



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

POTENCIAL TOXICOGENÉTICO DE INSETICIDAS NEONICOTINÓIDES EM
DIFERENTES SISTEMAS *IN VIVO*

Aluno: Cássio Resende de Moraes

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Coorientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

UBERLÂNDIA - MG
2019



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

POTENCIAL TOXICOGENÉTICO DE INSETICIDAS NEONICOTINÓIDES EM
DIFERENTES SISTEMAS *IN VIVO*

Aluno: Cássio Resende de Moraes.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Coorientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

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

UBERLÂNDIA - MG
2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M827 2019	<p>Morais, Cássio Resende de, 1989- Potencial Toxicogenético de inseticidas neonicotinóides em diferentes sistemas in vivo [recurso eletrônico] / Cássio Resende de Moraes. - 2019.</p> <p>Orientadora: Ana Maria Bonetti. Coorientador: Mário Antônio Spanó. Coorientador: Alexandre Azenha Alves de Rezende. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2166 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Genética. I. Bonetti, Ana Maria, 1949-, (Orient.). II. Spanó, Mário Antônio, 1951-, (Coorient.). III. Rezende, Alexandre Azenha Alves de, 1983-, (Coorient.). IV. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. V. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 575</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico - nº 13/2019 - PPGGB				
Data:	Vinte e nove de julho de 2019	Hora de início:	13:30h	Hora de encerramento:	17:30h
Matrícula do Discente:	11523GBI003				
Nome do Discente:	Cássio Resende de Moraes				
Título do Trabalho:	Potencial toxicogenéticos de inseticidas neonicotinóides em sistemas <i>in vivo</i> .				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação do potencial genotóxico em eucariotos.				

Aos vinte e nove dias do mês de julho de dois mil e dezenove, às 13:30 horas no Anfiteatro 4K, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof. Dr. Edimar Olegário de Campos Júnior, Prof. Dr. Edson Luis Maistro, Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior, Prof^ª. Dr^ª. Lusânia Maria Gregg Antunes e Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Bonetti, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, a Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Bonetti, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (a) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato (a): APROVADO (A). Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por Ana Maria Bonetti, Presidente, em 29/07/2019, às 17:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 69, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por Robson José de Oliveira Junior, Membro de Comissão,



em 29/07/2019, às 17:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 68, § 1º, do [Decreto nº 8.538, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Edimar Olegário de Campos Júnior, Usuário Externo, em 29/07/2019, às 17:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 68, § 1º, do [Decreto nº 8.538, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Lusania Maria Gregg Antunes, Usuário Externo, em 29/07/2019, às 17:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 68, § 1º, do [Decreto nº 8.538, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Edson Luis Maistro, Usuário Externo, em 29/07/2019, às 17:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 68, § 1º, do [Decreto nº 8.538, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1367297 e o código CRC 5B9E8AC1.



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

POTENCIAL TOXICOGENÉTICO DE INSETICIDAS NEONICOTINÓIDES EM
DIFERENTES SISTEMAS *IN VIVO*

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^{fa}. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Examinadores: Prof. Dr. Edimar Olegário de Campos Júnior

Prof. Dr. Edson Luís Maistro

Prof^{fa}. Dr^a. Lusânia Maria Greggi Antunes

Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior

Data da Defesa: 29 /7 /2019

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

Prof^{fa}. Dr^a. Ana Maria Bonetti

“Nós somos definidos pelo que fazemos repetidamente. A excelência, portanto, não é um ato, mas um hábito”.

(Aristóteles)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Sirlene Resende Cardoso** e **Heiton Lobianco de Moraes**, e aos meus avós, **João Resende Cardoso** e **Maria das Dores Resende Cardoso**. Grande parte do que sou, devo aos ensinamentos e aos valores transmitidos por vocês! Obrigado pelo carinho, apoio, confiança e estímulo durante toda minha vida! Vocês são meus exemplos!

AGRADECIMENTOS

Seria o mesmo que maquiar a realidade, se dissesse que esta conquista foi fruto apenas de meus esforços. Portanto, agradeço primeiramente a **Deus**, pelo dom da vida e por servir de combustível de determinação e fé, mesmo nos momentos de maiores turbulências.

Agradeço imensamente à minha querida professora, orientadora e amiga Profa. Dr^a. **Ana Maria Bonetti**, pelo acolhimento, sabedoria, compromisso, pontualidade e dedicação, bem como pelo exemplo de profissionalismo. Você representa minha referência de construção de minha profissão como docente.

Agradeço ao professor, coorientador e amigo Prof. Dr. **Alexandre Azenha Alves de Rezende**, pela orientação, leitura, interpretação e discussão dos resultados. Agradeço imensamente pelo conhecimento transmitido durante estes últimos anos, principalmente os ensinamentos na área da Mutagênese. Obrigado pelo companheirismo durante esta trajetória científica.

Agradeço de coração ao professor, coorientador e amigo Prof. Dr. **Mário Antônio Spanó**, pelo acolhimento no Laboratório de Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Agradeço pela coorientação, pela ajuda na parte experimental, análise e interpretação dos resultados, bem como pelos conselhos e momentos de descontração. Tenho um grande carinho por você. Você representa minha referência de professor e pesquisador.

Aos membros da comissão examinadora, **Prof. Dr. Edimar Olegário de Campos Júnior**; **Prof. Dr. Edson Luís Maistro**; **Prof^a. Dr^a. Lusânia Maria Greggi Antunes**; e **Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior**, pela participação na banca examinadora desta Tese de Doutorado, bem como pela leitura crítica do texto e pelas valiosas considerações. Vocês são fundamentais na lapidação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Stephan Malfitano Carvalho**, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo fornecimento dos inseticidas usados neste trabalho e os ensinamentos sobre a Toxicologia de Pesticidas.

Ao Prof. Dr. **Júlio César Nepomuceno** (*in memoriam*) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), pelo fornecimento da linhagem mutante de *Drosophila melanogaster* (*Warts*) e ao Prof. Dr. **Mário Antônio**

Spanó, do Laboratório de Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pelo fornecimento das linhagens mutantes *multiple wing hairs*, *flare* e *ORR*.

Às amigas e companheiras do Laboratório de Mutagênese (UFU), Msc. **Maria Paula Carvalho Naves** e **Nathalya Pereira Barbosa** pelo auxílio nos experimentos *in vivo* com *D. melanogaster*, pelo companheirismo e momentos de descontração.

À Fundação Carmelitana Mário Palmério (FUCAMP), pelo espaço cedido no Laboratório de Citologia, para a realização dos experimentos com *Tradescantia pallida*.

Aos amigos e companheiros de pesquisa **Msc. Carlos Fernando Campos Júnior** e **Prof. Dr. Boscolli Barbosa Pereira**, pelo auxílio na parte experimental *In vivo* com *T. pallida*. Pela interpretação e discussão dos resultados e pela parceria nos projetos paralelos.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica (UFU), pelos valiosos ensinamentos e pela contribuição na minha formação científica e docente.

A todo corpo técnico-administrativo, em especial à secretária **Janaina de Souza Mota** pelo profissionalismo exercido e a atenção especial prestada na documentação junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Ao Sr. **Paulo Roberto Moderno**, pela assistência técnica no Laboratório de Mutagênese (UFU).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado (Agosto 2015 – Abril 2019).

Aos colegas de trabalho do Colégio Nossa Senhora do Amparo (AMPARO), Colégio Alpha Coc (COC) e da Faculdade de Ciências Humanas e Sociais (FACIHUS) da Fundação Carmelitana Mário Palmerio (FUCAMP), pelo companheirismo e ambiente de aprendizagem constante.

Aos meus pais **Sirlene Resende Cardoso** e **Heiton Lobianco de Moraes**, vocês foram e são essenciais na minha vida. Agradeço todos os dias pelos pais que tenho, e sou grato pelos esforços repetidos em oferecer a melhor educação que lhes coube. Vocês representam o verdadeiro motivo das batalhas enfrentadas no dia-a-dia. Amo vocês

À minha esposa, companheira, amiga, parceira e eterna namorada **Thays Cunha Vieira**, pelo companheirismo, amizade e amor. Obrigado pelo incentivo constante. Junto somos mais fortes.

Ao meu Padrasto Sr. **João Corrêa Rabelo** e madrasta Sra. **Maria Eunice Mendonça**, sou eternamente grato pela amizade e companheirismo compartilhado com vocês.

Aos meus avós **João Resende Cardoso** e **Maria das Dores Resende Cardoso**, pelo carinho, amor e incentivo durante toda minha vida.

Aos meus irmãos **Cristiano Resende** e **Maria Fernanda Mendonça**, esta conquista também foi por vocês.

A todos os amigos e familiares, pelo incentivo, carinho e compreensão nos momentos de ausência e a todos aqueles que, porventura, não foram aqui elencados, mas fizeram parte, direta ou indiretamente, dessa conquista.

A todos vocês, o meu muito obrigado!

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil (UFU) e no Laboratório de Citologia da Fundação Carmelitana Mário Palmério (FUCAMP), com apoio financeiro das seguintes Agências de Fomento e Instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.
- Fundação Carmelitana Mário Palmério (FUCAMP), Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: Actara®.

ATP: Adenosina Trifosfato.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

B. tabaci: Bemisia tabaci

BH: Heterozigoto Balanceado.

DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio.

ACP: Acetamiprido.

CDK: Proteínas Quinases Dependente de Ciclina.

CL₅₀: Concentração Letal Média.

CYP6A2: Citocromo P450, família 6, subfamília A, isoenzima 2.

CYP6G1: Citocromo P450, família 6, subfamília G, isoenzima 1.

DBE: 1,2 dibromoetano.

D. melanogaster: Drosophila melanogaster.

DL₅₀: Dose Letal Média.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico.

DDT: Diclorodifeniltricloroetano.

ERO: Espécie Reativa de Oxigênio.

flr³: flare-3.

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization.

IA: Ingrediente Ativo.

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

INCA: Instituto Nacional do Câncer.

IMI: Imidacloprido.

HB: High Bioactivation Cross.

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MH: Trans-heterozigoto Marcado.

MMC: Mitomicina C.

MMS: Metanossulfato de Metila.

MN: Micronúcleo.

MOP: Mospilan®.

mwh: Multiple wing hairs.

ORR: Oregon-R.

PRM: Premier®.

SMART: *Somatic Mutation and Recombination Test.*

ST: Standard Cross.

TMX: Tiametoxam

TMN: Teste do Micronúcleo.

Trad-MCN: Teste do Micronúcleo em *Tradescantia pallida.*

T. pallida: Tradescantia pallida.

URE: Uretano

v/v: Volume/volume.

wt: *Warts.*

Capítulo I – Toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade de inseticidas neonicotinóides: Análise comparativa entre os ingredientes ativos e os produtos formulados.

Figura 1. Fórmula estrutural das substâncias usadas no presente estudo: **A.** Tiametoxam (TMX); **B.** Imidacloprido (IMI); **C.** Acetamiprido (ACP); **D.** Etil carbamato; **E.** Mitomicina C..... 10

Figura 2. Taxa de sobrevivência em *D. melanogaster* descendentes do cruzamento ST (A) e HB (B), expostas a diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX) e Actara® (AC)..... 16

Figura 3. Taxa de sobrevivência em *Drosophila melanogaster* descendentes do cruzamento ST (A) e HB (B), expostas a diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI) e Premier® (PRM)..... 17

Figura 4. Taxa de sobrevivência em *Drosophila melanogaster* descendentes do cruzamento ST (A) e HB (B), expostas a diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP) e Mospilan® (MOP)..... 18

Figura 5. Manchas mutantes observadas em *Drosophila melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de inseticidas neonicotinóides..... 33

Figura 6. Distribuição de manchas mutantes de acordo com as classes nos indivíduos dos cruzamentos ST e HB em *Drosophila melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX) e Actara® (AC)..... 35

Figura 7. Distribuição de manchas mutantes de acordo com as classes nos indivíduos dos cruzamentos ST e HB em *Drosophila melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI) e Premier® (PRM)..... 36

Figura 8. Distribuição de manchas mutantes de acordo com as classes nos indivíduos dos cruzamentos ST e HB em *Drosophila melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP) e Mospilan® (MOP).... 37

Figura 9. Comparação entre a taxa de sobrevivência, mutação e recombinação em *Drosophila melanogaster* descendentes do cruzamento HB, tratadas com diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX) e Actara (AC)..... 39

Figura 10. Comparação entre a taxa de sobrevivência, mutação e recombinação em <i>Drosophila melanogaster</i> descendentes do cruzamento ST e HB, tratadas com diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI) e Premier (PRM).....	41
Figura 11. Comparação entre a taxa de sobrevivência, mutação e recombinação em <i>Drosophila melanogaster</i> descendentes do cruzamento HB, tratadas com diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP) e Mospilan (MOP).....	43
Figura 12. Taxa de sobrevivência em <i>Drosophila melanogaster</i> descendentes do cruzamento entre machos <i>mwh/mwh</i> e fêmeas <i>wts/TM3, Sb¹</i> , expostas a diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX) e Actara (AC).....	44
Figura 13. Taxa de sobrevivência em <i>Drosophila melanogaster</i> descendentes do cruzamento entre machos <i>mwh/mwh</i> e fêmeas <i>wts/TM3, Sb¹</i> , expostas a diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI) e Premier® (PRM).....	45
Figura 14. Taxa de sobrevivência em <i>Drosophila melanogaster</i> descendentes do cruzamento entre machos <i>mwh/mwh</i> e fêmeas <i>wts/TM3, Sb¹</i> , expostas a diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP) e Mospilan® (MOP).....	46
Figura 15. Fenótipo de <i>Drosophila melanogaster</i> descendentes do cruzamento entre machos <i>mwh/mwh</i> e fêmeas virgens da linhagem <i>wts/TM3, Sb¹</i> , expressando tumores epiteliais.....	51

Capítulo II – Avaliação do potencial genotóxico de inseticidas neonicotinóides, por meio do Teste do Micronúcleo em *Tradescantia pallida*

Figura 1. <i>Tradescantia pallida</i>	79
Figura 2. Estrutura química dos compostos.....	81
Figura 3. Representação de micronúcleo em tétrade de <i>Tradescantia pallida</i>	85
Figura 4. Frequência de danos gerados em <i>Tradescantia pallida</i> tratadas com diferentes concentrações de inseticidas neocotinóides.....	89

Capítulo I – Toxicidade, Mutagenicidade e Carcinogenicidade de inseticidas Neonicotinóides: Análise comparativa entre os ingredientes ativos e os produtos formulados.

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos com o Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) na progênie trans-heterozigoto marcado (MH) do cruzamento padrão (ST), após tratamento com diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX) e Actara® (AC).....	21
Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos com o Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) na progênie trans-heterozigoto marcado (MH) e trans-heterozigoto balanceado (BH) do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), após tratamento com diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX) e Actara® (AC).....	22
Tabela 3. Resumo dos resultados obtidos com o Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) na progênie trans-heterozigoto marcado (MH) e trans-heterozigoto balanceado (BH) do cruzamento padrão (ST), após tratamento com diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI) e Premier® (PRM).....	25
Tabela 4. Resumo dos resultados obtidos com o Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) na progênie trans-heterozigoto marcado (MH) e trans-heterozigoto balanceado (BH) do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), após tratamento com diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI) e Premier® (PRM).....	27
Tabela 5. Resumo dos resultados obtidos com o Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) na progênie trans-heterozigoto marcado (MH) do cruzamento padrão (ST), após tratamento com diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP) e Mospilan® (PRM).....	30
Tabela 6. Resumo dos resultados obtidos com o Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) na progênie trans-	

heterozigoto marcado (MH) e trans-heterozigoto balanceado (BH) do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), após tratamento com diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP) e Mospilan® (MOP).....	31
Tabela 7. Frequência de clones de tumores epiteliais observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor <i>wts</i> em <i>D. melanogaster</i> tratadas com diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX) e Actara® (AC).....	48
Tabela 8. Frequência de clones de tumores epiteliais observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor <i>wts</i> em <i>D. melanogaster</i> , tratadas com diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI) e Premier® (PRM).....	49
Tabela 9. Frequência de clones de tumores epiteliais observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor <i>wts</i> em <i>D. melanogaster</i> , tratadas com diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP) e Mospilan® (MOP).....	50
Tabela 10. Análise comparativa dos resultados obtidos em <i>D. melanogaster</i> tratadas com inseticidas neonicotinóides (IA).....	64

Capítulo II – Avaliação do potencial genotóxico de inseticidas neonicotinóides, por meio do Teste do Micronúcleo em *Tradescantia pallida*.

Tabela 1. Características dos inseticidas.....	83
Tabela 2. Frequência de Micronúcleos em <i>Tradescantia pallida</i> tratada com diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX).....	86
Tabela 3. Frequência de Micronúcleos em <i>Tradescantia pallida</i> tratada com diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI).....	87
Tabela 4. Frequência de Micronúcleos em <i>Tradescantia pallida</i> tratada com diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP).....	88

SUMÁRIO

	Pág
Capítulo I – Toxicidade, Mutagenicidade e Carcinogenicidade de inseticidas Neonicotinóides: Análise comparativa entre os ingredientes ativos e os produtos formulados	
Resumo.....	1
Abstract.....	3
1. Introdução.....	5
2. Objetivos.....	8
3. Material e Métodos.....	9
4. Resultados.....	15
5. Discussão.....	52
6. Conclusão.....	72
Capítulo II – Avaliação do potencial genotóxico de inseticidas neonicotinóides, por meio do Teste do Micronúcleo em <i>Tradescantia pallida</i>	
Resumo.....	75
Abstract.....	76
1. Introdução.....	77
2. Objetivos.....	80
3. Material e Métodos.....	80
4. Resultados.....	85
5. Discussão.....	90
6. Conclusão.....	95
7. Referências.....	97
Anexo I	118
Anexo II	119

CAPÍTULO I

**TOXICIDADE, MUTAGENICIDADE E CARCINOGENICIDADE DE
INSETICIDAS NEONICOTINÓIDES: ANÁLISE COMPARATIVA
ENTRE OS INGREDIENTES ATIVOS E OS PRODUTOS
FORMULADOS.**

RESUMO

Tiametoxam (TMX), Imidacloprido (IMI), e Acetamiprido (ACP) são inseticidas neurotóxicos neonicotinóides, agonistas aos receptores nicotínicos da acetilcolina. Actara® (AC), Premier® (PRM) e Mospilan® (MOP) são produtos formulados à base de TMX, IMI e ACP, respectivamente. O presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade e os potenciais mutagênicos, recombinogênicos e carcinogênicos desses inseticidas. Os efeitos mutagênicos e recombinogênicos foram avaliados *in vivo* por meio do “Somatic mutation and recombination test” (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Larvas de 72h, descendentes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação metabólica (HB), foram tratadas com diferentes concentrações de TMX, IMI, ACP, AC, PRM ou MOP, por aproximadamente 48h. Todos os inseticidas foram tóxicos nas maiores concentrações. TMX e AC não foram mutagênicos no cruzamento ST, mas induziram aumentos estatisticamente significativos nas frequências de manchas mutantes nas concentrações de $9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ mM do cruzamento HB. IMI induziu aumento significativo apenas nos tratados com $2,4$ e $4,8 \times 10^{-4}$ mM do cruzamento HB, enquanto o produto formulado PRM foi mutagênico em todas as concentrações (de $1,2$ a $9,7 \times 10^{-4}$ mM), em ambos os cruzamentos. ACP e MOP não foram mutagênicos no cruzamento ST. No cruzamento HB o ACP induziu aumento significativo de manchas mutantes em todas as concentrações utilizadas, enquanto o MOP foi mutagênico apenas nas concentrações de $1,9$ e $3,9 \times 10^{-3}$. Os efeitos carcinogênicos dos inseticidas foram avaliados por meio do Epithelial Tumor Test (ETT) em *D. melanogaster*. Larvas de 72h resultantes do cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb¹* e machos da linhagem *mwh/mwh* foram tratadas com as mesmas concentrações testadas no SMART. Foi observada atividade carcinogênica apenas nos tratados com o inseticida PRM. Conclusão: Os inseticidas e os respectivos produtos formulados foram tóxicos, mutagênicos após serem ativados por enzimas do citocromo P450 (CYP6A2) (com exceção do PRM, que foi mutagênico mesmo em níveis enzimáticos basais) e não carcinogênicos (com exceção do PRM, que apresentou efeitos carcinogênicos). Os ingredientes inertes interferem na toxicidade e mutagenicidade dos ingredientes ativos.

Palavras-chave: Tiametoxam; Imidacloprido; Acetamiprido; Genotoxicidade; Ingredientes inertes.

ABSTRACT

Thiamethoxam (TMX), Imidacloprid (IMI) and Acetamiprid (ACP) are defined as neonicotinoid neurotoxic insecticides, acting as agonists to nicotinic acetylcholine receptors. Actara® (AC), Premier® (PRM) and Mospilan® (MOP) are formulated products composed of TMX, IMI and ACP, respectively. The present study aimed to assess the toxicity and mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of these insecticides. The mutagenic and recombinogenic effects were evaluated *in vivo* through the somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. Larvae of 72h resulting from descendants of standard crosses (ST) and high metabolic bioactivation (HB) crosses were treated with different concentrations of TMX, IMI, ACP, AC, PRM or MOP for approximately 48 h. All the insecticides were toxic at the highest concentrations. TMX and AC were non-mutagenic at the ST crossing, but induced statistically significant increases in mutant spot frequencies at the concentrations of 9.7×10^{-4} and 1.9×10^{-3} mM regarding the HB crossing. IMI induced a significant increase only in those treated with 2.4 and 4.8×10^{-4} mM of the HB crossing, whereas the formulated PRM was mutagenic at all concentrations (from 1.2 to 9.7×10^{-4} mM) in both the crosses. ACP and MOP were not mutagenic considering the ST crossing. At the HB crossing, ACP induced a significant increase of mutant spots at all concentrations tested, while MOP was mutagenic only at the concentrations 1.9 and 3.9×10^{-3} . The carcinogenic effects of insecticides were evaluated using the Epithelial Tumor Test (wts) in *D. melanogaster*. Larvae of 72h descended from the crossing between virgin females *wts/TM3*, *Sb¹* and *mwh/mwh* males were treated with the same concentrations used in SMART. In this case, carcinogenic activity was observed only in those treated with the PRM insecticide. As conclusion, the findings revealed toxic and mutagenic effects of the insecticides and their formulated products after being activated by cytochrome P450 enzymes (CYP6A2) (except PRM, which was mutagenic even at basal enzyme levels) and non-carcinogenic (except PRM, which showed carcinogenic effects). Thus, the inert ingredients interfere on the toxicity and mutagenicity of the active ingredients.

Keywords: Thiamethoxam; Imidacloprid; Acetamiprid; Genotoxicity; Inert
Ingredients

1. INTRODUÇÃO

Pesticidas são substâncias ou misturas de substâncias que têm por finalidade matar, repelir ou controlar organismos considerados pragas e que, dependendo das características físico-químicas, do mecanismo de ação, da dose e persistência, podem resultar em efeitos adversos ao ambiente e às espécies não-alvo de combate (Farooqui, 2013).

Devido ao clima tropical, que oferece um ambiente propício para o desenvolvimento de um amplo espectro de pragas, o Brasil configura-se um dos países com maior utilização de produtos fitossanitários (Londres, 2011; Rigotto *et al.*, 2014).

Dentre os pesticidas utilizados no Brasil, destacam-se os neonicotinóides, representantes dos inseticidas neurotóxicos, amplamente utilizados em sistemas agrícolas, domissanitário e médico-veterinário (Tomizawa e Casida, 2005). Desde a sua introdução no mercado, em 1990 (Kollmeyer *et al.*, 1999), os neonicotinóides têm ganhado destaque, substituindo cada vez mais os inseticidas tradicionais, como os da classe dos carbamatos, piretróides, organofosforados e outros inseticidas neurotóxicos (Stivaktakis *et al.*, 2016) e, atualmente, representam os inseticidas mais comercializados mundialmente (Sparks e Nauen, 2015).

Essas moléculas apresentam afinidade agonista aos receptores nicotínicos da acetilcolina, e ao se ligar nesses receptores, resultam na abertura anormal dos canais de sódio, levando a episódios de hiperexcitação, paralisia severa e, finalmente, à morte de insetos expostos (Tomizawa e Yamamoto, 1993; Goulson, 2013; Bagri *et al.*, 2016).

A preferência demonstrada por profissionais das ciências agrárias, quanto à utilização de inseticidas neonicotinóides, se deve à atividade sistêmica destes nos vegetais, tendo, portanto, a habilidade de deslocarem-se tanto pelo xilema quanto pelo floema, protegendo as culturas de um amplo espectro de pragas (Goulson, 2013).

Há muito se sabe que a utilização intensa de pesticidas está diretamente relacionada à contaminação de compartimentos do ambiente e de organismos não alvo de combate, podendo muitas vezes causar ainda bioacumulação nos

diferentes níveis tróficos (Bagri e Jain, 2018; Macchi *et al.*, 2018; Dromard *et al.*, 2018).

Pesticidas podem, em longo prazo, prejudicar a saúde humana e de outros animais, devido à exposição crônica aos resíduos do princípio ativo e de seus metabólitos no ambiente e nos alimentos (Houk, 1992), podendo gerar efeitos adversos, como disfunção nas vias bioquímicas e instabilidade genética (Wilczek *et al.*, 2016; Ahmadi *et al.*, 2018; Maharajan *et al.*, 2018; Hong *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2018).

Dentre a variedade de efeitos toxicológicos proporcionados pela exposição crônica a doses subletais de pesticidas, destacam-se as alterações genéticas, como eventos genotóxicos, mutagênicos, recombinogênicos e carcinogênicos (Bolognesi, 2003; Çelik *et al.*, 2014; Morais *et al.*, 2016^b; 2017). Além disso, doenças de natureza degenerativas e eventos teratogênicos são recorrentemente relacionadas aos pesticidas (Bhalli *et al.*, 2009; Uggini *et al.*, 2012; Mehid e Qamar, 2013; Bolognesi e Moretto, 2014; Narayan *et al.*, 2016; Wendt, 2018).

O 3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine, conhecido como Tiametoxam (TMX) é um inseticida neonicotinóide de classificação toxicológica III (grupo N-nitroguanidinas) (Jeschke *et al.*, 2011), usado no controle de pragas em uma grande variedade de cultivares agrícolas, que incluem arroz, batata, café, milho, soja e tomate (MAPA, 2018).

O 1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine, conhecido popularmente como Imidacloprido (IMI), assim como o TMX, pertence à classe dos neonicotinóides, grupo das N-nitroguanidinas, e apresenta baixa toxicidade (classificação toxicológica III). IMI representa o primeiro inseticida da classe dos neonicotinóides a ser liberado no mercado agrícola e, atualmente, é usado no controle de uma grande variedade de pragas, em culturas de grande destaque no país (arroz, café, cana-de-açúcar, feijão, milho, soja, tomate, dentre outros) (MAPA, 2018).

O ((E)-N-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N0-cyano-N-methyl-acetamidine) conhecido como Acetamiprido (ACP) é um inseticida de classificação toxicológica III, também pertence à classe dos neonicotinóides, grupo N-cianoaminidinas (Jeschke *et al.*, 2011). No Brasil é usado no controle de pragas em mais de 15 tipos de culturas, incluindo arroz, café, feijão, milho, soja e tomate (MAPA, 2018).

No Brasil, o TMX é usado como ingrediente ativo (IA) em 25 produtos formulados de uso agrícola, o IMI é usado em 37 formulações, e o ACP, em 29. Actara® 250 WG (AC), Premier® (PRM) e Mospilan® (MOP), representam exemplos de produtos formulados de uso agrícola à base de TMX, IMI e ACP, respectivamente (MAPA, 2018).

No Brasil, a obtenção de registro e regulamentação de pesticidas é feita mediante a aprovação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Godoy e Oliveira, 2004). No entanto, as avaliações feitas no âmbito toxicológico e ecotoxicológico, limitam-se a avaliação do IA não incluindo os ingredientes inertes (presentes nos produtos formulados) em algumas análises toxicológicas (Brasil, 1992). Os dados gerados, por meio dos ensaios laboratoriais, permitem o cálculo da dose diária admissível para humanos, bem como as doses que não impõem risco à biota, justificando a presença dos resíduos dos pesticidas em níveis admissíveis no ambiente (Mesnage *et al.*, 2014).

Na literatura, TMX, IMI e ACP já foram relacionados a eventos que resultam em instabilidade genética, como eventos genotóxicos, mutagênicos, clastogênicos e aneugênicos (Kocaman e Topaktas, 2007; 2009; Çavas *et al.*, 2014; Rodriguez *et al.*, 2015; Chakroun *et al.*, 2016; Stivaktakis *et al.*, 2016; Zeljezic *et al.*, 2017; Iturburu *et al.*, 2017; Bagri e Jain, 2018; Vieira *et al.*, 2018; Hong *et al.*, 2018).

No entanto, a literatura carece de dados que buscam comparar os IA com os seus respectivos produtos formulados. Dados da literatura evidenciam diferenças na toxicidade de produtos formulados quando comparado ao IA (Mesnage *et al.*, 2013; 2014). Nesse sentido, as análises toxicológicas apenas do IA podem subestimar os efeitos toxicológicos dos produtos formulados nos componentes bióticos dos ecossistemas.

Visando contribuir, com dados pautados na Genética Toxicológica, sobre a mutagenicidade e carcinogenicidade de TMX, IMI e ACP, bem como verificar os efeitos dos ingredientes inertes sobre a toxicogenética dos IA destes inseticidas, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar a toxicidade, mutagenicidade, recombinogenicidade e carcinogenicidade dos inseticidas TMX, IMI e ACP (IA) e

dos seus produtos formulados AC, PRM e MOP, por meio do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation and Recombination Test - SMART) e o Teste para detecção de tumor epitelial (Epithelial Tumor Test - ETT), ambos em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

O SMART fundamenta-se na análise de pelos mutantes nas asas das moscas, resultantes da perda da heterozigose de genes marcadores (*mwh* e *flr³*) durante a diferenciação das células dos discos imaginais. A perda da heterozigose dos genes marcadores pode ocorrer por eventos mutagênicos (mutações pontuais, eventos clastogênicos ou aneugênicos) ou recombinogênicos, em resposta à exposição a diferentes xenobióticos antes (mutágeno) e após metabolização (pró-mutágeno) via complexo enzimático citocromo P450 (CYP6A2) (Graf *et al.*, 1984; Graf e van Schaik, 1992; Graf e Würgler, 1996).

O ETT, assim como o SMART, fundamenta-se na perda da heterozigose de marcadores genéticos (*wts*). No entanto, neste caso, o gene marcador exerce papel fundamental no controle do ciclo celular, atuando como um gene supressor de tumor (gene *warts*) (Xu *et al.*, 1995). A deleção desse gene resulta na instalação e progressão da massa tumoral no tecido epitelial da mosca (Nishiyama *et al.*, 1999).

Tais testes destacam-se pela sensibilidade à avaliação de agentes químicos com propriedades mutagênica e carcinogênica (Nepomuceno, 2015; Morais *et al.*, 2016^{ab}; 2018; Vasconcelos *et al.*, 2017; Naves *et al.*, 2018).

2. OBJETIVO

Avaliar os efeitos tóxico, mutagênico, recombinogênico e carcinogênico de inseticidas neocotinóides em células somáticas de *D. melanogaster*.

2.1. Objetivos específicos

Avaliar a toxicidade dos ingredientes ativos TMX, IMI e ACP, e dos seus produtos formulados AC, PRM e MOP nos cruzamentos ST e HB do SMART.

Avaliar a mutagenicidade e recombinogenicidade dos ingredientes ativos TMX, IMI e ACP, e dos seus produtos formulados AC, PRM e MOP nos cruzamentos ST e HB do SMART.

Avaliar a toxicidade dos ingredientes ativos TMX, IMI e ACP, e dos seus produtos formulados AC, PRM e MOP por meio do ETT.

Avaliar a carcinogenicidade dos ingredientes ativos TMX, IMI e ACP, e dos seus produtos formulados AC, PRM e MOP por meio do ETT.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Agentes químicos

Tiametoxam (CAS 153719-23-4) (**Figura 1A**), Imidacloprido (CAS 138261-41-3) (**Figura 1B**) e Acetamiprido (CAS 135410-20-7) (**Figura 1C**) (99,9%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Tiametoxam Actara® 250 WG (25% IA) foi obtido da BASF S.A. (São Paulo, Brasil). Imidacloprido Premier® (70% IA) foi obtido da Bayer S.A., São Paulo, Brasil. Acetamiprido Mospilan® (20% IA) foi obtido da Iharabras S.A. Indústrias Químicas, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

Etil carbamato – Uretano (URE) (CAS 51-79-6) (**Figura 1D**) foi obtido da Fluka AG (Buchs, Switzerland). Mitomicina C (**Figura 1E**) foi manufaturada pela Kyowa Hakko Kirin Co. Ltd. (Shizuoka, Japan), embalada por Bristol-Myers Squibb S.r.l. Sermoneta-Latin-Italy e importada pela Bristol-Myers Squibb S.A.

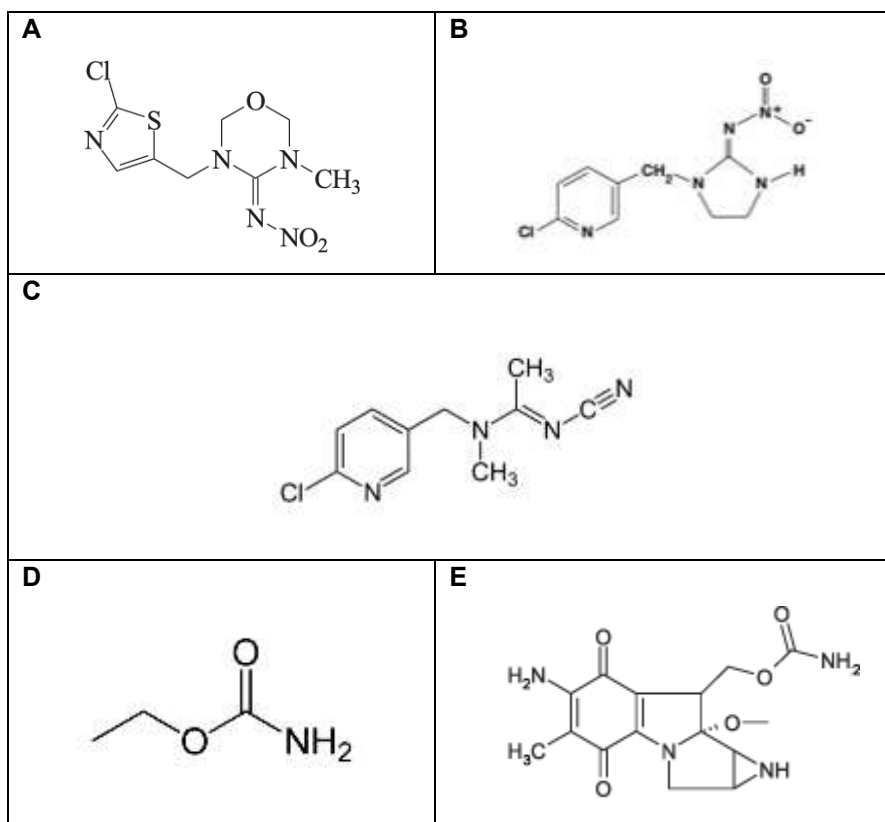


Figura 1. Fórmula estrutural das substâncias usadas no presente estudo: **A.** Tiametoxam (TMX); **B.** Imidacloprido (IMI); **C.** Acetamiprido (ACP); **D.** Etil carbamato; **E.** Mitomicina C.

3.2. Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em células de asas de *D. melanogaster* (Somatic Mutation and Recombination Test - SMART)

3.2.1. Linhagens mutantes, cruzamentos e tratamentos

Foram usadas três linhagens mutantes de *D. melanogaster*: 1] “multiple wing hairs”; 2] “flare-3”: e 3] “Oregon-R”.

A linhagem “multiple wing hairs” possui o marcador *mwh* e é mantido no cromossomo 3 no estado de homozigose recessiva (*mwh/mwh*) em uma região mais distal em relação ao centrômero (*mwh*, 3-0,3). A expressão do marcador *mwh* leva à formação de pelos múltiplos em cada célula, fenótipo que difere do pelo selvagem (único pelo por célula).

A linhagem “flare-3” (constituição cromossômica *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*) possui o marcador *flr³* que está localizado no cromossomo 3, em uma região mais próxima do centrômero (*flr³*, 3-38,8), quando comparado ao marcador *mwh*. Devido à letalidade em homozigose recessiva (*flr³/flr³*), o alelo é mantido em hemizigose pela presença do balanceador cromossômico TM3, *Bd^S*. Quando expresso na condição de homozigose recessiva (viável para a célula), o marcador *flr³* leva à formação de pelos mutantes que se assemelham à chama de vela ou espinho de roseira.

A linhagem Oregon-R (ORR) (constituição cromossômica *ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*) possui os mesmos marcadores da linhagem “flare-3”. A diferença é que esta linhagem possui níveis constitutivos de expressão de enzimas do complexo enzimático CYP6A2 nos cromossomos 1 e 2, enquanto a linhagem “flare-3” apresenta níveis basais deste complexo enzimático. Estas moscas são naturalmente resistentes ao inseticida diclorodifeniltricloroetano (DDT).

As linhagens foram mantidas em estoque, em frascos de 250 mL contendo meio de cultura à base de banana (1230 mL de água, 16,5 g de ágar, 234 g de banana, 37,5 g de fermento biológico, 1,5 g de nipagin e 2 mL de penicilina/estreptomicina), em estufa tipo BOD (SOLAB), em ciclos de claro/escuro (12h:12h) na temperatura de 25°C e umidade relativa de 65%.

Com estas linhagens foram realizados dois cruzamentos: (1) Cruzamento padrão (ST), entre machos “mwh” e fêmeas virgens “flr-3” (Graf *et al.*, 1984); (2) Cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), com machos “mwh” e fêmeas virgens *ORR; flr³/TM3, Bd^S* (Graf e van Schaik, 1992).

Estes cruzamentos respeitam as premissas mendelianas, gerando, portanto, duas progênies geneticamente e fenotipicamente distintas: (1) A progênie trans-heterozigota marcada (*mwh+/+flr³*) (MH); e (2) progênie heterozigota balanceada (*mwh+/+TM3, Bd^S*) (BH).

A análise da progênie MH possibilita a identificação de eventos mutagênicos e recombinogênicos, enquanto a progênie BH possibilita a ocorrência apenas de mutações, uma vez que os eventos recombinacionais são eliminados (Spanó *et al.*, 2001). Neste sentido, a análise dos resultados das duas

progênies permite identificar a contribuição dos eventos mutagênicos e recombinogênicos no total de manchas mutantes observadas.

Após 24 h da realização dos cruzamentos, ovos dos descendentes dos cruzamentos ST e HB foram coletados por um período de 8 horas, em frascos contendo meio de cultura à base de ágar (4%) e fermento biológico suplementado com sacarose.

Larvas de 3º estágio foram lavadas com água ultrapura Milli-Q (Millipore) e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina e submetidas ao tratamento crônico (aproximadamente 48 horas) em frascos contendo 1,5 g de purê de batatas (Yoki® Alimentos S.A) e hidratados com 5 mL de diferentes concentrações de TMX, IMI, ACP, AC, PRM ou MOP, em duas séries de experimentos independentes. As larvas foram contadas antes da distribuição em uma dessas séries de frascos. O número de moscas emergentes foi usado para o cálculo de taxa de sobrevivência após exposição, objetivando, desta forma, expressar a toxicidade dos inseticidas.

Uretano (Etil carbamato) (URE) foi usado como controle positivo, na concentração de 10 mM, conforme descrito na literatura (Silva *et al.*, 2006; Morais *et al.*, 2016^a; 2018). Água ultrapura Milli-Q foi usada como controle negativo.

3.2.2. Preparação das lâminas e análise microscópica

Moscas adultas descendentes dos cruzamentos ST e HB foram fixadas em etanol 70% (v/v). As asas foram dissecadas e montadas em lâminas de microscopia com solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato de cloral e 50 mL de água destilada). As asas foram analisadas sob microscopia óptica de luz, com aumento de 400X.

3.2.3. Análise estatística

Foram analisadas 40 moscas por concentração (aproximadamente 48.800 células por mosca), acompanhado de controles negativo e positivo. As frequências de manchas simples pequenas “mwh” ou “flare” (1 – 2 pelos mutantes); manchas simples grandes “mwh” ou “flare” (acima de 2 pelos mutantes) e gêmeas (“mwh” e “flare” na mesma mancha) foram registradas em um diagrama padrão, expressando o tamanho das manchas em classes (classe 1

= 1 pelo mutante; classe 2 = 2 pelos mutantes; classe 3 = 3 ou 4 pelos mutantes; classe 4 = 5 a 8 pelos mutantes; classe 5 = 9 a 16 pelos mutantes; classe 6 = 17 a 32 pelos mutantes, etc.). O procedimento de decisão múltipla (Frei e Würigler, 1988) foi utilizado para analisar os dados, resultando em três diferentes diagnósticos: negativo, positivo ou inconclusivo. As frequências de cada tipo de mancha (simples pequenas, simples grandes e gêmeas) e o total de manchas por mosca, de cada tratamento, foram comparadas aos pares (exemplo, controle negativo vs. tratamento TMX) de acordo com Kastenbaum e Bowman (1970), com $p = 0,05$ (Frei e Würigler, 1988).

3.3. Teste para detecção de tumores epiteliais em células somáticas de *D. melanogaster* (Epithelial Tumor Test - ETT)

3.3.1. Linhagens de *Drosophila*, cruzamento e tratamentos

Foram usadas duas linhagens de *D. melanogaster*: (1) Linhagem “multiple wing hairs” (*mwh*, 3-0,3) (descrição completa na seção 3.2.1); (2) Linhagem “wts” (*wts*, 3-100) (constituição: *wts*, [1] in [1] *kni* [*ri-1*] *p* [*p*] *wts* [3-17]/TM3, *S B* [1]). A linhagem “wts” possui um marcador *wts* no cromossomo 3, que devido à letalidade em homozigose recessiva (*wts*^{+/wts}) é mantido em hemizigose na presença do balanceador cromossômico TM3, *Sb*¹. O marcador *wts*, quando expresso na condição selvagem, atua como um gene supressor de tumor. A deleção desse gene e a expressão do alelo recessivo, leva à formação de clones de células que são consideradas altamente invasivas, acarretando a manifestação de tumores epiteliais no corpo e apêndices da mosca.

Foi realizado o cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens da linhagem *wts*/TM3, *Sb*¹. Duas progênies são geradas nesse cruzamento: (1) trans-heterozigoto marcado (*mwh*^{+/+}*wts*) (MH) e (2) heterozigoto balanceado (*mwh*^{+/+}TM3, *Sb*¹) (BH). No ensaio de detecção de tumor epitelial, apenas a progênie MH é analisada. A identificação da progênie é feita mediante a expressão do balanceador cromossômico TM3, *Sb*¹, que apresenta, como fenótipo, pelos curtos e espessos no corpo da mosca, o que difere da progênie MH, que apresenta pelos selvagens do tipo longos e finos.

As linhagens foram mantidas em estoque em frascos de 250 mL contendo meio de cultura à base de banana, em estufa tipo BOD (SOLAB) em ciclos de claro/escuro (12h:12h) na temperatura de 25°C e umidade relativa de 65%.

As concentrações utilizadas dos inseticidas TMX, IMI, ACP, AC, PRM e MOP foram determinadas mediante ensaio prévio de toxicidade, avaliada por meio da quantidade de imagos que sobreviveram à toxicidade conferida por esses agentes químicos. Para tanto, larvas descendentes das progênes geradas pelo cruzamento *mwh/mwh x wts/TM3, Sb¹* foram contadas e transferidas para frascos contendo 1,5 g de purê de batatas, hidratados com 5 mL de solução de diferentes concentrações de TMX, IMI, ACP, AC, PRM ou MOP. Após a metamorfose, foi registrado o número de sobreviventes, objetivando, desta forma, expressar a toxicidade dos inseticidas.

Como controle positivo foi usada MMC 0,1 mM. Esta concentração foi baseada em estudos de recombinação homóloga em *D. melanogaster* (Tsuda e Takeda, 1987) e ensaios de carcinogênese (Nepomuceno, 2015; Morais *et al.*, 2016^{ab}; Morais *et al.*, 2018; Naves *et al.*, 2018). No controle positivo Larvas de 3° estágio foram expostas a 0,1 mM de MMC durante 6 horas e, posteriormente, transferidas para frascos contendo 1,5 g de purê de batata hidratado com 5 mL de água ultrapura, onde permaneceram até o final da metamorfose.

3.3.2. Fixação das moscas e análise dos tumores epiteliais

Para análise dos tumores epiteliais, imagos resultantes do cruzamento entre machos *mwh+/+mwh* e fêmeas virgens *wts+/TM3, Sb¹* foram fixados em etanol 70% (v/v), colocados em placas de Petri embebidas em glicerina e analisados sob estereomicroscópio (Bel® Photonics). A análise baseou-se na contagem de tumores, de acordo com a descrição de Justice (1995). Os resultados foram registrados em um diagrama padrão, expressando os números de tumores observados em cada segmento do corpo das moscas: olhos, cabeça, corpo (tórax e abdome), asas, pernas e halteres.

3.3.3. Análise estatística

As frequências de tumores epiteliais observados nos indivíduos tratados com as diferentes concentrações de TMX, IMI, ACP, AC, PRM, MOP e MMC

foram comparadas estatisticamente com as frequências de tumores epiteliais observadas nas moscas tratadas com água ultrapura (controle negativo) usando o teste *U*, não paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância $p \leq 0,05$.

Comparações estatísticas referentes às taxas de sobrevivência foram realizadas por meio do teste do Chi-quadrado, para razões de amostras independentes, para todas as progênies tratadas com TMX, IMI, ACP, AC, PRM, MOP e os controles negativos e positivos.

4. RESULTADOS

4.1. Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em células de asas de *D. melanogaster* (Somatic Mutation and Recombination Test - SMART)

4.1.1. Toxicidade

A **Figura 2** apresenta os resultados do ensaio de sobrevivência em moscas descendentes do cruzamento ST e HB, tratadas com diferentes concentrações de TMX e AC.

TMX e AC foram tóxicos nas concentrações de $9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ mM para *D. melanogaster* descendentes do cruzamento ST (**Fig. 2A**), e na concentração de $1,9 \times 10^{-3}$ mM, para descendentes do cruzamento HB (**Fig. 2B**).

A **Figura 3** apresenta os resultados do ensaio de sobrevivência em moscas descendentes dos cruzamentos ST e HB, tratadas com diferentes concentrações de IMI e PRM.

IMI e PRM foram tóxicos para *D. melanogaster* descendentes do cruzamento ST apenas na concentração de $1,9 \times 10^{-3}$ mM (**Fig. 3A**). Em moscas descendentes do cruzamento HB, IMI exerceu atividade tóxica significativa ($p < 0,05$) na concentração de $1,9 \times 10^{-3}$ mM, enquanto PRM foi tóxico nas concentrações de $4,8 \times 10^{-4}$; $9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ mM (**Fig. 3B**). Em todas as concentrações avaliadas, tanto no cruzamento ST quanto no HB, PRM foi mais tóxico para *D. melanogaster* quando comparado ao IMI (**Fig. 3 A e 3 B**).

A **Figura 4** apresenta os resultados do ensaio de sobrevivência de moscas descendentes dos cruzamentos ST e HB, expostas a diferentes concentrações de ACP e MOP.

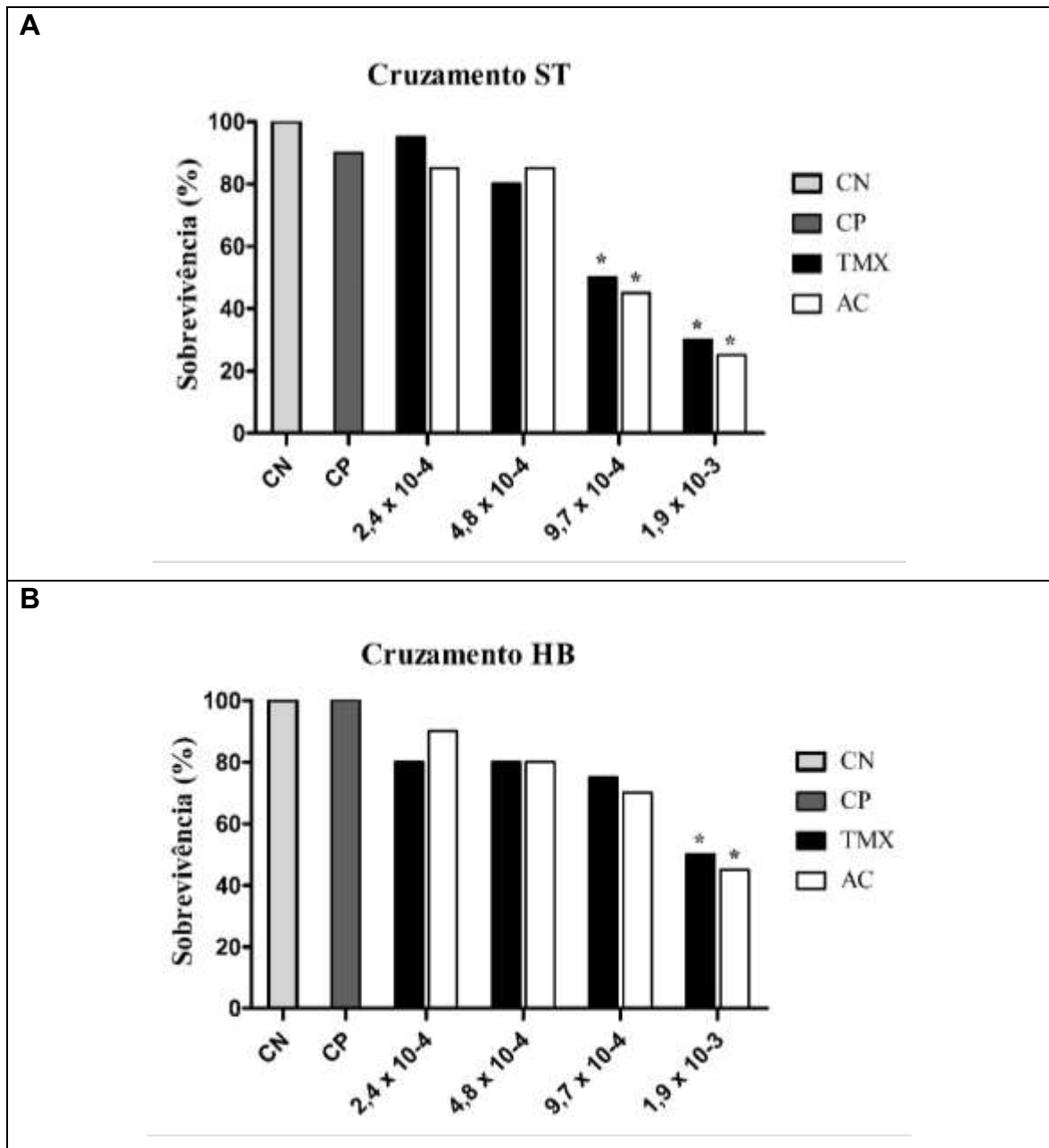


Figura 2. Taxa de sobrevivência em *D. melanogaster* descendentes do cruzamento ST (A) e HB (B), expostas a diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX) e Actara® (AC). CN: Controle negativo (água ultrapura); CP: Controle positivo (Uretano 10 mM). * Diferença estatisticamente significativa comparada ao controle negativo, de acordo com o teste do Chi-quadrado para razões de amostras independentes.

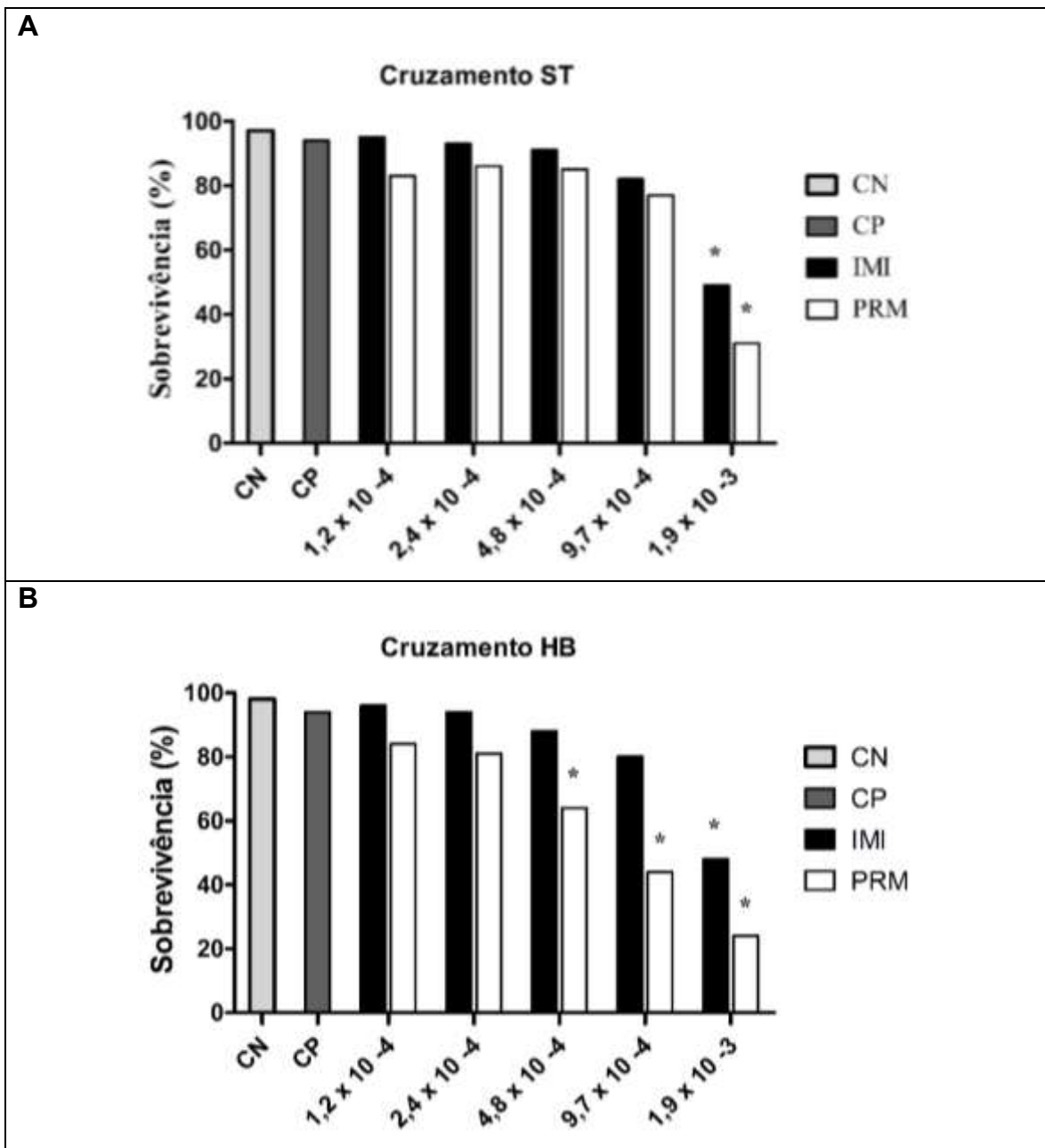


Figura 3. Taxa de sobrevivência em *D. melanogaster* descendentes do cruzamento ST (A) e HB (B), expostas a diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI) e Premier® (PRM). CN: Controle negativo (água ultrapura); CP: Controle positivo (Uretano 10 mM). * Diferença estatisticamente significativa comparada ao controle negativo, de acordo com o teste do Chi-quadrado para razões de amostras independentes.

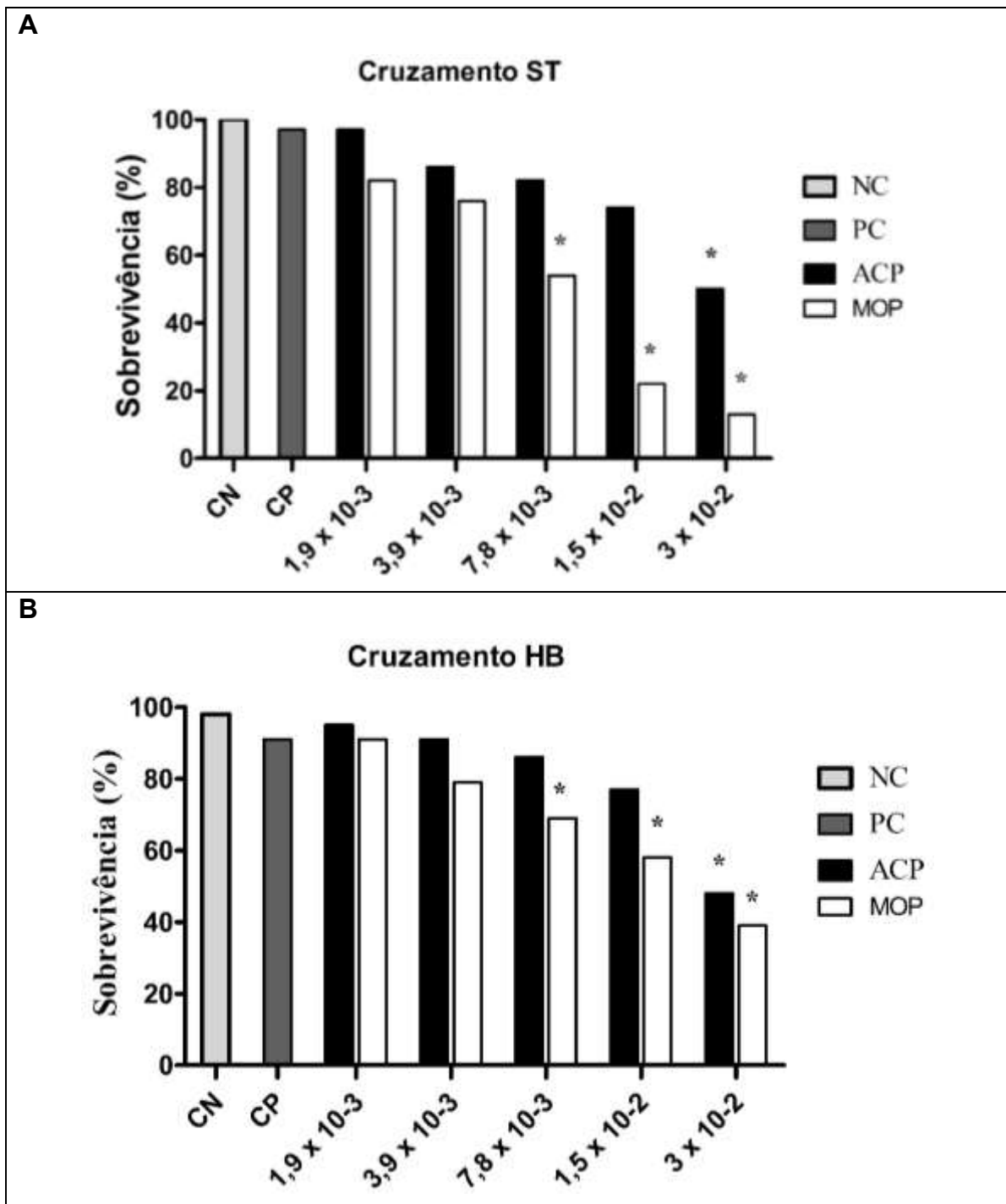


Figura 4. Taxa de sobrevivência em *D. melanogaster* descendentes do cruzamento ST (A) e HB (B), expostas a diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP) e Mospilan® (MOP). CN: Controle negativo (água ultrapura); CP: Controle positivo (Uretano 10 mM). * Diferença estatisticamente significativa

comparada ao controle negativo, de acordo com o teste do Chi- quadrado para razões de amostras independentes.

Em ambos os cruzamentos (ST e HB), o ACP apresentou toxicidade significativa ($p < 0,05$) apenas na maior concentração (3×10^{-2} mM), enquanto que MOP apresentou toxicidade significativa ($p < 0,05$) nas concentrações de $7,8 \times 10^{-3}$, $1,5 \times 10^{-2}$ e 3×10^{-2} mM. Embora os resultados tenham sido similares, a taxa de mortalidade foi inferior nas moscas descendentes do cruzamento HB, quando comparado ao ST (**Fig. 4 A e B**). Nos tratamentos com ACP e MOP, foi verificado maior toxicidade do produto formulado (MOP).

4.1.2. Detecção de Mutação e Recombinação

As concentrações utilizadas nos ensaios de mutagenicidade e recombinogenicidade foram determinadas com base nos ensaios de sobrevivência. Foram selecionadas apenas concentrações subletais, observadas em moscas descendentes do cruzamento ST expostas aos ingredientes ativos TMX, IMI e ACP, exceto as concentrações de $9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ mM de TMX, as quais apresentaram atividade tóxica em *D. melanogaster*. Estas concentrações foram incluídas nas análises de mutagenicidade e recombinogenicidade após serem observados resultados negativos para mutagenicidade e carcinogenicidade na maioria das concentrações subletais destes inseticidas.

TMX e AC não induziram aumento significativo no número total de manchas mutantes ($p > 0,05$) nos descendentes MH do cruzamento ST, quando comparado com o controle negativo (**Tabela 1**).

Por outro lado, em moscas da progênie MH, descendentes do cruzamento HB, foi observado diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na frequência total de manchas mutantes em moscas tratadas com $9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ mM de TMX quando comparado ao controle negativo (**Tabela 2**). Resultados similares foram observados em moscas tratadas com $9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ mM de AC. Portanto, conclui-se que TMX e AC possuem atividade mutagênica em *D. melanogaster*, dependente de metabolismo via CYP6A2.

Após constatada a atividade mutagênica nas concentrações de $9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ mM de TMX e AC nos descendentes MH, procedeu-se a análise da prole BH das moscas descendentes do cruzamento HB tratadas com essas

mesmas concentrações. Os resultados obtidos nos tratados com $9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ mM TMX sugerem que os mecanismos associados à perda da heterozigose dos marcadores genéticos *mwh* e *flr³* no cromossomo 3 das moscas são resultados de eventos recombinogênicos (75% e 55,56%, respectivamente), enquanto que os resultados do total de manchas mutantes observados em moscas expostas a $9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ mM de AC sugerem mecanismos associados a eventos mutagênicos (74,19 e 73,78%, respectivamente) (**Tabela 2**).

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos com o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) na progênie trans-heterozigota marcada (MH) do cruzamento padrão (ST), após tratamento com diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX) e Actara® (AC)

Genótipos e tratamentos (mM)	Número de moscas	Frequência de manchas por mosca (número de manchas); diagnóstico estatístico ^a				Manchas com clones <i>mwh</i> ^c	Frequência de formação de clones/10 ⁵ células por divisão ^d	
		Manchas simples pequenas (1-2 células) ^b	Manchas simples grandes (> 2 células) ^b	Manchas gêmeas	Total de manchas		Observado	Controle corrigido
<i>mwh/flr³</i>								
Controle negativo	40	0,48 (19)	0,08 (03)	0,00 (00)	0,55 (22)	20	1,02	
Uretano 10	40	1,98 (79) +	0,35 (14) +	0,20 (08) +	2,53 (101) +	87	4,45	3,43
TMX								
2,4 x 10 ⁻⁴	40	0,43 (17) -	0,10 (04) i	0,03 (01) i	0,55 (22) -	21	1,07	0,05
4,8 x 10 ⁻⁴	40	0,53 (21) i	0,05 (02) i	0,03 (01) i	0,60 (24) -	24	1,22	0,20
9,7 x 10 ⁻⁴	40	0,38 (15) -	0,23 (09) i	0,05 (02) i	0,65 (26) -	23	1,17	0,15
1,9 x 10 ⁻³	40	0,50 (20) i	0,10 (04) i	0,03 (01) i	0,63 (25) -	24	1,22	0,20
AC								
2,4 x 10 ⁻⁴	40	0,43 (17) -	0,10 (04) i	0,05 (02) i	0,58 (23) -	20	1,02	0,00
4,8 x 10 ⁻⁴	40	0,43 (17) -	0,10 (04) i	0,03 (01) i	0,55 (22) -	20	1,02	0,00
9,7 x 10 ⁻⁴	40	0,45 (18) -	0,08 (03) i	0,03 (01) i	0,55 (22) -	19	0,97	-0,05
1,9 x 10 ⁻³	40	0,55 (22) i	0,10 (04) i	0,00 (00) i	0,65 (26) -	25	1,28	0,26

Foram avaliadas moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh* / *flr³*).

^aDiagnósticos estatísticos de acordo com Frei e Würzler (1988): + positivo; i inconclusivo; - negativo. p≤0,05 vs. Controle negativo.

^b Incluindo manchas simples raras *flr³*.

^c Considerando clones *mwh* simples e de manchas gêmeas.

^d Frequência de formação de clones: clones / moscas / 48.800 células (sem correção de tamanho).

Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos com o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) na progênie trans-heterozigota marcada (MH) e trans-heterozigota balanceada (BH) do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), após tratamento com diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX) e Actara® (AC)

Genótipos e tratamentos (mM)	Número de moscas	Frequência de manchas por mosca (número de manchas) / diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas <i>mwh</i> ^c	Frequência de formação de clones/10 ⁵ células por divisão ^d		Recombinação (%) ^e	Mutação (%)
		Manchas simples pequenas ^b (1-2 células)	Manchas simples grandes ^b (> 2 células)	Manchas gêmeas	Total de manchas		Observado	Controle corrigido		
<i>mwh/fir</i>³										
C. negativo	40	0,53 (21)	0,03 (01)	0,00 (00)	0,55 (22)	22	1,12			
Uretano 10	40	4,80 (192) +	0,65 (26)+	0,55 (22) +	6,00 (240) +	208	10,65	9,53	33,90	66,10
TMX										
2,4 x 10 ⁻⁴	40	0,43 (17) -	0,08 (03) i	0,08 (03) i	0,58 (23) -	23	1,17	0,05		
4,8 x 10 ⁻⁴	40	0,45 (18) -	0,05 (02) i	0,08 (03) i	0,58 (23) -	23	1,17	0,05		
9,7 x 10 ⁻⁴	40	0,78 (31) i	0,10 (04) i	0,03 (01) i	0,90 (36) +	36	1,84	0,72	75,00	25,00
1,9 x 10 ⁻³	40	0,80 (32) i	0,10 (04) i	0,05 (02) i	0,95 (38) +	36	1,84	0,72	55,56	44,44
AC										
2,4 x 10 ⁻⁴	40	0,48 (19) -	0,05 (02) i	0,05 (02) i	0,58 (23) -	23	1,17	0,05		
4,8 x 10 ⁻⁴	60	0,60 (36) -	0,03 (02) i	0,02 (01) i	0,65 (39) -	39	1,33	0,21		
9,7 x 10 ⁻⁴	40	0,85 (34) i	0,18 (07) +	0,00 (00) i	1,03 (41) +	34	1,74	0,62	25,81	74,19
1,9 x 10 ⁻³	40	0,78 (31) i	0,25 (10) +	0,05 (02) i	1,08 (43) +	42	2,15	1,03	26,22	73,78
<i>mwh/TM3</i>										
C. negativo	40	0,43 (17)	0,00 (00)	f	0,43 (17)	17	0,87			
Uretano 10	40	3,03 (121) +	0,48 (19) +		3,50 (140) +	140	7,17	6,30		
TMX										
9,7 x 10 ⁻⁴	60	0,45 (27) -	0,07 (04) i		0,52 (31) i	31	1,05	0,18		
1,9 x 10 ⁻³	60	0,50 (30) i	0,08 (05) i		0,58 (35) i	35	1,19	0,32		
AC										
9,7 x 10 ⁻⁴	60	0,63 (38) i	0,02 (01) i		0,65 (39) i	39	1,33	0,46		
1,9 x 10 ⁻³	40	0,73 (29) i	0,08 (03) i		0,80 (32) +	32	1,63	0,76		

Foram avaliadas moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh / flr³*) e trans-heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*).

^a Diagnósticos estatísticos de acordo com Frei e Würzler (1988): + positivo; i inconclusivo; - negativo. $p \leq 0,05$ vs. Controle negativo.

^b Incluindo manchas simples raras *flr³*.

^c Considerando clones *mwh* simples e de manchas gêmeas.

^d Frequência de formação de clones: clones / moscas / 48.800 células (sem correção de tamanho).

^e Calculado como: Recombinação = 100 – mutação. Mutação = frequência de manchas em moscas BH/ frequência de manchas em moscas MH x 100; cálculo de recombinação: 100 – mutação; Mutação = frequência de clones nas moscas da progênie BH/ moscas da progênie MH x 100 (Santos *et al.*, 1999).

^f O balanceador cromossômico TM3 não possui a mutação *flr³* e a recombinação é suprimida devido às múltiplas regiões invertidas neste cromossomo.

Os resultados referentes à análise de manchas mutantes nas moscas descendentes do cruzamento ST, tratadas com diferentes concentrações de IMI e PRM estão apresentados na **Tabela 3**. As frequências de manchas mutantes observadas nos tratados com IMI não diferiram significativamente ($p > 0,05$) da frequência de manchas observada no controle negativo, não apresentando, portanto, atividade mutagênica ou recombinogênica. Por outro lado, o PRM foi capaz de aumentar significativamente ($p \leq 0,05$) a frequência de manchas mutantes em todas as concentrações avaliadas, atuando como mutágeno direto.

Após metabolização via CYP6A2, IMI nas concentrações de $2,4 \times 10^{-4}$ e $4,8 \times 10^{-4}$ mM e PRM, em todas as concentrações avaliadas, induziram altas frequências de manchas mutantes, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) do controle negativo (**Tabela 4**). Assim, esses resultados sugerem que, após metabolização via CYP6A2, tanto IMI quanto PRM são capazes de induzir instabilidade genética, levando à formação de manchas mutantes.

Os resultados da análise dos eventos associados à formação de manchas mutantes nas asas de *D. melanogaster* nos permitem concluir que IMI exerce atividade mutagênica dependente de metabolismo via citocromo P450 (CYP6A2). A taxa de mutação observada nos descendentes do cruzamento HB tratados com $2,4 \times 10^{-4}$ e $4,8 \times 10^{-4}$ mM foram de 56,59% e 84,92%, respectivamente (**Tabela 4**).

PRM, nas concentrações de $1,2 \times 10^{-4}$, $2,4 \times 10^{-4}$ e $4,8 \times 10^{-4}$ mM, incrementa a frequência de manchas mutantes nas moscas descendentes do cruzamento ST, preferencialmente por eventos recombinogênicos (73,71; 59,20 e 62,44%, respectivamente) (**Tabela 3**). No entanto, após metabolização via CYP6A2 (cruzamento HB), PRM incrementa manchas mutantes em *D. melanogaster* principalmente por eventos mutagênicos (**Tabela 4**).

Tabela 3. Resumo dos resultados obtidos com o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) na progênie trans-heterozigota marcada (MH) e trans-heterozigota balanceada (BH) do cruzamento padrão (ST), após tratamento com diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI) e Premier® (PRM)

Genótipos e tratamentos (mM)	Número de moscas	Frequência de manchas por mosca (número de manchas) / diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas <i>mwh</i> ^c	Frequência de formação de clones/10 ⁵ células por divisão ^d		Recombinação (%) ^e	Mutação (%)
		Manchas simples pequenas ^b (1-2 células)	Manchas simples grandes ^b (> 2 células)	Manchas gêmeas	Total de manchas		Observado	Controle corrigido		
<i>mwh/fir</i>³										
C. negativo	40	0,43 (17)	0,03 (01)	0,03 (01)	0,48 (19)	19	0,97			
Uretano	40	2,18 (87) +	0,25 (10) +	0,03 (01) i	2,45 (98) +	93	4,76	3,79	35,36	64,64
<i>IMI</i>										
1,2 x 10 ⁻⁴	40	0,38 (15) -	0,08 (03) i	0,00 (00) i	0,45 (18) -	18	0,92	- 0,05		
2,4 x 10 ⁻⁴	40	0,43 (17) -	0,05 (02) i	0,00 (00) i	0,48 (19) -	17	0,87	- 0,10		
4,8 x 10 ⁻⁴	40	0,48 (19) i	0,05 (02) i	0,00 (00) i	0,53 (21) -	21	1,07	0,10		
9,7 x 10 ⁻⁴	40	0,38 (15) -	0,05 (02) i	0,03 (01) i	0,45 (18) -	17	0,87	- 0,10		
<i>PRM</i>										
1,2 x 10 ⁻⁴	40	0,60 (24) i	0,45 (18) +	0,18 (07) +	1,23 (49) +	49	2,51	1,54	73,71	26,29
2,4 x 10 ⁻⁴	40	0,45 (18) -	0,30 (12) +	0,13 (05) i	0,88 (35) +	34	1,74	0,77	59,20	40,80
4,8 x 10 ⁻⁴	40	0,68 (27) i	0,20 (08) +	0,05 (02) i	0,93 (37) +	37	1,89	0,92	62,44	37,56
9,7 x 10 ⁻⁴	40	0,45 (18) -	0,28 (11) +	0,08 (03) i	0,80 (32) +	30	1,53	0,56	47,06	52,94
<i>mwh/TM3</i>										
C. negativo	40	0,43 (17)	0,00 (00)	f	0,43 (17)	17	0,87			
Uretano 10	40	1,43 (57) +	0,20 (08) +		1,63 (65) +	65	3,32	2,45		
<i>PRM</i>										
1,2 x 10 ⁻⁴	40	0,30 (12) -	0,03 (01) i		0,33 (13) -	13	0,66	- 0,21		
2,4 x 10 ⁻⁴	40	0,30 (12) -	0,05 (02) i		0,35 (14) -	14	0,71	- 0,16		
4,8 x 10 ⁻⁴	40	0,30 (12) -	0,05 (02) i		0,35 (14) -	14	0,71	- 0,16		
9,7 x 10 ⁻⁴	40	0,35 (14) -	0,05 (02) i		0,40 (16) -	16	0,81	- 0,06		

Foram avaliadas moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh / flr³*) e trans-heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*).

^a Diagnósticos estatísticos de acordo com Frei e Würzler (1988): + positivo; i inconclusivo; - negativo. $p \leq 0,05$ vs. Controle negativo.

^b Incluindo manchas simples raras *flr³*.

^c Considerando clones *mwh* simples e de manchas gêmeas.

^d Frequência de formação de clones: clones / moscas / 48.800 células (sem correção de tamanho).

^e Calculado como: Recombinação = 100 – mutação. Mutação = frequência de manchas em moscas BH/ frequência de manchas em moscas MH x 100; cálculo de recombinação: 100 – mutação; Mutação = frequência de clones nas moscas da progênie BH/ moscas da progênie MH x 100 (Santos *et al.*, 1999).

^f O balanceador cromossômico TM3 não possui a mutação *flr³* e a recombinação é suprimida devido às múltiplas regiões invertidas neste cromossomo.

Tabela 4. Resumo dos resultados obtidos com o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) na progênie trans-heterozigota marcada (MH) e trans-heterozigota balanceada (BH) do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), após tratamento com diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI) e Premier® (PRM)

Genótipos e tratamentos	Número de moscas	Frequência de manchas por mosca (número de manchas) / diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas <i>mwh</i> ^c	Frequência de formação de clones/10 ⁵ células por divisão ^d		Recombinação (%) ^e	Mutação (%)
		Manchas simples pequenas ^b (1-2 células)	Manchas simples grandes ^b (> 2 células)	Manchas gêmeas	Total de manchas		Observado	Controle corrigido		
<i>mwh/flr³</i>										
C. negativo	40	0,50 (20)	0,03 (01)	0,05 (02)	0,58 (23)	21	1,07			
Uretano 10	40	11,0 (440) +	1,28 (51) +	1,53 (61) +	13,80 (552) +	505	25,87	24,80	29,73	70,27
<i>IMI</i>										
1,2 x 10 ⁻⁴	40	0,53 (21) -	0,03 (01) i	0,00 (00) i	0,55 (22) -	22	1,12	0,05		
2,4 x 10 ⁻⁴	40	0,90 (36) +	0,25 (10) +	0,03 (01) i	1,18 (47) +	46	2,35	1,28	43,41	56,59
4,8 x 10 ⁻⁴	40	0,85 (34) +	0,10 (04) i	0,03 (01) i	0,98 (39) +	39	1,99	0,92	15,08	84,92
9,7 x 10 ⁻⁴	40	0,58 (23) -	0,03 (01) i	0,05 (02) i	0,65 (26) -	26	1,33	0,26		
<i>PRM</i>										
1,2 x 10 ⁻⁴	40	0,65 (26) i	0,53 (21) +	0,05 (02) i	1,23 (49) +	48	2,45	1,38	31,03	68,97
2,4 x 10 ⁻⁴	40	0,63 (25) i	0,40 (16) +	0,10 (04) i	1,13 (45) +	42	2,15	1,08	35,82	64,18
4,8 x 10 ⁻⁴	40	0,80 (32) i	0,25 (10) +	0,05 (02) i	1,10 (44) +	41	2,10	1,03	17,15	82,85
9,7 x 10 ⁻⁴	40	0,68 (27) i	0,25 (10) +	0,10 (04) i	1,03 (41) +	41	2,10	1,03	05,24	94,76
<i>mwh/TM3</i>										
C. negativo	40	0,45 (18)	0,03 (01)	f	0,48 (19)	19	0,97			
Uretano 10	40	7,93 (317) +	0,95 (38) +		8,88 (355) +	355	18,18	17,21		
<i>IMI</i>										
2,4 x 10 ⁻⁴	40	0,65 (26) i	0,00 (00) i		0,65 (26) i	26	1,33	0,36		
4,8 x 10 ⁻⁴	40	0,80 (32) +	0,03 (01) i		0,83 (33) +	33	1,69	0,72		
<i>PRM</i>										
1,2 x 10 ⁻⁴	40	0,75 (30) i	0,08 (03) i		0,83 (33) +	33	1,69	0,72		
2,4 x 10 ⁻⁴	40	0,68 (27) i	0,00 (00) i		0,68 (27) i	27	1,38	0,41		
4,8 x 10 ⁻⁴	40	0,83 (33) +	0,03 (01) i		0,85 (34) +	34	1,74	0,77		
9,7 x 10 ⁻⁴	40	0,90 (36) +	0,08 (03) i		0,98 (39) +	39	1,99	1,02		

Foram avaliadas moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh / flr³*) e trans-heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*).

^a Diagnósticos estatísticos de acordo com Frei e Würigler (1988): + positivo; i inconclusivo; - negativo. $p \leq 0,05$ vs. Controle negativo.

^b Incluindo manchas simples raras *flr³*.

^c Considerando clones *mwh* simples e de manchas gêmeas.

^d Frequência de formação de clones: clones / moscas / 48.800 células (sem correção de tamanho).

^e Calculado como: Recombinação = 100 – mutação. Mutação = frequência de manchas em moscas BH/ frequência de manchas em moscas MH x 100; cálculo de recombinação: 100 – mutação; Mutação = frequência de clones nas moscas da progênie BH/ moscas da progênie MH x 100 (Santos *et al.*, 1999).

^f O balanceador cromossômico TM3 não possui a mutação *flr³* e a recombinação é suprimida devido às múltiplas regiões invertidas neste cromossomo.

Os resultados referentes à análise de manchas mutantes em moscas descendentes do cruzamento ST, tratadas com ACP e MOP (**Tabela 5**) foram semelhantes aos resultados observados em moscas tratadas com TMX e AC (**Tabela 1**). Nenhuma das concentrações avaliadas diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) do controle negativo, demonstrando ausência de efeitos mutagênicos ou recombinogênicos.

Por outro lado, um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) na frequência de manchas mutantes fora observado em moscas tratadas com ACP e MOP após metabolização via CYP6A2 (**Tabela 6**). ACP diferiu estatisticamente ($p \leq 0,05$) na frequência de manchas mutantes nas concentrações de $1,9 \times 10^{-3}$; $3,9 \times 10^{-3}$; $7,8 \times 10^{-3}$ e $1,5 \times 10^{-2}$ mM, quando comparado as moscas do controle negativo. MOP apresentou efeito mutagênico estatisticamente significativo nas menores concentrações avaliadas ($1,9 \times 10^{-3}$ e $3,9 \times 10^{-3}$ mM).

A análise da prole BH nos permitiu concluir que ACP, após metabolização via CYP6A2, causa danos no material genético de *D. melanogaster* principalmente por eventos recombinogênicos, enquanto MOP causa danos por eventos mutagênicos (**Tabela 6**). A taxa de recombinação nas moscas descendentes do cruzamento HB, tratadas com ACP foi de 66,31; 76,12; 100 e 79,23% nas concentrações de 9×10^{-3} ; $3,9 \times 10^{-3}$; $7,8 \times 10^{-3}$ e $1,5 \times 10^{-2}$, respectivamente. Os resultados positivos para a frequência total de manchas mutantes nas moscas tratadas com MOP devido a eventos mutagênicos foram de 86,11 e 100% para as concentrações de 1,9 e $3,9 \times 10^{-3}$ mM.

No presente trabalho, as moscas pertencentes aos controles negativo (água ultrapura) e positivo (uretano a 10 mM) responderam fielmente de acordo com os resultados esperados para frequência de manchas mutantes no SMART. Uretano a 10 mM induziu frequência total de manchas mutantes de 2,53 (**Tabelas 1 e 5**) e 2,45 (**Tabela 3**) em moscas pertencentes a prole MH (ST) e 2,40 (**Tabelas 2 e 6**) e 13,80 (**Tabela 4**) (HB). Todas as categorias de manchas mutantes (simples pequenas, simples grandes e gêmeas) diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) do controle negativo (**Tabelas 1- 6**).

Tabela 5. Resumo dos resultados obtidos com o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) na progênie trans-heterozigoto marcado (MH) do cruzamento padrão (ST), após tratamento com diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP) e Mospilan® (PRM)

Genótipos e tratamentos (mM)	Número de moscas	Frequência de manchas por mosca (número de manchas); diagnóstico estatístico ^a				Manchas com clones <i>mwh</i> ^c	Frequência de formação de clones/10 ⁵ células por divisão ^d	
		Manchas simples pequenas (1-2 células) ^b	Manchas simples grandes (> 2 células) ^b	Manchas gêmeas	Total de manchas		Observado	Controle corrigido
<i>mwh/flr³</i>								
C. negativo	40	0,40 (16)	0,08 (03)	0,00 (00)	0,48 (19)	18	0,92	
URE	40	1,98 (79) +	0,35 (14) +	0,20 (08) +	2,53 (101) +	87	4,45	3,53
ACP								
1,9 x 10 ⁻³	40	0,40 (16) -	0,08 (03) i	0,00 (00) i	0,48 (19) -	17	0,87	- 0,05
3,9 x 10 ⁻³	40	0,43 (17) i	0,10 (04) i	0,00 (00) i	0,53 (21) -	21	1,07	0,15
7,8 x 10 ⁻³	40	0,33 (13) -	0,08 (03) i	0,08 (03) i	0,48 (19) -	19	0,97	0,05
1,5 x 10 ⁻²	40	0,40 (16) -	0,08 (03) i	0,00 (00) i	0,48 (19) -	18	0,92	0,00
MOP								
1,9 x 10 ⁻³	40	0,33 (13) -	0,00 (00) -	0,05 (02) i	0,38 (15) -	15	0,76	- 0,16
3,9 x 10 ⁻³	40	0,33 (13) -	0,05 (02) i	0,03 (01) i	0,40 (16) -	15	0,76	- 0,16
7,8 x 10 ⁻³	40	0,28 (11) -	0,10 (04) i	0,03 (01) i	0,40 (16) -	16	0,81	- 0,11
1,5 x 10 ⁻²	40	0,43 (17)i	0,00 (00) -	0,00 (00) i	0,43 (17) -	17	0,87	- 0,05

Foram avaliadas moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh* / *flr³*).

^aDiagnósticos estatísticos de acordo com Frei e Würigler (1988): + positivo; i inconclusivo; - negativo. $p \leq 0,05$ vs. Controle negativo.

^b Incluindo manchas simples raras *flr³*.

^c Considerando clones *mwh* simples e de manchas gêmeas.

^d Frequência de formação de clones: clones / moscas / 48.800 células (sem correção de tamanho).

Tabela 6. Resumo dos resultados obtidos com o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) na progênie trans-heterozigota marcada (MH) e trans-heterozigota balanceada (BH) do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), após tratamento com diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP) e Mospilan® (MOP)

Genótipos e tratamentos (mM)	Número de moscas	Frequência de manchas por mosca (número de manchas) / diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas <i>mwh</i> ^c	Frequência de formação de clones/10 ⁵ células por divisão ^d		Recombinação (%) ^e	Mutação (%)
		Manchas simples pequenas ^b (1-2 células)	Manchas simples grandes ^b (> 2 células)	Manchas gêmeas	Total de manchas		Observado	Controle corrigido		
<i>mwh/fir</i>³										
C. negativo	40	0,45 (18)	0,03 (01)	0,03 (01)	0,50 (20)	20	1,02			
Uretano 10	40	4,80 (192) +	0,65 (26) +	0,55 (22) +	6,00 (240) +	208	10,65	9,63	33,96	66,04
ACP										
1,9 x 10 ⁻³	40	0,80 (32) +	0,10 (04) i	0,05 (02) i	0,95 (38) +	38	1,94	0,92	66,31	33,69
3,9 x 10 ⁻³	40	0,70 (28) i	0,13 (05) i	0,08 (03) i	0,90 (36) +	33	1,69	0,67	76,12	23,88
7,8 x 10 ⁻³	40	0,78 (31) +	0,10 (04) i	0,03 (01) i	0,90 (36) +	31	1,58	0,56	100,0	00,00
1,5 x 10 ⁻²	40	0,85 (34) +	0,10 (04) i	0,00 (00) i	0,95 (38) +	35	1,79	0,77	79,23	20,77
MOP										
1,9 x 10 ⁻³	40	0,73 (29) +	0,10 (04) i	0,03 (01) i	0,85 (34) +	34	1,74	0,72	13,89	86,11
3,9 x 10 ⁻³	40	0,78 (31) +	0,10 (04) i	0,03 (01) i	0,90 (36) +	34	1,74	0,72	00,00	100,0
7,8 x 10 ⁻³	40	0,43 (17) -	0,03 (01) i	0,03 (01) i	0,48 (19) -	14	0,71	- 0,31		
1,5 x 10 ⁻²	40	0,45 (18) -	0,08 (03) i	0,00 (00) i	0,53 (21) -	18	0,92	- 0,10		
<i>mwh/TM3</i>										
C. negativo	40	0,38 (15)	0,03 (01)		0,40 (16)	16	0,81			
Uretano 10	40	3,03 (121) +	0,48 (19) +		3,50 (140) +	140	7,17	6,36		
ACP										
1,9 x 10 ⁻³		0,48 (19) i	0,08 (03) i		0,55 (22) i	22	1,12	0,31		
3,9 x 10 ⁻³	40	0,38 (15) -	0,10 (04) i		0,48 (19) i	19	0,97	0,16		
7,8 x 10 ⁻³	40	0,38 (15) -	0,03 (01) i		0,40 (16) -	16	0,81	0,00		
1,5 x 10 ⁻²	40	0,48 (19) i	0,00 (00) i		0,48 (19) i	19	0,97	0,16		
MOP										
1,9 x 10 ⁻³	40	0,70 (28) +	0,00 (00) i		0,70 (28) +	28	1,43	0,62		
3,9 x 10 ⁻³	40	0,70 (28) +	0,05 (02) i		0,75 (30) +	30	1,53	0,72		

Foram avaliadas moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh / flr³*) e trans-heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*).

^a Diagnósticos estatísticos de acordo com Frei e Würzler (1988): + positivo; i inconclusivo; - negativo. $p \leq 0,05$ vs. Controle negativo.

^b Incluindo manchas simples raras *flr³*.

^c Considerando clones *mwh* simples e de manchas gêmeas.

^d Frequência de formação de clones: clones / moscas / 48.800 células (sem correção de tamanho).

^e Calculado como: Recombinação = 100 – mutação. Mutação = frequência de manchas em moscas BH/ frequência de manchas em moscas MH x 100; cálculo de recombinação: 100 – mutação; Mutação = frequência de clones nas moscas da progênie BH/ moscas da progênie MH x 100 (Santos *et al.*, 1999).

^f O balanceador cromossômico TM3 não possui a mutação *flr³* e a recombinação é suprimida devido às múltiplas regiões invertidas neste cromossomo.

A **Figura 5** apresenta diferentes tipos de manchas mutantes observadas em moscas tratadas com diferentes concentrações dos inseticidas neonicotinóides avaliados neste trabalho.

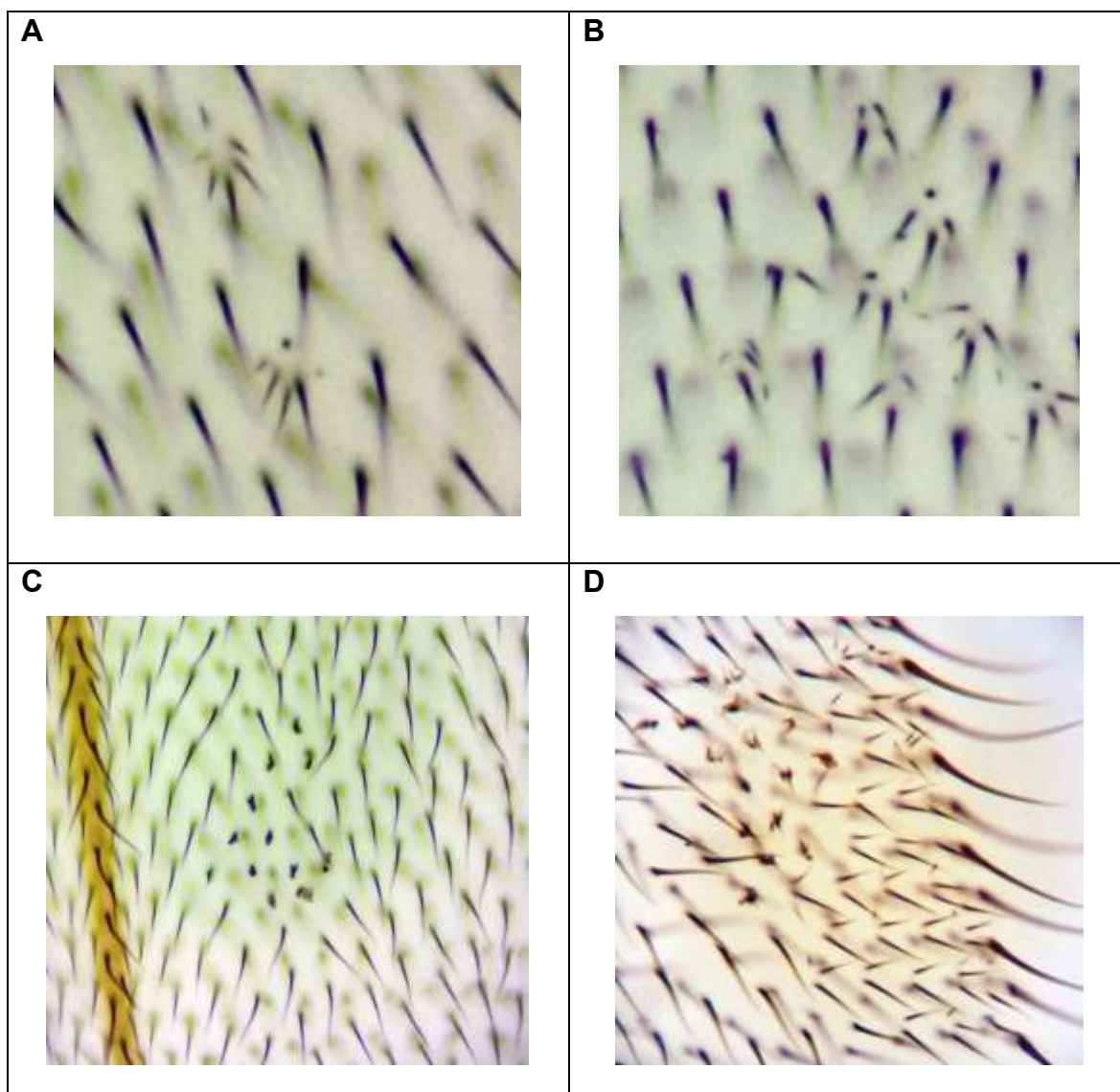


Figura 5. Manchas mutantes observadas em *D. melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de inseticidas neonicotinóides. A: Mancha mutante simples pequena (1-2 células) do tipo *multiple wing hairs*; B: Mancha mutante simples grande (>2 células) do tipo *multiple wing hairs*; C: Mancha simples mutante grande do tipo *flare*; D: Mancha gêmea (pelos *multiple wing hairs* e *flare*). Aumento de 400X.

A cinética da indução de manchas mutantes (mecanismo tardio ou precoce de indução) foi avaliada de acordo com a análise do tamanho das manchas mutantes, sendo estas classificadas em classes (1, 2, 3, 4, 5, etc), sendo que a mancha mutante de classe 1 possui apenas uma célula com 1 tricoma alterado (*multiple wing hair* ou *flare*); as manchas de classe 2 possuem de 2 a 3 tricomas alterados; manchas de classe 3 possuem de 4 a 8 células com tricomas alterados; manchas de classe 4 possuem de 9 a 16 células com tricomas alterados, e assim por diante (**Figuras 6 - 8**).

Como apresentado na **Figura 6**, a maioria das manchas mutantes observadas em *D. melanogaster* descendentes dos cruzamentos ST (**Figura 6 A e B**) ou HB (**Figura 6 C e D**) tratadas com diferentes concentrações de TMX e AC foram do tipo simples pequenas (classes 1 e 2).

Resultados similares foram observados em moscas descendentes dos cruzamentos ST e HB tratadas com diferentes concentrações de IMI (**Figura 7 A e C**), sendo, portanto, observado maior frequência de manchas mutantes distribuídas entre as classes 1 e 2. No entanto, em moscas descendentes dos cruzamentos ST e HB, tratadas com diferentes concentrações de PRM foi constatado maior heterogeneidade na distribuição de manchas, sendo observado um acréscimo nas manchas simples grandes (Classe ≥ 3) (**Figura 7 B e D**).

Em moscas tratadas com ACP e MOP foi observado maior homogeneidade nos resultados, sendo que a maioria das manchas mutantes observadas foram classificadas como pertencentes às classes 1 e 2, tanto no cruzamento ST (**Figura 8A e B**) quanto no cruzamento HB (**Figura 8C e D**).

Em todas as análises do controle positivo (URE 10 mM) foi observado maior frequência de manchas mutantes pequenas simples, pertencentes às classes 1 e 2. Vale destacar que, após metabolização via CYP6A2, URE induz maior frequência de manchas mutantes, demonstrando a ação potencializadora de URE após atividade metabólica (**Figuras 6 a 8**).

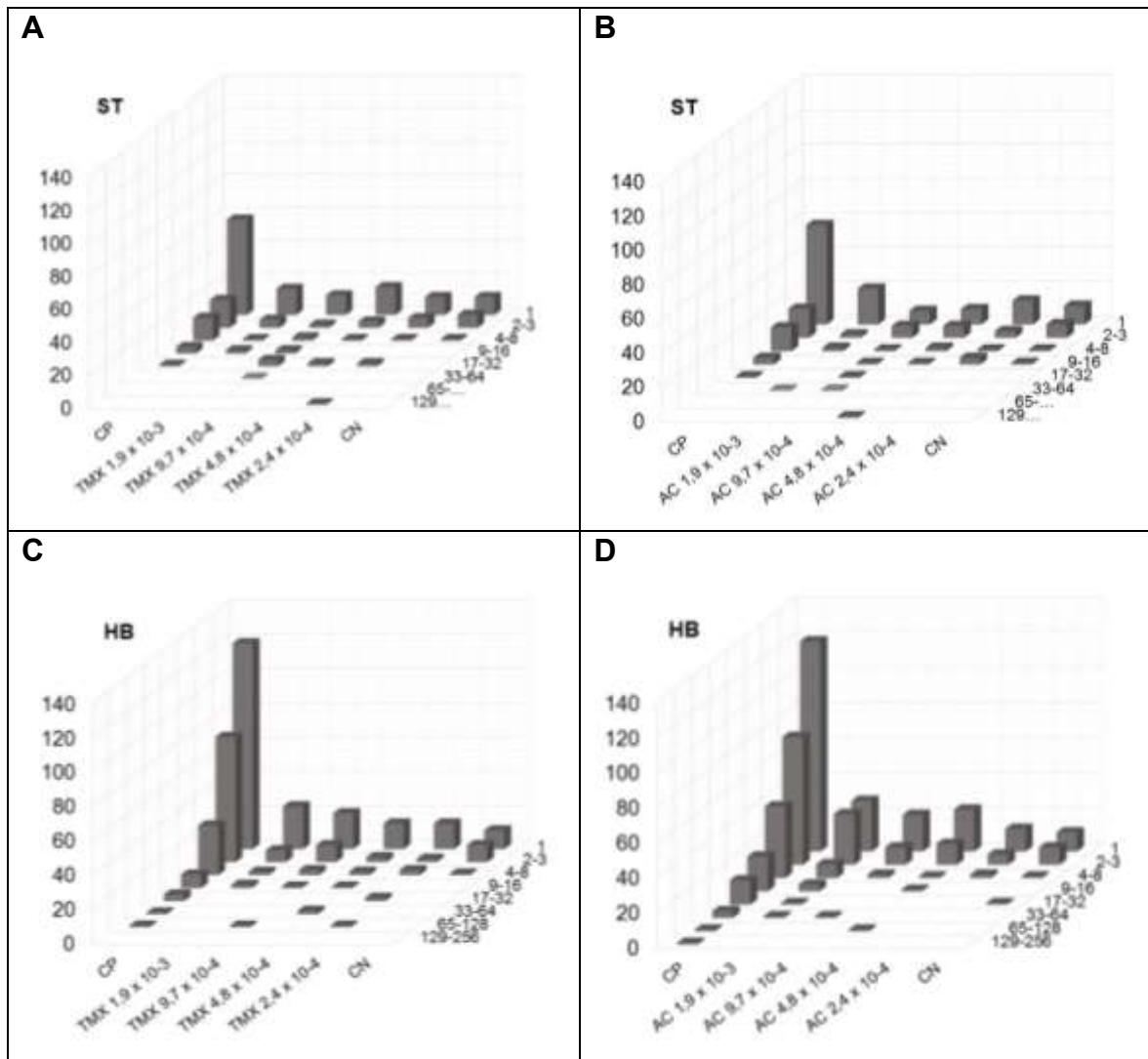


Figura 6. Distribuição de manchas mutantes de acordo com as classes nos indivíduos dos cruzamentos ST e HB em *D. melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX) (6A e C) e Actara® (AC) (6B e D). CN: Controle negativo; CP: Controle positivo (Uretano 10 mM). As classes representam o número de tricomas (*mwh* ou *flr³*) encontrados em cada mancha mutante nas asas de *D. melanogaster*.

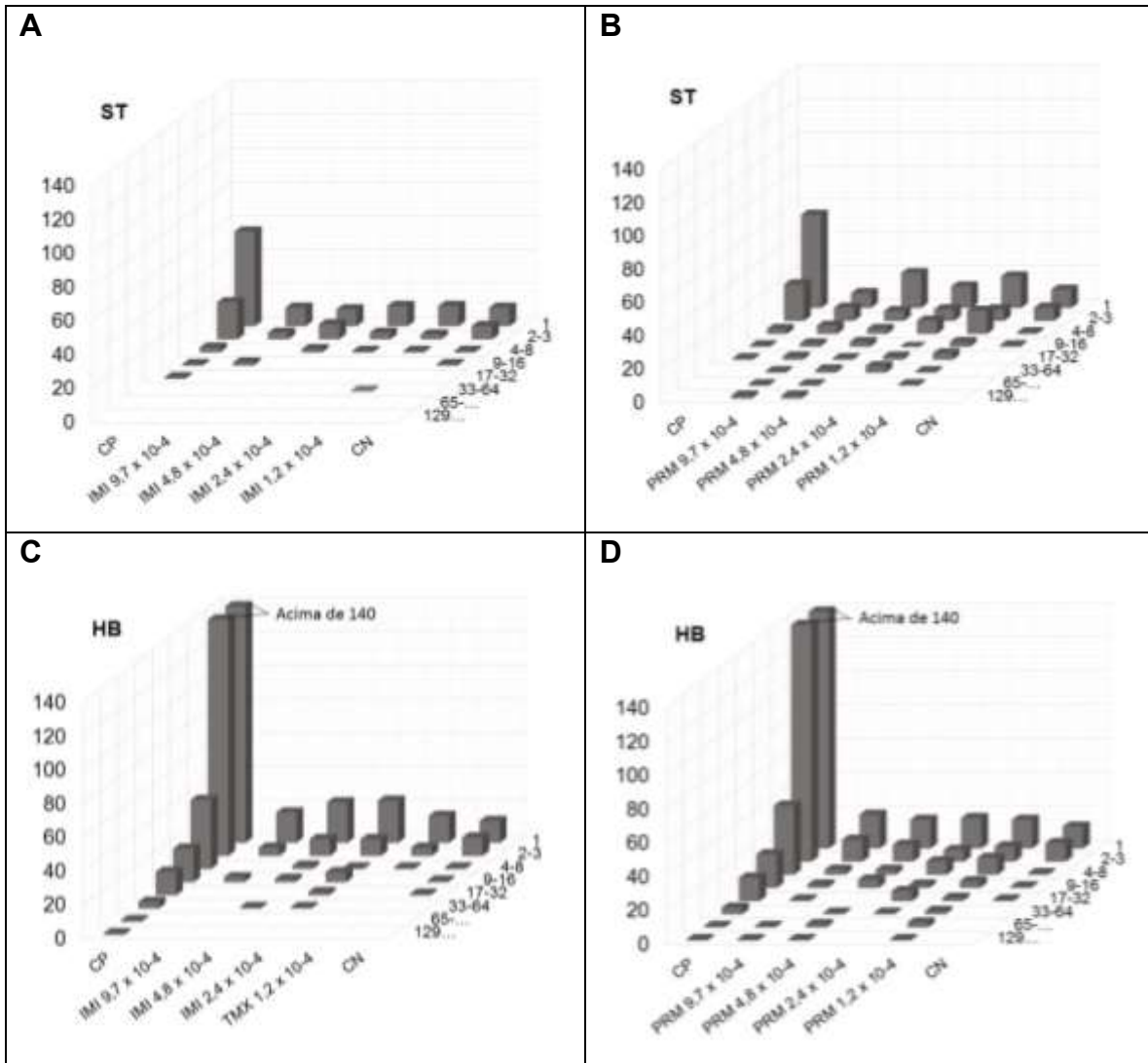


Figura 7. Distribuição de manchas mutantes de acordo com as classes nos indivíduos dos cruzamentos ST e HB em *D. melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI) (7A e C) e Premier® (PRM) (7B e D). CN: Controle negativo; CP: Controle positivo (Uretano 10 mM). As classes representam o número de tricomas (*mwh* ou *flr*³) encontrados em cada mancha mutante nas asas de *D. melanogaster*.

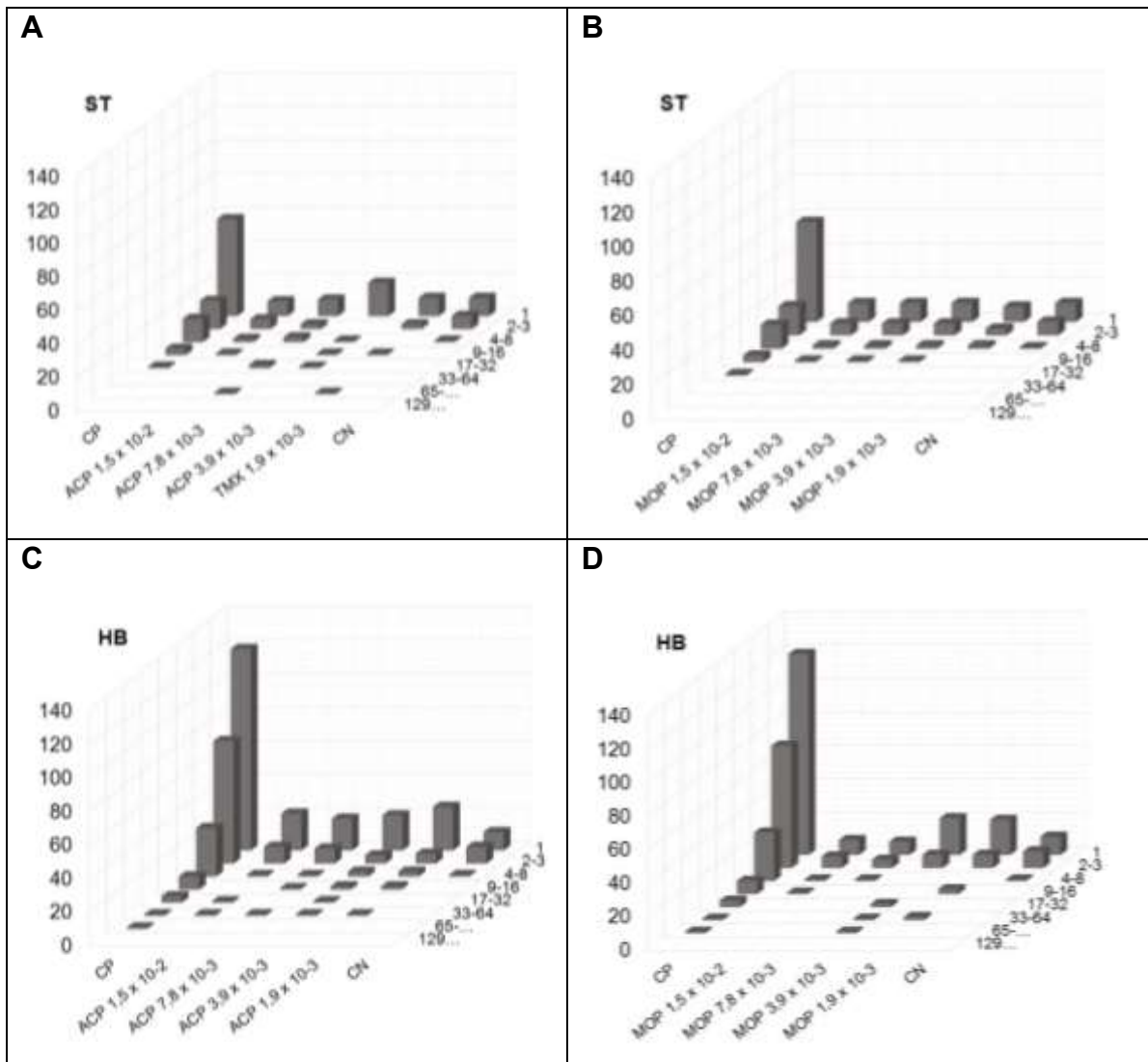


Figura 8. Distribuição de manchas mutantes de acordo com as classes nos indivíduos dos cruzamentos ST e HB em *D. melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP) (8A e C) e Mospilan® (MOP) (8B e 8D). CN: Controle negativo; CP: Controle positivo (Uretano 10 mM). As classes representam o número de tricomas (*mwh* ou *flr³*) encontrados em cada mancha mutante nas asas de *D. melanogaster*.

Para compreender a toxicogenética dos inseticidas neonicotinóides TMX, AC, IMI, PRM, ACP e MOP, bem como a influência dos ingredientes inertes sobre a toxicidade, mutagenicidade e recombinogenicidade dos ingredientes ativos TMX, IMI e ACP, foram comparados os efeitos toxicológicos dos ingredientes ativos com os danos gerados pelos produtos formulados. Os resultados estão apresentados nas **Figuras 9 a 11**.

A análise dos resultados de toxicidade (sobrevivência), mutagenicidade e recombinogenicidade observados e moscas descendentes do cruzamento HB, tratadas com TMX, mostram que, na concentração de $9,7 \times 10^{-4}$ mM, uma alta taxa de recombinação (75%) é observada, paralelo a uma baixa taxa de mutação (25%) (**Figura 9A**). À medida que se aumenta a concentração de TMX para $1,9 \times 10^{-3}$ mM é observado um decréscimo na taxa de recombinação (55,56%) paralelo ao aumento na taxa de mutação (44,44%). A taxa de mortalidade aumenta com o aumento da concentração de TMX.

Embora os resultados de toxicidade observados nas moscas descendentes do cruzamento HB, tratadas com diferentes concentrações de AC (**Figura 9 B**), sejam semelhantes àqueles observados nas moscas expostas ao TMX (**Figura 9 A**), os resultados referentes às taxas de mutação e recombinação são diferentes. As taxas de mutação e recombinação em *D. melanogaster* expostas a $9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ de AC permaneceram constantes, sendo observadas elevadas taxas de mutação (74,19 e 73,78%, respectivamente) e baixas taxas de recombinação (25,81 e 26,22%, respectivamente), resultados que diferem do observado em moscas tratadas com TMX.

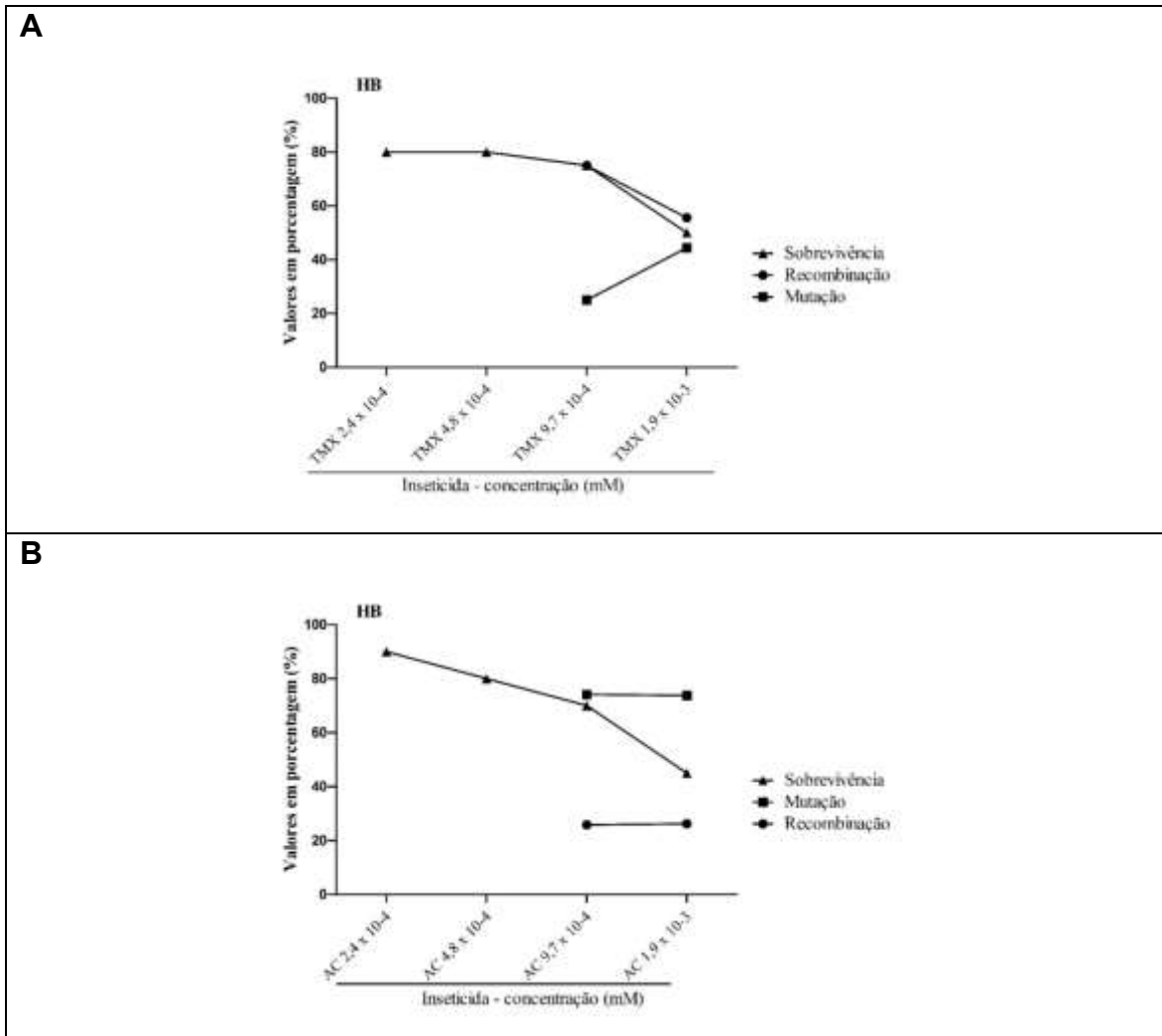


Figura 9. Comparação entre a taxa de sobrevivência, mutação e recombinação em *D. melanogaster* descendentes do cruzamento HB, tratadas com diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX) (A) e Actara (AC) (B).

Neste estudo, o PRM foi o único inseticida capaz de induzir manchas mutantes em moscas com níveis basais de CYP6A2. Portanto, a toxicocinética do PRM foi avaliada tanto em moscas descendentes do cruzamento ST, quanto do HB. A **Figura 10 A** mostra que o PRM induziu manchas mutantes preferencialmente por eventos de recombinação. No entanto, com o aumento da concentração do PRM de $1,2 \times 10^{-4}$ para $2,4 \times 10^{-4}$ mM a taxa de recombinação apresentou decréscimo (de 73,71 para 59,20%), paralelo ao aumento na taxa de mutação (de 26,29 para 40,80%). As taxas de recombinação e mutação

mantiveram-se estáveis da concentração de $2,4 \times 10^{-4}$ até a concentração de $4,8 \times 10^{-4}$ mM. Na maior concentração avaliada ($9,7 \times 10^{-4}$ mM) foi observado uma redução na taxa de recombinação (47,06%) e aumento na taxa de mutação (52,94%). A sobrevivência manteve-se estável entre as concentrações de $1,2 \times 10^{-4}$ mM a $4,8 \times 10^{-4}$ mM (80,85 e 85%, respectivamente), caindo para 75% na concentração de $9,7 \times 10^{-4}$ mM.

As moscas oriundas do cruzamento HB, tratadas com IMI (**Figura 10 B**) e PRM (**Figura 10 C**), apresentaram baixas taxas de recombinação, quando comparadas às taxas de mutação.

Moscas tratadas com $2,4 \times 10^{-4}$ mM de IMI apresentaram 43,41% de recombinação e 56,59% de mutação (**Figura 10 B**). Seguindo o fator de concentração/diluição, a próxima concentração ($4,8 \times 10^{-4}$ mM) induziu 15,08% de recombinação e 84,92% de mutação, sendo, portanto, evidente a tendência de redução da taxa de recombinação, com aumento da concentração do inseticida. A taxa de sobrevivência foi inversamente proporcional à taxa de mutação.

Em moscas tratadas com $1,2 \times 10^{-4}$ mM e $2,4 \times 10^{-4}$ mM de PRM, foi observado redução na taxa de mutação (de 68,97 para 64,97%), paralelo ao aumento na taxa de recombinação (de 31,03 para 35,82%) (**Figura 10 C**). Nas concentrações acima de $2,4 \times 10^{-4}$ mM houve redução brusca na taxa de recombinação e aumento na taxa de mutação. Com aumento da taxa de mutação, diminuiu a taxa de sobrevivência (44,00%).

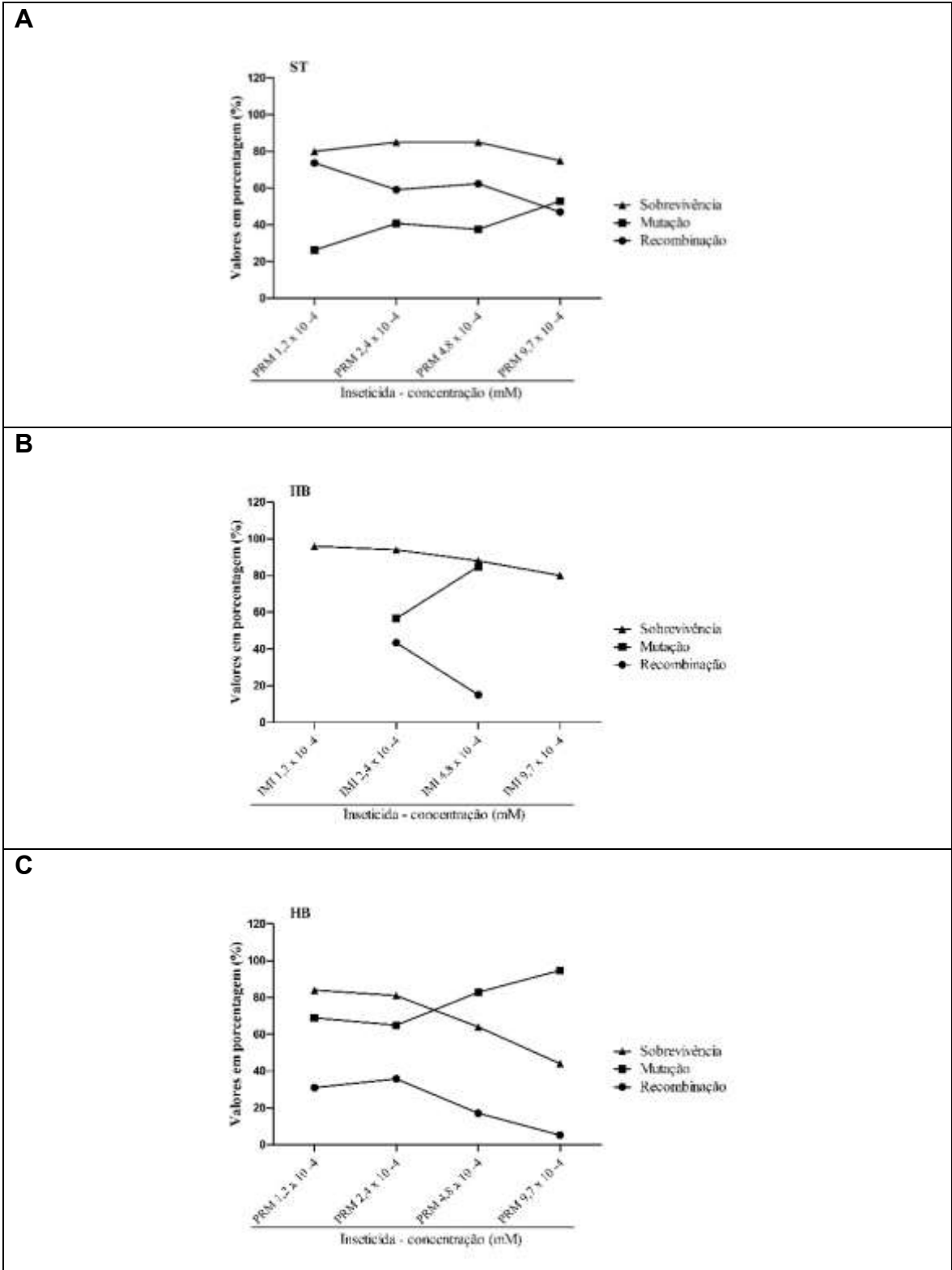


Figura 10. Comparação entre a taxa de sobrevivência, mutação e recombinação em *D. melanogaster* descendentes do cruzamento ST e HB, tratadas com diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI) (B) e Premier (PRM) (A e C).

Em moscas descendentes do cruzamento HB expostas ao ACP foi observado uma tendência no aumento da taxa de recombinação nas concentrações de $1,9 \times 10^{-3}$ mM (66,31%); $3,9 \times 10^{-3}$ mM (76,12%) e $7,8 \times 10^{-3}$ mM (100,00%) (**Figura 11 A**), paralelo a uma redução na taxa de mutação, nessas mesmas concentrações. Na maior concentração avaliada ($1,5 \times 10^{-2}$ mM) foi observado um aumento na taxa de mutação (20,77%) e um decréscimo na taxa de recombinação (79,23%), quando comparado às frequências observadas na concentração de $7,8 \times 10^{-3}$ mM. Além disso, foi constatado aumento na taxa de mortalidade de *D. melanogaster* diretamente proporcional ao aumento da concentração de ACP.

Em moscas tratadas com MOP nas concentrações de $1,9 \times 10^{-3}$ mM e $3,9 \times 10^{-3}$ mM foi observado a redução da taxa de recombinação (de 13,89 % para 0,00%) e aumento na taxa de mutação (de 86,11 % para 100 %) (**Figura 11 B**).

Os resultados observados em moscas tratadas com TMX (**Figura 9 A**) IMI, PRM (**Figura 10 B e C**) e ACP (**Figura 11 A**) são similares, sendo observado redução na taxa de recombinação nas maiores concentrações avaliadas. Além disso, os produtos formulados AC (**Figura 9 B**), PRM (**Figura 10 C**) e MOP (**Figura 11 B**) apresentaram baixas taxas de recombinação nas concentrações avaliadas.

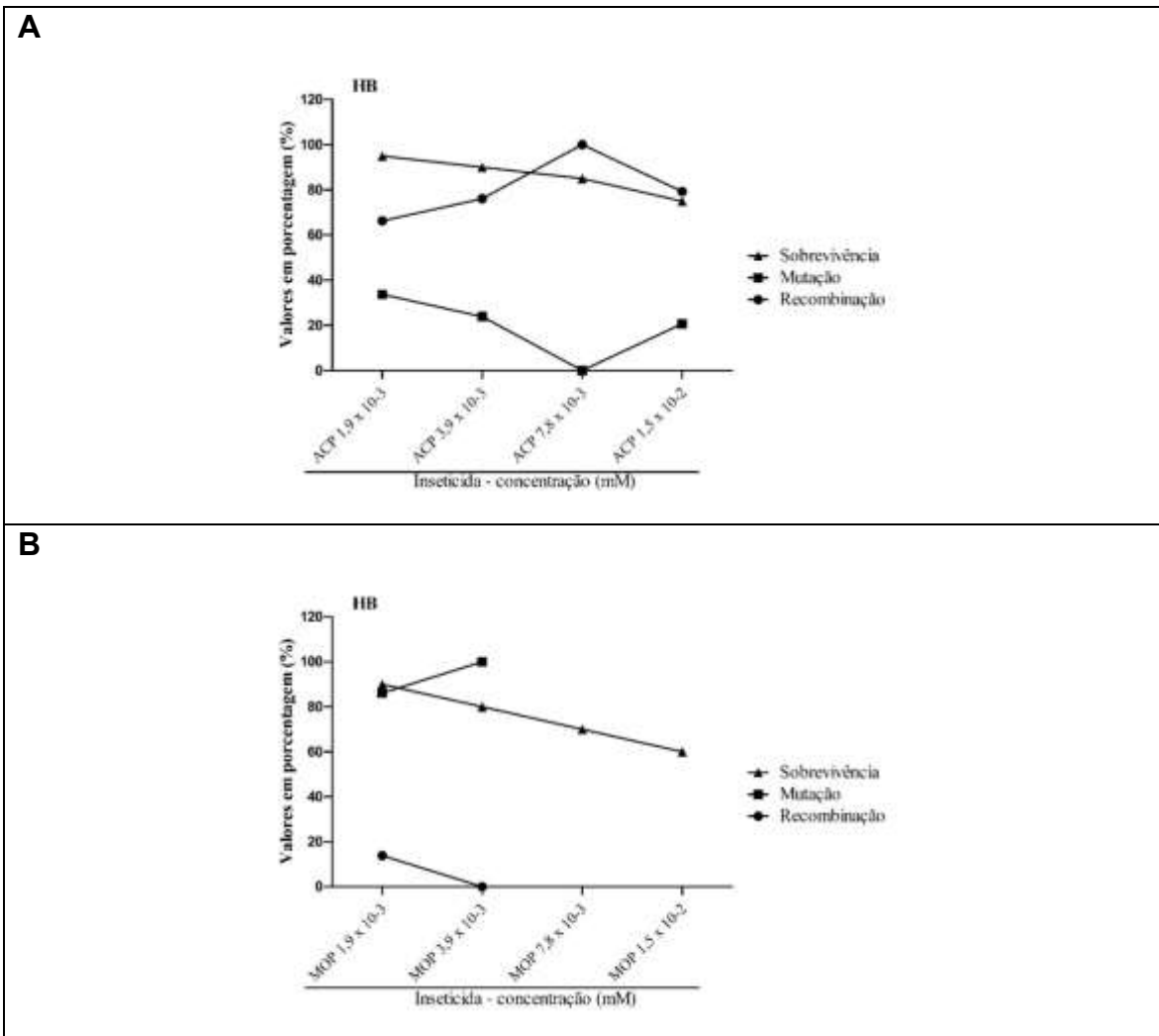


Figura 11. Comparação entre a taxa de sobrevivência, mutação e recombinação em *D. melanogaster* descendentes do cruzamento HB, tratadas com diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP) (A) e Mospilan (MOP) (B).

4.2. Teste para detecção de tumores epiteliais em células somáticas de *D. melanogaster* (Epithelial Tumor Test - ETT)

4.2.1. Toxicidade

No presente trabalho foi verificada, também, a toxicidade dos inseticidas neonicotinóides em moscas descendentes do cruzamento entre machos *mwh/mwh* com fêmeas *wts/TM3, Sb¹*.

TMX e AC apresentaram toxicidade significativa ($p < 0,05$) para as moscas tratadas com as concentrações de $9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ mM (**Figura 12**).

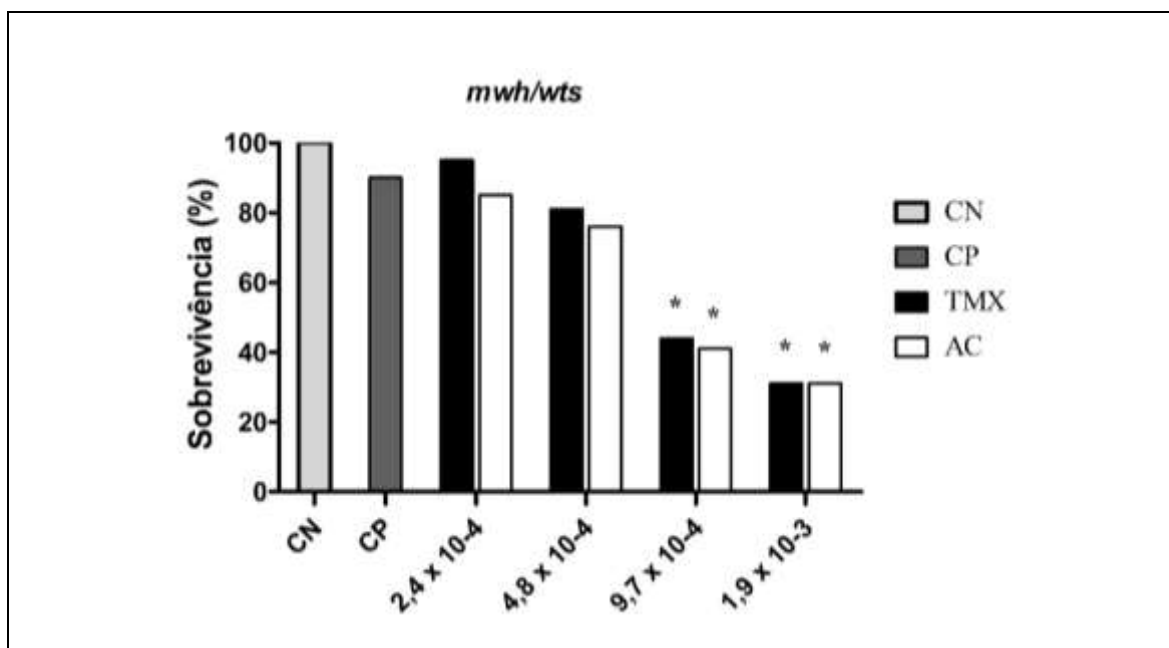


Figura 12. Taxa de sobrevivência em *D. melanogaster* descendentes do cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas *wts/TM3, Sb¹*, expostas a diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX) e Actara® (AC). CN: Controle negativo (água ultrapura); CP: Controle positivo (Mitomicina C 0,1 mM).

* Diferença estatisticamente significativa comparada ao controle negativo, de acordo com o teste do Chi- quadrado para razões de amostras independentes.

IMI e PRM foram tóxicos ($p < 0,05$) apenas na concentração de $1,9 \times 10^{-3}$ mM (Figura 13).

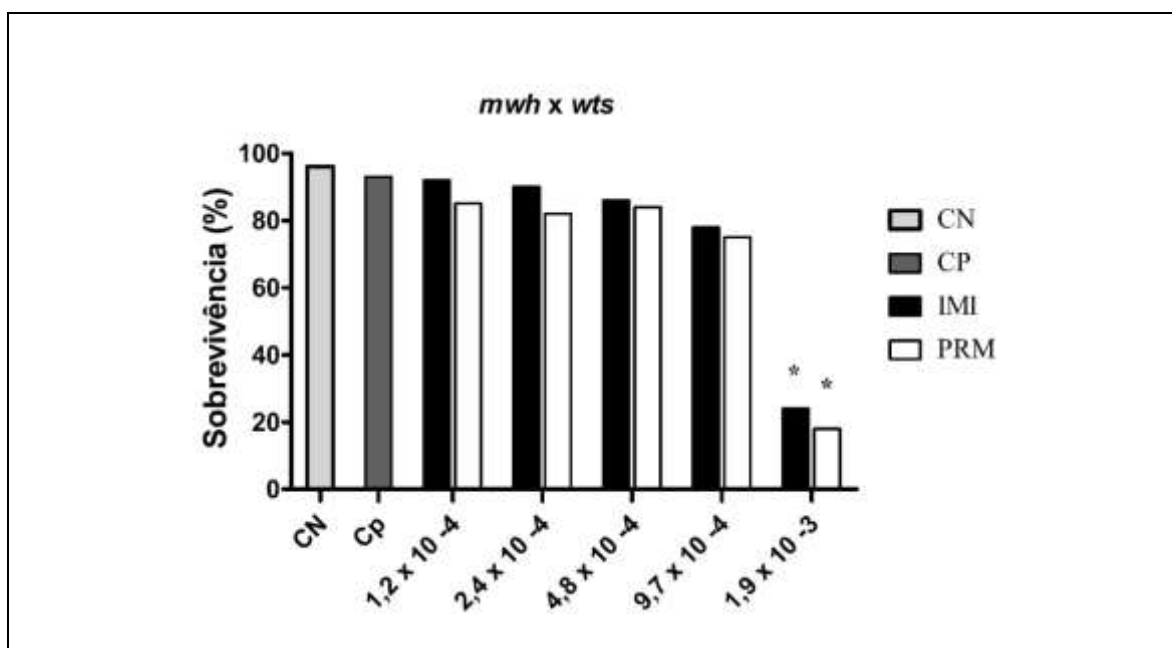


Figura 13. Taxa de sobrevivência em *D. melanogaster* descendentes do cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas *wts/TM3, Sb¹*, expostas a diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI) e Premier® (PRM). CN: Controle negativo (água ultrapura); CP: Controle positivo (Mitomicina C 0,1 mM).

* Diferença estatisticamente significativa comparada ao controle negativo, de acordo com o teste do Chi- quadrado para razões de amostras independentes.

O inseticida ACP foi tóxico ($p < 0,05$) apenas na concentração de 3×10^{-2} mM, enquanto que o produto formulado MOP foi tóxico nas concentrações de $7,8 \times 10^{-3}$, $1,5 \times 10^{-2}$ e 3×10^{-2} mM (Figura 14).

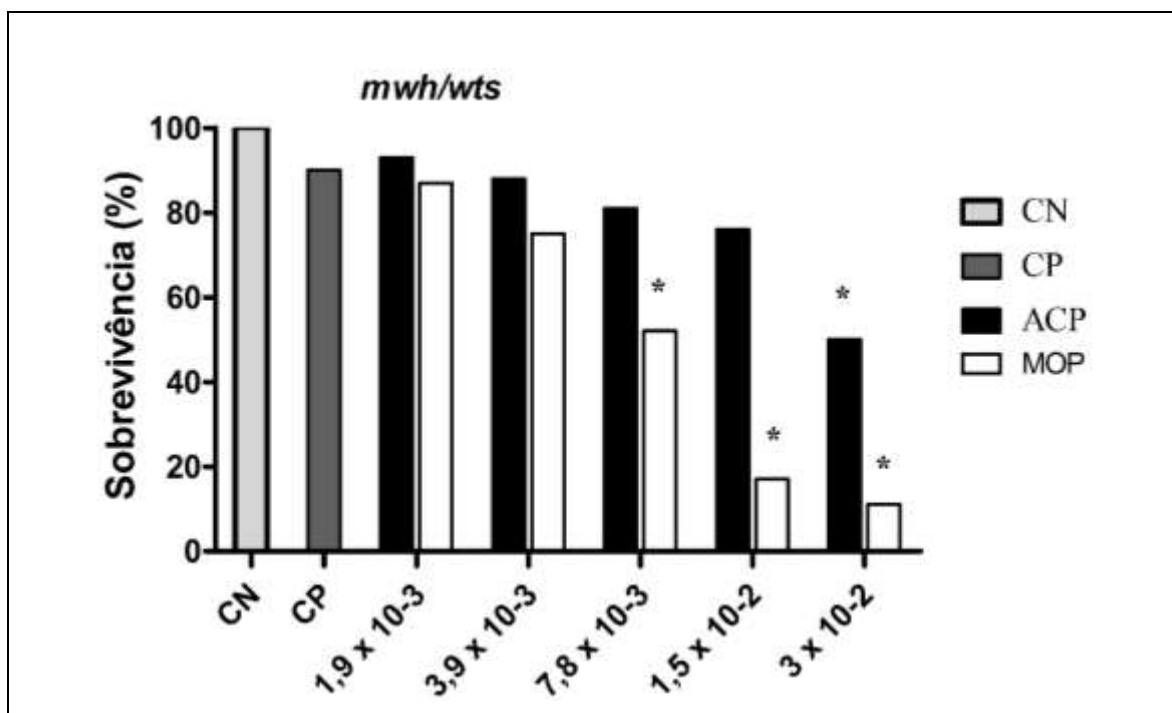


Figura 14. Taxa de sobrevivência em *D. melanogaster* descendentes do cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas *wts/TM3, Sb¹*, expostas a diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP) e Mospilan® (MOP). CN: Controle negativo (água ultrapura); CP: Controle positivo (Mitomicina C 0,1 mM). * Diferença estatisticamente significativa comparada ao controle negativo, de acordo com o teste do Chi- quadrado para razões de amostras independentes.

Os resultados de toxicidade desses inseticidas neonicotinóides observados em moscas descendentes do cruzamento entre machos *mwh/mwh* com fêmeas *wts/TM3, Sb¹* são concordantes com os resultados observados no SMART (cruzamentos ST e HB), onde também foi possível verificar maior toxicidade do produto formulado, quando comparado com o ingrediente ativo.

4.2.2. Avaliação de tumores epiteliais

No presente trabalho, TMX, AC, IMI, PRM, ACP e MOP foram avaliados quanto à capacidade de induzir tumores epiteliais em descendentes de *D. melanogaster* provenientes do cruzamento entre machos *mwh/mwh* com fêmeas virgens *wts/TM3,Sb¹*. As concentrações utilizadas foram determinadas com base nos ensaios de sobrevivência. Foram selecionadas apenas concentrações subletais.

TMX e AC não foram capazes de induzir aumento na frequência de tumores em nenhuma das concentrações avaliadas ($p > 0,05$), quando comparado com o controle negativo (**Tabela 7**), demonstrando, portanto, ausência de efeito carcinogênico em *D. melanogaster*.

IMI não apresentou efeito carcinogênico em *D. melanogaster*. No entanto, PRM nas concentrações de 2,4; 4,8 e 9,7 x 10⁻⁴ mM induziram a perda da heterozigose do marcador *wts* demonstrando, portanto, potencial carcinogênico (**Tabela 8**).

Resultados negativos para carcinogenicidade também foram observados nas moscas tratadas com diferentes concentrações de ACP e MOP (**Tabela 9**).

Tabela 7. Frequência de clones de tumores epiteliais observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor *wts* em *D. melanogaster*, tratadas com diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX) e Actara® (AC)

Tratamento (mM)	Número de indivíduos	Frequência de tumores analisados (total de tumores)						Frequência de tumores/mosca (Total)
		Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Hallters	
Controle negativo	200	0,005 (01)	0,005 (01)	0,030 (06)	0,050 (10)	0,015 (03)	0,000 (00)	0,105 (21)
MMC 0,1	150	0,140 (21)*	0,120 (18)*	2,233 (335)*	0,666 (100)*	0,233 (35)*	0,053 (08)*	2,585 (517)*
TMX								
2,4 x 10 ⁻⁴	200	0,015 (03)	0,020 (04)	0,035 (07)	0,045 (09)	0,005 (01)	0,005 (01)	0,125 (25)
4,8 x 10 ⁻⁴	200	0,000 (00)	0,010 (02)	0,025 (05)	0,070 (14)	0,010 (02)	0,010 (02)	0,145 (25)
9,7 x 10 ⁻⁴	200	0,020 (04)	0,000 (00)	0,045 (09)	0,055 (11)	0,015 (03)	0,000 (00)	0,135 (27)
1,9 x 10 ⁻³	200	0,010 (02)	0,000 (00)	0,025 (05)	0,060 (12)	0,020 (04)	0,005 (01)	0,120 (24)
AC								
2,4 x 10 ⁻⁴	200	0,005 (01)	0,015 (03)	0,050 (10)	0,035 (07)	0,025 (05)	0,000 (00)	0,130 (26)
4,8 x 10 ⁻⁴	200	0,010 (02)	0,010 (02)	0,050 (10)	0,045 (09)	0,015 (03)	0,005 (01)	0,135 (27)
9,7 x 10 ⁻⁴	200	0,000 (00)	0,000 (00)	0,020 (04)	0,060 (12)	0,010 (02)	0,005 (01)	0,095 (19)
1,9 x 10 ⁻³	200	0,015 (03)	0,010 (02)	0,040 (08)	0,055 (11)	0,015 (03)	0,000 (00)	0,135 (27)

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste de Mann-Whitney. Nível de significância ($p \leq 0,05$).

MMC: Mitomicina C (Controle positivo); TMX: Tiametoxam; AC: Actara®.

* Valores considerados estatisticamente diferentes do controle negativo.

Tabela 8. Frequência de clones de tumores epitheliais observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor *wts* em *D. melanogaster*, tratadas com diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI) e Premier® (PRM)

Tratamento (mM)	Número de indivíduos	Frequência de tumores analisados (total de tumores)						Frequência de tumores/mosca (Total)
		Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Hallters	
Controle negativo	200	0,015 (03)	0,000 (00)	0,025 (05)	0,090 (18)	0,035 (07)	0,000 (00)	0,165 (33)
MMC 0,1	170	0,205 (35)*	0,164 (28)*	1,441 (245)*	0,776 (132)*	0,252 (43)*	0,047 (08)*	2,888 (491)*
IMI								
1,2 x 10 ⁻⁴	200	0,000 (00)	0,005 (01)	0,025 (05)	0,070 (14)	0,040 (08)	0,010 (02)	0,150 (30)
2,4 x 10 ⁻⁴	200	0,005 (01)	0,005 (01)	0,035 (07)	0,085 (17)	0,045 (09)	0,005 (01)	0,180 (36)
4,8 x 10 ⁻⁴	200	0,000 (00)	0,010 (02)	0,020 (04)	0,105 (21)	0,020 (04)	0,005 (01)	0,160 (32)
9,7 x 10 ⁻⁴	200	0,010 (02)	0,005 (01)	0,025 (05)	0,095 (19)	0,030 (06)	0,000 (00)	0,165 (33)
PRM								
1,2 x 10 ⁻⁴	200	0,015 (03)	0,015 (03)	0,020 (04)	0,100 (20)	0,020 (04)	0,015 (03)	0,185 (37)
2,4 x 10 ⁻⁴	200	0,045 (09)	0,035 (07)*	0,040 (08)	0,120 (24)	0,050 (10)	0,005 (01)	0,295 (59)*
4,8 x 10 ⁻⁴	200	0,030 (06)	0,030 (06)*	0,075 (15)	0,125 (25)	0,030 (06)	0,015 (03)	0,305 (61)*
9,7 x 10 ⁻⁴	200	0,040 (08)	0,025 (05)*	0,045 (09)	0,110 (22)	0,050 (10)	0,020 (04)	0,290 (58)*

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste de Mann-Whitney. Nível de significância (p≤0,05).

MMC: Mitomicina C (Controle positivo); TMX: Tiametoxam; AC: Actara®.

* Valores considerados estatisticamente diferentes do controle negativo.

Tabela 9. Frequência de clones de tumores epitheliais observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor *wts* em *D. melanogaster*, tratadas com diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP) e Mospilan® (MOP)

Tratamento (mM)	Número de indivíduos	Frequência de tumores analisados (total de tumores)						Frequência de tumores/mosca (Total)
		Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Hallters	
Negative control	200	0,005 (01)	0,005 (01)	0,020 (04)	0,125 (25)	0,010 (02)	0,000 (00)	0,165 (33)
MMC 0,1	130	0,138 (18)*	0,115 (15)*	2,138 (278)*	0,823 (107)*	0,300 (39)*	0,046 (06)*	3,561 (463)*
ACP								
1,9 x 10 ⁻³	200	0,015 (03)	0,010 (02)	0,030 (06)	0,110 (22)	0,015 (03)	0,005 (01)	0,185 (37)
3,9 x 10 ⁻³	200	0,010 (02)	0,000 (00)	0,025 (05)	0,140 (28)	0,010 (02)	0,000 (00)	0,185 (37)
7,8 x 10 ⁻³	200	0,005 (01)	0,015 (03)	0,030 (06)	0,120 (24)	0,000 (00)	0,005 (01)	0,175 (35)
1,5 x 10 ⁻²	200	0,000 (00)	0,005 (01)	0,035 (07)	0,120 (24)	0,010 (02)	0,000 (00)	0,170 (34)
MOP								
1,9 x 10 ⁻³	200	0,010 (02)	0,015 (03)	0,005 (01)	0,125 (25)	0,005 (01)	0,000 (00)	0,160 (32)
3,9 x 10 ⁻³	200	0,000 (00)	0,000 (00)	0,030 (06)	0,135 (27)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,165 (33)
7,8 x 10 ⁻³	200	0,010 (02)	0,005 (01)	0,025 (05)	0,11 (22)	0,015 (03)	0,005 (01)	0,170 (34)
1,5 x 10 ⁻²	200	0,005 (01)	0,010 (02)	0,015 (03)	0,120 (24)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,150 (30)

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste de Mann-Whitney. Nível de significância (p≤0,05).

MMC: Mitomicina C (Controle positivo); TMX: Tiametoxam; AC: Actara®.

* Valores considerados estatisticamente diferentes do controle negativo.

A **Figura 15** apresenta imagens de *D. melanogaster* descendentes do cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens da linhagem *wts/TM3, Sb¹*, expressando diferentes tipos de tumores epiteliais.

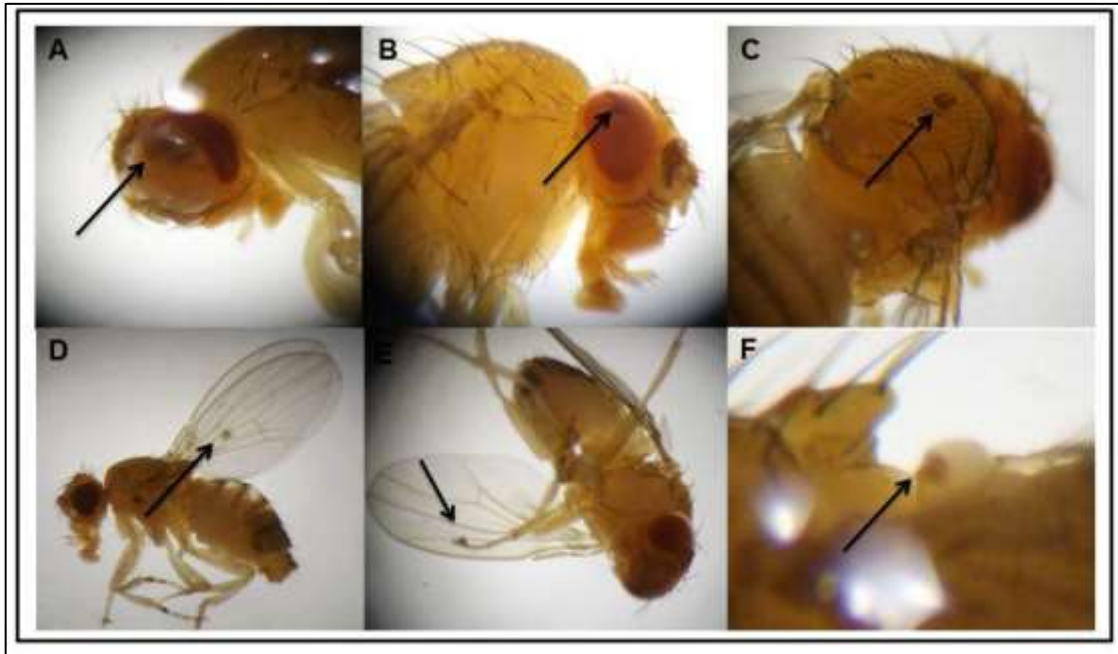


Figura 15. *D. melanogaster* descendentes do cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens da linhagem *wts/TM3, Sb¹*, expressando tumores epiteliais. Tumor na cabeça (**A**), Olho (**B**), No tórax (**C**), Asas (**D**), Pernas (**E**) e Halter (**F**).

5. Discussão

No presente trabalho, foram avaliadas a toxicidade e a ação mutagênica, recombinogênica e carcinogênica dos inseticidas neonicotinóides TMX, IMI e ACP, assim como dos seus respectivos produtos formulados AC, PRM e MOP, por meio do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation and Recombination Test - SMART) e do Teste para Detecção de Tumores Epiteliais (Epithelial Tumor test - ETT), ambos em células somáticas de *D. melanogaster*.

A escolha destes inseticidas está diretamente associada à sua ampla utilização no sistema agrícola, sendo, atualmente, os inseticidas neurotóxicos mais utilizados no controle de insetos pragas (Sparks e Nauen, 2015).

Os resultados referentes à toxicidade de TMX e AC em moscas descendentes do cruzamento ST (**Figura 2 A**), mostram que o ingrediente ativo e o produto formulado apresentam toxicidade significativa nas mesmas concentrações avaliadas. No entanto, os resultados mostram que AC exerce maior toxicidade em *D. melanogaster*, quando comparado ao ingrediente ativo declarado – TMX. Resultados similares foram observados nas moscas descendentes do cruzamento HB tratadas com TMX e AC (**Figura 2 B**).

Em moscas descendentes do cruzamento ST (**Figura 3 A**) e HB (**Figura 3 B**) tratadas com diferentes concentrações de IMI e PRM, também foi observado maior toxicidade dos produtos formulados, em relação ao ingrediente ativo declarado.

Maior toxicidade do produto formulado, quando comparado ao ingrediente ativo, também foi observada em moscas descendentes do cruzamento ST (**Figura 4 A**) e HB (**Figura 4 B**) tratadas com ACP e MOP.

Estes resultados sugerem que os ingredientes inertes, não declarados pelos fabricantes, presentes nos produtos formulados, podem potencializar a toxicidade do ingrediente ativo dos pesticidas.

Em estudo *in vitro* feito com 9 pesticidas (3 fungicidas, 3 inseticidas e 3 herbicidas), foi constatada maior toxicidade dos produtos formulados, quando comparado aos ingredientes ativos. Os resultados também sugeriram uma relação entre os ingredientes inertes e a potencialização do efeito tóxico dos

pesticidas avaliados, devido, sobretudo, à indução de modificações de membrana mitocondrial e morte celular por necrose e/ou apoptose (Mesnage *et al.*, 2014).

Os resultados de sobrevivências mostram uma diferença no padrão de toxicidade de moscas tratadas com os inseticidas neonicotinóides, expressando níveis basais e constitutivos de enzimas do complexo citocromo P450.

Em moscas descendentes do cruzamento HB, tratadas com TMX e AC (**Figura 2 B**), foi observado redução estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na taxa de sobrevivência, apenas na concentração de $1,9 \times 10^{-3}$ mM de TMX e AC, demonstrando um menor efeito tóxico quando comparado ao padrão de toxicidade observado no cruzamento ST do SMART. Resultados similares foram observados em moscas expostas ao ACP e MOP, sendo evidenciada redução na toxicidade das moléculas, após metabolização via CYP6A2 (**Figura 4 B**).

Estes resultados podem ser explicados em função da constituição genética das três linhagens de *D. melanogaster* usadas neste estudo. As linhagens *multiple wing hairs* e *flare* apresentam níveis basais de enzimas do complexo citocromo P450 (Graf *et al.*, 1984; Nepomuceno, 2015), que estão diretamente associadas à metabolização de xenobióticos, enquanto a linhagem ORR, apresenta alta expressão dos genes codificantes deste complexo enzimático (Graf e van Schaik, 1992).

Dados da literatura demonstram que inseticidas neonicotinóides, após a metabolização via citocromo P450, tendem a apresentar uma natureza menos tóxica, motivo pelo qual têm sido evidenciados casos de resistência de pragas no sistema agrícola (Puinenean *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013; Bas *et al.*, 2015).

De acordo com o *Arthropod Pesticide Resistance Database*, entre 2000 e 2018, foram relatados 918 casos de resistência de pragas aos inseticidas neonicotinóides, sendo que, desses, 212 foram atribuídos ao TMX e 119 ao ACP (IRAC, 2018).

Existem, basicamente, três mecanismos de resistência a inseticidas documentadas: 1] Desintoxicação metabólica; 2] Redução da penetração do químico no tegumento dos insetos; e 3] Alteração dos receptores alvos dos toxicantes (Li *et al.*, 2007).

Entender a toxicocinética de pesticidas, frente a diferentes vias de metabolização, é de suma importância no intuito de identificar possíveis rotas de

desenvolvimento de resistência a pesticidas, por pragas que fazem uso de diferentes vias enzimáticas para metabolizar diferentes xenobióticos (Danielson, 2002). Enzimas do complexo citocromo P450 exercem fundamental papel em vários processos biológicos, que incluem síntese hormonal e desintoxicação de químicos (Jones *et al.*, 2010).

Em insetos, as enzimas do complexo P450 estão diretamente associadas ao crescimento, desenvolvimento, alimentação e resistência a inseticidas e toxinas vegetais, por meio da metabolização em compostos mais solúveis e menos tóxicos (Feyereisen, 2005; Scott, 1999).

Gao *et al.* (2014) analisaram o desenvolvimento de resistência ao inseticida TMX, utilizando como organismo teste o inseto *Frankliniella occidentalis*. Inicialmente, a concentração letal média (CL₅₀) era de 3,508 mg/mL⁻¹. Após 55 gerações, houve um salto para 48,633 mg/mL⁻¹, o que corresponde a 15,1 vezes a CL₅₀ inicial. De acordo com estes autores, a principal rota de metabolização de TMX, em um composto menos tóxico, é mediada por monoxigenases do complexo citocromo P450.

Outros autores relataram a participação de diferentes enzimas do citocromo P450 na metabolização de inseticidas neonicotinóides, em particular ao inseticida TMX (Nauen *et al.*, 2003; Karunker *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2010; Puinean *et al.*, 2010), resultando em metabólitos menos tóxicos (Gao *et al.*, 2014).

Em *D. melanogaster* com níveis basais de expressão de CYP6G1, tratadas com ACP, foi observada a dose letal mediana (DL₅₀) de 4,99 µg/mL⁻¹, enquanto que em moscas resistentes, expressando altos níveis deste complexo enzimático, foi constatado DL₅₀ de 36,97 µg/mL⁻¹, o que representa uma dose 7,40 vezes mais concentrada, demonstrando claramente a participação de enzimas do citocromo P450 em casos de resistências a inseticidas neonicotinóides (Jones *et al.*, 2010).

Em *D. melanogaster*, o mutante Oregon apresenta alta expressão constitutiva de CYP6A2 nos cromossomos 1 e 2. Em função da alta capacidade metabólica, a linhagem Oregon, desde 1952, resultou em inúmeros casos de resistência ao inseticida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) (Hällström, 1985; Graf e van Schaik, 1992). Esta mesma linhagem é usada no cruzamento HB do SMART.

O DDT altera a permeabilidade dos íons de potássio e apresenta capacidade de se ligar aos canais de sódio dos neurônios, mantendo-os abertos por mais tempo. Somado a estes eventos, o DDT inibe as ATPs neuronais e interfere na modulação de cálcio. Como consequência deste mecanismo, a transmissão nervosa dos insetos fica desregulada, levando a quadros de hiperexcitação neural, paralisia e morte (Yu, 2008).

Neonicotinóides são análogos sintéticos da nicotina, que também age no sistema nervoso dos insetos. Essas moléculas desregulam a transmissão do impulso nervoso ao agir de maneira agonista aos receptores nicotínicos da acetilcolina. Como consequência, o influxo de sódio não é interrompido, levando os insetos à paralisia severa e morte (Tomizawa e Yamamoto, 1993; Goulson, 2013).

Da mesma forma que altos níveis constitutivos de CYP6A2 foram responsáveis pela redução da cinética tóxica do inseticida DDT, os dados deste trabalho sugerem que os inseticidas TMX, AC, ACP e MOP, após metabolização em *D. melanogaster* resultantes do cruzamento HB, passam a apresentar uma natureza menos tóxica, quando comparado a moscas desprovidas de altos níveis de CYP6A2.

A toxicidade observada no cruzamento ST alerta para a possibilidade de contaminação nos níveis tróficos, e morte, principalmente de organismos não alvos, com baixa expressão metabólica. Abelhas, por exemplo, apresentam baixa expressão de enzimas associadas ao processo de desintoxicação (Claudianos *et al.*, 2006) e são frequentemente susceptíveis à contaminação por neonicotinóides, em função da atividade sistêmica dos mesmos nos vegetais (Goulson, 2013).

Os resultados de toxicidade, observados em moscas tratadas com IMI, mostram ausência de diferença na toxicidade do inseticida, quando comparado à taxa de sobrevivência de moscas com níveis basais de expressão de CYP6A2 (**Figura 3 A**), com as moscas dotadas de níveis constitutivos deste complexo enzimático (**Figura 3 B**). Embora a resistência de insetos pragas tenha sido relacionada com a expressão constitutiva de enzimas do citocromo P450, a expressão de CYP6A2 não é influenciada pelo IMI. Esta informação é sustentada pelo trabalho de Kalajdzic *et al.* (2013), que demonstram, via expressão gênica, a

não participação de CYP6A2 e CYP6G1 no processo de desintoxicação de IMI, em moscas naturalmente resistentes a este inseticida (Linhagem MIT[W]3R2).

Enzimas de desintoxicação objetivam metabolizar xenobióticos tóxicos e transformá-los em compostos com características físico-químicas mais hidrofílicas (polar), possibilitando maior facilidade na excreção do metabólito. No entanto, a modificação de um xenobiótico não necessariamente o deixa menos tóxico. Após metabolização, o metabólito pode exercer uma natureza mais tóxica, comparado ao princípio ativo. Resultados que comprovam a ativação de inseticidas em moscas com níveis constitutivos de expressão de CYP6A2 já foram descritos por *Morais et al.* (2016).

Além disso, os resultados mostram que, após metabolização (**Figura 3 B**), o PRM apresentou maior toxicidade nas maiores concentrações avaliadas, quando comparado às moscas com níveis basais de expressão de CYP6A2 (**Figura 3 A**). Em função da ausência de modificação do perfil tóxico de IMI em sistemas com níveis basais e constitutivos de CYP6A2 (**Figura 3**), sugerimos que a metabolização dos ingredientes inertes pode potencializar a toxicidade do ingrediente ativo, conforme apresentado nos resultados de sobrevivência (**Figura 3**). Estes resultados estão em concordância com os resultados de toxicidade observados em moscas tratadas com ACP e MOP (**Figura 4**), demonstrando claramente a influência dos ingredientes inertes na toxicidade induzida pelo toxicante ativo declarado.

Os resultados de mutagenicidade em *D. melanogaster* descendentes do cruzamento ST mostram que TMX, AC (**Tabela 1**), ACP e MOP (**Tabela 5**) não apresentam atividade mutagênica, uma vez que as frequências de manchas mutantes observadas nas asas das moscas, não diferem significativamente das frequências observadas no controle negativo. No entanto, os resultados mostram que, após metabolização, estes compostos atuam como pró-mutágenos (**Tabelas 2 e 6**). Nesse sentido a mutagenicidade de TMX, AC, ACP e MOP está condicionada à metabolização destas moléculas em metabólitos que, direta ou indiretamente, podem resultar em instabilidade genética.

O IMI também apresenta atividade mutagênica dependente de metabolismo via CYP6A2 (**Tabela 4**), não sendo capaz de causar danos genéticos significativos em níveis basais deste complexo enzimático (**Tabela 3**).

No entanto, os resultados mostram que, mesmo em níveis basais de expressão de CYP6A2, o correspondente produto formulado, PRM, apresenta atividade mutagênica. Estes resultados sugerem que os ingredientes inertes, usados em conjunto com os ingredientes ativos, podem influenciar diretamente na toxicocinética dos inseticidas.

A análise de manchas mutantes em descendentes do cruzamento HB demonstra que o IMI é capaz de alterar o material genético apenas nas concentrações de $2,4 \times 10^{-4}$ mM e $4,8 \times 10^{-4}$ mM, sugerindo que a menor concentração avaliada ($1,2 \times 10^{-4}$ mM) é insuficiente para gerar instabilidade genética. Os resultados negativos para mutagenicidade de IMI na maior concentração avaliada ($9,7 \times 10^{-4}$ mM) sugerem possível efeito citotóxico.

No SMART, os resultados positivos para mutagenicidade estão condicionados à identificação de manchas mutantes (*multiple wing hairs, flare*, ou gêmeas) que são resultantes da perda da heterozigose dos marcadores genéticos *mwh* e *flr*³. Nesse sentido, o diagnóstico positivo, indicativo de mutagenicidade, é diretamente proporcional à quantidade de manchas mutantes observadas, e o tamanho das manchas mutantes (simples pequena, simples grande, ou gêmeas). No entanto, caso o xenobiótico tenha potencial citotóxico, os danos gerados não são identificados em nível do fenótipo, haja vista que a mutação é eliminada com a morte celular.

Resultados similares foram observados nas moscas tratadas com MOP, sendo observados efeitos mutagênicos apenas nas menores concentrações avaliadas ($1,9 \times 10^{-3}$ e $3,9 \times 10^{-3}$ mM), sugerindo efeito citotóxico nas maiores concentrações (**Tabela 6**). Esta hipótese é sustentada pelo aumento da mortalidade em moscas descendentes do cruzamento HB, expostas às maiores concentrações de MOP, quando comparado com as moscas expostas ao ACP (**Figura 4 B**). Resultados similares foram observados por Morais *et al.* (2016) em tratamento crônico (48 h) de *D. melanogaster* com o inseticida Fipronil.

De maneira análoga, o tratamento crônico de *D. melanogaster*, descendentes do cruzamento HB, com o produto formulado PRM, resultou em manchas mutantes acima do limite tolerável basal (manchas observadas no CN), em todas as concentrações avaliadas (**Tabela 4**), demonstrando que os ingredientes inertes influenciam diretamente na mutagenicidade de IMI.

Para avaliar se o mecanismo de ação dos inseticidas ocorre de forma precoce ou tardia, as manchas mutantes foram classificadas em classes, levando em consideração o tamanho de cada mancha mutante.

Diferentes tipos de distribuição de manchas são esperados, frente ao tratamento crônico de larvas com diferentes xenobióticos. De acordo com Graf *et al.* (1984), o tratamento crônico de larvas, por 48 horas, resulta no predomínio de manchas pequenas, caracterizada pela presença de 1 a 3 células com pelos mutantes em uma única mancha. Conforme apresentado na **Figura 6** tanto no cruzamento ST, quanto no HB, foi observado a maior concentração de manchas mutantes nas classes 1 (1 célula com pelo mutante) e 2 (2-3 células com pelos mutantes) em moscas tratadas com TMX (**Figura 6 A - C**) e AC (**Figura 6 B - D**). Resultados similares foram observadas em moscas descendentes dos cruzamentos ST e HB tratadas com ACP (**Figura 8 A - C**) e MOP (**Figura 8 B - D**).

O SMART fundamenta-se na premissa de que, durante a diferenciação das células dos discos imaginais nas larvas, a perda da heterozigose de um dos marcadores (*mwh* ou *flr³*) leva à instalação da mutação, que resulta no fenótipo dos pelos mutantes (*multiple wing hairs* ou *flare*) (Graf *et al.*, 1984). Caso esta mutação ocorra no início da diferenciação das células dos discos imaginais, a mutação irá se propagar por sucessivas mitoses, originando manchas grandes.

Os resultados observados sugerem que TMX, AC, ACP e MOP, após metabolização via citocromo P450, induzem aumentos estatisticamente significativos de manchas pequenas simples (**Figs 6 e 8**), o que indica que os mesmos possuem mecanismo de ação tardio, agindo no final da diferenciação das células dos discos imaginais, não permitindo a propagação da mutação nas asas da mosca.

Por outro lado, o inseticida PRM induz aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas simples grandes, tanto no cruzamento ST, quanto no cruzamento HB, apresentando heterogeneidade na distribuição das manchas (**Figura 7 B e D**). A distribuição de manchas mutantes sugere que PRM causa instabilidade genética de maneira precoce, agindo, portanto, no início da diferenciação das células dos discos imaginais.

Nesse sentido, fica evidente que os ingredientes inertes podem influenciar a toxicocinética de IMI, acelerando o mecanismo de mutagenicidade, uma vez que a distribuição de manchas mutantes em moscas expostas ao IMI foi mais frequente nas classes 1 e 2.

Quando resultados estatisticamente significativos são observados na progênie MH, faz-se necessário a análise da progênie BH (*mwh/Tm3, Bd^s*) com o objetivo de quantificar a contribuição dos eventos mutagênicos e recombinogênicos na frequência total de manchas nas asas das moscas.

A taxa de clones mutantes foi calculada nas duas progênies (MH e BH) de acordo com Frei e Würigler (1995). Em resumo, a frequência dos eventos que resultaram em manchas simples *mwh* e gêmeas foi quantificada em porcentagem de mutação e recombinação.

Os resultados obtidos foram usados para compreender a toxicogenética dos ingredientes ativos TMX, IMI e ACP, bem como verificar a influência dos ingredientes inertes não declarados pelos fabricantes na mutagenicidade dos ingredientes ativos.

As análises dos resultados obtidos sugerem que os danos no DNA foram exclusivamente atribuídos aos ingredientes ativos (TMX, IMI e ACP). No entanto os autores concluem que os ingredientes inertes presentes na formulação de TMX, IMI e ACP estão interferindo no mecanismo de reparo por recombinação homóloga, contribuindo para o aumento de manchas mutantes.

Em moscas descendentes do cruzamento HB tratadas com o ingrediente ativo TMX (**Figura 9 A**) e ACP (**Figura 11 A**) é verificado alta taxa de recombinação, paralelo a uma baixa taxa de mutação nas menores concentrações. Os resultados sugerem a atuação do mecanismo de reparo por recombinação homóloga em resposta aos danos induzidos por TMX e ACP. No entanto, a exposição de *D. melanogaster* a altas concentrações de TMX e ACP incrementa tantos danos no DNA, que se torna inviável ou ineficaz o reparo, restando a célula o mecanismo de morte celular. Seguindo esta premissa, o aumento nos danos induzidos por TMX e ACP de maneira concentração dependente, justifica a redução na taxa de sobrevivência de moscas (**Figuras 9 A e 11 A**).

Quando analisada a cinética de AC (**Figura 9 B**) e MOP (**Figura 11 B**) em *D. melanogaster*, é observada baixa atividade de reparo do DNA (taxa de recombinação) nas concentrações de $9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ mM de AC (**Figura 9 B**) e $1,9$ e $3,9 \times 10^{-3}$ mM de MOP (**Figura 11 B**), paralelo a alta taxa de mutação de maneira concentração dependente.

Partindo da premissa, que a única diferença entre os IA e os produtos formulados é a presença dos ingredientes inertes na formulação de AC e MOP, sugerimos que a redução da atividade do mecanismo de reparo do DNA ocorre devido a atividade dos ingredientes inertes, sendo estes diretamente associados com o não reparo dos danos induzidos pelos ingredientes ativos, o que maximiza o efeito genotóxico de TMX e ACP.

O mecanismo de reparo por recombinação homóloga é encontrado em todos os organismos e exerce fundamental papel na manutenção da estabilidade gênica (Heyer, 2007). Reparo por recombinação homóloga é uma via de metabolismo do DNA que resulta no reparo de danos clastogênicos ocasionados por quebras de fitas duplas (Santelli e Sivieiro, 2014). Além de corrigir danos proporcionados por potenciais xenobióticos, o mecanismo de reparo por recombinação homóloga está associado à segregação correta dos cromossomos na meiose (Heyer *et al.*, 2010) e manutenção dos telômeros (Li e Heyer, 2008), o que comprova que exercem fundamental papel na estabilidade gênica.

Sabe-se que em *Drosophila* sp. o mecanismo de reparo por recombinação homóloga funciona corrigindo quebras cromossômicas até um limite, que é determinado pela agressividade do dano (Li e Heyer, 2008). Acreditamos que nas concentrações de $7,8 \times 10^{-3}$ e $1,5 \times 10^{-2}$ mM de MOP os danos são de natureza mais agressiva de tal forma que a única forma de garantir a não propagação de células mutantes, seria por meio da morte celular, o que justifica a toxicidade destas concentrações em descendentes do cruzamento HB (**Figura 4 B**) e a baixa frequência de manchas mutantes (**Tabela 6**).

Além disso, PRM foi o único inseticida capaz de causar aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas mutantes em descendentes do cruzamento ST (**Tabela 3**). Os resultados obtidos pelo SMART em *D. melanogaster* tratadas com PRM (**Figura 10 A**) mostram que a alta frequência de manchas mutantes fora derivada de eventos resultantes de

recombinação, sugerindo a presença do mecanismo de reparo atuando na correção dos danos induzidos por IMI, possibilitando a fixação de eventos recombinacionais. É possível verificar na maior concentração avaliada de PRM ($9,7 \times 10^{-4}$ mM), uma redução na taxa de recombinação, paralelo ao aumento na taxa de mutação e mortalidade, indicando a ineficácia do sistema de reparo na correção de danos genéticos de larga escala, restando a célula a ativação da morte celular por necrose ou apoptose.

Embora os resultados da toxicogenética de IMI (**Figura 10 B**) e PRM (**Figura 10 C**) sejam semelhantes (baixa taxa de recombinação) em moscas descendentes do cruzamento HB, os resultados indicam que após metabolização dos ingredientes inertes via CYP6A2, os metabólitos dos ingredientes inertes passam a interferir com o mecanismo de reparo por recombinação homóloga. Esta hipótese é sustentada pela redução da taxa de recombinação em moscas descendentes do cruzamento HB (**Figura 10 C**) quando comparado aos descendentes do cruzamento ST (**Figura 10 A**). As análises dos resultados oferecem grandes contribuições no entendimento da toxicogenética dos ingredientes ativos TMX, IMI e ACP, bem como demonstram a atividade evidente dos ingredientes inertes, os quais podem interferir com a toxicidade dos ingredientes ativos, bem como atuar na inibição da atividade do sistema de reparo por recombinação homóloga.

No presente trabalho, foi avaliada a atividade carcinogênica dos inseticidas neonicotinóides em *D. melanogaster* por meio do ETT. As concentrações avaliadas foram selecionadas mediante ensaio de sobrevivência.

As taxas de sobrevivência, observadas no presente estudo, em descendentes do cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas *wts/TM3, Sb¹*, expostas a diferentes concentrações dos inseticidas neonicotinóides, demonstram que o TMX e AC (**Figura 12**), o IMI e PRM (**Figura 13**), e o ACP e MOP (**Figura 14**), apresentaram o mesmo padrão de toxicidade observado no cruzamento ST do SMART (**Figuras. 2 A, 3 A e 4 A**). O padrão de toxicidade observado se deve a constituição genética da linhagem *wts*, a qual assim como as linhagens de moscas usadas no SMART possuem níveis basais de expressão de enzimas CYP6A2 (Nepomuceno, 2015), apresentando portanto, padrão de toxicidade semelhante.

Para verificar o potencial carcinogênico de TMX, IMI, ACP, AC, PRM e MOP, foi utilizado o ETT. Este Teste faz uso de uma linhagem de *D. melanogaster* que apresenta o marcador *wts*, que quando expresso em condição selvagem, atua como gene supressor de tumor, inibindo qualquer tipo de progressão tumoral no epitélio da mosca (Xu *et al.*, 1995). A perda da heterozigose do marcador *wts* e a expressão do alelo mutante resultam na instalação e progressão de massa tumoral no epitélio da mosca em todos os apêndices originados após a diferenciação das células do disco imaginal (Nepomuceno, 2015). O ETT tem demonstrado relevância em estudos de toxicologia genética, sendo usado no rastreamento da carcinogenicidade de uma ampla variedade de xenobióticos (Morais *et al.*, 2016a; 2018; Vasconcelos *et al.*, 2017; Naves *et al.*, 2018) incluindo inseticidas (Morais *et al.*, 2016b).

Não foi observado efeito carcinogênico dos inseticidas TMX, AC (**Tabela 7**), IMI (**Tabela 8**), ACP e MOP (**Tabela 9**). Como mencionado anteriormente à linhagem *wts* apresenta níveis basais de expressão de CYP6A, confirmando mais uma vez a necessidade de ativação dos inseticidas TMX, IMI, ACP, AC e MOP para que estes possam causar danos direta ou indiretamente no DNA das moscas. Os resultados são concordantes com os resultados de mutagenicidade obtidos no SMART em moscas descendentes do cruzamento ST, demonstrando a necessidade de metabolização para instalação de processos cancerígenos.

PRM, por outro lado, apresentou efeito carcinogênico nas maiores concentrações avaliadas (2,4; 4,8 e 9,7 x 10⁻⁴ mM). Os resultados são concordantes com a análise de manchas mutantes em moscas descendentes do cruzamento ST, tratadas com PRM (**Tabela 3**). No entanto, no SMART foi verificado resultados positivos para mutagenicidade em todas as concentrações avaliadas, enquanto no ETT, PRM induziu formação de tumor epitelial apenas nas três maiores concentrações. Estes resultados sugerem maior sensibilidade do SMART no rastreamento da genotoxicidade de xenobióticos ambientais. A maior sensibilidade do SMART pode ser sustentada pela característica do teste, sendo que as manchas mutantes são geradas pela perda da heterozigose de um ou os dois marcadores genéticos (*mwh* e *flr³*), enquanto que o Teste *wts*, fundamenta-se na perda da heterozigose de apenas um marcador genético (*wts*) para que ocorra a progressão da massa tumoral.

Neste trabalho foi comparada a toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade dos IAs. Os resumos dos resultados estão apresentados na **Tabela 10**. A análise dos resultados mostra que TMX apresenta natureza mais tóxica comparada aos demais ingredientes ativos, seguido de IMI e ACP. Embora todos os ingredientes ativos sejam capazes de levar a perda da heterozigose dos marcadores genéticos apenas após metabolização via CYP6A2, os resultados permitem concluir que IMI apresenta maior atividade mutagênica, haja vista que este inseticida foi capaz de incrementar danos no material genético de *D. melanogaster* em menores concentrações, comparado as concentrações indutoras de manchas mutantes observadas nas moscas expostas a TMX e ACP.

Os resultados negativos para carcinogenicidade dificulta comparar o potencial carcinogênico dos inseticidas (ingredientes ativos) avaliados, uma vez que os inseticidas necessitam de biotransformação para desencadear processos cancerígenos (**Tabela 10**).

Pesticidas são produtos químicos usados no campo, que objetivam eliminar as pragas, aumentando a produtividade agrícola (Farooqui, 2013). Mesmo, muitos alegando seletividade, diversos trabalhos, demonstram que pesticidas estão diretamente ligados a eventos negativos em organismos não alvos de combate, incluindo abelhas (Hesselbach e Scheiner, 2018; Odmer *et al.*, 2018; Basley *et al.*, 2018), peixes (Nunes *et al.*, 2018; Kaur and Jindal, 2018; Clasen *et al.*, 2018), anfíbios (Zhang *et al.*, 2018; Amaral *et al.*, 2018; Quintaneiro *et al.*, 2018), reptéis (Solla *et al.*, 2014; Munoz e Vermeiren, 2018), aves (Pandey e Mohanty, 2017; Nambirajan *et al.*, 2018; Faria *et al.*, 2018) e mamíferos (Sebastian e Raghavan, 2016; Ansari *et al.*, 2018; Kopjar *et al.*, 2018).

Dentre os diversos eventos negativos, destaca-se a capacidade de muitos pesticidas desencadear eventos mutagênicos e carcinogênicos (Demsia *et al.*, 2007; Bhinder *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2017; Tariba-Lorakovic *et al.*, 2017; Gonçalves *et al.*, 2017; Santo *et al.*, 2018), incluindo inseticidas (Arcaute *et al.*, 2014; Atli-Skeroglu *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2018; Calderon-Segura *et al.*, 2018). Inseticidas neonicotinóides estão diretamente associados ao incremento de modificações gênicas, resultantes de eventos genotóxicos e/ou mutagênicos em sistemas *in vivo* e *in vitro* (Zejezic *et al.*, 2017; Vieira *et al.*, 2018; Hong *et al.*, 2018; Iturburu *et al.*, 2018; Bagri e Jain, 2018).

Tabela 10. Análise comparativa dos resultados obtidos em *D. melanogaster* tratadas com inseticidas neonicotinóides (IA).

Composto e concentração (mM)	Ensaio de toxicidade			Ordem da toxicidade	SMART		Natureza das manchas mutantes (HB)		Ordem da mutagenicidade	ETT
	ST	HB	wts		ST	HB	Mutação	Recombinação		
TMX 2,4 x 10 ⁻⁴	-	-	-		-	-	NA	NA		-
TMX 4,8 x 10 ⁻⁴	-	-	-		-	-	NA	NA		-
TMX 9,7 x 10 ⁻⁴	+	-	+		-	+		X		-
TMX 1,9 x 10 ⁻³	+	+	+	TMX > IMI > ACP	-	+		X	IMI > TMX > ACP	-
IMI 1,2 x 10 ⁻⁴	-	-	-		-	-	NA	NA		-
IMI 2,4 x 10 ⁻⁴	-	-	-		-	+		X		-
IMI 4,8 x 10 ⁻⁴	-	-	-		-	+		X		-
IMI 9,7 x 10 ⁻⁴	-	-	-		-	-	NA	NA		-
IMI 1,9 x 10 ⁻³	+	+	+		NA	NA	NA	NA		NA
ACP 1,9 x 10 ⁻³	-	-	-		-	+	X			-
ACP 3,9 x 10 ⁻³	-	-	-		-	+	X			-
ACP 7,8 x 10 ⁻³	-	-	-		-	+	X			-
ACP 1,5 x 10 ⁻²	-	-	-		-	+	X			-
ACP 3,0 x 10 ⁻²	+	+	+		NA	NA	NA	NA		NA

TMX: Tiametoxam; IMI: Imidacloprido; ACP: Acetamiprido; NA: Não avaliado; +: Efeito observado; -: Efeito não observado; X: Efeito predominante observado.

Na classe dos inseticidas neonicotinóides existem basicamente sete ingredientes ativos (Tiacloprido, Acetamiprido, Imidacloprido, Tiametoxam, Clotianidina, Dinotefuran e Nitempiran). Dos sete neonicotinóides, imidacloprido é o mais intensamente estudado em parâmetros de genética toxicológica (Feng *et al.*, 2004; 2005; Demisia *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2009; Behinder *et al.*, 2012; Pérez-Iglesias *et al.*, 2014; Bagri *et al.*, 2014; 2016; Bianchi *et al.*, 2015; 2016; Al-Sarar *et al.*, 2015; Arslan *et al.*, 2015; Kataria *et al.*, 2015; Stivaktakis *et al.*, 2016; Iturburu *et al.*, 2016; 2018; Hong *et al.*, 2018; Muzinic *et al.*, 2018; Yucel e Kavis *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2018).

Guo *et al.* (2018) avaliaram os efeitos de IMI em células linfoblastos TK6 e identificaram danos de natureza mutagênica e genotóxica nas concentrações de 0,1; 1; 5 e 10 µg/mL, por meio do teste do micronúcleo (TMN) e o ensaio cometa. Em outro estudo *In vitro* (cultura de linfócitos), IMI induziu danos genéticos nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 mg/mL (ensaio cometa) e danos resultantes de troca de cromátides irmãs nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg/L (Feng *et al.*, 2005). Resultados para mutagenicidade também foram observados nas concentrações de 0,00036; 0,0036; 0,036 e 0,36 g/L em células HepG2 (TMN) (Bianchi *et al.*, 2015). Os resultados para genotoxicidade foram confirmados por meio do ensaio cometa (0,036 e 0,36 g/L).

Em células de ovário de hamster chinês, IMI mostrou ser capaz de induzir a formação de micronúcleos (MN) na concentração de 114,63 µM (Al-Sarar *et al.*, 2015). Muitos autores confirmaram que IMI é capaz de induzir a formação de MN, porém poucos trabalhos avaliaram o mecanismo usado por IMI para a indução desses danos genéticos. Resultados obtidos por meio de análise de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) mostram que IMI pode gerar danos por eventos clastogênicos (Bianchi *et al.*, 2015) e aneugênicos (Muzinic *et al.*, 2018).

Por outro lado, IMI já foi relacionado com alterações gênicas de natureza pontual. Behinder *et al.* (2012) avaliaram o efeito genotóxico de IMI na concentração de $2,3 \times 10^{-5}$ µL/mL em *Anopheles stephensi*. Os resultados de análise de mutação por reação em cadeia da polimerase (PCR) permitiram concluir que das 88 mutações observadas, 8 eram do tipo deleção, 29 inserções de pares de bases, 18 transições e 33 transversões, confirmando portanto, a heterogeneidade de indução de processos mutagênicos por IMI.

Além disso, diferenças na toxicogenética do ingrediente ativo IMI, quando comparado ao produto formulado Confidor® foram verificados por Costa et al (2009). Os resultados mostram a capacidade de IMI induzir MN na concentração de 20 µM de maneira estatisticamente significativa em linfócitos, somente após metabolização (S9+). No entanto, a análise da frequência de MN na concentração de 20 µM de Confidor® (17,8% de IMI na formulação), mostra a capacidade do produto formulado induzir aumento estatisticamente significativo na frequência de MN em células com níveis basais de expressão enzimática de desintoxicação (S9-) e em células com níveis constitutivos enzimáticos (S9+).

Os resultados do trabalho de Costa *et al.* (2009) entram em concordância com os dados apresentados no presente trabalho (**Tabelas 3-4**), demonstrando claramente que a presença dos ingredientes inertes na formulação dos inseticidas, podem aumentar os riscos de fragmentação no DNA e aberrações cromossômicas. Diferença na frequência de danos no DNA em linfócitos em cultura tratados com IMI e Confidor®, também foram observados por meio da análise em gel de DNA fragmentado, por meio do ensaio cometa (Costa *et al.*, 2009). Resultados que indicam diferenças no padrão de mutagenicidade do ingrediente ativo e o produto formulado também foram observados por Iturburu *et al.*, 2016, evidenciando que os ingredientes inertes podem potencializar a atividade mutagênica do ingrediente ativo.

Ensaio *in vivo* com coelhos mostraram que a dieta suplementada com IMI nas concentrações de 40 e 80 mg/Kg/dia podem resultar em aumento na frequência de MN após 2 meses de exposição, possibilitando a instalação de processos mutagênicos (Stivaktakis *et al.*, 2016).

Em *Mus musculus* formação de MN acima do limite tolerável basal foi observado nas concentrações de 112,5 mg/Kg, além de aberrações cromossômicas nas concentrações de 37,5; 75 e 112,5 mg/Kg via exposição oral por 24h (Kataria *et al.*, 2015). Em ratos albinos suíços expostos oralmente 5,5; 11 e 22 mg/Kg/dia foram observados aumento na frequência de MN e aberrações cromossômicas na concentração de 22 mg/Kg/dia (28 dias de exposição) (Bagri *et al.*, 2016) e anomalias nas cabeças dos espermatozoides de machos nas concentrações de 5,5; 11 e 22 mg/Kg/dia (14 e 28 dias de exposição) (Bagri *et al.*, 2014). Além disso, resultados para mutagenicidade por meio do Teste do

dominante letal foi observado na concentração de 22mg/Kg/dia durante 298 dias de exposição (Bagri *et al.*, 2014).

Em ratos (machos) expostos via injeção intraperitoneal a 170 mg/Kg foi constatado aumento na frequência de aberrações cromossômicas nos tempos de 12 e 24 h de exposição (Arslan *et al.*, 2015). Os autores ao injetar IMI na concentração de 170 mg/Kg com moduladores enzimáticos (PBO e MEN) verificaram a redução da frequência de aberrações cromossômicas, indicando a necessidade de metabolismo via citocromo P450 e esterases para induzir eventos mutagênicos. Estes resultados entram em concordância com os resultados apresentados no presente estudo (**Tabelas 3-4**).

Resultados positivos para genotoxicidade de IMI também foram observados em anfíbios. IMI nas concentrações de 8 e 32 mg/L⁻¹ foram capazes de induzir formação de MN em *Rana N.halowell* e *Rana limnocharis* em 7 dias de exposição (Feng *et al.*, 2004) e resultados positivos para fragmentação cromossômica (ensaio cometa) na concentração de 2; 8 e 32 mg/L⁻¹. Indução de MN foi observado em *Hypsiboas pulchellus* expostos a 25 mg/L durante 96h (Pérez-Iglesias *et al.*, 2014). Além disso, alterações nucleares foram observadas em *H. pulchellus* tratados com 25 e 37,5 mg/L de IMI nos tempos de 48 e 96 h de exposição.

Em *Galleria mellonella* IMI nas concentrações de 0,25; 0,50; 0,75 e 1 µg/mL induziram formação de MN acima do limite tolerável basal (Yucel e Kavis, 2018). Em *Allium cepa* foi verificado indução de aberrações cromossômicas em plantas expostas a 0,036; 0,36 e 3,6 g/L⁻¹ após 48h de recuperação e na concentração de 3,6 g/L⁻¹ após 72h de recuperação (Bianchi *et al.*, 2016).

Danos do tipo MN foram observados em peixes *Australoheros facetus* expostos às concentrações de 810 µg/L (Iturburu *et al.*, 2018) e 1000 mg/L (Iturburu *et al.*, 2016). Danos identificados por endonuclease III (Endo III) foram observados nas concentrações de 1; 10; 75 e 810 µg/L de IMI (Iturburu *et al.*, 2018). MN induzidos na concentração de 2mg/L foram observados em peixes por Hong *et al.* (2018).

Os resultados apresentados por outros autores confirmam o potencial mutagênico de IMI em diferentes sistemas *in vitro* e *in vivo*. Além disso, alguns achados mostram que IMI necessita de metabolismo enzimático mediado por

enzimas do complexo P450 para desencadear processos genotóxicos (Arslan *et al.*, 2015). De maneira análoga aos nossos resultados, a presença dos ingredientes inertes pode interferir na toxicogenética do IMI, aumentando a possibilidade, mesmo em níveis basais de atividade metabólica, de gerar instabilidade genética (Costa *et al.*, 2009), podendo ainda desencadear processos cancerígenos (**Tabela 8**).

ACP outro inseticida pertente a classe dos neonicotinóides, também foi relacionado com eventos resultantes de instabilidade genética (Kocaman e Topaktas, 2007; Kocaman e Topaktas, 2010; Çava *et al.*, 2014; Bagri e Jain, 2018).

Çavas *et al.* (2014) identificaram efeito genotóxico/mutagênico nas concentrações de 100; 200; 400; 800 e 1600 µg/mL por meio do ensaio cometa, TMN e o Teste H2AX em cultura de IMR-90.

Kocaman e Topaktas verificaram instabilidade genética, por meio do teste de troca de cromátides irmãs e TMN, alterações genéticas em linfócitos de sangue humano periférico, quando tratados com ACP (30; 35 e 40 µg/mL) (Kocaman e Topaktas, 2007) ou em conjunto com cipermetrina (Proporção de ACP+cipermetrina: 12.5 + 2.5; 15 + 5; 17.5 + 7.5 µg/mL) (Kocaman e Topaktas, 2010).

Bagri e Jain (2018) avaliaram o efeito de ACP via exposição oral em camundongos albinos suíços por 60 e 90 dias de exposição nas concentrações de 2,3 e 4,6 mg/Kg/dia. Os resultados de análise do TMN e ensaio de aberração cromossômica evidenciaram danos genéticos de maneira dose dependência.

Os resultados do nosso trabalho, quando confrontados com os resultados de outros autores, confirmam que a exposição ao ACP, seja por sistemas *in vitro* ou *in vivo*, pode resultar em danos genéticos, podendo inferir doenças relacionadas a instabilidade genética.

Embora haja um considerável número de trabalhos sobre o efeito mutagênico/genotóxico de inseticidas neonicotinóides, principalmente do inseticida IMI, poucos dados estão disponíveis sobre o inseticida TMX (Bhinder *et al.*, 2012; Sinha e Thaker, 2013).

Sinha e Thaker (2013) avaliaram o efeito da exposição crônica (28 dias) de 87,1 e 43,5 mg/Kg de TMX em camundongos, por meio do ensaio cometa, TMN e

o teste de aberrações cromossômicas. Não foram observados valores acima dos limites toleráveis basais para efeitos mutagênicos ou genotóxicos neste trabalho

Por outro lado, Bhinder et al (2012) ao avaliar o efeito TMX sobre o material genético de *Anopheles stephensi*, por meio de um ensaio de genotoxicidade baseada em reação em cadeia de polimerase (PCR), verificou um grande aumento de mutações pontuais no gene ITS2. Após 24 horas de exposição a 5×10^{-3} $\mu\text{L/mL}$ de TMX foram identificadas 133 mutações, sendo que destas, 8 eram inserções, 10 deleções, 47 transições e 68 transversões.

Estes resultados quando comparado com os do presente trabalho sugerem que as mutações induzidas por TMX são preferencialmente do tipo pontuais. Tal afirmação justifica a baixa frequência de danos no DNA observados no trabalho de Sinha e Thaker (2013), já que o TMN e o ensaio cometa apesar da sua alta sensibilidade são inviáveis na identificação de danos mais discretos (mutações de ponto).

Além da avaliação direta do efeito do TMX, Dourado *et al.*, 2016, em um trabalho de monitoramento ambiental, atribuiu a alta frequência de micronúcleos e quebras de fita simples e dupla (ensaio cometa) em peixes coletados em rio contaminado, à presença de metais pesados e ao inseticida TMX nas matrizes de água coletadas.

Embora não seja evidenciado efeito carcinogênico de TMX e AC no presente trabalho, a indução de tumor pelo TMX já foi relatada por Green et al (2005). Neste trabalho foi constatado a queda do colesterol, seguida de morte celular (apoptose e necrose) após 10 semanas de tratamento em ratos com 50, 200, 500, 1250, 2500 e 5000 ppm de TMX e aumento da replicação celular 20 semanas após o tratamento. Este comportamento foi correlacionado com o aumento da incidência de tumores hepáticos nos ratos tratados com TMX. Neste trabalho foi constatada a influência dos metabólitos de TMX na hepatotoxicidade e hepatocarcinogenicidade.

Embora não tenha sido avaliado diretamente como TMX. IMI, ACP, AC, PRM e MOP agem incrementando danos ao DNA, dados na literatura confirmam que a exposição de organismos a inseticidas, pode resultar no aumento do estresse oxidativo (Ben Salem *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Hung *et al.*, 2016), pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais podem, ao oxidar

biomoléculas, causar danos que resultem em instabilidade gênica (Abdalla *et al.*, 2014).

Inseticidas neonicotinóides são espécies químicas capazes de aumentar a formação de ERO (Yan *et al.*, 2015; 2016; Chakroun *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017ab; Wang *et al.*, 2018), sendo relacionado com oxidação do DNA e o incremento de mutações acima do limite tolerável basal (Ge *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016b; Liu *et al.*, 2017ab). Nesse sentido, sugerimos que o aumento de manchas mutantes observados em descendentes do cruzamento HB (**Tabelas 2, 4 e 6**) seja causado pelo aumento de ERO. Além disso, IMI já foi citado como potencial alquilante (Bianchi *et al.*, 2015). A propriedade alquilante de um xenobiótico está relacionada com sua eletronegatividade, sendo, portanto, capaz de tornar altamente reativo em sites do DNA ricos em elétrons. Nesse sentido, IMI pode se ligar covalentemente às bases nitrogenadas do DNA e formar ductos gerados por eventos clastogênicos (Jasen *et al.*, 1994; Benigni *et al.*, 2012).

O estresse oxidativo é fundamental na manutenção da homeostase do organismo e está envolvido na produção de energia, fagocitose, sinalização intracelular, síntese de substâncias biológicas e regulação do crescimento celular. Contudo, o aumento do estresse oxidativo acima dos níveis normais, leva a produção de radicais livres reativos, que podem promover a oxidação de biomoléculas, como lipídios, proteínas e DNA (Maes *et al.*, 2011; Abdullah *et al.*, 2015). A excessiva produção de ERO em organismos expostos a xenobióticos está diretamente associada a danos genotóxicos e processos cancerígenos (Albert e Magee, 2000; Peluso *et al.*, 2015).

No Brasil, a comercialização e utilização de pesticidas no sistema agrícola devem passar pela autorização de três órgãos, MAPA (dossiê técnico), ANVISA (dossiê toxicológico) e IBAMA (dossiê ambiental) (Brasil, 1992). MAPA é incumbido de fornecer dados sobre a efetividade da molécula no controle das pragas alvo. ANVISA pelas características toxicológicas da molécula, estabelecendo padrões de segurança de utilização, que não venha a prejudicar a saúde humana, usando como limite de exposição, a dose diária aceitável (IDA).

E por último, o IBAMA avalia os efeitos da molécula no meio ambiente e na biota, estabelecendo padrões de segurança que não prejudique o ecossistema e as espécies viventes (Brasil, 1992).

No entanto, a grande maioria dos testes toxicológicos é realizada apenas com o ingrediente ativo, negligenciando os efeitos dos ingredientes inertes, os quais são incluídos na formulação dos pesticidas (Brasil, 1992; Godoy e Oliveira, 2004).

Ingredientes inertes são químicos de natureza neutra e de baixo custo que servem como veículo dispersante do toxicante (ingrediente ativo) (Yu, 2008). Além disso, os ingredientes inertes, tais como adjuvantes, tem o papel de proteger o ingrediente ativo contra degradação, aumentando sua persistência no ambiente e a permeabilidade do toxicante via membrana plasmática dos organismos-alvo (Marutani e Edirveerasingan, 2006).

Ensaio de mutagenicidade em procariontes e eucariontes, teratogenicidade, efeitos sobre a reprodução e a prole, bem como testes de neurotoxicidade são conduzidos apenas com o ingrediente ativo (Mesnage *et al.*, 2014). As empresas fabricantes de inseticidas asseguram que os ingredientes inertes não interferem com a toxicidade do ingrediente ativo. No entanto, o presente trabalho mostra que os ingredientes inertes interferem diretamente no mecanismo de reparo por recombinação homóloga, potencializando os efeitos tóxicos e mutagênicos dos ingredientes ativos.

É muito difícil analisar de maneira isolada os efeitos genotóxicos dos ingredientes inertes, uma vez que os fabricantes não declaram na rotulagem quais foram usados na formulação. Nesse sentido, fica evidente que o sistema para liberação de pesticidas no Brasil, precisa adotar como medida padrão a inclusão de ensaios pautados na genética toxicológica também nos produtos formulados, visando garantir a liberação da utilização de produtos fitossanitários com maior rigor padrão de segurança humana e ambiental. Evidentemente, dispensar a análise dos efeitos dos ingredientes inertes pode resultar, em longo prazo, em diversos danos ambientais e na saúde humana, já que os ingredientes inertes podem potencializar a ação tóxica e mutagênica dos ingredientes ativos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que, nestas condições experimentais:

O TMX e AC são tóxicos nas concentrações de $9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ mM em *D. melanogaster* com níveis basais de enzimas CYP6A2. Após metabolização, apresentam natureza menos tóxica, sendo observado toxicidade significativa apenas na concentração de $1,9 \times 10^{-3}$ mM.

O IMI e PRM apresentaram atividade tóxica na concentração de $1,9 \times 10^{-3}$ mM em *D. melanogaster* com níveis basais de enzimas CYP6A2. Após metabolização via CYP6A2, PRM apresentou toxicidade significativa nas concentrações de $4,8; 9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ mM, indicando que os ingredientes inertes não declarados podem potencializar a toxicidade dos ingredientes ativos em *D. melanogaster*.

MOP apresenta maior toxicidade quando comparado ao ingrediente ativo ACP em *D. melanogaster* tanto em níveis basais como elevados de CYP6A2, demonstrando, mais uma vez, que os ingredientes inertes podem potencializar a atividade tóxica dos ingredientes ativos.

A ordem da toxicidade dos ingredientes ativos foi $TMX > IMI > ACP$. TMX, AC, ACP, MOP e IMI não são mutagênicos para *D. melanogaster* com níveis basais de enzimas CYP6A2.

Todos os inseticidas apresentaram atividade mutagênica após metabolização via CYP6A2.

Os ingredientes inertes podem potencializar a mutagenicidade e a carcinogenicidade do IMI e interferir no mecanismo de reparo por recombinação homóloga, resultando em aumento dos danos induzidos pelos ingredientes ativos.

TMX, AC, IMI, ACP e MOP induzem aumento na frequência de manchas mutantes em *D. melanogaster* do cruzamento HB de maneira tardia, enquanto PRM causa danos no DNA de maneira precoce tanto no ST quanto no HB.

A ordem de mutagenicidade dos ingredientes ativos em *D. melanogaster* foi $IMI > TMX > ACP$.

TMX, AC, IMI, ACP e MOP não induziram aumento estatisticamente significativo na frequência de tumores epiteliais em *D. melanogaster*.

PRM, nas maiores concentrações utilizadas induziu aumento estatisticamente significativo na frequência de tumores epiteliais em *D. melanogaster*.

Mais trabalhos devem ser realizados, usando outros organismos testes, com o objetivo de contribuir com dados a respeito da periculosidade de inseticidas neonicotinóides.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE INSETICIDAS NEONICOTINÓIDES POR MEIO DO TESTE DO MICRONÚCLEO EM *Tradescantia pallida*

RESUMO

Neonicotinóides são inseticidas neurotóxicos agonistas aos receptores nicotínicos da acetilcolina, que agem ao desregular a atividade neural dos insetos, resultando em morte. Apesar dos benefícios conferidos pelo uso de inseticidas no sistema agrícola, o uso indevido ou indiscriminado de inseticidas está diretamente associado a diversos efeitos toxicológicos na biota e em diferentes níveis tróficos. Partindo desta premissa, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar a capacidade genotóxica de diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX), Acetamiprido (ACP) e Imidacloprido (IMI), por meio do Teste do Micronúcleo em *Tradescantia pallida* (Trad-MCN). Após aclimatização (24 h), hastes de *T. pallida* foram tratadas com diferentes concentrações de TMX, ACP ou IMI, por um período de 8h. Em seguida as hastes de *T. pallida* foram submetidas a fase de recuperação (24 h). As inflorescências jovens das hastes foram colhidas e fixadas em solução Carnoy e, após 24h, foram conservadas em etanol 70% até o momento das análises. As anteras obtidas foram maceradas sobre lâminas para microscopia, coradas com corante carmim acético e em seguida cobertas com lamínulas, e analisadas em microscopia óptica. A frequência de micronúcleos (MN) nas plantas tratadas com TMX nas concentrações de 0,2 e 0,4 g/L, ACP nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 g/L e IMI nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 g/L diferiram estatisticamente ($p < 0,05$, Tukey) da frequência de MN das plantas pertencentes ao controle negativo. Todos os inseticidas avaliados apresentaram atividade genotóxica em *T. pallida* nas maiores concentrações avaliadas.

Palavras-chave: Aneugenicidade; Genotoxicidade; Micronúcleos; Neonicotinóides; Pesticidas.

ABSTRACT

Neonicotinoids are neurotoxic insecticidal agonists to nicotinic acetylcholine receptors, which act by deregulating the neural activity of insects, resulting in death. Despite the benefits conferred by the use of insecticides in the agricultural system, the misuse or indiscriminate use of these chemicals is directly associated with several toxicological effects in biota and at different trophic levels. Based on this premise, the aim of the present study was to evaluate and compare the genotoxic capacity of different concentrations of thiamethoxam (TMX), acetamiprid (ACP) and imidacloprid (IMI) through the Micronucleus Test in *Tradescantia pallida* (Trad-MCN). After acclimatization (24 h), *T. pallida* stems were treated with established concentrations of TMX, ACP or IMI for 8 h. Then, the stems of the model organism were submitted to a recovery phase (24 h). The young inflorescences were harvested and fixed in Carnoy solution and, after 24h, were conserved in ethanol 70% until the analyzes. The obtained anthers were macerated on slides for microscopy, stained with acetic carmine dye and covered with coverslips before analysis by light microscopy. Considering the insecticides, the micronuclei (MN) frequency in plants treated at concentrations of 0.2 and 0.4 g/L for TMX, 0.2; 0.4 and 0.8 g/L for ACP, 0.1; 0.2; 0.4; 0.8 and 1.6 g/L for IMI differed statistically ($p < 0.05$, Tukey) from the MN frequency of the negative control. All chemicals evaluated revealed genotoxic activity in *T. pallida* at the highest concentrations.

Keywords: Aneugenicity; Genotoxicity; Micronucleus; Neonicotinoids; Pesticides.

1. INTRODUÇÃO

Pesticidas são substâncias puras ou mistura de substâncias comumente utilizadas no controle de pragas no sistema agrícola, médico-veterinário e domissanitário (Bagri e Jain., 2018).

Na agricultura moderna, o uso de pesticidas tem se tornado uma das alternativas mais recorrentes por agricultores, objetivando aumentar a produção de alimentos, pela redução de perdas por ataque de pragas (Bhinder *et al.*, 2012). No entanto, devido ao uso intensivo ou impróprio destes químicos, pesticidas têm sido encontrados em diferentes compartimentos do ecossistema, oferecendo grande risco a biota (Kocaman e Topaktas., 2009).

Pesticidas apesar de serem correlacionados com toxicidade seletiva em pragas no campo, também são capazes de interagir com biomoléculas de espécies não alvas de combate, podendo desencadear efeitos toxicológicos em diferentes níveis na biota, incluindo humanos (Mondal *et al.*, 2012). Do ponto de vista ocupacional, pesticidas são preocupantes devido a magnitude da contaminação em um contexto global, partindo da premissa que o homem está exposto diariamente a diferentes concentrações, por meio da ingestão dos alimentos contendo resíduos de diferentes agroquímicos (Al-Sarar *et al.*, 2015).

Dentre os pesticidas utilizados no controle de insetos pragas, destacam-se os inseticidas neurotóxicos, os quais se ligam em diferentes sítios dos receptores neurais, levando a desregulação da atividade neural dos insetos, resultando em morte.

Inseticidas neonicotinóides são neurotóxicos, e se ligam de maneira agonista aos receptores nicotínicos da acetilcolina, levando a um estímulo neural excessivo, seguido de hiperexcitação, paralisa e morte de insetos expostos (Tomizawa e Yamamoto 1993; Goulson, 2013; Bagri *et al.*, 2015). Nesta classe, estão inseridos três grupos de moléculas químicas, N-nitroguanidinas (Imidacloprido, Tiametoxam, Clotianidina e Dinotefuran), Nitrometilenos (Nitempiram) e N-cianoamidinas (Acetamiprido e Tiaclopride) (Jeschke *et al.*, 2011) que em conjunto lideram o mercado de inseticidas neurotóxicos (Sparks e Nauen, 2015).

Tiametoxam (TMX), Acetamiprido (ACP) e Imidacloprido (IMI) são representantes desta classe de inseticidas e sua eficiência está relacionada com

a toxicidade seletiva a insetos e a atividade sistêmica nos vegetais, protegendo todas as estruturas vegetais de um amplo espectro de pragas (Goulson, 2013).

Mesmo apresentando eficiência no controle de pragas, inseticidas neurotóxicos têm sido associados a eventos que resultam em instabilidade genética, incluindo TMX (Morais *et al.*, 2017; Feki *et al.*, 2018), ACP (Çavas *et al.*, 2014; Bagri e Jain, 2018) e IMI (Guo *et al.*, 2018; Iturburu *et al.*, 2018), colocando em risco a biota nos seus diferentes níveis tróficos.

Levando em consideração que mutações podem desencadear processos neoplásicos, avaliar o potencial genotóxico de diferentes agentes químicos é de grande importância, com o objetivo de prevenir doenças associadas a instabilidade genética. Além disso, estudos que buscam avaliar alterações moleculares e celulares causados por xenobióticos ambientais são fundamentais no intuito de identificar a periculosidade associada a estas moléculas, antes que possam causar efeito deletério nas populações expostas (Dorr *et al.*, 2014).

Um dos grandes desafios da genética toxicológica é a padronização de ensaios biológicos que sejam sensíveis a diferentes xenobióticos, apresentando, portanto, eficiência no rastreio da genotoxicidade induzida por componentes isolados ou amostras complexas e ao mesmo tempo, apresente reprodutibilidade e seja economicamente viável.

Em se tratando de inseticidas, avaliar a mutagenicidade destes compostos nas concentrações usadas nas lavouras (indicadas pelos fabricantes), torna-se uma tarefa difícil, já que na maioria das vezes as concentrações de uso tendem a levar a morte, os organismos usados nos experimentos em condições laboratoriais.

Nesse sentido, a utilização de um organismo que suporte a toxicidade destas moléculas e ao mesmo tempo, apresente sensibilidade de resposta é fundamental na compreensão da toxicogenética, bem como na identificação de danos induzidos por pesticidas em concentrações de uso.

Tradescantia pallida (**Figura 1**) representa um dos eucariotos vegetais mais utilizados em pesquisas de mutagênese, sendo altamente sensíveis a diferentes poluentes ambientais (Pereira *et al.*, 2014).



Figura 1: *Tradescantia pallida*.

Em *T. pallida*, um dos testes mais utilizados e padronizados é o teste do micronúcleo (Trad-MCN), o qual permite o rastreamento de danos no material genético por eventos clastogênicos ou aneugênicos. O Trad-MCN foi primeiramente proposto por Ma et al (1978).

Micronúcleos (MNs) são fragmentos de cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros, que durante o processo de divisão celular ficaram fora do núcleo principal da célula. A formação de MN pode ocorrer por mecanismos que resultem na quebra de fita dupla do DNA (evento clastogênico) ou por não disjunção dos cromossomos durante a divisão celular (evento aneugênico) (Fenech, 2000).

Para realização do TMN diferentes linhagens celulares e organismos vivos podem ser utilizados, incluindo, insetos, plantas e animais. O requisito para a realização do TMN é que o tecido apresente células com intensa divisão mitótica ou meiótica, já que os MNs gerados são visíveis no término da telófase.

O Trad-MCN é realizado em células de grão de pólen, que são gerados por decorrência de divisão celular meiótica, sendo os MNs analisados em células no estágio de tétrades (células interfásicas com quatro núcleos), consideradas ideais para observação de MNs, já que estes ficam visíveis na intérfase.

O Trad-MCN já demonstrou ser sensível na detecção da genotoxicidade de poluentes atmosféricos (Pereira *et al.*, 2014; Crispim *et al.*, 2014; Sposito *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2018), aquáticos (Campos *et al.*, 2015; Cassanego e Droste,

2017; Aghajanya *et al.*, 2018) e presentes no solo (Lah *et al.*, 2008; Cesniene *et al.*, 2017).

2. OBJETIVO

Partindo da premissa que neonicotinóides são amplamente utilizados no controle de pragas no campo, e que estes estão presentes nos diferentes compartimentos do ecossistema, expondo toda a biota do meio, incluindo o homem, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar o potencial genotóxico dos inseticidas TMX, ACP e IMI, por meio do Trad-MCN.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade genotóxica dos inseticidas TMX, ACP e IMI em concentrações realísticas, por meio do Trad-MCN.
- Comparar a genotoxicidade dos inseticidas TMX, ACP e IMI de acordo com o grau de danos no material genético de *T. pallida*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Agentes químicos

TMX Actara® 250 WG (25% de ingrediente ativo) (**Figura 2A**) - $C_8H_{10}ClN_5O_3S$ (IUPAC: 3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4 ylidene(nitro)amine; CAS: 153719-23-4) foi obtido da empresa BASF S.A, São Paulo, Brasil. ACP Mospilan® (**Figura 2B**) (20% de ingrediente ativo), $C_{10}H_{11}ClN_4$ (IUPAC: (E)-N1-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N2-cyano-N1-methylacetamide; CAS: 135410-20-7), foi obtido da empresa Iharabras S.A Indústrias Químicas, Sorocaba, São Paulo, Brasil. IMI Evidence® (**Figura 2C**) (70% de ingrediente ativo) - $C_9H_{10}ClN_5O_2$ (IUPAC: 1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine; CAS: 138261-41-3), foi obtido da empresa Bayer S.A, São Paulo, Brasil. Formaldeído (**Figura 2D**) – CH_2O (CAS 50-00-0), foi obtido da empresa Sigma Aldrich, Saint Louis Mo, Estados Unidos.

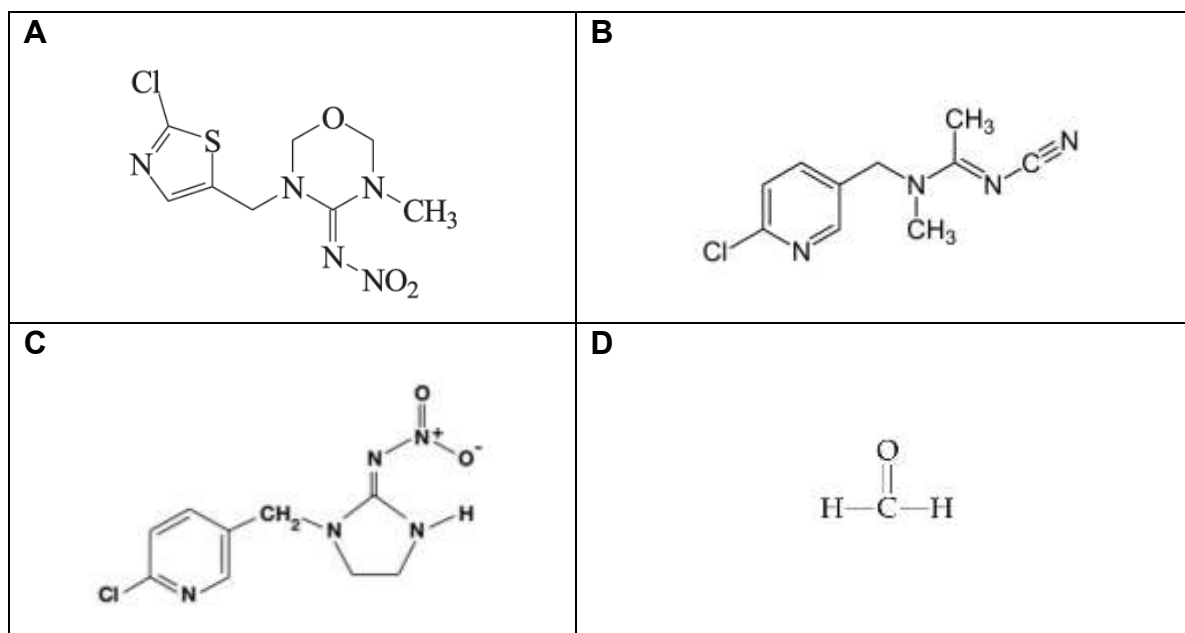


Figura 2. Estrutura química dos compostos testados. A. Tiametoxam (TMX); B. Acetamiprido (ACP); C. Imidacloprido (IMI); D. Formaldeído.

3.2. TESTE DO MICRONÚCLEO EM *Tradescantia pallida* (TRAD-MCN)

3.2.1 Material biológico

Tradescantia pallida (Rose) D.R Hunt var. *purpurea* foram cultivadas em casa de vegetação da Fundação Carmelitana Mário Palmério (FUCAMP), Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil, em temperatura de 16°C noite e 26°C dia, com umidade relativa do ar de 70 ± 10°C.

Fotoperíodo de 16 horas diárias de luz foi aplicado para induzir a floração. As plantas foram cultivadas em vasos com capacidade volumétrica de 1L. A fertilização e a irrigação foram sistematicamente controladas, assim como a taxa de mutação espontânea do estoque de plantas. A taxa de mutação do estoque de plantas foi verificada mensalmente, não podendo exceder 2 micronúcleos (MN) em 100 tétrades analisadas. A temperatura foi constantemente monitorada não podendo ser inferior a 11°C.

3.2.2. Exposição das plantas

Visando garantir a homogeneidade nos grupos de plantas submetidas ao tratamento com diferentes concentrações dos inseticidas neonicotinóides, a produção de mudas foi obtida a partir de uma única matriz, garantindo a isogenicidade das amostras. O bioensaio foi conduzido de acordo com o protocolo descrito por Ma et al (1984), com adaptação de Campos et al (2015).

Floreiras com no mínimo 25 plantas foram utilizadas em cada experimento. Hastes de 15 centímetros, com inflorescências jovens foram cortadas e submetidas ao processo de climatização em água destilada por 24 horas. Decorrido o tempo de climatização, as hastes foram submetidas ao tratamento por 8 horas em diferentes concentrações dos inseticidas TMX, ACP e IMI (Rodriguez et al., 2015; Fadic et al., 2017).

As hastes foram expostas as concentrações 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4 g/L de TMX Actara®; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 g/L de ACP Mospilan® e IMI Evidence® nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 g/L de solução. Todas as concentrações usadas foram baseadas nas recomendações de doses estipuladas pelos fabricantes (**Tabela 1**). No tratamento de tomate para controle de *Bemisia tabaci* TMX Actara® e ACP Mospilan® são recomendados na concentração de 0,2 e 0,4 g/L, respectivamente. Para IMI Evidence® a dose recomendada pelo fabricante no tratamento de feijão via modalidade foliar contra *B. tabaci* é de 0,8 g/L.

Nesse sentido, todas as concentrações avaliadas de TMX, ACP e IMI estão de acordo com as concentrações recomendadas pelos fabricantes, exceto as concentrações de 0,4 g/L de TMX, 0,8 g/L de ACP e 1,6 g/L de IMI. Estas concentrações foram incluídas nos experimentos, buscando avaliar os efeitos genotóxicos do uso indiscriminados de defensivos agrícolas sobre o material genético de espécies não-alvos de combate.

Tabela1. Características dos inseticidas

Produto técnico	Ingrediente ativo	Classe	Classe toxicológica	Classe ambiental	Modo de aplicação	Dose produto técnico (g/L)	Cultura	Praga	Dose I.A (g/L)
Actara®	Tiametoxam	Neonicotinóide	III	III	Foliar	0,2	Tomate	<i>Bemisia tabaci</i>	0,05
Mospilan®	Acetamiprido	Neonicotinóide	III	II	Foliar	0,4	Tomate	<i>Bemisia tabaci</i>	0,08
Evidence®	Imidacloprido	Neonicotinóide	IV	III	Foliar	0,8	Feijão	<i>Bemisia tabaci</i>	0,56

Classificação Toxicológica: I: Altamente tóxico; II: Moderadamente tóxico; III: Pouco tóxico; IV: Não tóxicos.

Classificação Ambiental: I: Altamente perigoso; II: Muito perigoso; III: Perigoso; IV: Pouco perigoso.

I.A: Ingrediente ativo.

Fonte: Agrofit, 2019.

Formaldeído na concentração de 0,2% foi utilizado como controle positivo, como descrito por Campos et al (2015). Como controle negativo, foi usado água obtida por sistema de osmose reversa.

Decorrido o tempo de exposição aos inseticidas (8 h), as hastes foram transferidas para beakers contendo água destilada, onde permaneceram por 24 horas em etapa de recuperação.

3.2.3. Análise de microscopia

Após etapas de climatização, exposição e recuperação, as inflorescências jovens das hastes foram colhidas e fixadas em solução carnoy (3 etanol: 1 ácido acético glacial) por 24 horas e depois conservadas em etanol 70% até o momento das análises.

As anteras foram maceradas com bastão de vidro sobre lâminas para microscopia, coradas com carmim acético, cobertas com lamínulas e aquecidas a 80°C.

Foram analisados 20 botões florais com células de grão de pólen em estado de tétrade para cada concentração de inseticida testado. Para cada concentração de inseticida 10 lâminas foram analisadas (300 tétrades por lâmina), totalizando 3000 tétrades por concentração de inseticida, em microscopia óptica de luz sob magnificação de 400 vezes (Ma *et al.*, 1994). A frequência de micronúcleos (MN) foi apresentada como número de micronúcleos em 100 tétrades analisadas.

3.2.4. Análise estatística

No Trad-MCN, a análise de variância (ANOVA) foi usada para determinar a significância entre a frequência de MN das plantas exposta a diferentes concentrações dos inseticidas TMX, ACP e IMI. Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. O Teste de Tukey foi empregado para comparar a frequência de MN entre os grupos tratados e os controles positivo e negativo.

4. RESULTADOS

No Trad-MCN, foram analisadas 3000 células de cada grupo experimental, objetivando verificar a frequência de MN em plantas tratadas com diferentes concentrações dos inseticidas TMX, ACP e IMI. Os resultados referentes à frequência de micronúcleos em *T. pallida* tratadas com diferentes concentrações dos diferentes inseticidas estão apresentados nas **Tabelas 2-4**.

Os resultados obtidos demonstram que todos os inseticidas testados, nas maiores concentrações, induziram a formação de MN em *T. pallida* quando comparados ao controle negativo. Na **Figura 3** esta representada um exemplo de tétrade com MN.

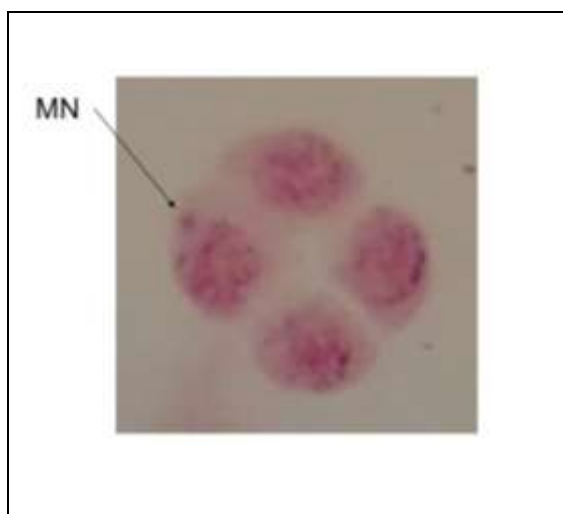


Figura 3. Representação de micronúcleo em tétrade de *Tradescantia pallida*. Imagem obtida por microscopia óptica de luz em aumento de 400x.

MN: Micronúcleo.

TMX nas maiores concentrações avaliadas, 0,2 ($5,20 \pm 1,47$) e 0,4 g/L ($5,70 \pm 1,15$) elevaram a frequência de MN, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$, Tukey) do controle negativo (**Tabela 2**), confirmando, portanto, efeito clastogênico e/ou aneugênico.

Tabela 2. Frequência de Micronúcleos em *Tradescantia pallida* tratada com diferentes concentrações de Tiametoxam (TMX)

Tratamentos g/L	Tétrades analisadas	Frequência de micronúcleos/100 ± SD	Diagnóstico estatístico ^a	Frequência de danos gerados ^b
CN	3000	1,90 ± 0,99		
CP	3000	15,0 ± 3,55	+	13,10
TMX				
0,00625	3000	2,10 ± 0,99	-	0,20
0,0125	3000	2,70 ± 1,70	-	0,80
0,025	3000	2,40 ± 1,34	-	0,50
0,05	3000	3,10 ± 1,19	-	1,20
0,1	3000	3,40 ± 1,34	-	1,50
0,2	3000	5,20 ± 1,47	+	3,30
0,4	3000	5,70 ± 1,15	+	3,80

^a Diagnóstico estatístico: + Médias com diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle negativo de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$); - Médias que não diferiram do controle negativo.

^b Frequência de danos gerados = Frequência média de micronúcleos em plantas tratadas com TMX ou CP – Frequência de média de micronúcleos observados em plantas pertencentes ao controle negativo.

IMI, outro inseticida também pertencente ao grupo das N-nitroguanidinas, nas concentrações de 0,1 ($4,90 \pm 2,37$); 0,2 ($7,70 \pm 1,41$); 0,4 ($6,90 \pm 2,18$); 0,8 ($6,60 \pm 1,57$) e 1,6 g/L ($5,40 \pm 2,95$) também alterou de forma significativa ($p < 0,05$, Tukey) a frequência de MN quando comparado ao controle negativo (**Tabela 3**). Além disso, os tratamentos com IMI induziram maiores frequências de MN quando comparadas às mesmas concentrações de TMX, sugerindo maior potencial genotóxico.

Tabela 3. Frequência de Micronúcleos em *Tradescantia pallida* tratada com diferentes concentrações de Imidacloprido (IMI)

Tratamentos g/L	Tétrades analisadas	Frequência de micronúcleos/100 ± SD	Diagnóstico estatístico ^a	Frequência de danos gerados ^b
CN	3000	1,50 ± 1,35		
CP	3000	17,20 ± 3,70	+	15,70
IMI				
0,025	3000	1,90 ± 1,44	-	0,40
0,05	3000	3,80 ± 1,81	-	2,30
0,1	3000	4,90 ± 2,37	+	3,00
0,2	3000	7,70 ± 1,41	+	6,20
0,4	3000	6,90 ± 2,18	+	5,40
0,8	3000	6,60 ± 1,57	+	5,10
1,6	3000	5,40 ± 2,95	+	3,90

^a Diagnóstico estatístico: + Médias com diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle negativo de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$); - Médias que não diferiram do controle negativo.

^b Frequência de danos gerados = Frequência média de micronúcleos em plantas tratadas com IMI ou CP – Frequência de média de micronúcleos observados em plantas pertencentes ao controle negativo.

Já para as plantas tratadas com ACP, inseticida pertencente ao grupo das N-cianoamidas, resultados positivos foram observados também nas maiores concentrações (**Tabela 4**). A frequência de MN nas concentrações de 0,2 (4,90 ± 1,79), 0,4 (5,00 ± 1,24) e 0,8 g/L (6,80 ± 1,47), diferiram significativamente ($p < 0,05$, Tukey), quando comparado com a frequência de micronúcleos das plantas pertencentes ao controle negativo.

Tabela 4. Frequência de Micronúcleos em *Tradescantia pallida* tratada com diferentes concentrações de Acetamiprido (ACP)

Tratamentos g/L	Tétrades analisadas	Frequência de micronúcleos/100 ± SD	Diagnóstico estatístico ^a	Frequência de danos gerados ^b
CN	3000	1,80 ± 0,78		
CP	3000	23,90 ± 2,64	+	21,26
ACP				
0,0125	3000	1,80 ± 1,47	-	0,00
0,025	3000	2,00 ± 1,33	-	0,20
0,05	3000	2,40 ± 1,57	-	0,60
0,1	3000	3,90 ± 1,37	-	2,10
0,2	3000	4,90 ± 1,79	+	3,10
0,4	3000	5,00 ± 1,24	+	3,20
0,8	3000	6,80 ± 1,47	+	5,00

^a Diagnóstico estatístico: + Médias com diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle negativo de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$); - Médias que não diferiram do controle negativo.

^b Frequência de danos gerados = Frequência média de micronúcleos em plantas tratadas com ACP ou CP – Frequência de média de micronúcleos observados em plantas pertencentes ao controle negativo.

Neste trabalho foram calculadas as frequências de danos gerados exclusivamente por cada um dos inseticidas avaliados (**Tabela 2-4**). A frequência de danos gerados foi quantificada de acordo com a seguinte fórmula:

$$MN(frtr) - MN(frc)$$

Onde, MN (frtr) corresponde a frequência de micronúcleos gerados nas plantas tratadas com os inseticidas ou com formaldeído; MN (frc), corresponde a

frequência basal de micronúcleos observados nas plantas pertencentes ao grupo controle negativo.

Quando comparado a frequência de MN nas plantas tratadas com as mesmas concentrações dos diferentes inseticidas, IMI foi aquele que apresentou maior potencial genotóxico quando comparado aos demais inseticidas (**Figura 4**), visto que a frequência de danos gerados (micronúcleos) foi maior em todas as concentrações avaliadas, quando comparado aos demais inseticidas, exceto na concentração de 0,025 g/L na qual TMX induziu maior frequência de danos genéticos.

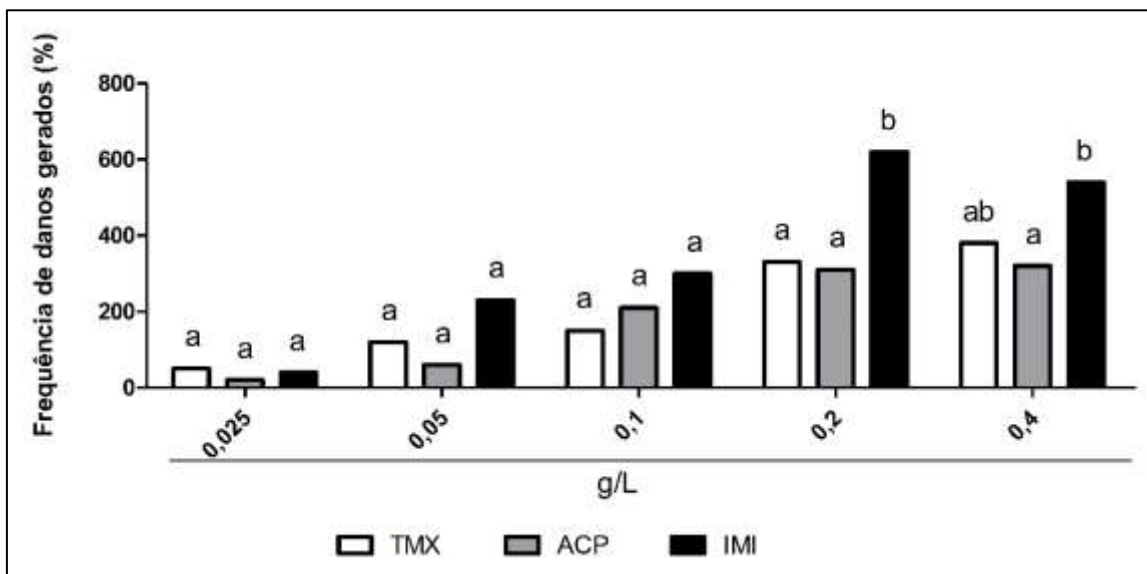


Figura 4. Frequência de danos gerados em *Tradescantia pallida* tratadas com diferentes concentrações de inseticidas neonicotinóides. TMX: Tiametoxam; ACP: Acetamiprid. IMI: Imidacloprid.

* Médias com letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Vale destacar, que na concentração de 0,2 g/L de inseticida, IMI diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) na frequência de MN de todos os inseticidas avaliados. Resultados semelhantes foram observados na concentração de 0,4 g/L de IMI

quando comparado a frequência de MN nas plantas tratadas com ACP na mesma concentração.

Mesmo não sendo observado diferenças estatisticamente significativas, nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,2 e 0,4 g/L TMX demonstrou ser o segundo inseticida com maior potencial genotóxico, seguido por ACP.

A frequência de micronúcleos encontrada nos controles utilizados (negativo e positivo) em todos os experimentos estão de acordo com Campos et al. (2015).

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram avaliados o potencial genotóxico de inseticidas neurotóxicos amplamente utilizados no sistema agrícola, buscando verificar a periculosidade de concentrações realísticas (encontradas no campo). Avaliar a indução de danos cromossômicos de pesticidas é fundamental no intuito de prevenir doenças associadas a instabilidade genética em humanos, bem como de toda biota exposta.

TMX pertence ao grupo das N-nitroguanidinas sendo um dos inseticidas neurotóxicos de ampla utilização no Brasil, em culturas de grande destaque econômico, como por exemplo, arroz, café, cana-de-açúcar, soja e tomate, sendo utilizado em diferentes modalidades (tratamento do solo, foliar e sementes) (Agrofit, 2019). TMX, segundo a ANVISA (2008) apresenta baixa toxicidade para mamíferos (classe toxicológica III) e é considerado perigoso ao meio ambiente (classe ambiental III) (**Tabela 1**).

Os dados observados no presente trabalho mostram que TMX nas maiores concentrações avaliadas (0,2 e 0,4 g/L) (**Tabela 2**), oferecem grande risco para as populações não alvos de combate. A concentração recomendada pelo fabricante é de 0,2 g/L para eliminação de *B. tabaci* em tomate, o que corresponde a uma dose de 0,05 g/L de ingrediente ativo. Doses menos concentradas de TMX já foram relacionadas com danos genéticos *in vivo* (Morais et al., 2017). Os resultados estão de acordo com outros autores, que apresentam resultados positivos para mutagenicidade de TMX em diferentes sistemas de avaliação (Bhinder et al., 2012; Dourado et al., 2016; Moraes et al., 2017).

Bhinder et al (2012) avaliaram o efeito de TMX sobre o DNA de *Anopheles stephensi* por meio de estudos de mutagênese via reação em cadeia da

polimerase (PCR). Após 24 horas de exposição ao TMX (5×10^{-3} $\mu\text{L/mL}$) foram quantificadas um total de 133 mutações (8 inserções, 10 deleções, 47 transições e 68 transversões).

Resultados de mutagenicidade em *Drosophila melanogaster* foram apresentados por Moraes et al (2017). Os autores compararam a mutagenicidade de TMX e TMX Actara® e observaram aumento na frequência de manchas mutantes (Teste SMART) nas concentrações de $9,7 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ mM, tanto no ingrediente ativo quanto no produto formulado, após metabolização via sistema enzimático citocromo P450 (CYP6A2). Os dados são preocupantes, visto que mutações em insetos podem favorecer a seleção de organismos mais resistentes, o que aumenta a probabilidade de aumento da concentração no campo na tentativa de combate das pragas. Os resultados aqui apresentados mostram que TMX em doses indiscriminadas tende a potencializar os efeitos mutagênicos, maximizando assim os danos na biota.

Além disso, aumentos na frequência de MN e de quebras de fita simples e dupla no DNA em peixes, foram relacionados com a presença de TMX e metais pesados em amostras de água em estudos de monitoramento ambiental (Dourado et al., 2016).

Por outro lado, IMI, também pertencente ao grupo das N-nitroguanidinas, é considerado não tóxico (classe IV), e perigoso ao meio ambiente (classe III) (**Tabela 1**). Porém, de acordo com os dados obtidos no presente trabalho, de todos os inseticidas avaliados, IMI foi aquele que apresentou maior atividade genotóxica (**Figura 2**). IMI nas 5 maiores concentrações avaliadas demonstraram aumentar a frequência de micronúcleos (**Tabela 3**), incluindo a dose recomendada pelo fabricante (0,8 g/L) para tratamento de feijão contra *B. tabaci* via modalidade foliar. Esta concentração de produto formulado contém 0,56 g/L de ingrediente ativo.

Dos inseticidas neonicotinóides, IMI representa o inseticida mais extensamente estudado em parâmetros de genética toxicológica (Feng et al., 2004; Feng et al., 2005; Costa et al., 2009; Stivaktakis et al., 2010; Bhinder et al., 2012; Pérez-Iglesias et al., 2014; Al-Sarar et al., 2015; Arslan et al., 2015; Bagri et al., 2015; Kataria et al., 2015; Bianchi et al., 2015; 2016; Stivaktakis et al., 2016;

Hong *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2018; Muzinic *et al.*, 2018; Yucel e Kavis, 2018; Guo *et al.*, 2018; Iturburu *et al.*, 2018).

De acordo com a literatura, eventos genotóxicos, mensurados por meio do ensaio cometa, foram relatados em cultura de linfócitos de sangue periférico humano suplementado com 1,7; 1,1; $8,3 \times 10^{-3}$ e 5,7; $2,8 \times 10^{-4}$ M (Calderón-Segura *et al.*, 2012); 20 μ M (Costa *et al.*, 2009), 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 mg/L de IMI (Feng *et al.*, 2005). Indução de MN em linfócitos também foi observada quando expostos a concentrações de 20 μ M (ingrediente ativo e produto formulado após metabolização) (Costa *et al.*, 2009) e também de 0,1 e 0,5 mg/L (Feng *et al.*, 2009).

Em células HepG2 IMI demonstrou atividade clastogênica/aneugênica nas concentrações de 0,00036 a 3,6 g/L (24 h de exposição – Teste do micronúcleo) e genotóxica nas concentrações de 0,036 e 3,6 g/L de IMI (Bianchi *et al.*, 2015). Resultados positivos em relação à mutagenicidade e genotoxicidade de IMI foram observados em células expostas às concentrações de 0,1; 0,5; 1 e 10 μ g/mL em células TK6, por meio do ensaio de mutação do gene TK, ensaio cometa e teste do micronúcleo (Guo *et al.*, 2018) e em células de ovário de hamster chinês nas concentração de 114,63 μ M (teste do micronúcleo) (Al-Sarar *et al.*, 2015).

De maneira análoga em peixes, IMI demonstrou ser capaz de causar aberrações cromossômicas e também micronúcleos, na concentração de 2 mg/L em 2 meses de exposição (Hong *et al.*, 2018). Em *Australoheros facetus*, IMI induziu danos genéticos nas concentrações de 1; 10; 75 e 810 μ g/mL e alterações do tipo MN nas concentrações de 810 μ g/mL (Iturburu *et al.*, 2018).

Resultados positivos para mutagenicidade de IMI foram verificados em anfíbios nas concentrações de 314,9 e 566,8 mg/L⁻¹ após 7 dias de exposição (Feng *et al.*, 2004) e 25 mg/L após 96 h de exposição (Pérez-Iglesias *et al.*, 2014), por meio do TMN e genotoxicidade induzida nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 mg/L⁻¹ (diagnóstico obtido por meio do ensaio cometa) (Feng *et al.*, 2004). Além disso, uma série de alterações nucleares foram verificados em girinos expostos a 25 e 37,5 mg/L de IMI nos tempos de 48 e 96 h de exposição (Pérez-Iglesias *et al.*, 2014).

Em estudos *in vivo* com mamíferos (ratos/camundongos e coelhos) IMI, induziu alterações do tipo micronúcleo, aberrações/anomalias cromossômicas em

diferentes concentrações, via de exposição e tempo de exposição (Demsia *et al.*, 2007; Arslan *et al.*, 2015; Kataria *et al.*, 2015; Bagri *et al.*, 2016; Stivaktakis *et al.*, 2016).

Em *Allium cepa* IMI induziu aberrações cromossômicas no tempo de 48 h de recuperação em todas as concentrações avaliadas (0,036; 0,36 e 3,6 g/L⁻¹ e na concentração de 3,6 g/L⁻¹ no tempo de 72 h de recuperação) (Bianchi *et al.*, 2016). Alterações genéticas do tipo MN foram observadas em *A. cepa* (80 mg m⁻²) e *T. pallida* (80; 40 e 20 mg m⁻²) (Rodriguez *et al.*, 2015). Os resultados apresentados por estes autores, quando confrontados com o presente trabalho, aqui apresentado, mostra que uso de plantas na genética toxicológica, configura-se uma excelente alternativa no rastreio da genotoxicidade induzida por pesticidas.

ACP pertence ao grupo das N-cianoamidinas da classe dos neonicotinóides. A toxicidade de ACP é considerada baixa para mamíferos (classe toxicológica III) e muito perigosa ao meio ambiente (classe ambiental II) (**Tabela 1**) (ANVISA, 2016).

No presente trabalho, ACP nas três maiores concentrações avaliadas (0,2; 0,4 e 0,8 g/L) demonstraram apresentar atividade genotóxica, devido ao aumento na frequência de micronúcleos observados e *T. pallida* (**Tabela 4**). ACP, de acordo com o fabricante, é recomendado na concentração de 0,4 g/L no combate de *B. tabaci* em tomate, o que corresponde a uma dose de 0,08 g/L de ingrediente ativo. Assim como nos resultados apresentados sobre a genotoxicidade de TMX e IMI, a concentração recomendada de ACP para uso no campo, também foi capaz de induzir danos genéticos em *T. pallida*. Além disso, ACP na concentração de 0,2 g/L, metade da concentração recomendada pelo fabricante, também apresentou atividade clastogênica e/ou aneugênica.

Nós enquanto autores, reconhecemos que esta concentração não deve ser encontrada nos alimentos destinados ao homem em função do período de carência após aplicação dos inseticidas, no entanto, pensando na biota, este período de carência não é respeitado, podendo levar a contaminação por contato, inalação ou ingestão, dependendo da modalidade de aplicação.

Os resultados apresentados estão de acordo com dados prévios da literatura (Kocaman e Topkatas, 2007; 2009; Çavas *et al.*, 2014; Bagri e Jain,

2018). Em cultura de linfócitos de sangue periférico humano foi verificado aumento na frequência de aberrações cromossômicas e troca de cromátides irmãs nas concentrações de 25; 30; 35 e 40 µg/mL de ACP nos tempos de 24 e 48 h de exposição, de maneira dose dependência e na frequência de MN na concentração de 30 e 40 µg/mL, após 24 h de exposição. Por outro lado, todas as concentrações avaliadas após 48 h de exposição aumentaram significativamente a frequência de MN (Kocaman e Topkatas, 2007). Além disso, ACP demonstrou apresentar efeito sinérgico com cipermetrina elevando a frequência de alterações genéticas, sendo a quebra de cromossomos apontada como principal mecanismo de ação do ACP (Kocaman e Topkatas, 2009).

Avaliações por meio do TMN e pelo Ensaio Cometa em fibroblastos humanos (IMR-90), também demonstraram que ACP aumentou significativamente a frequência de MN e também de outros danos genotóxicos nas concentrações de 50; 100; 200; 400; 800 e 1600 µM em 24 horas de exposição (Çavas *et al.*, 2014). De forma análoga, em camundongos (*Mus musculus*) tratados intraperitoneal com ACP nas concentrações de 2,3; 4,6 e 46 mg/Kg foi observado aumento na frequência de aberrações cromossômicas e MN em ratos expostos a todas as doses avaliadas, após 60 e 90 dias de exposição (Bagri e Jain, 2018).

Tanto IMI quanto ACP são usados no controle de pragas em arroz, batata, café, feijão, milho, pimentão, soja, trigo, dentre outras grandes culturas no Brasil, sendo, portanto, inseticidas muito versáteis, o que aumenta a probabilidade de contaminação da biogeocenose.

Mesmo que os resultados não tenham demonstrado relação dose dependência, no presente trabalho, todos os inseticidas neurotóxicos avaliados, aumentaram a frequência de MN em *T. pallida* nas maiores concentrações avaliadas, demonstrando, portanto, que todos os inseticidas avaliados apresentam atividade clastogênica e/ou aneugênica.

Levando em consideração as concentrações em comum, outrora avaliadas, podemos concluir que a ordem de genotoxicidade dos compostos avaliados foi IMI >TMX > ACP (**Figura 2**).

Embora não tenha sido avaliado no presente trabalho o mecanismo de indução de micronúcleos em *T. pallida*, diferentes trabalhos sugerem como sendo o aumento do estresse oxidativo, gerado pelos inseticidas TMX, ACP e IMI a

causa da instabilidade genética. O aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) já foram relatados por diferentes autores que estudaram TMX (Yan *et al.*, 2016), ACP (Li *et al.*, 2018) e IMI (Zhang *et al.*, 2014; Ge *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Shakir *et al.*, 2018).

Assim, o aumento da concentração destes inseticidas pode estar diretamente relacionado ao aumento do estresse oxidativo, que apesar de natural e fundamental nos organismos (Barretos e David, 2006), o aumento pode promover a oxidação de biomoléculas, incluindo o DNA (Abdullah, 2015).

ERO geradas por pesticidas são fortes candidatas ao surgimento de distúrbios neurodegenerativos, tais como as doenças de Parkinson e de Alzheimer (Bogdanov *et al.*, 2001). Em adição, alguns estudos têm demonstrado o aumento do risco do parkinsonismo em indivíduos expostos cronicamente a pesticidas (Brown *et al.*, 2006). Somado a estes eventos, o aumento da produção de ERO em organismos expostos a diferentes xenobióticos está diretamente associado a danos genotóxicos, o que aumenta as chances de eventos neoplásicos (Peluso *et al.*, 2015).

Diante do acima exposto, os autores destacam a necessidade da avaliação do potencial genotóxico de concentrações de uso de produtos formulados (ingredientes ativos + ingredientes inertes), visto que a toxicogenética dos ingredientes ativos podem ser afetados pelos ingredientes inertes, influenciando diretamente na toxicidade (Mesnage *et al.*, 2014) e genotoxicidade destes xenobióticos ambientais (Morais *et al.*, 2017).

6. CONCLUSÕES

T. pallida demonstrou ser um excelente organismo modelo no rastreamento da genotoxicidade induzida por inseticidas. Os resultados aqui apresentados permitem concluir que, nas condições experimentais utilizadas, TMX foi genotóxico nas concentrações de 0,2 e 0,4 g/L, ACP nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 g/L e IMI nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 g/L.

Em todos os compostos avaliados, a concentração indicada pelo fabricante causou instabilidade genômica, refletindo no aumento de micronúcleos em *T. pallida*. Além disso, os resultados relacionados às concentrações de uso indiscriminado nos permitem concluir que a utilização indevida dos inseticidas no

campo pode aumentar as chances de contaminação da biota, favorecendo a instalação de alterações genéticas, o que pode levar a efeitos deletérios nas populações afetadas diretamente ou indiretamente.

Mais pesquisas devem ser conduzidas, utilizando outros organismos modelos e sistemas testes de avaliação, buscando a melhor compreensão da toxicogenética de TMX, ACP e IMI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla, D.S.P., Faine, L.A., Loureiro, A.P.M., 2014. Radicais livres e antioxidantes, in: Oga, S., Camargo, M.M.A., Batistuzzo, J.A.O. (Eds.), Fundamentos de Toxicologia. Atheneu, São Paulo, pp. 59-70.
- Abdullah, A.H., Mohammed, A.S., Rasedee, A., Mirghani, M.E.S., Al-Qubaisi, M.S., 2015. Induction of apoptosis and oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer, MDA-MB231 cells, by ethanolic mango seed extract. BMC Complement Altern Med. 1, 3-17. DOI: 10.1186/s12906-015-0575-x.
- Aghajanyan, E.A., Avalyan, R.E., Simonyan, A.E., Atoyants, A.L., Gabrielyan, B. K., Aroutiounian, R.M., Khosrovyan, A., 2018. Clastogenecity evaluation of water of Lake Sevan (Armenia) using Tradescantia micronucleus assay. Chemosphere. 209, 1-6. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.05.142.
- Agrofit – Sistema de agrotóxicos fitossanitário - Consulta aberta. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Available in: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Access: 01/05/2019.
- Ahmadi, N., Mandegary, A., Jamshidzadeh, A., Mohammadi-Sardoo, M., 2018. Hematological abnormality, greenhouse pesticide sprayers; investigating the role of NQO1 gene polymorphism. Toxics, 6, E13, doi: 10.3390/toxics6010013
- Albert, R.E., Magee, P.S., 2000. The tumorigenicity of mutagenic contact sensitizing chemicals. Risk Anal. 20, 317e325. DOI:10.1111/0272-4332.203031.
- Al-Sarar., Abobakr, A.S.Y., Bayoumi, A.E., Hussein, H.I., 2015. Cytotoxic and genotoxic effect of abamectin, chlorfenapyr, and imidacloprid on CHO_{k1} cells. Environ Sci Pollut Res Int. 22, 17041-17052. DOI: 10.1007/s11356-015-4927-3.
- Amaral, D.F., Montalvao, M.F., de Oliveira Mendes, B., da Silva Castro, A.L. Malafaia, G., 2018. Behavioral and mutagenic biomarkers in tadpoles exposed to different abamectin concentrations. Environ. Sci. Pollut .Res. Int. In Press. DOI: 10.1007/s11356-018-1562-9.

- Ansari, S.M., Saquib, Q., Attia, S.M., Abdel-Salam, E.M., Alwathnani, H.A., Faisal, M., Alatar, A.A., Al-Khedhairi, A.A., Musarrat, J., 2018. Pendimethalin induces oxidative stress, DNA damage, and mitochondrial dysfunction to trigger apoptosis in human lymphocytes and rat bone-marrow cells. *Histochem. Cell Biol.*, 149, 127-141. DOI:10.1007/s00418-017-1622-0.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância sanitária., 2008. Consulta pública n° 25, de 18 de junho de 2008. Available:
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância sanitária., 2016. Consulta pública n° 266, de 04 de novembro de 2016. Available:
- Arcaute, C.R., Perez-Iglesias, J.M., Nikoloff, N., Natale, G.S., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2014. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus tadpoles* (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecol. Indic.* 45, 632e639. DOI: org/10.1016/j.ecolind.2014.05.034.
- Arslan, M., Sevgiler, Y., Buyukleyla, M., Yardimci, M., Yilmaz, M., Rencuzogullari, E., 2015. Sex-related effects of imidacloprid modulated by piperonyl butoxide and menadione in rats. Part II: genotoxic and cytotoxic potential. *Drug Chem Toxicol.* 39, 81-86. DOI: 10.3109/01480545.2015.1029049.
- Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., Uçgun, E., Kontas Yedier, S., Aydin, B., 2018. Cytotoxicity and genotoxicity of clothianidin in human lymphocytes with or without metabolic activation system. *Drug Chem. Toxicol.*, 2018, 1-7. DOI: 10.1080/01480545.2018.1438458.
- Bagri, P., Jain, S.K., 2018. Assessment of acetamiprid-induced genotoxic effect in bone marrow cells of Swiss albino male mice. *Drug Chem Toxicol.* 6, 1-7. DOI: 10.1080/01480545.2018.1429461.
- Bagri, P., Kumar, V., Sikka, A.K., 2015. An in vivo assay of the mutagenic potential of imidacloprid using sperm head abnormality test and dominant lethal test. *Drug Chem Toxicol*, 38, 342-348. DOI: 10.3109/01480545.2014.966832.
- Bagri, P., Kumar, V., Sikka, A.K., 2016. Assessment of imidacloprid-induced mutagenic effects in somatic cells of Swiss albino male mice. *Drug Chem Toxicol.* 39, 412-417. DOI: 10.3109/01480545.2015.1137301.
- Barretos, A.L.B.S., David, J.M., 2006. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova.* 1, 113-123.

- Bas, C., Denholm, I., Williamson, M.S., Nauen, R., 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic. Biochem. Phys.*, 121, 78-87. DOI: [org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004).
- Basley, K., Davenport, B., Vogiatzis, K., Goulson, D., 2018. Effects of chronic exposure to thiamethoxam on larvae of the hoverfly *Eristalis tenax* (Diptera, Syrphidae). *PeerJ*, 6, e4258.
- Ben Salem, I., Boussabbeh, M., Bacha, H., Abid, S., 2015. Dichlorvos-induced toxicity in HCT116 cells: involvement of oxidative stress and apoptosis. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 119, 62-66. DOI: [10.1016/j.pestbp.2015.02.004](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.02.004).
- Benigni, R., Palombo, F., Dogliotti, E., 1992. Multivariate statistical analysis of mutation spectra of alkylating agents. *Mutat. Res.* 267, 77-88.
- Bhalli, J.A., Ali, T., Asi, M.R., Khalid, Z.M., Ceppi, M., Khan, Q.M., 2009. DNA damage in Pakistani agricultural workers exposed to mixture of pesticides. *Environ. Mol. Mutagen.* 50, 37-45. DOI: [org/10.1002/em.20435](https://doi.org/10.1002/em.20435).
- Bhinder, P., Chaudhry, A., Barna, B., Kaur, S., 2012. Imidacloprid and Thiamethoxam Induced Mutations in Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) of *Anopheles stephensi*. *Toxicol. Int.* 19, 201-216. DOI: [10.4103/0971-6580.97223](https://doi.org/10.4103/0971-6580.97223).
- Bhinder, P., Chaudhry, A., Barna, B., Kaur, S., 2012. Imidacloprid and Thiamethoxam Induced Mutations in Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) of *Anopheles stephensi*. *Toxicol. Int.* 19, 201-206. DOI: [10.4103/0971-6580.97223](https://doi.org/10.4103/0971-6580.97223).
- Bianchi, J., Cabral-de-Mello, D.C., Marin-Morales, M.A., 2015. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 120, 174-183. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2015.05.040](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.040).
- Bianchi, J., Fernandes, T.C., Marin-Morales, M.A., 2016. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. *Chemosphere.* 144, 475-83. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2015.09.021](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.021).
- Bogdanov, M.B., Andreassen, O.A., Dedeoglu, A., Ferrante, R.J., Beal, M.F., 2001. Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse model of

- Huntington's disease. *J Neurochem.* 79, 1246–1249. DOI: [org/10.1046/j.1471-4159.2001.00689](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00689).
- Bolognesi, C., 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.*, 543, 251-272. Doi: [Org/10.1016/S1383-5742\(03\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2).
- Bolognesi, C., Moretto, A., 2014. Genotoxic risk in rubber manufacturing industry: a systematic review. *Toxicol. Lett.*, 230, 345e355. DOI: [org/10.1016/j.toxlet.2013.11.013](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.11.013).
- Brasil, Portaria nº.3 de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das diretrizes e orientações referentes a orientações de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos, e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF*, p. 1356, 4 fev., Seção 1 pt.1. Available In: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1992/prt0003_16_01_1992.html. Accessed in 1, 2018.
- Brown, T.P., Rumsby, P.C., Capleton, A.C., Rushton, L., Levy, L.S., 2006. Pesticides and Parkinson's disease—is there a link? *Environ Health Perspect.* 114, 156-164. DOI: [10.1289/ehp.8095](https://doi.org/10.1289/ehp.8095).
- Calderon-Segura, M.E., Gomez-Arroyo, S., Cortes-Eslava, J., Martinez-Valenzuela, C., Mojica-Vazquez, L.H., Sosa-Lopez, M., Flores-Ramirez, D., Romero-Velazquez, Z.E., 2018. In vitro cytotoxicity and genotoxicity of Furia®180 SC (zeta-cypermethrin) and Bulldock 125® SC (beta-cyfluthrin) pyrethroid insecticides in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol. Mech. Methods*, 268-278. DOI: [10.1080/15376516.2017.1402977](https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1402977).
- Campos, C.F., Pereira, B.B., Campos-Junior, E.O., Sousa, E.F., Souto, H.N., Morelli, S., 2015. Genotoxic evaluation of the River Paranaíba hydrographic basin in Monte Carmelo, MG, Brazil, by the *Tradescantia micronucleus*. *Genet Mol Biol*, 38, 507-512. DOI: [10.1590/S1415-475738420150117](https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150117).
- Cassanego, M.B., Droste, A., 2017. Assessing the spatial pattern of a river water quality in southern Brazil by multivariate analysis of biological and chemical indicators. *Braz J Biol.* 77, 118-126. DOI: [10.1590/1519-6984.11215](https://doi.org/10.1590/1519-6984.11215).
- Çavas, T., Çinkilic, N., Vatan, O., Yilmaz, D., 2014. Effects of fullerene nanoparticles on acetamiprid induced cytotoxicity and genotoxicity in culture

- human lung fibroblasts. *Pestic Biochem Physiol*, 114: 1-7. DOI: 10.1016/j.pestbp.2014.07.008.
- Çelik, A., Ekinci, S.Y., Quler, G., Yildirim, S., 2014. *In vitro* genotoxicity of Fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test, and comet assay. *DNA Cell Biol.* 33, 148-154, 2014. DOI: 10.1089/dna.2013.2158.
- Cesniene, T., Kleizaite, V., Bondzinskaite, S., Taraskevicius, R., Zvingila, D., Siuksta, R., Rancelis, V., 2017. Metal bioaccumulation and mutagenesis in a *Tradescantia* clone following long-term exposure to soils from urban industrial areas and closed landfills. *Mutat Res.* 823, 65-72. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2017.09.004.
- Chakroun, S., Ezzi, L., Grissa, I., Kerkeni, E., Neffati, F., Bhouiri, R., Sallem, A., Naijar, M.F., Hassine, M., Mehdi, M., Haouas, Z., Ben Cheikh., 2016. Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 23, 24, 125191-25199. DOI:10.1007/s11356-016-7650-9.
- Chakroun, S., Ezzi, L., Grissa, I., Kerkeni, E., Neffati, F., Bhouiri, R., Sallem, A., Naijar, M.F., Hassine, M., Mehdi, M., Haouas, Z., Ben Cheikh., 2016. Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 23, 24, 125191-25199. DOI: 10.1007/s11356-016-7650-9.
- Clasen, B., Loro, V.L., Murussi, C.R., Tiecher, T.L., Moraes, B., Zanella, R., 2018. Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio reared* in a rice-fish system. *Sci. Total Environ.*, 626, 737-743. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.154.
- Claudianos, C., Ranson, J., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., Feyereisen, R., Oakeshott, J.G., 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.* 15, 615e636. DOI: org/10.1111/j.1365-2583.2006.00672.x.
- Costa, C., Silvari, V., Melchini, A., Catania, S., Heffron, J.J., Trovato, A., De Pasquale, R., 2009. Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutat Res.* 672, 40-44. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.018.

- Crispim, B.A., Sposito, J.C., Mussury, R.M., Seno, L.O., Grisolia, A.B., 2014. Effects of atmospheric pollutants on somatic and germ cells of *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt cv. purpúrea. An Acad Bras Cienc. 86, 1899-1906. DOI: 10.1590/0001-3765201420140338.
- Danielson, P.B., 2002. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. Curr. Drug Metab., 3, 561-597. doi: 10.2174/1389200023337054.
- Demsia, G., Vlastos, D., Goumenou, M., Matthopoulos, D.P., 2007. Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. Mutat Res. 634, 32-39. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2007.05.018.
- Dorr, F., Guaratini, T., Cardozo, K.H.M., Pavanellini, D.D., Colepicolo, P., Pinto, E., 2014. Ecotoxicologia. In Oga, S., Camargo, M.M.A., Batistuzzo, J.A.O (Eds), Fundamentos de Toxicologia. Atheneu, São Paulo, pp. 133-147.
- Dourado, P.L.R., Rocha, M.P., Roveda, L.M., Junior, J.L.R., Cândido, L.S., Cardoso, C.A.L., Morales, M.A.M., Oliveira, K.M.P., Grisolia, A.B., 2016. Genotoxic and mutagenic effects of polluted surface water in the midwestern region of Brazil using animal and plant bioassays. Genet. Mol. Biol. DOI: ORG/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0223.
- Dromard, C.R., Bouchon-Navaro, Y., Cordonnier, S., Guene, M., Harmelin-Vivien, M., Bouchon, C., 2018. Different transfer pathway of an organochlorine pesticide across marine tropical food webs assessed with stable isotope analysis. Plos One, 13, e0191335. DOI: 10.1371/journal.pone.0191335.
- Fadic, X., Placencia, F., Dominguez, A.M., Cereceda-Balic, F., 2017. *Tradescantia* as a biomonitor for pesticide genotoxicity evaluation of iprodione, carbaryl, dimethoate and 4,4'-DDE., 2017. Sci Total Environ. 575, 146-151. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.198.
- Faria, D.B.G., Montalvao, M.F., de Souza, J.M., de Oliveira Mendes, B., Malafaia, G., Rodrigues, A.S.L., 2018. Analysis of various effects of abamectin on erythrocyte morphology in *Japanese quails* (*Coturnix japonica*). Environ. Sci. Pollut. Res. Int., 25, 3, 2450-2456. DOI: 10.1007/s11356-017-0677.

- Farooqui, T., 2013. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: a unique hypothesis. *Neurochem. Int.* 62, 122-136. DOI: org/10.1016/j.neuint.2012.09.020.
- Feki, A., Saad, H.B., Bkhairia, I., Katari, N., Naifar, M., Boudawara, O., Droguet, M., Magné, C., Nasri, M., Amara, I.B., 2018. Cardiotoxicity and myocardia infarction-associated DNA damage induced by thiametoxam in vitro and in vivo: Protective role of *Trigonella foenum-graecum* seed-derived polysaccharide. *Environ Toxicol.* 1-12. DOI: 10.1002/tox.22682.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*, 455, 1-2, 81-95.
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Peng, P., Zeng, E.Y., 2005. Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicol Environ Saf.* 61, 239-246. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2004.10.005.
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Zhao, L., Peng, P., 2004. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. *Chemosphere.* 56, 457-463. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.02.010.
- Feng, Y., Wu, Q., Wang, S., Chang, X., Xie, W., Xu, B., Zhang, Y., 2010. Cross-resistance study and biochemical mechanisms of thiamethoxam resistance in B-biotype *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest. Manag. Sci.* 66, 313e318. DOI: org/10.1002/ps.1877.
- Frei, H., Würgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203, 297-308. DOI: 10.1016/0165-1161(88)90019-2.
- Frei, H., Würgler, F.E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 334, 247-258. DOI: doi:10.1016/0165-1161(95)90018-7.
- Gao, C.F., Ma, S.Z., Shan, C.H., Wu, S.F., 2014. Thiametoxam resistance selected in the western flowers trips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera> Thripidae): cross-resistance patterns, possible biochemical mechanisms and fitness costs analysis. *Pestic. Biochem. Phys.* 114, 90e96. DOI: ORG/10.1016/J.PESTBP.2014.06.009.

- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., Wang, J., 2015. Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). J Agric Food Chem. 63, 1856-1862. DOI: 10.1021/jf504895h.
- Godoy, R.C.B., Oliviera, M.L., 2004. Agrotóxicos no Brasil: Processo de Registro, Riscos a saúde e programas de monitoramento. Embrapa, 30pp.
- Goncalves, M.W., Marins de Campos, C.B., Batista, V.G., da Cruz, A.D., de Marco Junior, P., Bastos, R.P., de Melo, E., Silva, D., 2017. Genotoxic and mutagenic effects of Atrazine Atanor 50 SC on *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura: Hylidae) developmental larval stages. Chemosphere, 182, 730-737. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.078.
- Goulson, D., 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. J. Appl. Ecol. 50, 977-987. doi: 10.1111/1365-2664.12111.
- Graf, U., van Schaik, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res., 271, 59-67. DOI: org/10.1016/0165-1161(92)90032-H.
- Graf, U., Würgler, F.E., 1996. The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ. Mol. Mutagen. 27, 219-226. DOI: org/10.1002/(SICI)10982280(1996)27:3<219::AIDEM7>3.0.O2e9.
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ. Mol. Mutagen. 6, 153-188. DOI: org/10.1002/em.2860060206.
- Green, T., Toghil, A., Lee, R., Waechter, F., Edgar, W., Noakes, J., 2005. Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans. Toxicol. Sci. 86, 36e47. doi: org/10.1093/toxsci/kfi124.
- Guo, J., Shi, R., Cao, Y., Luan, Y., Zhou, Y., Gao, Y., Tian, Y., 2018. Genotoxic effects of imidacloprid in human lymphoblastoid TK6 cells. Drug Chem Toxicol. 13, 1-5. DOI: 10.1080/01480545.2018.1497048.
- Hallstrom, I., 1985. Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. II. Localization of some genes regulating cytochrome P-450 activity. Chem. Biol. Interact. 56, 173e184. DOI: ORG/10.1016/0009-2797(85)90004-3.

- Hesselbach, H., Scheiner, R., 2018. Effects of the novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) on honeybee taste and cognition. *Sci. Rep.*, 8: 4954. DOI: 10.1038/s41598-018-23200-0.
- Heyer, W.D., 2007. Biochemistry of eukaryotic homologous recombination. *Top. Curr. Genet.* 17, 251–283. DOI: 10.1007/978-3-540-71021-9.
- Heyer, W.D., Ehmsen, K.T.; Liu, J., 2010. Regulation of Homologous Recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 244,113–139. DOI:10.1146/annurev-genet-051710-150955.
- Hong, X., Zhao, X., Tian, X., Li, J., Zha, J., 2018. Changes of hematological and biochemical parameters revealed genotoxicity and immunotoxicity of neonicotinoids on Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*). *Environ Pollut.* 233, 862-871. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.12.036.
- Hong, Y., Yang, X., Yan, G., Huang, Y., Zuo, F., Shen, Y., Ding, Y., Cheng, Y., 2017. Effects of glyphosate on immune responses and haemocyte DNA damage of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol.*, 71, 19-27. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.09.062.
- Houk, V.S., 1992. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. *Mutat. Res.* 277, 91-138. doi: org/10.1016/0165-1110(92)90001-P.
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3077957/CONSULTA+P%C3%A9BLICA+N+266+GGTOX+.pdf/f919f199-e9d7-4220-9efe-bea5bfe11a64>. Access: 01/05/2019.
- <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2540793/Consulta%2BP%25C3%25BAblica%2Bn%25C2%25BA%2B25%252C%2Bde%2B18%2Bde%2Bjunho%2Bde%2B2008..pdf/1c6d2525-ab6e-4905-8f00-d1c0d2d00ae6?version=1.0>. Access: 01/05/2019.
- Hung, J.H., Chen, C.Y., Omar, H.A., Huang, K.Y., Tsao, C.C., Chiu, C.C., Chen, Y.L., Chen, P.H., Teng, Y.N., 2016. Reactive oxygen species mediate Terbufos-induced apoptosis in mouse testicular cell lines via the modulation of cell cycle and pro-apoptotic proteins. *Environ. Toxicol.*, 33(12), 1888-1898. DOI: 10.1002/tox.22190.
- IRAC: Insecticide Resistance Action Committee, 2017. Arthropod Pesticide Resistance Database. Available in: <http://www.pesticideresistance.org/>. (Accessed 8 January 2017).

- Iturburu, F.G., Simoniello, M.F., Medici, S., Panzeri, A.M., Menone, M.L., 2018. Imidacloprid causes DNA damage in fish: Clastogenesis as a mechanism of genotoxicity. *Bull Environ Contam Toxicol.* 100, 760-764. DOI: 10.1007/s00128-018-2338-0.
- Iturburu, F.G., Zomisch, M., Panzeri, A.M., Crupkin, A.C., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Menone, M.L., 2016. Uptake, distribution in different tissues, and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 36, 3, 699-708. DOI: 10.1002/etc.3574.
- Jansen, J.G., De Groat, A.J.L., Van Teijlingen, C.M.M., Lohman, P.H.M., Mohn, G.R., Vrieling, H., VanZeeland, A.A., 1994. Formation and persistence of DNA adducts in pouch skin fibroblasts and liver tissue frats exposed in vivo to the mono-functional alkylating agents N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. *Mutat. Res.* 307, 95–105.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A., 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food. Chem.* 59, 2897-2908. DOI: 10.1021/jf101303g.
- Justice, R.W., Zilian, O., Woods, D.F., Noll, M., Bryant, P.J., 1995. The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes. Dev.*, 9, 534-546. DOI: 10.1101/gad.9.5.534.
- Kalajdzic, P., Markaki, M., Oehler, S., Savakis, C. Imidacloprid does not induce Cyp genes involved in insecticide resistance of a mutant *Drosophila melanogaster* line. *Food Chem Toxicol*, 60, 355-359. DOI: 10.1016/j.fct.2013.07.080.
- Karabay, N.U., Oguz, M.G., 2005. Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. *Genet. Mol. Res.*, 4, 653-662.
- Karunker, I., Benting, J., Lueke, B., Ponge, T., Nauen, R., Roditakis, E., Vontas, J., Gorman, K., Denholm, I., Morin, S., 2008. Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 38, 634e644. DOI: org/10.1016/j.ibmb.2008.03.008.

- Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.*, 9, 527-549. DOI: 10.1016/0027-5107(70)90038-2
- Kataria, S.K., Chhillar, A.K., Kumar, A., Tomar, M., Malik, V., 2015. Cytogenetic and hematological alterations induced by acute oral exposure of imidacloprid in female mice. *Drug Chem Toxicol*, 39, 59-65. DOI: 10.3109/01480545.2015.1026972.
- Kaur, M., Jindal, R., 2018. Toxicopathic Branchial Lesions in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) Exposed to Chlorpyrifos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 100, 665-671. DOI: 10.1007/s00128-018-2320-x
- Khan, M.M., Moniruzzaman, M., Mostakim, G.M., Khan, M.S.R., Rahman, M.K., Islam, M.S., 2018. Aberrations of the peripheral erythrocytes and its recovery patterns in a freshwater teleost, silver barb exposed to profenofos, *Environ. Pollut.*, 234, 830-837. DOI: org/10.1016/j.envpol.2017.12.033.
- Kocaman, A.Y., Topaktas, M., 2007. In Vitro evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutat.* 48, 483-490. DOI: org/10.1002/em.20309.
- Kocaman, A.Y., Topaktas, M., 2010. Genotoxic effects of a particular mixture of acetamiprid and alpha-cypermethrin on chromosome aberration, sister chromatid exchange, and micronucleus formation in human peripheral blood lymphocytes. *Environ. Toxicol.*, 25, 2, 157-168. DOI: 10.1002/tox.20485.
- Kollmeyer, W.D., Flattum, R.F., Foster, J.P., Powell, J.E., Schoreder, M.E., Soloway, S.B., 1999. Discovery of the nitromethylene heterocycle insecticides. In: Yamamoto, 1, Casida, J. (Eds.), *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptors*, pp. 71-88.
- Kopjar, N., Zunec, S., Mendas, G., Micek, V., Kasuba, V., Mikolic, A., Lovakovic, B. T., Milic, M., Pavicic, I., Cermak, A. M. M., Pizent, A., Lucic Vrdoljak, A., Zeljezic, D., 2018. Evaluation of chlorpyrifos toxicity through a 28-day study: Cholinesterase activity, oxidative stress responses, parent compound/metabolite levels, and primary DNA damage in blood and brain tissue of adult male Wistar rats. *Chem. Biol. Interact.*, 279, 51-63. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.10.029.

- Lah, B., Vidic, T., Glasencnik, E., Cepeljnik, T., Gorjanc, G., Marinsek-Logar, R., 2008. Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary *Tradescantia micronucleus* assay. *Environ Monit Assess.* 139, 1-3, 107-118. DOI: 10.1007/s10661-007-9819-7.
- Li, B., Xia, X., Wang, J., Zhu, L., Wang, J., Wang, G. Evaluation of acetamiprid-induced genotoxic and oxidative responses in *Eisenia fetida*. 2018. *Ecotoxicol Environ Saf.* 161, 610-615. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.06.022.
- Li, X., Heyer, W.D., 2008. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell. Res.* 18, 99-113. DOI: 10.1038/cr.2008.1.
- Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* 52 DOI: org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104, 231e153.
- Liu, T., Wang, X., Xu, J., You, X., Chen, D., Wang, F., Li, Y., 2017^b. Biochemical and genetic toxicity of dinotefuran on earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, 176, 156-164. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.113.
- Liu, T., Wang, X., You, X., Chen, D., Li, Y., Wang, F., 2017^a. Oxidative stress and gene expression of earthworm (*Eisenia fetida*) to clothianidin. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 142, 489-496. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.04.012.
- Londres, F., 2011. *Agrotóxicos no Brasil: Um guia para ação em defesa da vida.* Rio de Janeiro, AS-PTA Assessoria e Serviços e Projetos em Agricultura Alternativa, 191pp.
- Ma, T., Sparrow, A., Schairer, L., Nauman, A., 1978. Effect of 1,2-dibromoethane (DBE) on meiotic chromosomes of *Tradescantia*. *Mutat Res.*, 58, 251-258. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(78\)90016-2](https://doi.org/10.1016/0165-1218(78)90016-2)
- Ma, T.H., 1981. *Tradescantia micronucleus* bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environ Health Perspect.* 37, 85-90. DOI: 10.1289/ehp.813785.
- Ma, T.H., Harris, M.M., Anderson, V.A., Ahmed, I., Mohammad, K., Bare, J.L. Lin, G., 1984. *Tradescantia-Micronucleus* (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. *Mutat Res.* 138, 157-67. DOI: org/10.1016/0165-1218(84)90039-9.
- Macchi, P., Loewy, R.M., Lares, B., Latini, L., Monza, L., Guinazu, N., Montagna, C.M., 2018. The impact of pesticide on the macroinvertebrate Community in the water channels of Rio Negro and Neuquen Valley, North Patagonia

- (Argentina). Environ. Sci. Pollut. Res. Int., 25, 10668-10678. DOI: 10.1007/s11356-018-1330-x.
- Maes, M., Ruckoanich, P., Chang, Y.S., Mahanonda, N., Berk, M., 2011. Multiple aberrations in shared inflammatory and oxidative & nitrosative stress (IO&NS) pathways explain the co-association of depression and cardiovascular disorder (CVD), and the increased risk for CVD and due mortality in depressed patients. Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry 35, 769e783. DOI: org/10.1016/j.pnpbp.2010.06.008.
- Maharajan, K., Muthulakshmi, S., Nataraj, B., Ramesh, M., Kadirvelu, K., 2018. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. Aquat. Toxicol., 196, 132-145. DOI: 10.1016/j.aquatox.2018.01.010.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Available: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Accessed 16 April 2018.
- Marutani, M., Edirveerasingam, V., 2006. Influence of irrigation methods and na adjuvant on the persistence of carbaryl on pakchoi, J. Environ. Qual., 35,1994-1998. DOI: 10.2134/jeq2005.0484.
- Mehid, S.H., Qamar, A., 2013. Paraquat-induced ultrastructural changes and DNA damage in the nervous system is mediated via oxidative-stress-induced cytotoxicity in *Drosophila melanogaster*. Toxicol. Sci., 134, 355-365. DOI: org/10.1093/toxsci/kft116.
- Mesnage, R., Bernay, B., Seralini, E., 2013. "Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity," Toxicology, 313, 122–128. DOI: 10.1016/j.tox.2012.09.006.
- Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendomois, J., Seralini, G. E., 2014. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. Biomed Res Int. 179691. DOI: 10.1155/2014/179691.
- Mondal, S., Gohsh, R.C., Mukhopadhyaya, S.K., 2012. Studies on the electrolytes and microelements in Wistar rat following multiple exposures to acetamiprid. Toxicol Ind Heath, 28, 422-427. DOI: 10.1177/0748233711413800.
- Morais, C.R., Bonetti, A.M., Carvalho, S.M., Rezende, A.A.A., Araújo, G.R., Spanó, M.A., 2016b. Assessment of the mutagenic, recombinogenic and

- carcinogenic insecticide in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, 165, 342-351. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.023.
- Morais, C.R., Bonetti, A.M., Mota, A.A., Campos, C.F., Souto, H.N., Naves, M.P.C., Santos, V.S.V., Campos-Júnior, E.O., Pavanin, L.A., Rezende, A.A.A., Spanó, M.A., Pereira, B.B., 2018. Evaluation of toxicity, mutagenicity and carcinogenicity of samples from domestic and industrial sewage. *Chemosphere*, 201, 342-350. DOI: org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.016.
- Morais, C.R., Carvalho, S.M., Naves, M.P.C., Araújo, G., Rezende, A.A.A., Bonetti, A.M., Spanó, M.A., 2017. Mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of thiametoxam insecticide and formulated product in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere* 187, 163-172. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.108.
- Morais, C.R., Vieira, T.C., Borges, R.M., Guimarães, L.M.M., Barcelos, L.A., Souza, F.C., Pimentel, L.S., Silva, J.C., Vasconcelos, M.A., Rodrigues, T.S., Sousa, F.A., Rezende, A.A.A., Spanó, M., Bonetti, A.M., 2016a. Assessment of carcinogenic potential of soft drinks of cola, diet cola, orange and lemon, produced in the city of Uberlândia, Minas Gerais state. *Braz. Biosci. J.*, 32, 1025-1039. DOI: org/10.14393/BJ-v32n4a2016-32969.
- Munoz, C. C., Vermeiren, P., 2018. Profiles of environmental contaminants in hawksbill turtle egg yolks reflect local to distant pollution sources among nesting beaches in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Mar. Environ. Res.*, 135, 43-54. DOI: 10.1016/j.marenvres.2018.01.012.
- Muzinic, V., Ramic, S., Zeljezic, D., 2018. Chromosome Missegregation and Aneuploidy Induction in Human Peripheral Blood Lymphocytes In vitro by Low Concentrations of Chlorpyrifos, Imidacloprid and alpha-Cypermethrin. *Environ Mol Mutagen.* 60, 72-84. DOI: 10.1002/em.22235.
- Nambirajan, K., Muralidharan, S., Manonmani, S., Kirubhanandhini, V., Ganesan, K., 2018. Incidences of mortality of Indian peafowl *Pavo cristatus* due to pesticide poisoning in India and accumulation pattern of chlorinated pesticides in tissues of the same species collected from Ahmedabad and Coimbatore. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 1-9. DOI: 10.1007/s11356-018-1750-7.

- Narayan, S., Liew, Z., Bronstein, J.M., Ritz, B., 2017. Occupational pesticide use and Parkinson's disease in the Parkinson Environmental Gene (PEG) study. *Environ. Int.*, 107, 266- 273. DOI: 10.1016/j.envint.2017.04.010_
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V.L., Kausmann, M., 2003. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pestic. Biochem. Phys.* 76, 55e69. DOI: Org/10.1016/S0048-3575(03)00065-8.
- Naves, M.P.C., Morais, C.R., Silva, A.C.A., Dantas, N.O., Spanó, M.A., Rezende, A.A.A., 2018. Assessment of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of titanium dioxide nanocrystals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.*, 112, 273-281. DOI: org/10.1016/j.fct.2017.12.040.
- Nepomuceno, J.C., 2015. Using the *Drosophila melanogaster* to assessment carcinogenic agents thought the test for detection of epithelial tumor clones (warts). *Adv. Tech. Biol. Med.* 3, 2-8. DOI: ORG/10.4172/23791764.1000149.
- Nishiyama, Y., Hirota, T., Morisaki, T., Hara, T., Marumoto, T., Iada, S., Makino, K., Yamamoto, H., Hiraoka, T., Kitamura, N., Saya, H., 1999. A human homolog *Drosophila* warts supressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *Febs Lett.* 459, 159-165. DOI: org/10.1016/S0014-5793(99)01224-7.
- Nunes, M.E.M., Muller, T. E., Murussi, C., do Amaral, A.M.B., Gomes, J.L.C., Marins, A.T., Leitemperger, J., Rodrigues, C.C.R., Fiuza, T.L., Costa, M.D., Severo, E.S., Rosemberg, D.B., Loro, V.L., 2018. Oxidative effects of the acute exposure to a pesticide mixture of cypermethrin and chlorpyrifos on carp and zebrafish - A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 206-207, 48-53. DOI: 10.1016/j.cbpc.2018.03.002_
- Odemer, R., Nilles, L., Linder, N., Rosenkranz, P., 2018. Sublethal effects of clothianidin and *Nosema* spp. on the longevity and foraging activity of free flying honey bees. *Ecotoxicology.* 27, 527-538. DOI: 10.1007/s10646-018-1925-5.
- Pandey, S. P., Mohanty, B., 2017. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis on co-exposures to dithiocarbamate and neonicotinoid pesticides: Study

- in a wildlife bird, *Amandava amandava*. *Neurotoxicology*, 60, 16-22. DOI: 10.1016/j.neuro.2017.02.010.
- Peluso, M.E.M., Giese, R.W., Chellini, E., Ceppi, M., Capacci, F., 2015. Oxidatively damaged DNA in the nasal epithelium of workers occupationally exposed to silica dust in Tuscany region, Italy. *Mutagenesis*. 30, 519-525. DOI: 10.1093/mutage/gev014.
- Pereira, B.B., Campos, E.O., Lima, E.A., Barrozo, M.A., Morelli, S., 2014. Biomonitoring air quality during and after a public transportation strike in the center of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil by *Tradescantia micronucleus* bioassay. *Environ Sci Pollut Res Int*. 21, 3680-3685. DOI: 10.1007/s11356-013-2335-0.
- Perez-Iglesias, J.M., Ruiz de Arcaute, C., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G.S., Larramendy, M. L., 2014. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol Environ Saf*. 104, 120-126. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.002.
- Pesticide Properties DataBases (PPDB). Acetamiprid. Available: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/11.htm>. Accessed 16 April 2019.
- Puinean, A.M., Foster, S.P., Oliphant, L., Denholm, I., Field, L.M., Millar, N.S., Williamson, M.S., Bass, C., 2010. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLOS Genet*. 6, e1000999. DOI: [org/10.1371/journal.pgen.1000999](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000999)
- Quintaneiro, C., Soares, A.M.V.M, Monteiro, M. S., 2018. Effects of the herbicides linuron and S-metolachlor on Perez's frog embryos. *Chemosphere*, 194, 595-601. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.171.
- Rigotto, R.M., Vasconcelos, D.P., Rocha, M.M., 2014. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. *Cad. Saude Publica*, 30, 1-3. DOI: [org/10.1590/0102-311XPE020714](https://doi.org/10.1590/0102-311XPE020714)
- Rocha, A.D.N., Candido, L.S., Pereira, J.G., Silva, C.A.M., Silva, S.V., Mussury, R.M., 2018. Evaluation of vehicular pollution using the TRAD-MCN mutagenic bioassay with *Tradescantia pallida* (Commelinaceae). *Environ Pollut*. 240, 440-447. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.04.091.

- Rodriguez, Y.A., Christofolletti, C.A., Pedro, J., Bueno, O.C., Malaspina, O., Ferreira, R.A., Fontanetti, C.S., 2015. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. *Chemosphere*. 120, 438-442. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.08.022.
- Santelli, G.M.M., Sivieiro, F., 2014. Mutagênese e Carcinogênese, in: Oga, S., Camargo, M.M.A., Batistuzzo, J.A.O (Eds.), *Fundamentos de Toxicologia*. Atheneu, São Paulo, pp. 71-84.
- Santo, G.D., Grotto, A., Boligon, A.A., Da Costa, B., Rambo, C.L., Fantini, E.A., Sauer, E., Lazzarotto, L.M.V., Bertoncetto, K.T., Junior, O.T., Garcia, S.C., Siebel, A.M., Rosemberg, D.B., Magro, J.D., Conterato, G.M.M., Zanatta, L., 2018. Protective effect of *Uncaria tomentosa* extract against oxidative stress and genotoxicity induced by glyphosate-Roundup(R) using zebrafish (*Danio rerio*) as a model. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 25, 11703–11715. DOI: 10.1007/s11356-018-1350-6.
- Santos, J.H., Graf, U., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 1999. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesion in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 444, 355-365. DOI: 10.1016/s1383-5718(99)00101-1.
- Sebastian, R., Raghavan, S.C., 2016. Induction of DNA damage and erroneous repair can explain genomic instability caused by endosulfan. *Carcinogenesis*, 37, 929-940. DOI: 10.1093/carcin/bgw081.
- Shakir, S.K., Irfan, S., Akhtar, B., Rehman, S.U., Daud, M.K., Taimur, N., Azizullah, A., 2018. Pesticide-induced oxidative stress and antioxidant responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings. *Ecotoxicology*. 27, 919-935. DOI: 10.1007/s10646-018-1916-6.
- Silva, L.P., Costa-Cruz, J.M., Spanó, M.A., Graf, U., 2006. Genotoxicity of vesicular fluid and saline extract of *Taenia solium* metacestodes in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 47, 247-253. DOI: 10.1002/em.20194.
- Sinha, S., Thaker, A.M., 2013. Sub-acute genotoxicity studies of thiametoxam in mice. *Indian. Vet. J.* 90, 42e44.
- Solla, S.R., Palonen, K.E., Martin, P.A., 2014. Toxicity of pesticides associated with potato production, including soil fumigants, to snapping turtle eggs

- (*Chelydra serpentina*). Environ. Toxicol. Chem., 33, 102-106. DOI: 10.1002/etc.2393.
- Spanó, M.A., Frei, H., Würgler, F.E., Graf, U., 2001. Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. Mutagenesis. 16, 385-394. DOI: 10.1093/mutage/16.5.385.
- Sparks, T.C., Nauen, R., 2015. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. Pest. Biochem. Phys. 121, 122-128. DOI: org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014.
- Sposito, J.C.V., Crispim, B.D.A., Roman, A.I., Mussury, R.M., Pereira, J.G., Seno, L.O., Grisolia, A.B., 2017. Evaluation the urban atmospheric conditions in different cities using comet and micronuclei assay in *Tradescantia pallida*. Chemosphere. 175, 108-113. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.136
- Stivaktakis, P., Vlastos, D., Giannakopoulos, E., Matthopoulos, D.P., 2010. Differential micronuclei induction in human lymphocyte cultures by imidacloprid in the presence of potassium nitrate. Scientific World Journal. 10, 80-89. DOI: 10.1100/tsw.2010.9.
- Stivaktakis, P.D., Kavvalakis, M.P., Tzatzarakis, M.N., Alegakis, A.K., Panagiotakis, M.N., Fragkiadaki, P., Vakonaki, E., Ozcagli, E., Hayes, W.A., Rakitskii, V.N., Tsatsakis, A.M., 2016. Long-term exposure of rabbits to imidacloprid as quantified in blood induces genotoxic effect. Chemosphere. 149, 108-113. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.01.040.
- Tariba Lovakovic, B., Pizent, A., Kasuba, V., Kopjar, N., Micek, V., Mendas, G., Dvorscak, M., Mikolic, A., Milic, M., Zunec, S., Lucic Vrdoljak, A., Zeljezic, D., 2017. Effects of sub-chronic exposure to terbuthylazine on DNA damage, oxidative stress and parent compound/metabolite levels in adult male rats. Food Chem. Toxicol., 108, 93-103. DOI: 10.1016/j.fct.2017.07.046.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. Annu. Rev. Entomol. 48, 339-64. DOI: 10.1146/annurev.ento.48.091801.112731.
- Tomizawa, M., Yamamoto, I., 1993. Structure-activity relationships of nicotinoids and imidacloprid analogs. J Pest Sci. 18, 91-98. DOI: org/10.1584/jpestics.18.91.

- Uggini, G.K., Patel, P.V., Balakrishnan, S., 2012. Embryotoxic and teratogenic effect of pesticides in chick embryos: a comparative study using two commercial formulations. *Environ. Toxicol.*, 27, 166-174. DOI: 10.1002/tox.20627_
- Vasconcelos, M.A., Orsolin, P.C., Oliveira, R.G.S., Nepomuceno, J.C., Spanó, M.A., 2017. Assessment of the carcinogenic potential of high intense sweeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.*, 101, 1-7. DOI: org/10.1016/j.fct.2016.12.028.
- Vieira, C.E.D., Perez, M.R., Acayaba, R.D., Raimundo, C.C.M., Dos Reis Martinez, C.B, 2018. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere.* 195, 125-134. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.077.
- Wang, J., Wang, J., Wang, G., Zhu, L., Wang, J., 2016. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in the earthworm *Eisenia fétida*. *Chemosphere.* 144, 510-517. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.09.004.
- Wang, J., Wang, J., Wang, G., Zhu, L., Wang, J., 2016^b. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in the earthworm *Eisenia fétida*. *Chemosphere,* 144, 510-517. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.09.004.
- Wang, X., Anadon, A., Wu, Q., Qiao, F., Ares, I., Martinez-Larranaga, M.R., Yuan, Z., Martinez, M.A., 2018. Mechanism of neonicotinoid toxicity: Impact on oxidative stress and metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 58, 471-507. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010617-052429.
- Wang, X., Martinez, M.A., Dai, M., Chen, D., Ares, I., Romero, A., Castellano, V., Martinez, M., Rodriguez, J.L., Martinez-Larranaga, M.R., Anadon, A., Yuan, Z., 2016^a. Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. *Environ. Res.*, 149, 86-104. DOI: 10.1016/j.envres.2016.05.003_
- Wendt, A., 2018. Pesticide exposure and Parkinson's disease in the Agrican study. *Int. J. Epidemiol.*, 1006. DOI: 10.1093/ije/dyy035.

- Wiilczek, G., Medrzak, M., Augustyniak, M., Wilczek, P., Stalmach, M., 2016. Genotoxic effect of starvation and dimethoate in haemocytes and midgut gland cells of Wolf spider *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae). *Environ. Pollut.*, 213, 370-378. DOI: [org/10.1016/j.envpol.2016.02.037](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.037).
- Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R.A., Yu, W., 1995. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development*, 121, 1053-1063.
- Yan, S.H., Wang, J.H., Zhu, L.S., Chen, A.M., Wang, J., 2015. Thiametoxam induces oxidative stress and antioxidant response in zebrafish (*Danio Rerio*) Livers. *Environ. Toxicol* 31, 2006e2015. DOI: [org/10.1002/tox.22201](https://doi.org/10.1002/tox.22201).
- Yan, S.H., Wang, J.H., Zhu, L.S., Chen, A.M., Wang, J., 2016. Thiamethoxam induces oxidative stress and antioxidant response in zebrafish (*Danio Rerio*) livers. *Environ Toxicol*, 31, 2006-2015. DOI: [10.1002/tox.22201](https://doi.org/10.1002/tox.22201).
- Yang, N., Xie, W., Jones, C.M., Bass, C., Jiao, X., Yang, X., Liu, B., Li, R., Zhang, Y., 2013. Transcriptome profiling of the whitefly *Bemisia tabaci* reveals stage-specific gene expression signatures for thiamethoxam resistance. *Insect. Mol. Biol.*, 22, 485– 496. DOI: [10.1111/imb.12038](https://doi.org/10.1111/imb.12038).
- Yu, S.J., 2008. *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides*. CRC Press, 275p.
- Yucel, M.S., Kayis, T., 2018. Imidacloprid induced alterations in oxidative stress, biochemical, genotoxic, and immunotoxic biomarkers in non-mammalian model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *J Environ Sci Health B*. 1-8. DOI: [10.1080/03601234.2018.1530545](https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1530545).
- Zeljezic, D., Vinkovic, B., Kasuba, V., Kopjar, N., Milic, M., Mladinic, M., 2017. The effect of insecticides chlorpyrifos, alpha-cypermethrin and imidacloprid on primary DNA damage, TP 53 and c-Myc structural integrity by comet-FISH assay. *Chemosphere*, 182, 332-338. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2017.05.010](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.010).
- Zhang, Q., Zhang, B., Wang, C., 2014. Ecotoxicological effects on the earthworm *Eisenia fetida* following exposure to soil contaminated with imidacloprid. *Environ Sci Pollut Res Int*. 21, 12345-12353. DOI: [10.1007/s11356-014-3178-z](https://doi.org/10.1007/s11356-014-3178-z).

Zhang, W., Lu, Y., Huang, L., Cheng, C., Di, S., Chen, L., Zhou, Z., Diao, J., 2018. Comparison of triadimefon and its metabolite on acute toxicity and chronic effects during the early development of *Rana nigromaculata* tadpoles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 156, 247-254. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.009.

Artigo Científico

Periódico: Chemosphere

Fator de impacto: 5,108

Chemosphere 187 (2017) 161–172



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of thiamethoxam insecticide and formulated product in somatic cells of *Drosophila melanogaster*



Cássio Resende de Moraes^a, Stephan Malfitano Carvalho^b, Maria Paula Carvalho Naves^a, Galber Araujo^{a,c}, Alexandre Azenha Alves de Rezende^a, Ana Maria Bonetti^a, Mário Antônio Spanó^{a,*}

^a Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Campus Umuarama, 38900-402, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

^b Department of Entomology, Federal University of Lavras, PO Box 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brazil

^c Department of Molecular Biology, University of Salzburg, 5020, Salzburg, Austria

HIGHLIGHTS

- The mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of Thiamethoxam and Actara were studied in vivo.
- Thiamethoxam and Actara are mutagenic after bioactivation.
- Increasing the metabolic capacity decreases the toxic effect of Thiamethoxam and Actara.
- Inert ingredients present in Actara may interfere with the repair mechanism by homologous recombination.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2017

Received in revised form

18 August 2017

Accepted 19 August 2017

Available online 19 August 2017

Handling Editor: Jim Lazorchak

Keywords:

Actara

Insecticide

Neonicotinoid

SMART

Warts

ABSTRACT

Thiamethoxam (TMX) belongs to a class of neuro-active insecticides referred as neonicotinoids, while actara[®] (AC) is one of the most popular TMX-based products in Brazil. The aim of this study was to evaluate the mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of TMX and AC insecticides. The mutagenic and recombinogenic effect of TMX and AC were evaluated in vivo by the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) while carcinogenic effects were evaluated through the Test for Detection of Epithelial Tumor Clones (wtb test), both in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In the SMART, third instar larvae from standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses were treated with different concentrations of TMX and AC (2.4; 4.8; 9.7×10^{-4} mM and 1.9×10^{-3} mM). The results revealed mutagenic effects at the highest concentrations tested in the HB cross. In the test for the detection of epithelial tumor, third instar larvae resulting from the cross between wtb/TMX, Δb^1 virgin females and mwly/mwly males were treated with the same concentrations of TMX and AC used in the SMART. No carcinogenic effect was observed at any of the concentrations tested. In this work, the inhibition of the mechanism of repair by homologous recombination was observed in flies exposed to 9.7×10^{-4} and 1.9×10^{-3} mM of AC. In conclusion, TMX and AC demonstrated to be a promutagen in the highest concentrations tested.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Artigo Científico

Periódico: Chemosphere

Fator de impacto: 5,108



Evaluation of the genotoxicity of neurotoxic insecticides using the micronucleus test in *Tradescantia pallida*

Cássio Resende de Moraes^{a,c}, Bosculli Barbosa Pereira^{a,b,d,e},
 Patrícia Cristina Almeida Sousa^c, Vanessa Santana Vieira Santos^a,
 Carlos Fernando Campos^a, Stephan Malfitano Carvalho^d, Mário Antônio Spanó^a,
 Alexandre Azenha Alves de Rezende^{a,c}, Ana Maria Bonetti^a

^a Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Campus Uruaçuama, 38900-402, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

^b Institute of Geography, Federal University of Uberlândia, Campus Santa Mônica, 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

^c Department of Cell Biology, Carmeliana Maria Palmaria Foundation, 38500-000, Monte Carmelo, Minas Gerais, Brazil

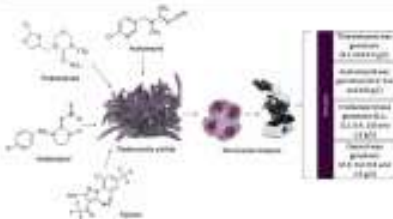
^d Department of Entomology, Federal University of Lavras, PO Box 3037, 37 200-000, Lavras, Minas Gerais, Brazil

^e Institute of Exact and Natural Sciences of Postal, Federal University of Uberlândia, Campus Postal, Estação, Minas Gerais, 38304-402, Brazil

HIGHLIGHTS

- Genotoxicity of neurotoxic insecticides were evaluated at realistic concentrations.
- Highly used neurotoxic insecticides exhibited clastogenic and/or aneugenic effects.
- *T. pallida* shown to be an excellent model organisms for screening induced genotoxicity.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2019

Received in revised form

9 April 2019

Accepted 10 April 2019

Available online 12 April 2019

Handling Editor: Willie Peijnenburg

Keywords:

Pesticides

Neurotoxicity

Phenylpyrazole

Genotoxicity

ABSTRACT

Neonicotinoids and phenylpyrazoles are classes of neurotoxic insecticides which are able to bind at different ligand sites of neural receptors, leading to the deregulation of insect neural activity and hence resulting in death. The misuse or indiscriminate use of these chemicals is directly associated with several toxicological effects in biota and at different trophic levels. Based on this premise, the aim of the present study was to evaluate and compare the genotoxic capacity of different concentrations of thiamethoxam (TMX), acetamiprid (ACP), imidacloprid (IMI) and fipronil (FP) through the Micronucleus Test in *Tradescantia pallida* (Trad-MCN). After acclimatization (24 h), *T. pallida* stems were treated with established concentrations of TMX, ACP, IMI and FP for 8 h. Then, the stems of the model organism were submitted to a recovery phase (24 h). The young inflorescences were harvested and fixed in Carnoy solution and, after 24 h, were conserved in ethanol 70% until the analyzes. The obtained anthers were macerated on slides for microscopy, stained with acetic carmine dye and covered with coverslips before analysis by light microscopy. Considering the insecticides, the micronuclei (MN) frequency in plants treated at concentrations of 0.2 and 0.4 g L⁻¹ for TMX, 0.2; 0.4 and 0.8 g L⁻¹ for ACP, 0.1; 0.2; 0.4; 0.8 and 1.6 g L⁻¹ for IMI and 0.2; 0.4; 0.8 and 1.6 g L⁻¹ for FP differed statistically ($p < 0.05$, Tukey) from the MN frequency of the