

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 15/07/2018.

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

---

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DE DOIS METALO-  
INSETICIDAS EM ORGANISMOS NÃO ALVOS**

**Raphael Bastão de Souza**

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).**

**Rio Claro  
Julho/2016**

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

---

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DE DOIS METALO-  
INSETICIDAS EM ORGANISMOS NÃO ALVOS**

**Raphael Bastão de Souza**

**Orientadora: Profa. Dra. Carmem S. Fontanetti Christofolletti**

**Co-orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno**

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).**

**Rio Claro  
Julho/2016**

591.5 Souza, Raphael Bastão  
S729a Avaliação do potencial tóxico de dois metalo-inseticidas em organismos não-alvos / Raphael Bastão Souza. - Rio Claro, 2016  
139 f. : il., figs., gráfs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientadora: Carmem S. Fontanetti Christofolletti  
Coorientador: Odair Correa Bueno

1. Ecologia animal. 2. Ecotoxicologia. 3. Genotoxicidade. 4. Histopatologia. 5. Proteína de estresse. 6. Teste de reprodução. 7. Invertebrados de solo. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DE DOIS METALO-INSETICIDAS EM ORGANISMOS NÃO-ALVOS

AUTOR: RAPHAEL BASTÃO DE SOUZA

ORIENTADORA: CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:




Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI-CHRISTOFOLETTI  
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Pós-Doutoranda PRISCILA CINTRA SOCOLOWSKI  
CEIS / IB Rio Claro



Profa. Dra. CINTYA APARECIDA CHRISTOFOLETTI DE FIGUEIREDO  
Fundação Hermínio Ometto, UNIARARAS



Profa. Dra. DÂNIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO  
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP



Prof. Dr. RAFAEL NEODINI REMEDIO  
Departamento de Ciências da Saúde / UFLA - Universidade Federal de Lavras

Rio Claro, 15 de julho de 2016

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista - UNESP e ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências de Rio Claro, em especial ao Laboratório de Mutagênese e ao Laboratório de Histologia, por fornecerem toda a estrutura necessária à realização deste estudo.

À Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de estudo concedida (Processo 2012/12019-5).

À Universidade de Coimbra e ao Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia de Solos por me acolherem e tornarem possível a realização dos experimentos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Carmem S. Fontanetti Christofolletti, por ser um exemplo de pessoa, inspiração e profissionalismo. Que um dia eu possa conduzir um grupo de pesquisa com a mesma sabedoria que você lidera o nosso. O mundo acadêmico seria outro caso todos tivessem 1/10 do seu profissionalismo e ética.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Odair Correa Bueno pela ajuda na preparação dos experimentos e por fornecer os produtos aqui testados.

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes e à Prof. Dr. Rose Maria Carlos da Universidade de São Carlos pela síntese e fornecimento dos produtos testados.

Ao Prof. Dr. José Paulo Sousa e ao Dr. Tiago Natal-da-Luz por tornarem possível a realização dos experimentos na Universidade de Coimbra.

Agradecimento especial à minha família pelo apoio. Sem vocês nada disso seria possível. Ao Tulio, por ser companheiro em todas as etapas, sejam fáceis ou difíceis. Muito obrigado pela paciência, apoio e incentivo. Ao melhor grupo de pesquisa que alguém poderia participar: Anne, Camila (melhor co-orientada), Chapinha, Ci, Cleiton, Cris, Jana, Jorge, Louise, Luiza, Maria Paula, Matraca, Monica, Tamaris, Thays, Vini e Yadi. Aos amigos do Laboratório de Mutagênese: Marin, Dânia, Fernanda, Franco, Jack, Laís, Leo, Letícia, Marcinha, Maria Tereza, Matheus, Michele, Nádia e Raquel. Cleiton e Franco, obrigado pela convivência na nossa casa. À Luara e Irene, por me receberem tão bem em Coimbra. À Carla, Daniela, Fernanda, Filipa, Eduardo, Gabriel, Capela, Sara e Sônia, por terem tornado minha estadia em Coimbra uma ótima experiência.

*A todos vocês, meu mais sincero OBRIGADO!*

*“É triste pensar que a natureza fala e que o gênero humano não a ouve”*

Victor Hugo

## RESUMO

A crescente utilização de agrotóxicos com o intuito de aumentar a produção agrícola tornou-se um dos principais problemas em relação ao meio ambiente. O solo é o primeiro compartimento a receber estas substâncias e, portanto, os organismos que nele habitam são os mais prejudicados pela sua aplicação. Com o intuito de proteger a biodiversidade do planeta, a comercialização e utilização de muitos agrotóxicos com reconhecida ação tóxica a organismos não-alvos têm sido proibidas por diversos países e organizações internacionais. Para substituí-los de forma eficaz, novos produtos têm sido desenvolvidos. As substâncias testadas no presente estudo,  $[\text{Mg}(5\text{-Cl-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$  e  $[\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ , foram desenvolvidas como uma alternativa ao formicida sulfluramida, amplamente utilizado no combate às formigas cortadeiras e proibido em muitos países. Estas substâncias são complexos metálicos, compostos por um produto natural extraído de frutos cítricos, o flavonóide hesperitina, ligado a um metal. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo investigar a toxicidade destas duas formulações de metalo-inseticidas para organismos não-alvo. Vegetais superiores, *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*, e invertebrados terrestres, *Rhinocricus padberdi*, *Eisenia fetida*, *Enchytraeus crypticus* e *Folsomia candida*, foram utilizados como organismos bioindicadores na realização dos bioensaios. A avaliação da toxicidade foi realizada pela análise de diferentes parâmetros, como aberrações cromossômicas e micronúcleo, alterações histológicas e histoquímicas, indução de proteínas de estresse HSP70, testes de mortalidade e reprodução. Por meio dos testes citogenéticos aplicados em *A. cepa* e *T. pallida*, foi possível observar que o metalo-inseticida  $[\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$  foi capaz de induzir aberrações cromossômicas e formação de micronúcleo, principalmente em *A. cepa*. A análise morfológica realizada no intestino médio do diplópodo *R. padbergi* não apresentou alterações estatisticamente significativas, indicando que os metalo-inseticidas são seguros para a espécie. Porém, a análise das proteínas de estresse revelou que os compostos podem induzir a síntese de HSP70. O composto  $[\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$  não é capaz de gerar mortalidade em minhocas da espécie *E. fetida* nem interferir na sua reprodução, embora interfira na reprodução de enquitrédeos da espécie *E. cryptus* e da espécie de colêmbolos *F. candida*, uma vez que diminuiu a geração de juvenis, principalmente nas maiores concentrações. Deste modo, sugere-se que o metalo-inseticida  $[\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$  apresenta maior potencial tóxico quando comparado ao metalo-inseticida  $[\text{Mg}(5\text{-Cl-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ .

Palavras-chave: genotoxicidade; histopatologia; proteína de estresse; reprodução

## ABSTRACT

The great use of pesticides in order to increase agricultural production has become a major problem to the environment and has concerned scientists worldwide. These substances reach primarily the soil and the organisms that inhabit it are the most affected by its implementation. In order to protect the planet's biodiversity, the commercialization and use of many pesticides with known toxic effects to non-target organisms have been banned by many countries and international organizations. In order to effectively replace them, new products have been developed. The substances tested in this study were developed to replace the sulfluramide formicide, widely used against leaf cutting ants and banned in many countries. These new substances are metal complexes consisting of a natural product, the flavonoid hesperetin, linked to an inorganic metal. Among the developed formulations, [Mg(5-Cl-phen)(hesperetin)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>COO) and [Mg(5-methyl-phen)(hesperetin)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>COO) were the ones which showed better insecticide efficacy. In this sense, the present study aimed to investigate the toxicity of these two new formulations of metal-insecticides to non-target organisms. Higher plants, *Allium cepa* and *Tradescantia pallida*, and terrestrial invertebrates, *Rhinocricus padberdi*, *Eisenia fetida*, *Enchytraeus crypticus* and *Folsomia candida* were chosen as bioindicator organisms. The toxicity evaluation was carried out by analyzing different parameters, such as chromosomal aberrations and micronucleus induction, histological and histochemical alterations, induction of HSP70 stress protein, mortality and reproduction. Cytogenetic tests in *A. cepa* and *T. pallida* revealed that the complex [Mg(5-methyl-phen)(hesperetin)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>COO) is able to induce chromosomal aberrations and induction of micronucleus, particularly in *A. cepa*. Morphological analysis performed with the millipede *R. padbergi* showed no statistically significant changes, indicating that the complexes are safe for the species. However, the analysis of stress proteins revealed that the compounds can induce the synthesis of HSP70. The compound [Mg(5-methyl-phen)(hesperetin)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>COO) is not able to cause mortality in *E. fetida* worms neither change its reproduction rates, but interferes in the reproduction of the species *E. cryptus* and *F. candida*, once a decreased generation of juveniles was observed, especially in the highest concentrations. Thus, it can be suggested that [Mg(5-methyl-phen)(hesperetin)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>COO) complex shows higher potential toxicity when compared to [Mg(5-Cl-phen)(hesperetin)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>COO).

Key-words: genotoxicity; histopathology; stress protein; reproduction

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Toxicidade dos compostos naturais derivados de plantas.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.1 Compostos fenólicos.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.2 Terpenóides.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.3 Alcalóides.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Uso de <i>A. cepa</i> em estudos de genotoxicidade.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Uso de <i>T. pallida</i> em estudos de genotoxicidade.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Diplópodos como bioindicadores.....</b>	<b>20</b>
<b>3.5 Anelídeos utilizados em testes ecotoxicológicos .....</b>	<b>22</b>
<b>3.5.1. Testes ecotoxicológicos com enquitreídeos.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5.2 Testes ecotoxicológicos com minhocas.....</b>	<b>25</b>
<b>3.6 Testes de reprodução com colêmbolos.....</b>	<b>26</b>
<b>3.7 Proteínas de estresse HSP70 como biomarcadores.....</b>	<b>26</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Metalo-inseticidas.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Material biológico.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Amostras de solo.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Bioensaios com <i>A. cepa</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>4.5 Bioensaios com <i>T. pallida</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>4.6 Bioensaios com o diplópodo <i>R. padbergi</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>4.6.1 Histologia.....</b>	<b>31</b>
<b>4.6.2 Histoquímica.....</b>	<b>32</b>

<b>4.6.3 Imunohistoquímica.....</b>	<b>33</b>
<b>4.7 Teste de reprodução com <i>E. crypticus</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>4.8 Teste de mortalidade com <i>E. fetida</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>4.9 Teste de reprodução com <i>F. candida</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>ARTIGO 1:</b> Toxicity of two metallic-insecticides using the <i>Allium cepa</i> test system.....	<b>37</b>
<b>ARTIGO 2:</b> Avaliação do efeito genotóxico de dois metalo-inseticidas por meio do teste Trad-MCN em <i>Tradescantia pallida</i> .....	<b>54</b>
<b>ARTIGO 3:</b> Utilização de marcadores morfológicos para avaliação da toxicidade de dois metalo-inseticidas em diplópodos.....	<b>64</b>
<b>ARTIGO 4:</b> Indução de proteínas de estresse HSP70 por dois complexos metálicos inseticidas em intestino médio de diplópodos.....	<b>82</b>
<b>ARTIGO 5:</b> Avaliação dos efeitos tóxicos de um complexo metálico inseticida por meio de protocolos internacionais para invertebrados de solo.....	<b>99</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>114</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>117</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>118</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de inseticidas sintéticos constitui a principal via de erradicação de pragas em plantações do mundo todo (OFUYA; OKUKU, 1994). Apesar da sua eficácia na agricultura, a constante utilização ao longo dos anos acarreta vários efeitos negativos ao meio ambiente (OFUYA; OKUKU, 1994; ZACHARIA, 2011). Além de serem responsáveis pela contaminação das águas e do solo, podem causar intoxicação em trabalhadores do campo e em consumidores e contribuir para que as pragas se tornem resistentes a eles (ISMAN, 2006).

No Brasil, o uso de pesticidas alcançou, no ano de 2005, o patamar de produção e comercialização de, aproximadamente, 400 mil toneladas (SANTOS et al., 2007). A partir de 2008, o país tornou-se o maior consumidor mundial de agrotóxicos, movimentando 6,62 bilhões de dólares, para um consumo de 725,6 mil toneladas de agrotóxicos, ou seja, 3,7 kg de agrotóxicos por habitante. De acordo com os Indicadores de Desenvolvimento Sustentável, divulgados pelo IBGE (2012), a comercialização de agrotóxicos em 2002 representava 2,7kg por hectare. Em 2012, houve um aumento de 155%, atingindo 6,9kg por hectare.

O fato de o Brasil possuir 10 espécies e 3 subespécies de *Atta* (saúvas) contribui para a classificação do país como um dos maiores consumidores mundiais de pesticidas (SANTOS et al., 2007), uma vez que as formigas cortadeiras deste gênero representam uma das principais pragas responsáveis por danos econômicos em áreas agrícolas das regiões tropicais e subtropicais das Américas por possuírem comportamento de cortar as folhas das plantas para utilizá-las como substrato aos fungos dos quais se alimentam (SCHOEREDER et al., 2012).

Os processos de combate às formigas cortadeiras têm sido realizados, historicamente, por pesticidas sintéticos (SCHOEREDER et al., 2012). Estes métodos possuem baixa especificidade, são altamente tóxicos e podem gerar populações de insetos resistentes (HEBLING et al., 1996). Desde que o pesticida dodecacloro foi proibido em 1993, a sulfluramida tornou-se o princípio ativo mais utilizado contra tais organismos (ZANUNCIO et al., 2000; ABRAISCA, 2011).

Porém, tanto a produção quanto a degradação da sulfluramida envolve sulfonato de perfluorooctano (PFOS), substância tóxica para mamíferos (LUEBKER et al., 2005; FAN et al., 2005), aves (VERREAULT, 2005; OLIVERO-VERBEL et al., 2006), peixes (TANIYASU et al., 2003) e outros insetos (BOTS et al., 2010).

Devido ao seu risco para humanos e meio ambiente, em 2009, a Convenção de Estocolmo decidiu banir a produção de PFOS, embora tenha permitido que os países

enviassem propostas para sua liberação quando seu uso fosse justificável. Sendo assim, no mesmo ano, o Brasil pleiteou e ganhou o direito de continuar produzindo sulfluramida (STOCKHOLM CONVENTION, 2009). Segundo a “United Nations Environment Programme” (UNEP), em 2007, a produção anual deste inseticida no Brasil atingiu 30 toneladas, liberando grande quantidade de PFOS no ambiente. Nos EUA, todos os produtos contendo sulfluramida já foram proibidos e os produtos estocados só puderam ser comercializados até dezembro de 2012 (USEPA, 2008).

Conscientes desta problemática, pesquisadores vêm conduzindo estudos a fim de desenvolver produtos economicamente viáveis e menos danosos aos ecossistemas no combate das formigas cortadeiras (BIAVATTI et al., 2005; ALMEIDA et al., 2007; BUENO et al., 2013). Neste sentido, a substância a ser testada neste trabalho, recentemente desenvolvida, apresenta-se como uma alternativa eficaz ao uso da sulfluramida.

Este novo inseticida, desenvolvido pela UFSCar (Universidade Federal de São Carlos) em parceria com a UNESP (Universidade Estadual Paulista), é um produto natural, derivado do flavonóide hesperitina, ligado a complexos inorgânicos metálicos. A presença, na mesma molécula, de um produto natural (L) e de um ligante polipiridínico (L'-L') com propriedades antiacetilcolinesterase, unidos por ligações covalentes a um mesmo íon metálico central (M), originou compostos do tipo *cis*-[M<sub>n</sub>(L)<sub>m</sub>(L'-L')<sub>k</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>x</sub> (OLIVEIRA, 2012).

Especificamente, trata-se de um complexo de metal inorgânico (M), *cis*-[M<sub>n</sub>(L)<sub>m</sub>(L'-L')<sub>k</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>x</sub>, onde M = Ru(II), Mg(II), Cu(II), Fe(II), Zn(II); L = hesperidina (hesp), hesperitina (hespt), naringina (ngina) e naringenina (ngnina); L'-L' = 1,10-fenantrolina (phen); n = 1,2; m = 1,2 k = 1,2; e x = 1,2. Tal formulação é utilizada como um sistema capaz de atuar como inseticida para as formigas cortadeiras quando adicionado às iscas e para lagartas-dos-cartuchos dos milhos e outros insetos pragas da agricultura em outras formulações. De todas as formulações testadas, as mais eficientes foram [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>COO) e [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>COO) (OLIVEIRA, 2012).

Os ensaios *in vivo* com insetos pragas realizados com este sistema metalo-inseticida apresentaram tempo de ação retardado, o qual é similar ao tempo de ação do inseticida comercial sulfluramida. A complexação com metais tem a função de permitir que o composto orgânico ativo atinja o local de ação. Quando adicionado às iscas, o metalo-inseticida é capaz de eliminar 85% do formigueiro em quantidades de 0,9 mmol L<sup>-1</sup>, atuando na colônia sem a

necessidade de adicionar outros agentes tóxicos para alcançar a atividade inseticida desejada (OLIVEIRA, 2012).

Apesar de inseticidas produzidos a partir de produtos naturais, como a substância a ser estudada neste trabalho, não possuem propriedades potencialmente tóxicas, a avaliação da sua utilização e dos seus possíveis riscos são importantes, uma vez que o fato de serem naturais não garante que sejam seguros (TOLBY, 1997 apud OPIYO, 2003).

Para a avaliação dos riscos ambientais, os estudos ecotoxicológicos são realizados com o principal objetivo de fornecer dados que serão utilizados para determinar a necessidade de precaução e limitação no uso de determinada substância, minimizando, assim, os efeitos adversos em organismos não alvos. Pesquisas recentes realizadas com outros produtos naturais utilizados como inseticidas (neem e fruta-do-conde) demonstraram que eles podem causar efeitos negativos tanto em humanos quanto em organismos não alvos ou apresentar efeitos genotóxicos (KWANKUA, 2010; PARAMJIT et al., 2009).

O acúmulo de dados sugerindo que a mutagenicidade é um parecer razoável para a carcinogenicidade e o rápido crescimento da literatura científica relacionada à genotoxicidade e à mutagenicidade, despertaram os governos mundiais sobre o risco dos agentes químicos para a população. Desde então, os órgãos de saúde pública e agências ambientais acrescentaram a análise de mutagenicidade a ser avaliada em sua bateria de testes antes que agentes químicos, aditivos alimentares e medicamentos fossem introduzidos no mercado (RIBEIRO et al., 2003). No Brasil, os testes de ecogenotoxicidade têm sido empregados desde a década de 80, visando uma melhor avaliação das condições ambientais (BUCKER, 2006).

As informações sobre a toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade das substâncias podem ser fornecidas através de ensaios realizados com plantas (RODRIGUES et al., 1997), uma vez que estudos citogenéticos nestes organismos têm a capacidade de descrever possíveis alterações em seus cromossomos causadas por substâncias mutagênicas (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012).

Entre as principais espécies utilizadas, encontra-se *Allium cepa*. A espécie permite a avaliação de danos no DNA, tais como aberrações cromossômicas e distúrbios no ciclo mitótico (LEME; MARIN-MORALES, 2009). O teste de micronúcleo em célula mãe do grão de pólen de *Tradescantia* (Trad-MCN) é considerado uma valiosa ferramenta por muitos pesquisadores devido à simplicidade da metodologia e sensibilidade à exposição aos agentes genotóxicos (GUIMARÃES et al., 2000). Trata-se de um teste de mutação em célula germinativa extremamente sensível, de exposição curta e avaliação simples, onde as plantas

podem ser diretamente expostas ao contaminante, sem que haja diluição ou filtração da amostra (STEINKELLNER et al., 1999). Dados obtidos em experimentos com esse vegetal indicam resultados similares aos testes com cultura de células de mamíferos e bactérias (CARVALHO, 2005).

Além de vegetais superiores, invertebrados da fauna terrestre também têm sido propostos como organismos bioindicadores para a avaliação de substâncias tóxicas presentes no solo (FONTANETTI et al., 2011). Eles têm mostrado grande potencial em se tornar um alerta precoce em solos contaminados, sendo que organismos da macrofauna são os mais adequados para esta finalidade (PAOLETTI et al., 1991). Para Opiyo (2003), informações a respeito dos efeitos causados por contaminantes no ambiente devem ser fornecidas levando em consideração a toxicidade da substância em invertebrados não alvos. Neste sentido, artrópodos e anelídeos têm sido muito utilizados em análises de toxicidade (NATAL-DALUZ et al., 2004; FONTANETTI et al., 2011).

Diplópodos, por estarem em íntimo contato com o solo e por serem colonizadores de suas várias camadas, podem ser muito influenciados pela presença de metais, compostos orgânicos e substâncias complexas presentes no ecossistema (FONTANETTI et al., 2011; SOUZA et al., 2014). Nestes organismos, as alterações morfológicas são utilizadas como biomarcadores na investigação de compostos químicos específicos e no monitoramento de efeitos agudos e crônicos. A análise histológica e ultra-estrutural de diferentes órgãos tem se tornado uma ferramenta amplamente utilizada em estudos com invertebrados com o objetivo de investigar danos causados por substâncias tóxicas (FONTANETTI et al., 2010). À análise morfológica, pode-se somar a análise de proteínas de estresse nos tecidos destes animais, embora pouco seja conhecido sobre as mesmas em invertebrados de solo, uma vez que a aplicação desta técnica nestes animais é recente quando comparada aos estudos com organismos aquáticos (KNIGGE et al., 2014; STAEMPFLI et al., 2002).

Enquitreídeos, pertencentes à Classe Oligoqueta, são anelídeos terrestres ecologicamente relevantes e, assim como diplópodos, possuem importante papel na decomposição da matéria orgânica e no processo de bioturbação do solo (DIDDEN, 1993). Os protocolos para o teste de reprodução com estes animais (ISO 16387, 2004; OECD 220, 2004), recomendam o uso da espécie *Enchytraeus albidus*, porém também sugerem o uso de espécies alternativas. Entre elas, a espécie *Enchytraeus crypticus* tem ganhado crescente importância devido a suas vantagens práticas (CASTRO-FERREIRA, 2012). Os testes de reprodução são importantes para estudos ecotoxicológicos devido a sua influência na

dinâmica populacional (DENNEMAN; STRAALLEN, 1991). O princípio do teste confere em expor os organismos em diferentes concentrações a serem testadas e, após quatro semanas, os efeitos na reprodução são avaliados pela contagem do número de descendente no solo (ISO 16387, 2004). Além do uso de enquitreídeos, testes de reprodução também são realizados com espécies de minhocas (*Eisenia fetida* e *E. andrei*) e colêmbolos (*Folsomia candida*). Os testes com estas espécies são semelhantes dos testes com enquitreídeos, alterando, principalmente, o tempo de exposição (ISO 11267, 1999; 11268-2, 2012).

Considerando o exposto acima e a necessidade da avaliação ecotoxicológica deste sistema metalo-inseticida para que sua aplicação seja ambientalmente segura, o presente estudo objetivou analisar o potencial tóxico dos complexos metalo-inseticidas [Mg(5-metilphen)(hesperitina)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>COO) e [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>COO) por meio de análises citogenéticas em células vegetais (*A. cepa* e *T. pallida*), análises morfológicas, histoquímicas e imunohistoquímicas no intestino médio de diplópodos (*Rhinocricus padbergi*) e bioensaios de mortalidade e reprodução com minhocas (*E. fetida*) e reprodução com enquitreídeos (*E. crypticus*) e colêmbolos (*F. candida*).

## 7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, conclui-se que:

- A utilização de diferentes organismos testes foi importante para a avaliação do potencial tóxico dos metalo-inseticidas testados.
- Os bioindicadores vegetais, *A. cepa* e *T. pallida*, foram eficientes na avaliação do potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico dos metalo-inseticidas testados. A espécie *A. cepa* mostrou-se mais sensível e revelou que [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>COO) apresenta maior toxicidade.
- As análises morfológicas do intestino médio de diplópodos revelaram que os metalo-inseticidas não são capazes de induzir alterações neste órgão, sugerindo que sua aplicação é segura para a espécie. Porém, a análise das proteínas de estresse sugere que os metalo-inseticidas podem influenciar na homeostase celular, uma vez que induzem maior expressão de HSP70.
- As minhocas não são afetadas pelo metalo-inseticida [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>COO), uma vez que os parâmetros analisados, reprodução, mortalidade e peso corpóreo, não foram alterados.
- Os testes de reprodução com enquitreídeos e colêmbolos revelaram que as maiores concentrações podem interferir na geração de juvenis destas espécies, principalmente para enquitreídeos.
- De acordo com os testes de reprodução, a espécie mais sensível foi *E. crypticus*, seguida de *F. candida* e *E. fetida*.
- O metalo-inseticida [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>COO) apresenta maior potencial tóxico quando comparado ao metalo-inseticida [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>COO), portanto recomenda-se cautela na sua aplicação. Apesar disso, eles podem ser uma alternativa mais segura no combate às formigas cortadeiras, principalmente se comparado a outros formicidas reconhecidamente tóxicos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAISCA – Associação Brasileira das Empresas Fabricantes de Iscas Inseticidas. **ABRAISCA defende a sulfluramida.** Disponível em: <http://www.abraisca.org.br/noticia01.html> Acesso: 14 de maio de 2012.

ALCÂNTARA, D.F.A.; RIBEIRO, H.F.; CARDOSO, P.C.S.; ARAÚJO, T.M.T.; BURBANO, R.R.; GUIMARÃES, A.C.; KHAYAT, A.S.; BAHIA, M.O. *In vitro* evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of artemether, an antimalarial drug, in a gastric cancer cell line (PG100). **J. Appl. Toxicol.**, v. 33, p. 151-156, 2013.

ALMEIDA, R.N.A.; PEÑAFLORES, M.F.G.V.; SIMOTE, S.Y.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F. Toxicity of substances isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2007.

ALVES, P.R.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; MARTINES, A.M.; SOUSA, J.P.; PASINI, A. Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 105, p. 65-71, 2014.

AMORIM, M.J.B.; ROMBKE, J.; SCHEFFCZYK, A.; SOARES, A.M.V.M. Effect of different soil types on the enchytraeids *Enchytraeus albidus* and *Enchytraeus luxuriosus* using the herbicide Phenmedipham. **Chemosphere**, v. 61, p. 1102-1114, 2005.

ANJANA, S.; THOPPIL, J.E. Analysis of cytotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk. using *allium cepa* root tip assay. **International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences**, v. 2, p. 562-566, 2013.

ANSARI, K.M.; DHAWAN, A.; KHANNA, S.K.; DAS, M. *In vivo* DNA damaging potential of sanguinarine alkaloid, isolated from argemone oil, using alkaline Comet assay in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 147-153, 2005.

AQUINO, I.; PERAZZO, F.F.; MAISTRO, E.L. Genotoxicity assessment of the antimalarial compound artesunate in somatic cells of mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1335–1339, 2011.

ARRATE, J.A.; RODRIGUEZ, P.; MARTINEZ-MADRID, M. Effects of three chemicals on the survival and reproduction of the oligochaete worm *Enchytraeus coronatus* in chronic toxicity tests. **Pedobiologia**, v. 46, p. 136–149, 2002.

ASITA, A.O.; MOKHOBLO, M.M. Clastogenic and cytotoxic effects of four pesticides used to control insect pests of stored products on root meristems of *Allium cepa*. **Environment and Natural Resources Research**, v. 3, p. 133-145, 2013.

BIAVATTI, M.W.; WESTERLON, R.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; PEÑAFLORES, M.F.G.V.; BUENO, O.C.; ELLENA, J. Leaf-cutting ants toxicity of limononic acid and degraded limonoids from *Raulinoa echinata*. X-Ray structure of Epoxy-fraxinellone. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 16, p. 1443-1447, 2005.

BOERSMA, M.G.; VERVOOT, J.; SZYMUSIAK, H.; LEMANSKA, K.; TYRAKOWSKA, B.; CENAS, N.; SEGURA-AGUILAR, J. RIETJENS, I.M.C.M. Regioselectivity and reversibility of the glutathione conjugation of quercetin quinone methide. **Chem, Res. Toxicol.** v. 13, p. 185-191, 2000.

BOND, J.E; SIERWALD, P. Current status of the Myriapod class Diplopoda (Millipedes): Taxonomic diversity and phylogeny. **Annu. Rev. Entomol.** v. 52, p. 401-420, 2007.

BOOS, G.; STOPPER, H. Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. **Toxicology Letters**, v. 116, p. 7-16, 2000.

BORS, W.; SARAH, M. Radical scavenging by flavonoid anti-oxidants. **Free Radical Research Communications**, v. 2, p. 289–294, 1987.

BOTS, J.; DE BRUYN, L.; SNIJKERS, T.; VAN DEN BRANDEN, B.; VAN GOSSUM, H. Exposure to perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) adversely affects the life-circle of the damselfly *Enallagma cyathigerum*. **Environmental Pollution**, v 158, p 901-905, 2010.

BRESLIN, D.T.; YU, C.; LY, D.; SCHUSTER, G.B. Structural modification changes the DNA binding mode of cation-substituted anthraquinone photonucleases: association by intercalation or minor groove binding determines the DNA cleavage efficiency. **Biochemistry**, v. 36, p. 10463–10473, 1997.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.S. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000, 1367 pp.

BUCKER, A.; CARVALHO W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagenicidade e genotoxicidade em *Engenmannia virescens*. **Acta Amaz.** v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006.

BUENO, F.C.; FORTI, L.C.; BUENO, O.C. Toxicity of Hydramethylnon to the Leaf-cutting Ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 60, p. 150-153, 2013.

CALABRESE, V.; LODI, R.; TONON, C.; AGATA, V.D.; SAPIENZA, M.; SCAPAGNINI, G.; MANGIAMELI, A.; PENNISI, G.; STELLA, A.M.G.; BUTTERFIELD, D.A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. **Journal of the Neurological Sciences**. v.233, p. 145-162, 2005.

CAMPAROTO, M.L.; TEIXEIRA, R.O.; MANTOVANI, M.S. VICENTINI, V.E.P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. And *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genet. Mol. Biol.**, v. 25, 2002.

CARVALHO, H.A. A *Tradescantia* como bioindicador vegetal na monitoração dos efeitos clastogenicos das radiações ionizantes. **Radiologia Brasileira**, v. 38, p. 459-462, 2005.

CASTRO-FERREIRA, M.P.; ROELOFS, D.; VAN GESTEL, C.A.M.; VERWEIJ, R.A.; SOARES, A.M.V.M.; AMORIM, J.B. *Enchytraeus crypticus* as model species in soil ecotoxicology. **Chemosphere**, v. 87, p. 1222–1227, 2012.

CHANDRA, P.; KHUDA-BUKHSH, A.R.; Genotoxic effects of cadmium chloride and azadirachtin treated singly and in combination in fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, p. 194-201, 2004.

CHELINHO, S. DOMENE, X.; ANDRES, P.; NATAL-DA-LUZ, T.; NORTE, C.; RUFINO, C.; LOPES, I.; CACHADA, A.; ESPINDOLA, E.; RIBEIRO, R.; DUARTE, A.C.; SOUSA, J.P. Soil microarthropod community testing: A new approach to increase the ecological relevance of effect data for pesticide risk assessment. **Applied Soil Ecology**, v. 83, p. 200-209, 2014.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, p. 1523, 2013.

CROMMENTUIJN, T.; VAN SATRAALEN, N.M. Influence of Cadmium on Life-History Characteristics of *Folsomia candida* (Willem) in an Artificial Soil Substrate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 26, p. 216-227, 1993.

DEMIRHAN, O.; DEMIR, C.; TUNÇ, E.; İNANDIKLIOĞLU, N.; SÜTCÜ, N.; SADIKOĞLU, N.; ÖZCAN, B. The genotoxic effect of nicotine on chromosomes of human fetal cells: The first report described as an important study. **Inhalation Toxicology**, v. 23, p. 829–834, 2011.

DENNEMAN, C.A.J.; STRAALEN, N.M. The toxicity of lead and copper in reproduction tests using the oribatid mite *Platynothrus peltifer*. **Pedobiologia**, v. 35, p. 305-311, 1991.

DHINGRA, V.K., RAO, V., NARASU, L.M. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. **Life Sci.**, v. 66, p. 279–300, 2000.

DIDDEN, W.A.M. Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. **Pedobiologia**, v. 37, p. 2–29, 1993.

DIDDEN, W.A.M., RÖMBKE, J. Enchytraeids as indicator organisms for chemical stress in terrestrial ecosystems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 50, p. 25–43, 2001.

DITTBRENNER, N.; CAPOWIEZ, Y.; KÖHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Stress protein response (Hsp70) and avoidance behaviour in *Eisenia fetida*, *Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris* when exposed to imidacloprid. **Journal of Soils and Sediments**, v. 12, p. 198-206, 2011.

EVSEEVA, T.I.; GERAS'KIN, S.A.; SHUKTOMOVA, I.I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmental Radioactivity**.v. 68, p. 235-248, 2003.

FAN, Y.O.; JIN, Y.H.; MA, Y.X.; ZHANG, Y.H.. Effects of perfluorooctane sulfonate on spermiogenesis function of male rats. **Wei Sheg Yan Jiu**. v.34, p. 37-39, 2005.

FASULO, A. M.; MAISANO, M.; GIANNETTO, A.; PARRINO, V.; GENNUSO, F.; D'AGATA, A. Immunohistochemical and molecular biomarkers in *Coris julis* exposed to environmental contaminants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 873-882, 2010.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Reviews of Physiology**, v. 61, p. 243- 282, 1999.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLES, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 125- 132, 2011.

FERNANDES, L.H.; NESSIMIAN, J.L.; MENDONÇA, M.C. Collembola poduromorpha as bioindicator of anthropogenic impact on “restinga” areas in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 67, p. 41-59, 2009.

FISKEJÖ, G. The *Allium cepa* test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 8, p. 291-298, 1993.

FISKEJO, G. The *Allium* test—an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutat.Res.** v. 197, p. 243–260, 1988.

FOUNTAIN, M.T.; HOPKIN, S.P. *Folsomia candida* (Collembola): a “standard” soil arthropod. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 50, p. 201-222, 2005.

FONTANETTI, C.S., CAMARGO-MATHIAS, M.I., TIRITAN, B.M.S. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 23, p. 487–493, 2006.

FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; TIRITAN, B.M.S. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Spirobolida). **Iheringia**, v. 94, 2004.

FONTANETTI, C.S.; MOREIRA-DE-SOUSA, C.; PINHEIRO, T.G.; SOUZA, R.B.; FRANCISCO, A. Digestive System. In: MINELLI, A. (Ed.). **The Myriapoda**. v. 2. Boston: Brill, 2015, p. 109.

FONTANETTI, C.S.; NOGAROL, L.R.; SOUZA, R.B.; PEREZ, D.G.; MAZIVIERO, G.T. Bioindicators and biomarkers in the assessment of soil toxicity. In: PASCUCCI, S. (Ed.). **Soil Contamination**. Croácia: InTech, p. 143-168, 2011.

FRANCISCO, A.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; NETO, N.R.; FONTANETTI, C.S. Histopathological changes in the perivisceral fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Spirobolida) triggered by biosolids. **Environ Sci Pollut Res**, v. 22, p 18590-18600, 2015.

GERAS'KIN, S.; EVSEEVA, T.; OUDALOVA, A. Plants as a tool for the environmental health assessment. In: NRIAGU, J.O. (Ed.). **Encyclopedia of Environmental Health**. San Diego, CA, USA: Elsevier Science, 2011, p. 571-579.

GINZKEY, C.; FRIEHS, G.; KOEHLER, C.; HACKENBERG, S.; HAGEN, R.; KLEINSASSER, N.H. Assessment of nicotine-induced DNA damage in a genotoxicological test battery. **Mutation Research**, v. 751, p. 34-39, 2013.

GINZKEY, C.; KAMPFINGER, K.; FRIEHS, G.; KÖHLER, C.; HAGEN, R.; RICHTER, E.; KLEINSASSER, N.H. Nicotine induces DNA damage in human salivary glands. **Toxicology Letters**, v. 184, p. 1-4, 2009.

GODOY, J. A. P; FONTANETTI, C. S. Diplopods as bioindicators of soils: analysis of midgut of individuals maintained in substract containing sewage sludge. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 210, p. 389-398, 2010.

GOLOVATCH, S.I.; KIME, R.D. Millipede (Diplopoda) distributions: A review. **Soil Organisms**, v. 81, p. 565–597, 2009.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**. v. 99, p. 273-291, 1981.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**. v. 310, p. 175-185, 1994.

GUADAÑO, A.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; PEÑA, E. Genotoxicity of the insecticide rotenone in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 414, p. 1-7, 1998.

GUIMARAES, E.T.; DOMINGOS, M.; ALVES, E.S.; CALDINI, N.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; SALDIVA, P.H.N. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. **Environ. Exp. Bot.**, v. 44, p. 1-8, 2000.

HAMER, B.; HAMER, D.P.; MÜLLER, W.E.G.; BATEL, R. Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of environmental pollution: a field study. **Environment International**. v.30, p. 873-882, 2004.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, **Biochem. Pharmacol.**, v. 32, p. 1141–1148, 1983.

HODNICK, W.F.; KUNG, F.S.; ROETTGER, W.J.; BOHMONT, C.W.; PARDINI, R.S. Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. **Biochem. Pharmacol.**, v. 35, p. 2345–2357, 1986.

HONEMANN, L.; NENTWUIG, W. Are survival and reproduction of *Enchytraeus albidus* (Annelida: Enchytraeidae) at risk by feeding on *Bt*-maize litter? **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 351-355, 2009.

HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The Biology of Millipedes**. Oxford: Oxford University Press, 1992. 233p.

HOPKIN, S. P.; WATSON, K.; MARTIN, M. H.; MOULD, M. L. The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chilopoda; Diplopoda). **Bijdragen tot de Dierkunde**, v. 55, p. 88-94, 1985.

HOPKIN, S.P.; READ, H.J. **The Biology of Millipedes**. 1 ed. New York: Oxford University Press, 1992. 233 pp.

HÖSS, S.; AHLF, W.; BERGTOLD, M.; BLUEBAUM-GRONAU, E.; BRINKE, M.; DONNEVERT, G.; MENZEL, R.; MÖHLENKAMP, C.; RATTE, H.T.; TRAUNSPURGER, W.; DANWITZ, B.; PLUTA, H.J. Interlaboratory comparison of a standardized toxicity test using the nematode *Caenorhabditis elegans* (ISO 10872). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, 2012.

HUKKANEN, J.; GOURLAY, S.G.; KENKARE, S.; BENOWITZ, N.L. Influence of menstrual cycle on cytochrome P450 2A6 activity and cardiovascular effects of nicotine. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, p. 159–169, 2005.

IRANSHANI, M.; REZAEI, R.; PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F. Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. **Life Sciences**, 2015.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, detergents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annu. Rev. Entomol.** v. 51, p. 45-66, 2006.

ISO (International Organisation for Standardisation). Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 2: Method for the determination of effects on reproduction. ISO 11268–2, 1998.

ISO (International Organisation for Standardisation). Soil Quality – Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. ISO 11267, 1999.

ISO (International Organisation for Standardisation). Soil Quality – Effects of Pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.). Determination of effects on reproduction. ISO 16387, 2002.

ISO (International Organisation for Standardisation).. Soil quality – effects of pollutants on earthworm – Part 2: determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida/Eisenia andrei*, ISO 11268-2, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983.123p.

KAWASAKI, Y.; GODA, Y.; NOGUCHI, H.; YAMADA, T. Identification of adducts formed by reaction of purine bases with a mutagenic anthraquinone, lucidin: mechanism of mutagenicity by anthraquinones occurring in Rubiaceae plants. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, p. 1971-1973, 1994.

KHALIL, H.; HAMIANI, O.; BITTON, G.; OUZZANI, N.; BOULARBAH, A.; Heavy metal concentration from mining sites in South Morocco: monitoring metal content and toxicity of soil runoff and groundwater. **Environ. Monit. Assess.**, v. 136, p. 147–160, 2008.

KHAN, P.K.; AWASTHY, K.S. Cytogenetic toxicity of neem. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1325-1328, 2003.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 80, p. 183-201, 1998.

KLAYMAN, D.L. Qinghaosu (artemisin): an antimalarial drug from China. **Science**, v. 228, p. 1049-1055, 1985.

KLEINSASSER, N.H.; SASSEN, A.W.; SEMMLER, M.P.; HARREUS, U.A.; LICHT, A.K.; RICHTER, E. The tobacco alkaloid nicotine demonstrates genotoxicity in human tonsillar tissue and lymphocytes. **Toxicological Sciences**, v. 86, p. 309–317, 2005.

KNIGGE, T.; BACHMANN, L.; KÖHLER, H. R. An intron containing, heat inducible stress 70 gene in the millipede *Tachypodoiulus niger* (Julidae, Diplopoda). **Cell Stress Chaperones**, v. 19, p. 741-747, 2014.

KÖHLER, H.R., ALBERTI, G. The Effect of Heavy Metal Stress on the Intestine of Diplopods. In: MEYER, E., THALER, K., SCHEDL, W. (Eds.), **Advances in Myriapodology**. Innsbruck: Berichte des Naturwissenschaftlich-Medizinischen Vereins, 1992, p. 257–267.

KÖHLER, H.R.; ALBERTI, G. The Effect of Heavy Metal Stress on the Intestine of Diplopods. **Ber. Nat. Med.** v. 10, p. 257-267, 1992.

KÖHLER, H.R.; KÖRTJE, K.H.; ALBERTI, G. Content, absorption quantities and intracellular storage sites of heavy metals in Diplopoda (Arthropoda). **Biometals**, v. 8, p. 37–46, 1995.

KOPLIKU, D.; MESI, A. Toxicity Screening of Water Sources in Flooded Agricultural Areas of Nën-Shkodra Lowland Using *Allium cepa* L. Assay. **Journal of Environmental Science and Engineering**, p. 1197-1202, 2012.

KULA, H. Species-specific sensitivity differences of earthworms to pesticides in laboratory tests. In: EIJSACKERS, H., DONKER, M., HEIMBACH, F. (Eds.), **Ecotoxicology of Soil Pollution**. Chelsea: Lewis, 1994, p. 241–250.

KWANKUA, W.; SENGSAI, S.; KULEUNG, C.; EUAWONG, N. Sunlight decreased genotoxicity of azadirachtin on root tip cells of *Allium cepa* and *Eucrosia bicolor*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 949-954, 2010.

LEE, S. M.; LEE, S. B.; PARK, C. H.; CHOI, J. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. **Chemosphere**, v. 65, p. 1074-1081, 2006.

LEITÃO, S.; CEREJEIRA, M.J.; VAN DEN BRINK, P.; SOUSA, J.P. Effects of azoxystrobin, chlorothalonil, and ethoprophos on thereproduction of three terrestrial invertebrates using a natural Mediterranean soil. **Applied Soil Ecology**, v. 76, p. 124–131, 2014.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.

LI, P.C.H.; LAM, E.; ROOS, W.P. Artenusate derived from traditional Chinese medicine induces DNA damage and repair. **Cancer Research**, v. 68, p. 4347-4351, 2008.

LIMA, P.D.L.; YAMADA, E.S.; COSTA, E.T.; PESSOA, C.O.; RABENHORST, S.H.B.; BAHIA, M.O.; CARDOSO, P.C.; SANTOS, R.A.; SMITH, M.A.C.; BURBANO, R.R. Genotoxic effects of rotenone on cultured lymphocytes. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, 2005.

LIMA, M.P.R.; CARDOSO, D.N.; SOARES, A.M.V.M.; LOUREIRO, S. Carbaryl toxicity prediction to soil organisms under high and low temperature regimes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 114, p. 263-272, 2015.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat-shock proteins. **Annu. Rev. Genet.** v. 22, p. 631–677, 1988.

LINS, V.S.; SANTOS, H.R.; GONÇALVES, M.C. The effect of the glyphosate, 2,4-D, atrazine e nicosulfuron herbicides upon the Edaphic collembola (Arthropoda: Ellipura) in a no tillage system. **Neotropical Entomology**, v. 36, 2007.

LIU, S.; ZHANG, F.; CHEN, J.; SUN, G. Arsenic removal from contaminated soil via biovolatilization by genetically engineered bacteria under laboratory conditions. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, p. 1544–1550, 2011.

LOUREIRO, S.; SOARES A.M.V.M.; NOGUEIRA, A.J.A. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. **Environmental Pollution**, v. 138, p. 121-131, 2005.

LUCCHINI, L.C.; PERES, T.B.; ANDRÉA, M.M. Monitoring of pesticide residues in a cotton crop soil. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 35, p. 51-59, 2000.

LUEBKER, D.J.; YORK, R.G.; HANSEN, K.J.; MOORE, J.A.. Neonatal mortality in utero exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) in Sprague-Dawley rats: Dose-response, and biochemical and pharmacokinetic parameters. **Toxicology**. 215, p. 149-169, 2005.

MA, T.H.; KHAN, S.H. Pollen mitosis and pollen tube growth inhibition by SO<sub>2</sub> in cultured pollen tubes of *Tradescantia*. **Environmental Research**, v. 12, p. 144-149, 1976.

MACGREGOR, J.T.; JURD, L. Mutagenicity of plant flavonoids: Structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. **Mutat. Res.**, v. 54, p. 297-309, 1978.

MADANI, S.; COORS, A.; HADDIOUI, A.; KSIBI, M.; PEREIRA, R.; SOUSA, J.P.; ROMBKE, J. Effects of contaminated soils from a former iron mine (Ait Amar, Morocco) on enchytraeids (*Enchytraeus bigeminus*) and predatory mites (*Hypoaspis aculeifer*) in standard laboratory tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 90-97, 2015.

MALUSZYNSKA, J.; JUCHIMIUK, J. Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. **Arh. Hig. Rada. Toksikol.**, v. 56, p. 177-184, 2005.

MERLINI, V. V.; NOGAROL, L. R.; MARIN-MORALES, M. A.; FONTANETTI, C. S. Toxicity of trifluralin herbicide in a representative of the edaphic fauna: Histopathology of the midgut of *Rhinocricus pdebergi* (Diplopoda). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1361-1369, 2012.

MICHEREFF-FILHO, M.; GUEDES, R.N.C.; DELLA-LUCIA, T.M.C.; MICHEREFF, M.F.F.; CRUZ, I. Non-target impact of chlorpyrifos on soil arthropods associated with no-tillage cornfields in Brazil. **International Journal of Pest Management**, v. 50, p. 91-99, 2004.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: HARBONE, J.B. (Org.). **The Flavonoids**. London: Chapman & Hall, 1994, p. 619-652.

MINGUEZ, L.; BRULÉ, N.; SOHM, B.; DEVIN, S.; GIAMBÉRINI, L. Involvement of apoptosis in host-parasite interactions in the *Zebra mussel*. **Plos One**, v. 8, p. 1-7, 2013.

MISIK, M.; MA, T.H., NERSESYAN, A.; MONARCA, S.; KIM, J.K.; KNASMUELLER, S. Micronucleus assays with *Tradescantia* pollen tetrads: an update. **Mutagenesis**, v. 26, p. 215–221, 2011.

MOHAMMED, K. B.; MA, T. H. *Tradescantia*-micronucleus and -stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. **Mutation Research**, v. 426, p. 193-199, 1999.

MONKS, T.J.; JONES, D.C. The Metabolism and Toxicity of Quinones, Quinonimines, Quinone Methides, and Quinone-Thioethers. **Current Drug Metabolism**, v. 3, p. 425-438, 2002.

MORAGA, D.; MEISTERTZHEIM, A. L.; TANGUY-ROYER, S.; BOUTET, I.; TANGUY, A.; DONVAL, A. Stress response in Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> exposed oysters (*Crassostrea gigas*): An immunohistochemical approach. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 141, p. 151-156, 2005.

MORDUE, A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **J. Insect Physiol.**, v. 39, p. 903-924, 1993.

MOTA, T.C.; CARDOSO, P.C.S.; GOMES, L.M.; VIEIRA, P.C.M.; CORRÊA, R.M.S.; SANTANA, P.P.B.; MIRANDA, M.S.; BURBANO, R.R.; BAHIA, M.O. *In vitro* evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of artesunate, an antimalarial drug, in human lymphocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 52, p. 590-594, 2011.

MUPOSHI, V. K.; UTETE, B.; SITHOLE-NIANG, I.; MUKANGENYAMA, S. Active biomonitoring of a subtropical river using glutathione-S-transferase (GST) and heat shock proteins (HSP 70) in *Oreochromis niloticus* as surrogate biomarkers of metal contamination. **African Journals Online**, v. 41, p. 425-431, 2015.

NATAL-DA-LUZ, T.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J.P. Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 2188-2193, 2004.

NETTO, E.; MADEIRA, R.A.; SILVEIRA, F.Z.; FIORI, M.A.; ANGIOLETO, E.; PICH, C.T.; GEREMIAS, R. Evaluation of the toxic and genotoxic potential of acid mine drainage using physicochemical parameters and bioassays. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, p. 511-516, 2013.

NOGAROL, L. R.; FONTANETTI, C.S. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: Tissue responses of the midgut. **Micron**, v. 41, p. 239-246, 2010.

NOVAIS, S.C.; SOARES, A.M.V.M.; AMORIM, M.J.B. *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta) exposed to several toxicants: effects on survival, reproduction and avoidance behaviour. **Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Biological Responses to Contaminants**, p. 237-242, 2010.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). OECD-Guideline for Testing of Chemicals No. 220. Enchytraeidae Reproduction Test. Paris, 2003.

OFUYA, T.I.; OKUKU, I.E. Insecticidal effect of some plant extracts on the cowpea aphid *Aphis craccivora* Koch (Homoptera: Aphidae). **Anz. Schädlingskunde**, v. 67, p. 127-129, 1994.

OLIVEIRA, R.M.M.; SOUZA, J.F.F.; DE AGUIAR, I.; SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; CARLOS, R.M.J. Structural effects on the hesperidin properties obtained by chelation to magnesium complexes. **Inorg Biochem**, v. 129, p. 35-42, 2013.

OLIVERO-VERBEL, J. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in biological samples from the north coast of Colombia. **Environmental pollution**, v. 142, n. 2, p. 367-372, 2006.

OPIYO, P. Guidelines for registration of biopesticides. In: WABULE, M.N.; NGARUIYA, P.N.; KIMMINS, F.K.; SILVERSIDE, P.J. (Eds.). **Registration for biocontrol agents in Kenya**. Aylesford, UK: Natural Resources International Ltd. 2003. p. 87-97.

PALANIKUMAR, L.; RAGUNATHAN, I.; PANNEERSELVAM, N. Chromosome aberrations induced by curcumin and aloin in *Allium cepa* L. root meristem cells. **Turk. J. Biol.**, v. 35, p. 145-152, 2011.

PAOLETTI, M.G.; FAVRETTO, M.R.; STINNER, B.R.; PURRINGTON, F.F.; BATER, J.E. Invertebrates as bioindicators of soil use. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 34, p. 341-362, 1991.

PARAMJIT, G.; SINGH, S.P.; PRABHAKAR, P.V.; REDDY, U.A.; BALASUBRAMANYAM, A.; MAHBOOB, M.; RAHMAN, M.F.; MISRA, S. *In vivo* assessment of genotoxic effects of *Annona squamosa* seed extract in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 47, p. 1964-1971, 2009.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. 4th ed., London: J&A. Churchill, v. 2, 1985, 998p.

PEDRO-ESCHER, J.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; FONTANETTI, C.S. Sugarcane Vinasse, a Residue of Ethanol Industry: Toxic, Cytotoxic and Genotoxic Potential Using the *Allium cepa* Test. **Journal of Environmental Protection**, v. 7, p. 602-612, 2016.

PEDRO-ESCHER, J.; MAZIVIERO, G.T.; FONTANETTI, C.S. Mutagenic Action of Sugarcane Vinasse in the *Tradescantia Pallida* Test System. **Ecosystem & Ecography**. v. 4, p. 2-4, 2014.

PEREZ, D. G.; FONTANETTI, C. S. Assessment of the toxic potential of sewage sludge in the midgut of the diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 128, p. 437-444, 2011a.

PEREZ, D. G.; FONTANETTI, C. S. Hemocital responses to environmental stress in invertebrates: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 177, p. 437-447, 2011b.

POGINSKY, B.; WESTENDORF, J.; BLÖMEKE, B.; MARQUARDT, H.; HEWER, A.; GROVER, P.L.; PHILLIPS, D.H. Evaluation of DNA-binding activity of hydroxyanthraquinones occurring in *Rubia tinctorum* L. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1265–1271, 1991.

POHREN, R.S.; COSTA, T.C.; VARGAS, V.M.F. Investigation of sensitivity of the *Allium cepa* test as an alert system to evaluate the genotoxic potential of soil contaminated by heavy metals. **Water Air Soil Pollut**, v. 224, p. 1460, 2013.

POSTUMA, L.; BAERSELMAN, R.; VAN VEEN, R.P.M.; BREEMEN, E.M.D. Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 38, p. 108-121, 1997.

PULI, L.K.; PATIL, P.A. Genotoxic evaluation of morphine, buprenorphine, pentazocine, and noscapine by micronucleus and comet assay in albino mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 39, p. 265-268, 2007.

PYZA, E.; MAK, P.; KRAMARZ, P.; LASKOWSKI, R. Heat Shock Proteins (HSP70) as Biomarkers in Ecotoxicological Studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 38, p. 244-251, 1997.

RAJESHKUMAR, S.; MUNUSWAMY, N. Impact of metals on histopathology and expression of HSP 70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island, South East Coast, India. **Chemosphere**, v. 83, p. 415-421, 2011.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, v. 390, p. 121-127, 1997.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SAVLADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p.21-27.

RICHARD, J.M.; CHARLES, J.W.; LISA, J.W. Artemisin antimalarials: preserving the “Magic Bullet”. **Drug Development Research**, v. 71, p. 12-19, 2010.

RIVERA, M.L.C.; TÉLLEZ, M.G.O.; CASTAÑEDA, A.; RODRIGUEZ-ARNAIZ, R. Emetine and/or its metabolites are genotoxic in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 70, p. 1713-1716, 2007.

RODRIGUES, G. S.; MA, T. H.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L.H. Tradescantia bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis - a review. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, p. 325-359, 1998.

RODRIGUES, G. S.; MA, T.H.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L. H. *Tradescantia* Bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. **Critical Reviews Science**. v. 16, p. 325-359, 1997.

RODRIGUES, G. S.; MA, T.H.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L. H. *Tradescantia* Bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. **Critical Reviews Science**. v.16, p. 325-359, 1997.

RODRÍGUEZ, Y. A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO, J.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; FERREIRA, R. A. C.; FONTANETTI, C. S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p. 438–442, 2015.

ROMBKE, J. Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. **Pedobiologia**, v. 47, p. 607–616, 2003.

ROMBKE, J.; MOSER, T. Validating the enchytraeid reproduction test: organisation and results of an international ringtest. **Chemosphere**, v. 46, p. 1117–1140, 2002.

ROSENKRANZ, H.S.; KLOPMAN, G. Relationship between electronegativity and genotoxicity. **Mutation Research**, v. 328, p. 215-227, 1995.

RUPPERT E. E.; BARNES R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. São Paulo: Roca, 6a ed., 2005. 1029p.

SALEHZADEH, A.; AKHKHA, A.; CUSHLEY, W.; ADAMS, R.L.P.; KUSEL, J.R.; STRANG, R.H.C. The antimutagenic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 33, p. 681-689, 2003.

SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Piretróides – uma visão geral. **Alim. Nutr.**, v.18, p. 339-349, 2007.

SAVAGE, J.R.K.; PAPWORTH, D.G. An investigation of LET 'finger-prints' in *Tradescantia*. **Mutation Research**, v. 422, p. 313–322, 1998.

SCHAEFER, M. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology – evaluation of different test systems in soil toxicity assessment. **J. Soils & Sediments**, v. 3, p. 79-84, 2003.

SCHOEREDER, J.H.; SILVA, H.M.M.; CARVALHO, A.F.; MUSCARDI, D.C. Proposed lime stone treatment as pest control fails for the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Crop Protection**, v. 42, p. 79-82, 2012.

SCHUBART, O. Os Myriápodes e suas relações com a agricultura. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 2, p. 205-234, 1942.

SILVA, D.I.; GASPAR, J.; COSTA, G.G.; RODRIGUES, A.S.; LAIRES, A.; RUEFF, J. Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutic agents. **Chemico-Biological Interactions**. v. 124, p. 29-51, 2000.

SILVA, I.D.; A.S. RODRIGUES, A.S.; J. GASPAR, J.; A. LAIRES, A.; J. RUEFF, J. Metabolism of galangin by rat cytochromes P450: relevance to the genotoxicity of galangin. **Mutation Research**, v. 393, p. 247–257, 1997.

SILVA-NETO, J.P.; BARRETO, R.A.; PITANGA, B.P.S.; SOUZA, C.S.; SILVA, V.D.; SILVA, A.R.; VELOZO, E.S.; CUNHA, S.D.; BATATINHA, M.J.M.; TARDY, M.; RIBEIRO, C.S.O.; COSTA, M.F.D.; EL-BACHA, R.S.; COSTA, S.L. Genotoxicity and

morphological changes induced by the alkaloid monocrotaline, extracted from *Crotalaria retusa*, in a model of glial cells. **Toxicol**, v. 55, p. 105-117, 2010.

SILVA-ZACARIN, E.C.M.; CHAUZAT, M. P.; ZEGGANE, S.; DRAJNUDEL, P.; SCHURR, F.; FAUCON, J.P.; MALASPINA, O.; ENGLER, J.A. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**, v. 1, p. 696-703, 2012.

SIVAKUMAR, V.; R. PRAKASH, R.; M. R. MURALI, M.R.; H. DEVARAJ, H.; DEVARAJ, S.N. In Vivo Micronucleus Assay and GST Activity in Assessing Genotoxicity of Plumbagin in Swiss Albino Mice. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 28, p. 499–507, 2005.

SNYDER, R.D.; GILLIES, P.J. Reduction of genistein clastogenicity in Chinese hamster V79 cells by daidzein and other flavonoids. **Food and Chemical Toxicology**. v. 41, p. 1291-1298, 2003.

SOBKOWIAK, R.; LESICKI, A. Genotoxicity of nicotine in cell culture of *Caenorhabditis elegans* evaluated by the comet assay. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 32, p. 252–257, 2009.

SOUZA, R. B.; FONTANETTI, C. S. Alterations in the fat body cells of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda) resulting from exposure to substrate containing sewage sludge. **Microscopy and Microanalysis**, v. 18, p. 317-323, 2012.

SOUZA, T.S.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; BOZZATTO, V.; FONTANETTI, C.S. The use of diplopods in soil ecotoxicology – A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 103, p. 68–73, 2014.

SOUZA, T.S.; HENCKLEIN, F.A.; ANGELIS, D.F.; FONTANETTI, C.S. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 1627-1636, 2013.

STAEMPFLI, C., SLOOTEN, B. V. K.; TARRADELLAS, J. Hsp70 instability and induction by a pesticide in *Folsomia candida*. **Biomarkers**, v. 7, p. 68-79, 2002.

STEINKELLNER, H.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S. *Tradescantia*-micronucleus assays for the assessment of the clastogenicity of Austrian water. **Mutation Research**. v. 426, p. 113-116, 1999.

STOCKHOLM CONVENTION ON PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS. **Adoption of amendments to annexes A, B AND C**, 2009.

SUYAMA, F.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.J.A.; RODRIGUES, G.S.; DOMINGOS, M.; ALVES, E.S.; CARVALHO, H.A.; SALDIVA, P.N.H. Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallidavar purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of X-rays. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, p. 127-129, 2002.

TANIWAKI, R.H.; ROSA, A.H.; LIMA, R.; MARUYAMA, C.R.; SECCHIN, L.F.; CALIJURI, M.C.; MOSCHINI-CARLOS, V. A influência do uso e ocupação do solo na qualidade e genotoxicidade da água no reservatório de Itupararanga, São Paulo, Brasil. **Interciencia**, v. 38, p. 164-170, 2013.

TANIYASU, S.; KANNAN, K.; HORII, Y.; HANARI, N.; YAMASHITA, N. A survey of perfluorooctane sulfonate and related perfluorinated organic compounds in water, fish, birds and humans from Japan. **Environ. Sci. Technol.** v. 37, p 2634-2639, 2003.

TEDESCO, S.B.; LAUGHINGHOUSE, H.D. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. In: SRIVASTAVA, J.K. (Ed.). **Environmental Contamination**. Croácia: InTech, 2012.

THOMAS, P. J.; QU, B. H.; PEDERSEN, P.L. Defective protein folding as a basis of human disease. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, p. 456-459, 1995.

TRUSHIN, M.V.; RATUSHNYAK, A.Y.; ARKHAROVA, I.A.; RATUSHNYAK, A.A. Genetic alterations revealed in *Allium cepa*-test system under the action of some xenobiotics. **World Applied Sciences Journal**, v. 22, p. 342-344, 2013.

TRUTĂ , E.; ZAMFIRACHE, M.M.; OLTEANU, Z. Caffeine induced genotoxic effects in *Phaseolus vulgaris* L. e *Raphanus sativus* L. **Botanica Serbica**, v. 35, p. 49-54, 2011.

UNEP – United Nations Environment Programme. Stockholm Convention on Persistent Organic Polltants, 2007.

USEPA - Special review and registration division. Sulfluramid registration review final decision. Registration Review Case 7411. Disponível em: <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2008/May/Day-16/p10919.pdf> Acesso: 25 de abril de 2012.

VERREAULT, J.; HOUDE, M.; GABRIELSEN, G.W.; BERGER, U.; HAUKAS, M.; LETCHER, R.J.; MUIR, D.C.G. Perfluorinated alkyl substance in plasma, liver, brain and eggs of glaucous gulls (*Larus hyperboreus*) from the Norwegian arctic. **Environ. Sci. Technol.** v. 39, p. 7439-7445, 2005.

WANG, Z.Y.; ZOU, L.Z.; FAN, B.L.; PENG, Y.K. Abnormal metaphase cell division induced by microtubules depolymerization and photosystem II inhibiting herbicides. **Cytologia**, v. 71, p. 289-295, 2006.

WESTENDORF, J.; MARQUARDT, H.; POGINSKY, B.; DOMINIAK, M.; SCHMIDT, J. Genotoxicity of naturally occurring hidroxyanthraquinones. **Mutation Research**, v. 240, p. 1-12, 1990.

WESTENDORF, J.; PFAU, W.; SCHULTE, A. Carcinogenicity and DNA adduct formation observed in ACI rats after long-term treatment with madder root, *Rubia tinctorum* L. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 2163-2168, 1998.

ZACHARIA, J.T. Ecological effects of pesticide. In: STOYTCHIEVA, M. (Ed.). **Pesticides in the modern world** – Risks and benefits. Croácia: InTech, 2011. p. 129-142.

ZANGER, M.; ALBERTI, G.; KUHN, M.; KOHLER, H.R. The stress-70 protein family in diplopods: induction and characterization. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 165, p. 622-627, 1996.

ZANUNCIO, J.C.; MAGESTE, G.; PEREIRA, J.M.M.; ZANETTI, R. Utilización del cebo Mirex-S (Sulfluramida 0.3%) para el control de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) em área estratificada de hormigueros. **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 26, p. 157-160, 2000.

ZHULIDOV, A.V.; DUBOVA, N.A. Mercury and cadmium accumulation by *Rossiulus kesseleri* (Diplopoda) at various levels of metals in food. **Ekologiya**, v. 19, p. 86–88, 1998.