esta falta de controle e de pesquisas realizadas, é em primeiro lugar, o próprio indivíduo e a população, e em segundo, os próprios governantes em suas diferentes instâncias. - Embasamento científico: em termos de segurança no uso de herbicidas, e uma garantia para o uso sem prejuízo para a manutenção da saúde.
- Caracterização do presente Projeto, na área de Ciências Biológicas e Biotecnologia (Biotecnologia em Saúde Humana e Monitoramento Ambiental), com futuro enfoque na área de Ciências Aplicadas (Biotecnologia e Saúde Coletiva/Saúde Pública/Monitoramento Ambiental), objetivando obter resultados para embasamento futuro e desenvolvimento de novas pesquisas, no sentido de proteção e conscientização dos indivíduos expostos direta ou indiretamente a herbicidas e outros agrotóxicos, e manutenção da saúde e qualidade de vida dos mesmos, além da preservação do meio ambiente.
- Produção de artigos científicos, a serem publicados em revistas nacionais e em periódicos internacionais divulgando os resultados, com seguro embasamento científico, gerando novos conhecimentos e originando indagações para o desenvolvimento de novas pesquisas e projetos.
- Apresentação dos resultados do presente projeto em congressos nacionais e internacionais, nas áreas de Mutagênese e Monitoramento Ambiental e em outros eventos científicos da área, como a agronômica.
- Implementar o estudo com produtos de amplo e indiscriminado uso na natureza, avaliando a necessidade deste tipo de tratamento, sua quantidade e qualidade de uso efetivos, pois quem perde com esta falta de controle e de pesquisas realizadas, é em primeiro lugar, o próprio indivíduo e a população, e em segundo, os próprios governantes em suas diferentes instâncias.

13.9 CONTRAPARTIDA NÃO FINANCEIRA DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

- Contrapartida da Universidade Estadual de Maringá: Água, Luz, Telefone, Intranet-PR, Espaço Físico dos Laboratórios do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/UEM e Salários dos Docentes e da Técnica de Laboratório.
- Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental do DBC (Bloco H67-11): Geladeira Duplex, Câmara de Fluxo Lâminar, Estufa BOD, Estufa de Secagem, Estufa Bacteriológica, pHmetro, Centrífuga, Microscópio de Luz, Microscópio Invertido, Balança Semi-analítica, Balança Analítica, Agitador Magnético, Agitador de Tubos, Pipetador Mecanizado, Banho-Maria, Botijão Criogênico de 20 litros, Sistema de Eletroforese, Computador, Balcões, Mesa, Cadeiras, Armários.
- Laboratório de Microscopia do DBC: Microscópio de Fluorescência.
- Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP/UEM): central de microscopia eletrônica de varredura e processamento de amostras; equipamento *Flex Station*.
- Bloco T-10: alocação dos aquários para aclimatação dos peixes e realização dos experimentos de monitoramento ambiental com estes animais.

13.10 LISTAR OS MUNICÍPIOS ABRANGIDOS PELO PROJETO

Maringá e região metropolitana (Sarandi, Marialva, Mandaguari, Paiçandu, Ângulo, Iguaraçu, Mandaguaçu, Floresta, Doutor Camargo, Itambé, Astorga, Ivatuba, Bom Sucesso, Jandaia do Sul, Cambira, Presidente Castelo Branco, Flórida, Santa Fé, Lobato, Munhoz de Mello, Floraí, Atalaia, São Jorge do Ivaí, Ourizona e Nova Esperança), totalizando 26 municípios, possui uma a área territorial de 5.978.592 km² e população estimada em 764.906 habitantes (IBGE/2013). Além disso, considerando que o Estado do Paraná possui vasto território agrícola, com plantações das principais culturas que são tratadas com os herbicidas avaliados no presente projeto, toda a população do mesmo pode se beneficiar direta ou indiretamente dos resultados desta pesquisa.

13.11 IDENTIFICAR RISCOS QUE PODERÃO PREJUDICAR O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO E SUGERIR PLANO DE CONTINGENCIAMENTO

Risco	Plano de Contingência
Atraso na liberação dos recursos	Início da realização dos experimentos que possam ser executados com os atuais recursos do laboratório.

14. INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES SOBRE A INSTITUIÇÃO PROPONENTE.

HISTÓRICO INSTITUCIONAL

O Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental, lotado no Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá, coordenado pela Profa. Dra. Veronica Elisa Pimenta Vicentini, vem desenvolvendo nos últimos anos diferentes trabalhos relacionados à citotoxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e monitoramento ambiental, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Atualmente, estão sendo desenvolvidas seis dissertações de Mestrado, quatro teses de Doutorado, uma co-orientação de Mestrado e uma de Doutorado, e três trabalhos de iniciação científica, relacionados a estes assuntos:

- Matheus Gimenez Buzo. Genotoxicidade e mutagenicidade de Nanopartículas de prata em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* (Prochilondontidae, Characiformes). Início: 2016. Dissertação (Mestrado profissional em Biologia Comparada) - Universidade Estadual de Maringá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

- Ana Clara Canesin de Almeida. Genotoxicidade e mutagenicidade do herbicida Atrazina e do seu tratamento por fotocatálise heterogênea em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* (Prochilondontidae, Characiformes).. Início: 2016. Dissertação (Mestrado profissional em Biologia Comparada) - Universidade Estadual de Maringá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador).

- Angélica Oliveira Furtado. Investigação do potencial citotóxico e mutagênico de efluentes bruto e tratados de uma lavanderia hospitalar em sistema teste vegetal. Início: 2016. Dissertação (Mestrado profissional em Biotecnologia Ambiental) - Universidade Estadual de Maringá. (Orientador).

- Fabiola Terra Lucio. Biomonitoramento do uso de Agroquímicos em Trabalhadores Rurais da região de Maringá pelo teste do Micronúcleo Bucal. Início: 2017. Dissertação (Mestrado profissional em Biotecnologia Ambiental) - Universidade Estadual de Maringá. (Orientador).

- Paulo Hallef Schneider Syritiuk. Atividade citotóxica e genotóxica do flavonoide Taxifolina em células tumorais renais (786-O).. Início: 2015. Dissertação (Mestrado profissional em Biotecnologia Ambiental) - Universidade Estadual de Maringá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador).

- Mariane Aparecida Franco de Godoy. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica e genotóxica do composto Bromelina em cultura de células de carcinoma renal (786-0). Início: 2016. Dissertação (Mestrado profissional em Biotecnologia Ambiental) - Universidade Estadual de Maringá. (Orientador).

- Elisa Parcero. Avaliação da citotoxicidade de Nanopartículas magnéticas em células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7). Início: 2016. Dissertação (Mestrado profissional em Biotecnologia Ambiental) - Universidade Estadual de Maringá. (Co-orientador).

- Nilson Benedito Lopes. Interação biológica de Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com o radiofármaco Iodo-131 e seu efeito citotóxico sobre células normais e tumorais humanas. Início: 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia Ambiental) - Universidade Estadual de Maringá. (Orientador).

- Jaqueline de Santana da Silva. Avaliação do potencial mutagênico e genotóxico de águas da cultura de arroz irrigado, em eritrócitos de peixes (*Astyanax* sp) e girinos (*Dendropsophus minutus*). Início: 2016. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) - Universidade Estadual de Maringá. (Orientador).

- Mariana Yoshimoto. Efeito citotóxico, genotóxico e citoprotetor/antigenotóxico/radioprotetor do Magnolol, frente ao radiofármaco Iodo-131, sobre células normais (IMR-90) e tumorais (HepG2/C3A e MCF-7) humanas. Início: 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia Ambiental) - Universidade Estadual de Maringá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador).

- Lilian Capelari Soares. Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de suplementos desportivos em células de hepatoma humano. Início: 2015. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) - Universidade Estadual de Maringá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador).

- Karina Midori Endo. Interação biológica de Nanopartículas magnéticas e seu efeito citotóxico sobre células normais e tumorais humanas. Início: 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia Ambiental) - Universidade Estadual de Maringá. (Co-orientador).

- Jonatas Alécio dos Prazeres. Avaliação do potencial citotóxico do composto fenólico Zingerona em sistema-teste *in vitro* de células tumorais de mama humana (MCF-7). Início: 2016. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Maringá. (Orientador).

- Débora Elisa Antunes de Mendonça. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do medicamento Orlistat em cultura de células humanas, normais de pulmão e tumorais de rim. Início: 2016. Iniciação científica (Graduando em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Maringá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. (Orientador).

- Vinicius Rodrigues Camilo da Silva. Avaliação da citotoxicidade do antidepressivo Hidroclorito de Hidroxibupropiona em cultura de células não tumorais de pulmão e de neuroblastoma humanas. Início: 2016. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Maringá, Fundação Araucária. (Orientador).

Trabalhos como estes já resultaram na orientação de 12 dissertações de Mestrado, 5 teses de Doutorado, 116 Monografias de conclusão de curso/Especialização, 32 trabalhos de conclusão de curso/Graduação, e 68 trabalhos de Iniciação Científica.

Além disso, o Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental é o único participante do Estado do Paraná de um projeto nacional que vai determinar a frequência de micronúcleos na mucosa bucal da população brasileira:

- Determinação da frequência basal de micronúcleos em células da mucosa bucal da população brasileira. PARECER PLATAFORMA BRASIL: APROVADO (890.188 DE 26/11/2014) / CAEE 35148214.6.0000.5349.

As principais publicações científicas em periódicos nacionais e internacionais dos últimos 10 anos somam 35 trabalhos, listados a seguir:

- DÜSMAN, E. ; ALMEIDA, I.V. ; Pinto, E.P. ; Lucchetta, L. ; VICENTINI, V.E.P. . Influence of processing and storage of integral grape juice (*Vitis labrusca* L.) on its physical and chemical characteristics, cytotoxicity, and mutagenicity in vitro. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH, v. 16, p. 1-12, 2017.

- CAVALCANTE, FLAVIA MARIA LIMA ; ALMEIDA, IGOR VIVIAN ; DÜSMAN, Elisângela ; MANTOVANI, Mário Sérgio ; VICENTINI, VERONICA ELISA PIMENTA . Cytotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of the gentisic acid on HTC cells. DRUG AND CHEMICAL TOXICOLOGY, v. 1, p. 1-7, 2017.

- ORLANDELLI, RAVELY CASAROTTI ; CORRADI DA SILVA, MARIA DE LOURDES ; VASCONCELOS, ANA FLORA DALBERTO ; ALMEIDA, IGOR VIVIAN ; VICENTINI, VERONICA ELISA PIMENTA ; PRIETO, ALICIA ; HERNANDEZ, MARIA DOLORES DIAZ ; AZEVEDO, JOÃO LÚCIO ; PAMPHILE, João Alencar . β-(1→3,1→6)-d-glucans produced by *Diaporthe* sp. endophytes: Purification, chemical characterization and antiproliferative activity against MCF-7 and HepG2-C3A cells. International Journal of Biological Macromolecules, v. 94, p. 431-437, 2017.

- IARK, D. ; GODOY, M. A. F. ; FURTADO, A. O. ; VICENTINI, V.E.P. ; Conte, Hélio . Contaminação de águas pluviais poe efluentes de funilaria e pintura automobilística. REVISTA UNINGÁ, v. 51, p. 110-116, 2017. Citações:2

- ALMEIDA, I. V. ; Cavalcante, F.M.L. ; VICENTINI, V.E.P. . Different responses of vanillic acid, a phenolic compound, in

HTC cells: cytotoxicity, antiproliferative activity, and protection from DNA-induced damage.. Genetics and Molecular Research, v. 15, p. gmr15049388, 2016.

- DÜSMAN, Elisângela ; ALMEIDA, I. V. ; TONIN, LILIAN TATIANI ; VICENTINI, V.E.P. . In vivo antimutagenic effects of the Barbados cherry fruit (*Malpighia glabra* Linnaeus) in a chromosomal aberration assay.. Genetics and Molecular Research, v. 15, p. gmr15049036, 2016.

- COSTA, A. C. ; DOMINGUES, Giovana ; DÜSMAN, Elisângela ; ALMEIDA, I. V. ; VICENTINI, V. E. P. . Cytotoxicity of Waters of the River Peixe (São Paulo-Brazil), in Meristematic Root Cells of *Allium cepa* L.. Bioscience Journal (Online), v. 31, p. 248-258, 2015.

- DUSMAN, Elisângela ; ALMEIDA, I. V. ; MARIUCCI, Rosinete Gonçalves ; MANTOVANI, Mário Sérgio ; VICENTINI, V. E. P. . Cytotoxicity and mutagenicity of fluoxetine hydrochloride (Prozac), with or without vitamins A and C, in plant and animal model systems. Genetics and Molecular Research, v. 13, p. 578-589, 2014.

- ALMEIDA, I. V. ; DOMINGUES, Giovana ; SOARES, L. C. ; DÜSMAN, ELISÂNGELA ; VICENTINI, V. E. P. . Evaluation of cytotoxicity and mutagenicity of the benzodiazepine flunitrazepam *in vitro* and *in vivo*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (Impresso), v. 50, p. 251-256, 2014.

- DUSMAN, Elisângela ; LUZZA, M. ; SAVEGNAGO, L. ; LAUXEN, D. ; VICENTINI, V. E. P. ; TONIAL, I. B. ; SAUER, T. P. . *Allium cepa* L. as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná, Brazil.. Environmental Monitoring and Assessment (Dordrecht. Online), v. 186, p. 1793-1800, 2014. Citações:3|6

- DÜSMAN, ELISÂNGELA ; BERTI, ALESSANDRA PAIM ; MARIUCCI, Rosinete Gonçalves ; Lopes, Nilson Benedito ; TONIN, LILIAN TATIANI ; VICENTINI, VERONICA ELISA P. . Radioprotective effect of the Barbados Cherry (*Malpighia glabra* L.) against radiopharmaceutical Iodine-131 in Wistar rats in vivo. BMC Complementary and Alternative Medicine (Online), v. 14, p. 41-59, 2014. Citações:2|3

- BERTI, A.P. ; DÜSMAN, E. ; MARIUCCI, R.G. ; LOPES, N.B. ; VICENTINI, V.E.P. . Antimutagenic and radioprotective activities of beta-carotene against the biological effects of iodine-131 radiopharmaceutical in Wistar rats. Genetics and Molecular Research, v. 13, p. 2248-2258, 2014. Citações:3|2

- VIANA, LILIAN ÁVILA ; DÜSMAN, ELISÂNGELA ; VICENTINI, VERONICA ELISA PIMENTA . Mutagenicity and cytotoxicity of liquid waste, press water and pond water, produced in the cassava flour industry, and of antitoxic sodium thiosulfate. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 94, p. 453-458, 2014.

- GUIDOTI, D.T. ; GUIDOTI, D.G.G. ; BERTI, A. P. ; DÜSMAN, ELISÂNGELA ; VICENTINI, V.E.P. . Potencial mutagênico do chá de folhas e do suco de atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.) em células hematopoiéticas de ratos Wistar. Revista Brasileira de Biociências (Online), v. 12, p. 1-4, 2014.

- GUIDOTI, D.G.G. ; GUIDOTI, D.T. ; BERTI, A.P. ; DÜSMAN, Elisângela ; VICENTINI, V. E. P. . Potencial mutagênico do extrato aquoso de *Allium cepa* L. em células hematopoiéticas de ratos Wistar.. Revista Brasileira de Biociências (Online), v. 12, p. 5-8, 2014.

- DÜSMAN, Elisângela ; ALMEIDA, I. V. ; LUCCHETTA, L. ; VICENTINI, V. E. P. . Effect of Processing, Post-Harvest Irradiation, and Production System on the Cytotoxicity and Mutagenicity of *Vitis labrusca* L. Juices in HTC Cells. Plos One, v. 9, p. e107974, 2014. Citações:1|2

- ALMEIDA, I. V. ; DUSMAN, Elisângela ; HECK, M. C. ; PAMPHILE, João Alencar ; Lopes, Nilson Benedito ; TONIN, L. T. D. ; VICENTINI, V. E. P. . Cytotoxic and mutagenic effects of iodine-131 and radioprotection of acerola (*Malpighia glabra* L.) and beta-carotene *in vitro*. Genetics and Molecular Research, v. 12, p. 6402-6413, 2013. Citações:4|5

- DUSMAN, Elisângela ; BERTI, A.P. ; SOARES, L. C. ; VICENTINI, V. E. P. . Cytotoxicity and mutagenicity of cola and grape flavored soft drinks in bone marrow cells of rodents.. Ciência e Tecnologia de Alimentos (Impresso), v. 33, p. 122-126, 2013. Citações:1|1

- DÜSMAN, ELISÂNGELA ; ALMEIDA, IGOR VIVIAN DE ; COELHO, ANA CAROLINA ; BALBI, THIAGO JOSÉ ; DÜSMAN TONIN, LILIAN TATIANI ; VICENTINI, VERONICA ELISA PIMENTA . Antimutagenic Effect of Medicinal Plants *Achillea millefolium* and *Bauhinia forficata In Vivo*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print), v. 2013, p. 1-6, 2013. Citações:1|3

- PERON, Ana Paula ; MARIUCCI, Rosinete Gonçalves ; DE ALMEIDA, IGOR VIVIAN ; DÜSMAN, Elisângela ; MANTOVANI, Mário Sérgio ; VICENTINI, VERONICA ELISA PIMENTA . Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and

antimutagenicity of a natural antidepressant, *Hypericum perforatum* L. (St. John?s wort), on vegetal and animal test systems. BMC Complementary and Alternative Medicine (Online), v. 13, p. 97-105, 2013. Citações:3|6

- DUSMAN, Elisângela ; GONÇALVES, Larissa Aparecida ; REUSING, Ana Flávia ; MARTIN, Paula Garcia ; MARIUCCI, Rosinete Gonçalves ; VICENTINI, V. E. P. . Cytotoxic potential of waters of the streams Mandacaru, Maringá, Miosotis and Nazareth in the urban area of Maringá, Paraná State, Brazil. Acta Scientiarum. Biological Sciences (Impresso), v. 34, p. 311-318, 2012. Citações:3

- DUSMAN, Elisângela ; BERTI, A.P. ; SOARES, L. C. ; VICENTINI, V. E. P. . The Main Mutagens and Carcinogens Agents of Human Exposure. SaBios (Faculdade Integrado de Campo Mourão. Online), v. 7, p. 66-81, 2012.

- HECK, M. C. ; VIANA, Lilian Avila ; VICENTINI, V. E. P. . Importance of *Copaifera* sp. (COPAÍBA) Oil. SaBios (Faculdade Integrado de Campo Mourão. Online), v. 7, p. 82-90, 2012.

- FERREIRA, C.F. ; FRUEH, A.B. ; DUSMAN, ELISÂNGELA ; HECK, M. C. ; VICENTINI, V. E. P. . Evaluation of Cytotoxicity of Varginha (Califórnia-PR) and Tabatinga (Mandaguari-PR) Water Streams in *Allium cepa* L.. SaBios (Faculdade Integrado de Campo Mourão. Online), v. 7, p. 46-54, 2012.

- DUSMAN, Elisângela ; SILVA, M. F. ; BERTI, A.P. ; MARIUCCI, Rosinete Gonçalves ; MANTOVANI, Mário Sérgio ; VICENTINI, V. E. P. . Investigation of the Cytotoxic and Mutagenic Effects of *Malpighia glabra* L. (Barbados Cherry) Fruit Pulp and Vitamin C on Plant and Animal Test Systems. Ciência e Tecnologia de Alimentos (Impresso), v. 32, p. 405-411, 2012.

- CIRCUNVIS, B. C. ; HECK, M. C. ; VICENTINI, V. E. P. . INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DAS ÁGUAS SUPERFICIAIS DO RIBEIRÃO ATLÂNTICO (MADAGUAÇU-PR) EM *Allium cepa* L.. SaBios (Faculdade Integrado de Campo Mourão. Online), v. 7, p. 7-14, 2012.

- HECK, M. C. ; VICENTINI, V. E. P. . *Linum usitatissimum* L. ? Linhaça.. Revista UNINGÁ Review (Online), v. 11, p. 39-45, 2012.

- DUSMAN, Elisângela ; FARIA, Juliana Sala de ; TOLEDO, Fabiana de ; MAZETI, Camila Montoro ; GONÇALVES, Marcus Eduardo Kamide ; VICENTINI, V. E. P. . Vegetal test-system investigation on cytotoxicity of water from urban streams located in the northeastern region of Maringá, Paraná State, Brazil.. Acta Scientiarum. Biological Sciences (Impresso), v. 33, p. 71-77, 2011.

- DUSMAN, Elisângela ; BERTI, A.P. ; MARIUCCI, Rosinete Gonçalves ; Lopes, Nilson Benedito ; VICENTINI, V. E. P. . MUTAGENICITY OF DIAGNOSTIC AND THERAPEUTICAL DOSES OF RADIOPHARMACEUTICAL IODINE-131 IN WISTAR RATS.. Radiation and Environmental Biophysics, v. 50, p. 579-584, 2011. Citações:3|4

- PERON, Ana Paula ; FELIPES, Joice ; MATTGE, Giselle ; CANTAGALLI, Liriana Belizário ; MARIUCCI, Rosinete Gonçalves ; VICENTINI, V. E. P. . Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less e *Solanum melongena* L., em células de medula óssea de ratos Wistar. Revista Brasileira de Biociências, v. 6, p. 127-130, 2008. Citações:3

- PERON, Ana Paula ; MARCUS, M. C. ; CARDOSO, Sibele Cardoso ; VICENTINI, V. E. P. . Avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Camellia sinensis* L. e *Cassia angustifolia* Vahl, em sistema teste vegetal. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, v. 12, p. 51-54, 2008.

- PERON, Ana Paula ; FRANZONI, J. F. S. ; MANTOVANI, D. ; VICENTINI, V. E. P. . Utilização das isoflavonas presentes na soja (*Glycine max* (L) Merril) na prevenção e tratamento de doenças crônicas uma breve revisão. Arquivos do Mudi (Online), v. 12, p. 1-3, 2008.

- PERON, Ana Paula ; Camilloto, F. G. ; VICENTINI, V. E. P. . Citotoxicidade do peróxido de carbamida em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. - Potencial citotóxico de substâncias químicas. Saúde e Pesquisa, v. 1, p. 229-232, 2008.

- PERON, Ana Paula ; FELIPES, Joice ; OLIVEIRA, A. C. S. ; VICENTINI, V. E. P. . Investigação da Citotoxicidade e Mutagenicidade do Hipocolesteremiante Sinvastatina em Células de Ratos Wistar e de *Allium cepa* L.. Revista Brasileira de Toxicologia, v. 21, p. 93-96, 2008. Citações:1

- CARDOSO, Sibele Cardoso ; VICENTINI, V. E. P. ; PERON, Ana Paula . Avaliação da citotoxicidade do antidepressivo Tricíclico Tryptanol, em células meristemáticas de *Allium cepa*. Revista Uningá, v. 14, p. 161-168, 2007.

15. DECLARAÇÃO DE COMPROMISSO INSTITUCIONAL

SETI/PTG Fl. 26 Rubrica

TERMO DE COMPROMISSO

Na qualidade de representante legal do proponente, estou de acordo com a proposta apresentada e declaro, para todos os fins de direito, conhecer as normas ora fixadas pelo Fundo Paraná, assim como inexistir qualquer débito em mora ou situação de inadimplência com o Tesouro Nacional ou qualquer órgão ou entidade da Administração Pública Federal, Estadual e Municipal, que impeça a transferência de recursos oriundos do Fundo Paraná.

Mauro Luciano Baesso

Reitor

Veronica Elisa Pimenta Vicentini

Coordenadora Técnico/Científico do Projeto da Instituição Proponente

Maria Helena Ambrósio Dias

Responsável Administrativo/Financeiro do Projeto da Instituição Proponente

Assinatura do Engenheiro Civil Responsável Pela Obra

Maria Regina da Fonseca

Responsável pelo Controle Interno da Instituição Proponente

Assinatura do Representante Legal da Instituição Parceira

ANEXO 1 - PLANO DE APLICAÇÃO
QUADRO RESUMO
Unidade Gestora do Fundo Paraná - UGF

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

TÍTULO DO PROJETO: BIOMONITORAMENTO HUMANO E AMBIENTAL DOS HERBICIDAS GLIFOSATO, ATRAZINA E 2,4-D: CITOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE, GENOTOXICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA, IN VITRO E IN VIVO

INSTITUIÇÃO PROPONENTE: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
COORDENADOR: PROFA. DRA. VERONICA ELISA PIMENTA VICENTINI

	Elementos de Despesa		UGF	%	Rendimentos Financeiros*
1. Outras Despesas de Custeio	1.1. Diárias	3390.14.00	0	0%	0
	1.2. Passagens e despesas de locomoção	3390.33.00	0	0%	0
	1.3. Serviços de Consultoria	3390.35.00	0	0%	0
	1.4. Material de Consumo **NACIONAL**	3390.30.00	33.764	33%	0
	1.5. Material de Consumo **IMPORTADO/ USO CONTROLADO**	3390.30.00	0	0%	0
	1.6. Serviços de Terceiros - Pessoa Física	3390.36.00	0	0%	0
	1.6.1. Obrigações Tributárias e Contributivas	3390.4700	0	0%	0
	1.7. Bolsas	3390.18.00	0	0%	0
	1.7.1 Auxílio Financeiro - Bolsas	3390.18.00	0	0%	0
	1.8. Serviços de Terceiros - Pessoa Jurídica	3390.39.00	0	0%	0
		Subtotal Custeio	33.764	33%	0
2. Investimentos	2.1. Equipamentos e Material Permanente **NACIONAL**	4490.52.00	68.000	67%	0
	2.2. Equipamentos e Material Permanente **IMPORTADO**	4490.52.00	0	0%	0
	2.3. Obras e Instalações	4490.51.00	0	0%	0
		Subtotal Investimentos	68.000	67%	0
		Total Geral	101.764	100%	0

Atender ao disposto no ATO ADMINISTRATIVO N° 03/16/UGF de 11/11/2016 , disponível em: www.seti.pr.gov.br/fundoparaná/atosadministrativos.

**** Esta coluna deverá ser preenchida, apenas por Termos de Convênios, quando da solicitação de utilização dos rendimentos da aplicação financeira.***

SETI/PTG Fl. 8 Rubrica

1. Mauro Luciano Baesso - Reitor

2. Veronica Elisa Pimenta Vicentini - Coordenadora do projeto

ANEXO 1 - PLANO DE APLICAÇÃO
1. OUTRAS DESPESAS DE CUSTEIO
Unidade Gestora do Fundo Paraná - UGF

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

1.4. CUSTEIO - Material de Consumo - Nacional

Subelementos de Despesa	Ação Nº	Etapa Nº	Descrição	Instituição	Valor			Rendimentos Financeiros
					Valor Unitário (R$)	Qtde	Subtotal	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Meio de cultura DMEM, caixa	UEM	320	4	1.280	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Soro bovino fetal, frasco	UEM	300	8	2.400	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Tripsina ETDA 0,25%, frasco	UEM	150	2	300	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Antibiótico/Antimicótico, frasco	UEM	290	1	290	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Agarose comum, frasco	UEM	600	2	1.200	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Agarose baixo ponto de fusão, frasco	UEM	1.200	2	2.400	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Kit completo Micropipeta	UEM	2.700	2	5.400	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Tubos para RT-PCR	UEM	387	5	1.935	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Tampa para tubo RT-PCR	UEM	99	5	495	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Frasco de cultura de células 60mL, pacote	UEM	30	100	3.000	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Placa de cultura de células 96 poços, peça	UEM	7	100	700	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Placa de cultura de células 6 poços, peça	UEM	7	100	700	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Tubo Falcon 15 mL, pacote	UEM	25	3	75	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Frasco reagente vidro 1000mL	UEM	34	6	204	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Frasco reagente vidro 500mL	UEM	25	5	125	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Frasco reagente vidro 250mL	UEM	65	5	325	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Frasco reagente vidro 100mL	UEM	20	10	200	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Dimetilsulfóxido, frasco	UEM	140	4	560	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	ETDA	UEM	70	2	140	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Tris ultrapuro	UEM	240	2	480	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Inibidor Rnase	UEM	600	2	1.200	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	SybrGreen supermix	UEM	700	2	1.400	
						TOTAL	24.809	0

1. Mauro Luciano Baesso - Reitor

2. Veronica Elisa Pimenta Vicentini - Coordenadora do projeto

SETI/DTG
Fl.
RUBRICA

1.4. CUSTEIO - Material de Consumo - Nacional

Subelementos de Despesa	Ação Nº	Etapa Nº	Descrição	Instituição	Valor			Rendimentos Financeiros
					Valor Unitário (R$)	Qtde	Subtotal	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Extran neutro, 5L	UEM	300	2	600	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Dnase, frasco	UEM	300	2	600	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Trizol, frasco	UEM	800	2	1.600	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	DNTP mix, frasco	UEM	900	2	1.800	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Taq polimerase, frasco	UEM	200	2	400	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Transcriptase reversa, frasco	UEM	1.000	2	2.000	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Primers	UEM	100	10	1.000	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	microtubo 1,5 mL	UEM	30	1	30	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Ponteira com filtro 20uL, pacote	UEM	200	1	200	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Ponteira com filtro 200uL, pacote	UEM	200	1	200	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Iodeto de propídeo, frasco	UEM	300	1	300	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Lâmina fosca, caixa	UEM	25	5	125	
33.90.30.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 e	Lamínula 24/60mm	UEM	20	5	100	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
						TOTAL	8.955	0

1. Mauro Luciano Baesso - Reitor

2. Veronica Elisa Pimenta Vicentini - Coordenadora do projeto

SETI/PR
FL. 89
RUBRICA

ANEXO 1 - PLANO DE APLICAÇAO
2. INVESTIMENTOS
Unidade Gestora do Fundo Paraná - UGF

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

2.1. INVESTIMENTOS - Equipamentos e Material Permanente - NACIONAL

Subelementos de Despesa	Ação Nº	Etapa Nº	Descrição e Especificação	Instituição	Valor			Rendimentos Financeiros
					Valor Unitário (R$)	Qtde	Subtotal	
44.90.52.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2.	RTCA - Real Time Cell Analyzer	UEM	40.000	1	40.000	
44.90.52.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2.	Osmose reversa de água	UEM	3.500	1	3.500	
44.90.52.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2.	Câmera fotográfica para microscópio Leica	UEM	9.500	1	9.500	
44.90.52.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2.	Centrífuga de tubos 15mL	UEM	5.000	1	5.000	
44.90.52.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2.	Cabine de extração de DNA/RNA	UEM	5.000	1	5.000	
44.90.52.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2.	Banho-maria digital	UEM	2.000	2	4.000	
44.90.52.00	1, 2 e 3	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2.	Centrífuga de microtubos	UEM	1.000	1	1.000	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
						TOTAL	68.000	0

1. Mauro Luciano Baesso - Reitor

2. Veronica Elisa Pimenta Vicentini - Coordenadora do projeto

SETTI/PTG
Fl.
Rubrica

ELEMENTOS DE DESPESA		VALOR PROJETO	*MÊS (ANO 1)												TOTAL	SALDO
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12		
3390.1400	Diárias	0													0	0
3390.3300	Passagens	0													0	0
3390.3500	Consultoria	0													0	0
3390.3000	Mat. Consumo NACIONAL	33.764	33 764												33.764	0
3390.3000	Mat. Consumo IMPORTADO	0													0	0
3390.3600	ST Pessoa Física	0													0	0
3390.4700	Obrigações Tributárias e Contributivas	0													0	0
3390.1800	Bolsas	0													0	0
	Auxílio Financeiro	0													0	0
3390.3800	ST Pessoa Jurídica	0													0	0
4490.5200	Equipamentos e Mat. Permanente NACIONAL	68.000	68 000												68.000	0
4490.5200	Equipamentos e Mat. Permanente IMPORTADO	0													0	0
4490.5100	Obras e Instalações	0													0	0
TOTAL:		101.764	101.764	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	101.764	0

** Entende-se por mês 1 (um) o mês de início das atividades do projeto.*

*** Definir valores a serem liberados mensalmente ao Projeto (em amarelo)*

1. Mauro Luciano Baesso - Reitor

2. Veronica Elisa Pimenta Vicentini - Coordenadora do projeto

SETI