
**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

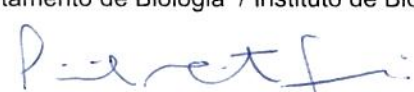
AUTOR: RAPHAEL BASTÃO DE SOUZA

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:



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



Pós-Doutoranda PRISCILA CINTRA SOCOLOWSKI
CEIS / IB Rio Claro



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



Prof. 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 padbergi*, *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, $[\text{Mg}(5\text{-Cl-phen})(\text{hesperetin})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ and $[\text{Mg}(5\text{-methyl-phen})(\text{hesperetin})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ 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 padbergi*, *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 $[\text{Mg}(5\text{-methyl-phen})(\text{hesperetin})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ 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 $[\text{Mg}(5\text{-methyl-phen})(\text{hesperetin})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ 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 $[\text{Mg}(5\text{-methyl-phen})(\text{hesperetin})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ complex shows higher potential toxicity when compared to $[\text{Mg}(5\text{-Cl-phen})(\text{hesperetin})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$.

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

SUMÁRIO

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

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

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 dodecacoloro 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_n(L)_m(L'-L')_k](PF₆)_x (OLIVEIRA, 2012).

Especificamente, trata-se de um complexo de metal inorgânico (M), *cis*-[M_n(L)_m(L'-L')_k](PF₆)_x, 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)(H₂O)₂](CH₃COO) e [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) (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⁻¹, 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).

Enquitrédeos, 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-metil-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) e [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) 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*).

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo geral analisar o potencial tóxico dos metalo-inseticidas $[\text{Mg}(5\text{-Cl-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ e $[\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$, por meio de diferentes biomarcadores e organismos-testes não-alvos.

Os objetivos específicos consistem em:

- Avaliar os potenciais citotóxico, genotóxico e de instabilidade cromossômica dos compostos em células meristemáticas e o potencial mutagênico em células da região F_1 em *A. cepa*, por meio das análises da frequência dos índices mitóticos, de aberrações cromossômicas e de micronúcleos.
- Avaliar o potencial genotóxico dos metalo-inseticidas por meio de ensaios de micronúcleos em células de *T. pallida*.
- Analisar histológica e histoquimicamente o intestino médio de diplópodos a fim de verificar possíveis alterações morfológicas e/ou fisiológicas.
- Avaliar a expressão de proteínas de estresse HSP70 por meio da imunohistoquímica no intestino médio de indivíduos da espécie *R. padbergi*.
- Avaliar o potencial tóxico do metalo-inseticida $\text{Mg}_6[\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ por meio do teste de reprodução com a espécie de enquitreídeos *E. cryptus*.
- Avaliar o potencial tóxico do metalo-inseticida $\text{Mg}_6[\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ por meio do teste de reprodução com a espécie de colêmbolos *F. candida*.
- Avaliar o potencial tóxico do metalo-inseticida $\text{Mg}_6[\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ por meio do teste de reprodução e mortalidade com a espécie de minhocas *E. fetida*.
- Comparar a toxicidade dos dois metalo-inseticidas para os diferentes organismos testes e parâmetros analisados com o intuito de determinar diferenças entre eles.
- Contribuir com informações sobre os sistemas metalo-inseticidas em organismos não alvos e, assim, fornecer subsídios para sua correta utilização e comercialização como pesticida, minimizando os efeitos para o meio ambiente e para o homem.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Toxicidade dos compostos naturais derivados de plantas

A demonstração do potencial fitoterápico ou pesticida de uma espécie vegetal é uma tarefa complicada, uma vez que os extratos de plantas consistem em uma mistura de compostos (metabólitos secundários) em diferentes concentrações, os quais podem estar envolvidos no efeito observado (SILVA et al., 2000). Portanto, com o intuito de avaliar se uma determinada substância pode apresentar potencial tóxico, estudos utilizando apenas os compostos de forma isolada são realizados. Estes estudos tornam-se de extrema importância por avaliar danos genéticos iniciais, os quais podem ser um fator de risco para câncer no homem ou causar perda da biodiversidade no ambiente.

Baseado na sua biossíntese, os metabólitos secundários das plantas podem ser divididos em três grupos principais: compostos fenólicos (aproximadamente 8.000 compostos), grupo ao qual pertence a hesperitina, um flavonóide encontrado em frutas cítricas e presente nas fórmulas dos metalo-inseticidas; terpenóides (aproximadamente 25.000 compostos); e alcalóides (aproximadamente 12.000 compostos) (BUCHANAN et al., 2000).

3.1.1 Compostos fenólicos

Dentre os compostos fenólicos encontram-se os mais de 4500 flavonóides conhecidos, entre eles a hesperitina (BUCHANAN et al., 2000). São conhecidos por possuir uma variedade de atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, antiviral, bactericida, antitumoral, anti-alérgica e antioxidante (HAVSTEEN, 1983; HODNICK et al., 1986; BORS; SARAH, 1987). Porém, atividade genotóxica ou mutagênica já foi relatada para os compostos quercetina, morina, galangina, canferol, ramnetina, fisetina, mirecetina (SILVA et al., 2000), genisteína (BOOS; STOPPER, 2000) e rotenona (LIMA et al., 2005; GUADAÑO et al., 1998).

Acredita-se que o mecanismo responsável pela genotoxicidade dos flavonóides esteja relacionado a vários fatores, como à atividade do citocromo P450, à oxidação enzimática ou química ou com inibição da topoisomerase II (MACGREGOR; JURD, 1978; MIDDLETON; KANDASWAMI, 1994; SILVA et al., 1997; BOERSMA et al., 2000; SNYDER; GILLIES, 2003). Para Macgregor e Jurd (1978) e Silva et al. (2000), a estrutura destes compostos também é responsável por sua toxicidade.

A hesperitina, no entanto, não apresenta toxicidade. Entre suas propriedades biológicas destacam-se a ação antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena. Também

possui ação protetora contra vários fatores, como microorganismos, parasitas e contaminantes ambientais. Ela atua no organismo protegendo a célula dos efeitos nocivos dos radicais livres, uma vez que está entre os flavonoides com maior capacidade conhecida como “scavenger”, ou seja, capacidade de neutralizar os radicais livres formando compostos menos reativos (IRANSHANI et al., 2015).

As quinonas, outro composto da classe, englobam as substâncias cujo uso na medicina é, provavelmente, o mais antigo entre todas as outras classes de compostos naturais (MONKS; JONES, 2002). Neste grupo encontram-se várias substâncias que já possuem seu efeito genotóxico conhecido, como a aloe-emodina, aloína, extraídas de *Aloe* spp; lucidina, alizarina e purpurina, extraídas de *Rubia tinctorum*; lausona, pigmento da tintura Henna; e plumbagina, extraída de *Plumbago zeylanica*.

O mecanismo de ação das quinonas é bastante amplo, podendo agir diretamente ou indiretamente no material genético. A aloe-emodina é capaz de causar mutações frameshift, pois tem a propriedade de ligar-se diretamente à fita de DNA (BRUSICK; MENGES, 1997; BRESLIN et al., 1997). A lucidina, devido a presença do grupo 2 hidroxil nas posições 1,3 (WESTENDORF et al., 1990) e do grupo hidroxil-metil no carbono 2 (KAWASAKI et al., 1994), também pode formar adutos de DNA (POGINSKY et al., 1991; WESTENDORF et al., 1998), assim como a purpurina. A aloína e a plumbagina, ao contrário, não se ligam ao material genético, mas podem produzir metabólitos químicos oxidados, espécies reativas de oxigênio ou inibir o fuso mitótico (PALANIKUMAR et al., 2011; SANTHAKUMARI et al., 1980; SIVAKUMAR et al., 2005).

3.1.2 Terpenóides

A azadiractina, um dos compostos mais importantes da classe, é um composto químico extraído, principalmente, da planta *Azadirachta indica*, popularmente conhecida como neem (MORDUE; BLACKWELL, 1993). Seu interesse biológico ocorre devido a sua capacidade de inibir a alimentação e crescimento de muitos artrópodes e pela sua propriedade anti-inflamatória e antiúlcera (MORGAN, 2009). Porém, apresenta genotoxicidade para plantas (*A. cepa* e *Eucrosia bicolor*) e peixes (*Oreochromis mossambicus*) (CHANDRA; KHUDBUKHSH, 2004; KWANKUA et al., 2010).

Sua ação genotóxica e carcinogênica é devido à presença de um radical furano, o qual ocorre em muitos agentes genotóxicos conhecidos, como as aflatoxinas. Além disso, a sua eletronegatividade é da mesma ordem de magnitude de moléculas reativas ao DNA (ROSENKRANZ; KLOPMAN, 1995; KHAN; AWASTHY, 2003). Sabe-se também que a

azadiractina possui características químicas semelhantes à colchicina, uma substância anti-mitótica com a capacidade de afetar a síntese e despolimerizar as fibras do fuso (SALEHZADEH et al., 2003; WANG et al., 2006).

A artemisinina, principal princípio ativo da *Artemisia annua* (KLAYMAN, 1985), e seus derivados, artesunate e artemeter, atualmente são utilizados como drogas anti-malária (DHINGRA et al., 2000), como fragrâncias na indústria de perfumes (SIMON et al., 1990) e, há pelo menos 2000 anos, vem sendo utilizada pelos chineses no tratamento de diversas doenças (RICHARD et al., 2010). Vários estudos recentes apontam que estas substâncias são genotóxicas (CARDOSO, 2012; AQUINO et al., 2011; MOTA et al., 2011; LI et al., 2008; ALCÂNTARA et al., 2013), porém sua toxicidade não está diretamente relacionada com alterações no DNA, e sim com a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais são capazes de danificá-lo (ALCÂNTARA et al., 2013; LI et al., 2008).

3.1.3 Alcalóides

Dentre os compostos desta classe, a nicotina é o que mais possui estudos relatando sua genotoxicidade em diferentes sistemas-testes (GINZKEY et al., 2009, 2013; KLEINSASSER et al., 2009; WU et al., 2005; SUDHEER et al., 2007 a, b; SOBKOWIAK; LESICKI, 2009; ARGENTIN; ATTIA, 2007 a, b; DEMIRHAN et al., 2011), porém, mesmo assim, seu mecanismo de dano ao DNA não é bem compreendido. Sabe-se que seu metabolismo produz intermediários reativos capazes de se ligarem à proteínas e ao DNA (HUKKANEN et al., 2005). Segundo Ginzkey et al. (2009), embora não haja dados convincentes sobre efeitos carcinogênicos da nicotina em humanos, efeitos co-carcinogênicos ou indutores de tumor não podem ser excluídos.

Outros alcalóides com efeito genotóxico conhecido são a cafeína (TRUTA et al., 2011; UTULU; BAKARE, 2010), a monocrolatina (SILVA-NETO et al., 2010), a emetina (RIVERA et al., 2007), a noscapina, a morfina (PULI; PATIL, 2007) e o sanguinarine (DAS et al., 2004; ANSARI et al., 2005).

3.2 Uso de *A. cepa* em estudos de genotoxicidade

O uso de *A. cepa* como sistema-teste foi introduzido por Levan, em 1938, ao demonstrar alterações no fuso mitótico devido ao uso de colchicina. O mesmo autor, em 1945, mostrou que diferentes soluções de sais orgânicos induziram vários tipos de aberrações cromossômicas (AC) nas células meristemáticas da raiz.

Segundo Fiskejö (1993;1994), há semelhanças entre o metabolismo de plantas e animais e, portanto, os dados podem ser extrapolados para os dois organismos. Sabe-se há anos que, para agentes químicos específicos, resultados semelhantes em termos de anormalidades genéticas são obtidos para plantas e animais (GRANT et al., 1981). Rank e Nielsen (1994) mostraram uma correlação de 82% entre o teste de *A. cepa* e o teste de carcinogenicidade em roedores, concluindo que o teste em *A. cepa* é mais sensível que o teste de Ames. Resultados semelhantes podem ser encontrados ao utilizar *A. cepa* e células da medula óssea de ratos (CAMPAROTO et al., 2002).

Grant (1994) cita algumas vantagens do emprego de plantas para estes testes, dentre elas: (1) por serem eucariontes, possuem organização celular semelhante aos humanos, sendo possível estabelecer comparações com animais; (2) as técnicas empregadas são simples e podem ser realizadas rapidamente; (3) o cultivo de plantas possui baixo custo e é de fácil manutenção.

Além disso, o teste desenvolvido com *A. cepa* é considerado favorável na avaliação de danos cromossômicos e distúrbios no ciclo mitótico devido à presença de boas condições dos seus cromossomos, como tamanho grande e número reduzido ($2n=16$) (FISKEJÖ, 1988), permitindo a avaliação de vários parâmetros, como alterações no índice mitótico, aberrações cromossômicas, anormalidades nucleares e presença de micronúcleos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Também tem mostrado alta sensibilidade na detecção de químicos ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2009), possui a duração do ciclo celular bem conhecida (EVSEEVA et al., 2003), rápido crescimento das raízes, grande número de células em divisão, alta tolerância à diversas condições de cultivo, disponibilidade e fácil manuseio (GRANT et al., 1994); por ser um excelente modelo em *in vivo*, as raízes crescem em contato direto com a substância a ser testada, permitindo a previsão de danos no DNA em eucariotos (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012).

O uso das células meristemáticas da sua raiz e da região F_1 permite a quantificação de vários parâmetros morfológicos, como crescimento e morfologia da raiz, e citogenéticos, como aberrações cromossômicas e presença de micronúcleos (LEME; MARIN-MORALES, 2009), as quais podem ser utilizadas como biomarcador de genotoxicidade e instabilidade cromossômica (FENECH et al., 2011).

Tais análises têm sido empregadas em células meristemáticas e da região F_1 com sucesso por muitos pesquisadores como um indicador de ação direta no DNA, podendo ser utilizado para avaliar o potencial mutagênico de compostos químicos (ASITA; MOKHOB, 2013; RODRÍGUEZ et al., 2015), metais (ODJEGBA; ADEBOYE, 2013; POHREN et al.,

2013; TRUSHIN et al., 2013), misturas complexas (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; SOUZA et al., 2013; PEDRO-ESCHER et al., 2016), plantas medicinais (PASTORI et al., 2013; RAI et al., 2012; ANJANA; THOPPIL, 2013; RATHNASAMY et al., 2013) e para o monitoramento ambiental, principalmente de água e solo (KOPLIKU; MESI, 2012; TANIWAKI et al., 2013; NETTO et al., 2013).

3.3 Uso de *T. pallida* em estudos de genotoxicidade

O gênero *Tradescantia* pertence à família Commelinaceae e possui aproximadamente 500 espécies. *Tradescantia pallida*, também conhecida como coração roxo, é uma planta que apresenta fácil adaptação em qualquer ambiente e pode se desenvolver durante todo o ano, tanto ao ar livre, nas regiões subtropicais, quanto em estufas, em qualquer parte do mundo. O tamanho da planta, relativamente pequeno, e o material genético composto por seis pares de cromossomos relativamente grandes, tornaram essa planta um instrumento favorável para estudos citogenéticos (CARVALHO, 2005). As espécies diplóides possuem 24 cromossomos metacêntricos em sua maioria; as inflorescências produzidas se desenvolvem em seqüência, permitindo exposição ao agente em todos os estágios de desenvolvimento (SAVAGE; PAPWORTH, 1998).

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).

Este teste foi desenvolvido em 1976 para a avaliação do gás etileno e foi adaptado para testes com líquidos por Ma et al. (1979). O teste consiste na exposição de botões florais jovens aos tratamentos e posterior recuperação em água, necessária para a divisão das células mãe de grão de pólen (GERASKIN et al., 2011). Ao microscópio, fragmentos de cromossomos sob forma arredondada e escura, chamados de micronúcleos, podem ser observados nas tétrades. Os micronúcleos são as consequências de defeitos ocorridos durante a replicação meiótica das células de pólen (SUYAMA et al., 2002).

Além do teste Trad-MCN, o clone #4430 permite a aplicação do teste Trad-SHM (Teste do Pelo Estaminal), o qual baseia-se em mutação pontual (mitótica) onde é suprimida a

expressão do caráter azul dominante em flores heterozigotas, resultando no aparecimento da cor rosa recessiva (RODRIGUES et al., 1997).

Aproximadamente 160 agentes químicos já foram testados por meio do teste trad-MCN, entre eles compostos orgânicos, metais pesados, produtos farmacêuticos e gases (MISIK et al., 2011) e misturas complexas (PEDRO-ESCHER et al., 2014). Os pesticidas ciazina, metaclor, atrazina, simazina, dicamba, picloram e imidacloprido foram responsáveis por induzir a formação de micronúcleos nas tétrades e confirmam a alta sensibilidade do teste (RODRIGUES et al., 1998; MOHAMMED; MA, 1999; RODRÍGUEZ et al., 2015).

3.4 Diplópodos como bioindicadores

A classe Diplopoda inclui cerca de 12.000 espécies descritas distribuídas por todo o mundo, porém estima-se que haja 80.000 espécies ainda desconhecidas, o que coloca a classe como sendo a terceira maior entre os Arthropoda, atrás apenas de Insecta e Arachnida (GOLOVATCH; KIME, 2009).

A maioria dos milípedes é detritívora e possui grande importância na decomposição por meio da fragmentação de partes mortas de plantas, incluindo madeira. Pelas fezes, eles promovem a mineralização do solo, uma vez que secretam amônia e ácido úrico que, quando degradados, enriquecem o solo com nitratos (SCHUBART, 1942). Assim, as espécies estimulam a atividade microbiótica essencial para a ciclagem de nutrientes, como carbono, nitrogênio, fósforo, além de promoverem a aeração ativa do solo (HOPKIN; READ, 1992; BOND; SIERWALD, 2007). Esses animais possuem hábito noturno, vivem em ambientes úmidos, sendo encontrados sob troncos e folhas caídas no solo; se alimentando de matéria orgânica, detritos, frutas e relativa quantidade de matéria mineral (RUPPERT; BARNES, 2005 tese cintya).

Nos últimos 20 anos, diplópodos têm recebido atenção de pesquisadores da área de ecotoxicologia terrestre devido a vários fatores: (1) há grande número de indivíduos distribuídos ao redor do mundo; (2) pertencem à fauna edáfica e estão continuamente expostos aos contaminantes; (3) muitas espécies possuem indivíduos grandes e fáceis de manusear; (4) podem ser utilizados para biomonitoramento tanto em laboratório quanto em campo; e (5) efeitos biológicos podem ser medidos em vários níveis de sua organização biológica (SOUZA et al., 2014).

O primeiro estudo envolvendo diplópodos como organismo bioindicador foi realizado por Hopkin et al. (1985) ao analisar indivíduos da espécie *Glomeris marginata* de locais contaminados e não contaminados, onde observaram alta absorção de cobre, zinco e cádmio

nos animais coletados em solo contaminado. Estudos revelam que algumas espécies podem desenvolver estratégias para minimizar os efeitos de metais no organismo. Indivíduos da espécie *Allaiulus nitidus*, *Glomeris conspersa*, *Julus scandinavus*, *Polysdemus denticulatus* e *Rossiulus kesseleri* diminuem a ingestão quando alimentados com detritos contaminados com chumbo, cádmio ou mercúrio (KHÖLER et al., 1992; ZHULIDOV; DUBOVA, 1998).

Quando no organismo dos animais, os metais podem ser armazenados em diferentes regiões: cádmio e chumbo são encontrados principalmente nas células epiteliais do intestino médio, enquanto que zinco é armazenado principalmente na cutícula (HOPKIN et al., 1985; KÖHLER et al., 1995). Células do corpo gorduroso também podem acumular metais sob forma de grânulos insolúveis (HOPKIN; READ, 1992; FONTANETTI et al., 2006).

As análises morfológicas conduzidas com diplópodos em estudos de ecotoxicologia utilizam principalmente o intestino médio e o corpo gorduroso perivisceral dos animais. Esta região é composta por epitélio, camada muscular, células hepáticas e musculatura; o epitélio possui três diferentes tipos de células – absorptivas, regenerativas e secretoras. Além da digestão, ele atua como uma barreira para prevenir a entrada de substâncias tóxicas e impedir sua disseminação pelo resto do organismo, funcionando, assim, como um órgão de detoxicação (FONTANETTI et al., 2015). O corpo gorduroso perivisceral preenche a cavidade corpórea do organismo e é composto por trofócitos e enócitos (FONTANETTI et al., 2004).

Diplópodos expostos a diferentes amostras de lodo de esgoto apresentaram alterações morfológicas no intestino médio em estudos realizados por Nogarol e Fontanetti (2010), Godoy e Fontanetti (2010) e Perez e Fontanetti (2011). Merlini et al. (2012) encontrou resultados semelhantes em diplópodos exposto ao herbicida trifluralina. Nestes estudos foi possível observar alterações que estão relacionadas com a função de detoxicação do órgão, como renovação epitelial, liberação de vesículas de secreção, presença de grânulos citoplasmáticos nas células hepáticas e presença de hemócitos.

O epitélio do intestino de invertebrados atua como uma barreira entre o meio externo e o interno. Quando essa barreira não funciona como o esperado, é possível observar alterações morfológicas causadas pelas substâncias tóxicas (HOPKIN et al., 1985). Os diplópodos têm a capacidade de neutralizar substâncias tóxicas, como metais, em grânulos citoplasmáticos, encontrados, principalmente, nas células hepáticas e no corpo gorduroso. Deste modo, as substâncias ficam armazenadas e não atingem outras regiões do organismo. Caso o limite de armazenamento seja atingido, estes grânulos são expelidos para o lúmen do intestino através de vesículas de secreção ou pela perda de células do epitélio. As células regenerativas,

presentes na base do epitélio, são responsáveis pela renovação das células perdidas. A presença de hemócitos entre as células hepáticas é considerada um indicativo de inflamação do tecido, uma vez que estas células circulam livremente pela hemolinfa e reconhecem material estranho ao organismo, com o objetivo de mediar a defesa celular, como fagocitose, nodulação e encapsulamento (PEREZ; FONTANETTI, 2011).

Ao analisar histológica e histoquimicamente o corpo gorduroso perivisceral da espécie expostas a lodo de esgoto e biossólido, Souza e Fontanetti (2012) e Francisco et al. (2015) observaram aumento no número de grânulos citoplasmáticos, ruptura da membrana plasmática, redução na quantidade de polissacarídeos e proteína. Nos animais expostos a maior concentração de lodo, foi observada total desintegração do tecido. Como o corpo gorduroso é o local de síntese de proteínas e glicogênio, a depleção destes componentes indica que a célula foi afetada, prejudicando o organismo como um todo. O corpo gorduroso parietal, encontrado próximo ao tegumento, não sofreu alterações. Este fato indica que o processo de detoxicação do organismo no intestino médio não foi suficiente para barrar a difusão das substâncias tóxicas para o corpo gorduroso, porém, os processos de detoxicação no corpo gorduroso perivisceral foram capazes de impedir a difusão para o corpo gorduroso parietal.

De acordo com Christofolletti et al. (2012; 2013), os diplópodos não possuem capacidade de biorremediar o lodo de esgoto, mas sim de bioprocessá-lo. Estudos demonstraram efeitos genotóxicos do lodo antes da exposição aos diplópodos. Após exposição, os efeitos genotóxicos foram significativamente reduzidos. Desta forma, o bioprocessamento por diplópodos pode ser uma alternativa eficaz para a redução da toxicidade do lodo.

3.5 Anelídeos utilizados em testes ecotoxicológicos

O solo é o principal depósito ambiental de pesticidas utilizados na agricultura (LUCCHINI et al., 2000), sendo este um dos principais problemas dos dias atuais, uma vez que, além de prejudicar a biota nele presente, pode acarretar na contaminação de lençóis freáticos, atingir a cadeia alimentar e, possivelmente, afetar a saúde humana (LOUREIRO et al., 2005). O risco ecotoxicológico destas substâncias deve ser verificado de acordo com protocolos internacionais. Em comparação com a ecotoxicologia aquática, poucos testes com organismos de solos são padronizados (ROMBKE; MOSER, 2002).

Para a avaliação de substâncias tóxicas presentes no solo, os invertebrados da fauna terrestre têm sido os mais utilizados como organismos bioindicadores (FONTANETTI et al., 2011). Eles têm mostrado grande potencial em demonstrar precocemente efeitos adversos

quando expostos a 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, anelídeos têm sido muito utilizados em análises de toxicidade (NATAL-DA-LUZ et al., 2004).

Em países desenvolvidos, principalmente na Europa, testes utilizando anelídeos para a avaliação de risco ambiental são comumente realizados. Um fator que contribui para a maior utilização destes organismos como bioindicadores foi a padronização, pela “International Organization for Standardization” (ISO), dos testes de reprodução (ISO 11267; ISO 11268-2) (SCHAEFER, 2003; HÖS et al., 2012). No Brasil, no entanto, estes testes ainda são pouco utilizados em relação a outros países.

3.5.1. Testes ecotoxicológicos com enquitreídeos

Dentre as espécies de anelídeos comumente utilizadas nos testes de reprodução encontram-se as do gênero *Enchytraeus* (POSTUMA, et al., 1997; RÖMBKE; MOSER, 2002; LOCK; JANSSEN, 2002; AMORIM et al., 2005; HONEMANN; NENTWIG, 2009; MADANI et al., 2015). Conhecidos como enquitreídeos, pertencem à Ordem Oligoqueta (família Enchytraeidae), e possuem importante papel ecológico no solo, sendo considerados mais relevantes que espécies de minhocas, como *Eisenia foetida* e *Eisenia andrei*. Enquitreídeos são abundantes em muitos solos não suportados por minhocas e o contrário raramente é observado (KULA 1994). Reproduzem-se sexualmente, com algumas exceções onde fragmentação assexual também é possível; são pequenos, possuem entre 1-40mm e alimentam-se de matéria em decomposição e microorganismos (DIDDEN, 1993).

Enquitreídeos têm sido utilizados em testes ecotoxicológicos desde a década de 1970. O primeiro estudo foi realizado com a espécie *E. albidus* para avaliar os efeitos de drogas veterinárias. A partir de 1990, vários grupos de pesquisas começaram a desenvolver, independentemente, diferentes métodos para os testes, utilizando substratos como água, solo e ágar (ROMBKE; MOSE, 2002).

O teste de reprodução com enquitreídeos foi validado pela Agência Federal Ambiental da Alemanha com ajuda do Escritório Europeu de Química. Durante o processo, participaram 29 governos, laboratórios públicos e privados de 15 países diferentes (ROMBKE, 2003). Em relação ao design experimental, o teste se assemelha ao teste de reprodução com minhocas e

colêmbolos (ISO 1998; ISO 1999), onde os organismos são expostos a diferentes concentrações de solo contaminado e o resultado é aferido pela contagem de descendentes.

A espécie *E. albidus* é a indicada pelos protocolos internacionais (ISO 16387, 2003; OECD 220, 2004) para a realização dos testes, porém os mesmos também sugerem espécies alternativas, como *E. crypticus* (figura 1A, B), *E. buchholzi*, *E. luxuriosus* e *E. bulbosus*. Assim, a espécie *E. crypticus* tem sido muito utilizada nos experimentos, uma vez que apresenta algumas vantagens em relação à *E. albidus*: (1) a cultura é feita em meio ágar; (2) possui uma taxa de reprodução mais alta; (3) período de procriação mais curto; (4) período mais curto de teste e (5) maior tolerância à diferentes propriedades de solo (pH, textura e matéria orgânica).

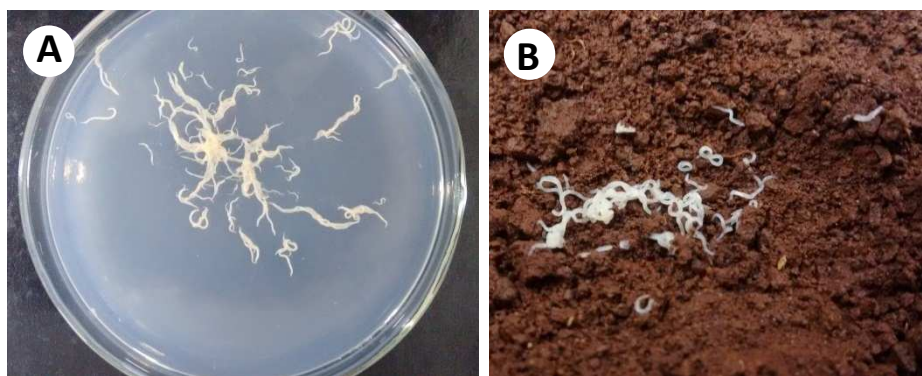


Figura 1. Indivíduos da espécie *E. crypticus* em placa de Petri com ágar para manutenção em laboratório (A) e encontrados no solo (B).

Durante os 40 anos de estudos ecotoxicológicos com estas espécies, sabe-se que elas reagem com grande sensibilidade a compostos químicos. Pesticidas, em particular, podem direta ou indiretamente, diminuir o suprimento de alimento e afetá-los negativamente (DIDDEN; ROMBKE, 2001).

Novais et al. (2010) utilizaram a espécie *E. albidus* para testar a toxicidade dos herbicidas fenmedifam e atrazina, dos fungicidas carbendazim e pentaclofenol e dos inseticidas dimetoato e lindane. Todos os compostos apresentaram efeitos sobre a espécie, sendo a reprodução o parâmetro mais afetado e sensível. Os compostos mais tóxicos foram carbendazim, dimetoato e atrazina. De acordo com Arrate et al. (2002), o carbendazim pode afetar a eclosão dos ovos e, conseqüentemente, diminuir o número de juvenis.

Porém, ao testar o potencial tóxico dos pesticidas azoxistrobina, clorotalonil e etoprofos, Leitão et al. (2014) verificaram que os enquitreídeos, dos três organismos testados (enquitreídeos, colêmbolos e minhocas), foram os menos sensíveis.

De acordo com Rombke e Moser (2002), enquitreídeos podem ser utilizados em testes de laboratório, semi-campo e campo e que tal amplitude de possibilidades é rara em estudos de ecotoxicologia, possível apenas para minhocas. Devido a isso, a utilização destes organismos em estudos de ecotoxicologia terrestre é altamente recomendada (ROMBKE et al., 2005).

3.5.2 Testes ecotoxicológicos com minhocas

Minhocas são comumente utilizadas em testes ecotoxicológicos (SPURGEON et al., 2002), embora pouco utilizadas no Brasil (CORREIA; MOREIRA, 2010). Estes organismos permitem a avaliação de vários parâmetros, como reprodução, mortalidade, fisiologia, morfologia e comportamento, além de serem utilizados para a caracterização das propriedades de produtos químicos (RIEPERT et al., 2009).

O primeiro teste de reprodução envolvendo minhocas foi desenvolvido por Van Gestel et al. (1989), com o objetivo de avaliar o impacto subletal de contaminantes nestes organismos (YASMIN; D'SOUZA, 2010). A partir dele, outros métodos foram propostos (KULA; LARINK, 1997; OECD, 2004; ISO, 2012). O princípio do teste confere em expor as minhocas em diferentes concentrações do produto a ser testado. Após quatro semanas, a mortalidade e os efeitos no crescimento são verificados e os adultos são retirados do solo. Passadas outras quatro semanas, os efeitos na reprodução são avaliados pela contagem do número de descendentes presentes no solo (OECD, 2004).

Especificamente, a avaliação do comportamento é extremamente relevante do ponto de vista ecológico, uma vez que a migração de minhocas e, conseqüentemente, a perda dos benefícios que sua presença acarreta ao solo podem afetar sua qualidade. Deste modo, testes que levam em consideração o comportamento devem ser incluídos na bateria de testes ecotoxicológicos para determinar os impactos tóxicos que uma substância química pode provocar no meio ambiente (SCHAEFER, 2003). Trata-se, também, de um teste ecotoxicológico muito sensível e com ótimo custo-benefício (SCHÄFER, 2003).

As minhocas podem perceber diversos estímulos externos, como contaminantes, através de quimiorreceptores e células sensoriais presentes na região da boca (LUKKARI et al., 2005; CSOKNYA et al., 2005). Deste modo, também é possível realizar testes de fuga, os quais se baseiam na detecção de condições ambientais adversas por este sistema sensorial, fazendo com que os indivíduos migrem para áreas com condições ambientais seguras (REINECKE et al., 2002).

3.6 Testes de reprodução com colêmbolos

Assim como os anelídeos, os colêmbolos têm sido utilizados como organismos testes há mais de 40 anos a fim de avaliar os efeitos de pesticidas e poluentes em organismos de solo não alvos. A espécie *Folsomia candida* é a mais utilizada (FOUNTAIN; HOPKIN, 2005) devido à padronização dos testes de fuga e reprodução pela ISO (1999), seu curto ciclo de vida e a capacidade de reprodução partenogenética, tornando-os excelentes organismos para estudar diferentes parâmetros individuais e populacionais em um único experimento (CROMMENTUIJN et al., 1993).

Estudos utilizando colêmbolos como bioindicadores são mais comuns ao analisar o grau de abundância e diversidade destes organismos em áreas impactadas (MICHEREFF-FILHO, 2004; LINS et al., 2007; FERNANDES et al., 2009). Em climas tropicais, testes de reprodução foram realizados para avaliar os pesticidas carbaril, imidacloprido, fipronil e tiametoxam, enquanto que testes de fuga não foram encontrados na literatura (CHELINHO et al., 2014).

Os efeitos tóxicos do carbaril foram avaliados em diferentes temperaturas (tropicais e temperadas) pelo teste de reprodução com *F. candida* por Lima et al. (2015). Os resultados obtidos mostraram que, em temperaturas mais altas, a reprodução da espécie é menos afetada pelo pesticida. Os pesticidas imidacloprido e fipronil também foram tóxicos para *F. candida* no teste de reprodução realizado por Alves et al. (2014), uma vez que reduziu a reprodução em concentrações abaixo e próximas a utilizadas em campo. No mesmo estudo, os autores concluíram que o tiametoxam não interferiu na reprodução.

3.7 Proteínas de estresse HSP70 como biomarcadores

Todos os organismos, das bactérias aos mamíferos, respondem a diferentes estressores ambientais da mesma forma, através da síntese de proteínas conservadas, conhecidas como proteínas de choque térmico (HSPs) (HAMER et al., 2004). Tais proteínas são codificadas por várias famílias de genes e classificadas de acordo com seu peso molecular, sendo que a família das HSP70 representa as mais conservadas (LINDQUIST; CRAIG, 1988; PYZA et al., 1997).

No organismo, mesmo em situações sem estresse e em baixíssimas concentrações, elas possuem papel vital no funcionamento celular (CALABRESE et al., 2005); acredita-se que falhas no seu funcionamento estão relacionadas a várias doenças humanas (THOMAS et al., 1995).

Por serem também induzidas por substâncias tóxicas e não apenas pelo calor, as HSPs passaram a ser chamadas de proteínas de estresse (FEDER; HOFMANN, 1999) e têm sido utilizadas como biomarcadores em estudos de toxicidade (LEE et al., 2006). Em condições normais, os genes que a codificam são expressos em níveis extremamente baixos. Na presença de um toxicante que seja capaz de alterar a conformação de alguma proteína e, por consequência, sua função, é iniciada uma resposta de estresse, a qual culmina com o rápido aumento da transcrição das HSPs (KIANG; TSOKOS, 1998; CALABRESE et al., 2005).

A utilização das HSPs como biomarcadores é mais comum em estudos de toxicologia aquática (MORAGA et al., 2005; LEE et al., 2006; FASULO et al., 2010; RAJESHKUMAR; MUNUSWAMY, 2011; MINGUEZ et al., 2013; MUPOSHI et al., 2015). De acordo com Knigge et al. (2014), pouco é conhecido sobre as proteínas de estresse em invertebrados de solo. Diplópodos, por exemplo, são pouco estudados, especialmente neste assunto, apesar da sua significativa contribuição para a fauna detritívora do solo. Köhler et al. (1992) e Zanger et al. (1996) aplicaram a técnica com sucesso em diplópodos para avaliação da toxicidade do cádmio.

A utilização de proteínas de estresse em estudos para avaliação de toxicidade utilizando invertebrados de solo é recente quando comparada aos estudos com organismos aquáticos. Desta forma, protocolos precisam ser adaptados (STAEMPFLI et al., 2002). Para diplópodos, o protocolo foi padronizado para aplicação no intestino médio por Mancini et al. (2016).

Nas últimas décadas, pesticidas passaram a ser avaliados utilizando proteínas de estresse para analisar a possível toxicidade aos invertebrados do solo. O inseticida imidacloprido foi avaliado por Dittbrenner et al. (2011) em três espécies de minhocas, *E. fetida*, *Lumbricus terrestres* e *Aporrectodea caliginosa*. Liu et al. (2011) avaliaram a expressão das HSP27 e HSP40 em minhocas expostas a quatro diferentes herbicidas: atrazina, butaclor, clorotoluron e acetoclor. A expressão da HSP40 foi um pouco maior que a HSP27, sendo que as expressões ocorreram na ordem atrazina > butaclor > acetoclor > clorotoluron.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Metalo-inseticidas

Os metalo-inseticidas utilizados neste 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 fornecidos pela Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar), responsável por sua síntese.

4.2 Material biológico

Para a realização dos bioensaios foram utilizados cinco organismos-testes:

- Sementes de *A. cepa* (Liliaceae), da variedade Baia Piriforme, de mesma marca, lote e prazo de validade, a fim de evitar diferentes respostas às diversas etapas dos testes.
- Inflorescências jovens de *T. pallida* coletadas em canteiros padronizados no Jardim Experimental da UNESP campus de Rio Claro.
- Indivíduos adultos de *R. padbergi* de ambos os sexos coletados manualmente no campus da UNESP e aclimatados por 15 dias em terrário contendo substrato do local de coleta, com temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (ciclo claro/escuro de 12h) controlados.
- Enquitreídeos da espécie *E. crypticus*, fornecidos pelo Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia de Solos da Universidade de Coimbra, Portugal. A cultura foi mantida à 22°C em placas de Petri preenchidas com ágar e alimentadas com farelo de aveia até o início dos testes.
- Minhocas da espécie *E. fetida*, fornecidas pelo Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia de Solos da Universidade de Coimbra, Portugal. A cultura foi mantida como descrito por Natal-da-Luz et al. (2008).
- Colêmbolos da espécie *F. candida*, fornecidos pelo Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia de Solos da Universidade de Coimbra, Portugal. A cultura foi mantida à 25°C e alimentada com fermento até o início dos experimentos.

4.3 Amostras de solo

Para os experimentos com diplópodos e cebola foi utilizado solo do mesmo local de coleta dos animais, no campus da UNESP Rio Claro; o mesmo é classificado como latossolo.

Os experimentos com enquitreídeos e minhocas foram realizados com Solo Artificial Tropical 5% (SAT 5%), composto por 75% de areia, 20% de caulino e 5% de fibra de côco.

4.4 Bioensaios com *A. cepa*

Os bioensaios foram realizados em placas de Petri, contendo, aproximadamente, 100 sementes, as quais foram germinadas diretamente nas amostras de solo (contato direto).

Os seguintes bioensaios foram realizados utilizando o metalo-inseticida [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO).

- Controle positivo realizado com o herbicida trifluralina (ação aneugênica) + amostra de solo;
- Controle positivo realizado com metilmetanosulfonato[®] (ação clastogênica) + amostra de solo;
- Controle negativo contendo apenas amostra de solo;
- Amostra de solo + 2,0mg/mL do metalo-inseticida;
- Amostra de solo + 1,0mg/mL do metalo-inseticida;
- Amostra de solo + 0,5mg/mL do metalo-inseticida.

Todos os bioensaios foram realizados em duplicata. As sementes foram mantidas sob condições constantes de temperatura (22°C) por 96 horas e, após a germinação, elas foram coletadas. A fixação das raízes foi feita em fixador Carnoy 3:1 (3 partes álcool etílico PA:1 parte de ácido acético glacial PA) por 6 h, sendo, após este período, transferidas para um novo Carnoy, onde foram conservadas em geladeira até sua utilização.

Para realizar as análises citológicas, as raízes foram submetidas a uma hidrólise ácida em HCl 1N a 60° C, durante 9 minutos, seguida de uma lavagem em água destilada. Logo após, foram colocadas em reativo de Schiff por duas horas. Na confecção das lâminas, foi utilizado carmim acético 2%. Todas as lâminas foram obtidas submetendo os meristemas radiculares e a região F₁ a um esmagamento suave entre lâmina e lamínula. As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas em Permount, para serem posteriormente observadas.

Foram analisadas 1.000 células meristemáticas e 1.000 células da região F₁ por lâmina (cerca de 10.000 células para cada tratamento) para se determinar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico, totalizando 120.000 células contabilizadas para o metalo-inseticida [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO).

O potencial tóxico foi analisado por meio do cálculo de índice de germinação. O potencial citotóxico foi avaliado baseado no cálculo do índice mitótico (IM) por meio da fórmula [(IM=n° de células em divisão/n° total de células observadas)x100]. O índice de genotoxicidade foi analisado baseado no número de células com aberrações cromossômicas,

tais como broto nuclear, pontes anáficas e telofásicas e C-metáfase por meio da fórmula $IG = (\text{n}^\circ \text{ de células com aberrações cromossômicas} / \text{n}^\circ \text{ total de células observadas}) \times 100$. A frequência de micronúcleos foi determinada pela quantidade de células com micronúcleos por meio da fórmula $FMN = (\text{n}^\circ \text{ de células com MN} / \text{n}^\circ \text{ total de células observadas}) \times 100$ com a finalidade de analisar genotoxicidade e instabilidade cromossômica. Caso os micronúcleos, observados em células da região F₁, não sejam reparados, há indicativo de efeito mutagênico. Para a análise estatística foi realizado o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Os mesmos bioensaios foram realizados para o metalo-inseticida [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) e para o 5-metil-fenantrolina.

4.5 Bioensaios com *T. pallida*

Tradescantia pallida contendo inflorescências jovens foram coletadas e expostas às seguintes concentrações do metalo-inseticida:

- Controle negativo com água destilada.
- Controle positivo com metilmetanosulfonato[®] (MMS).
- Amostra de água + 2,0 mg/mL de [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO).
- Amostra de água + 1,0 mg/mL de [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO).
- Amostra de água + 0,5 mg/mL de [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO).

Os mesmos bioensaios foram realizados para o metalo-inseticida [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO).

Foram expostas 10 inflorescência por bioensaio, onde permaneceram expostas por 8 horas, seguidas por 24 horas de recuperação em água destilada. Todos os bioensaios foram realizados em duplicata. Após as exposições, as inflorescências foram fixadas em fixador Carnoy I por 48 horas. Decorrido este período, as inflorescências foram dissecadas em lâmina, na qual apenas o botão que continha as anteras com células em estágio de tétrade foram imediatamente analisadas sob microscopia de luz.

O índice genotóxico foi avaliado de acordo com a frequência de micronúcleo observada por meio da fórmula $IG = (\text{n}^\circ \text{ de tétrades com MN} / \text{n}^\circ \text{ total de tétrades observadas}) \times 100$. Foram contabilizadas 3.000 células em fase de tétrade de cada bioensaio (300 células para dez lâminas de cada tratamento), totalizando 60.000 células analisadas para o metalo-inseticida [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) e 60.000 células para o metalo-inseticida [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO). Para a análise estatística foi realizado o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

4.6 Bioensaios com o diplópodo *R. padbergi*

Para a montagem dos bioensaios foram utilizados quatro terrários: um terrário controle, contendo apenas terra do local de coleta dos animais e três terrários contendo terra do local de coleta com diferentes concentrações dos metalo-inseticidas (2,0 mg/mL, 1,0 mg/mL, 0,5 mg/mL).

Após o período de aclimação, foram distribuídos, aleatoriamente, 10 animais em cada terrário, onde ficaram expostos por períodos de 21 e 90 dias. Durante o período de exposição, os animais foram mantidos nas mesmas condições de temperatura e luminosidade da aclimação.

4.6.1 Histologia

Após cada período de exposição, três indivíduos de cada bioensaio foram anestesiados com éter e dissecados para a retirada do intestino médio, o qual foi fixado em solução Bouin aquoso. Após a fixação, o material foi colocado em solução tampão fosfato de sódio pH=7,4 durante 24 horas e mantido na geladeira. O material foi desidratado em soluções de etanol 70, 80, 90 e 95%, durante 30 minutos cada banho. Posteriormente, o material foi processado seguindo rotina histológica para inclusão em resina.

Os blocos foram cortados com o auxílio de micrótomo a 6µm de espessura; os cortes foram hidratados e recolhidos em lâminas. Após secagem, as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris por 10 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos para a reação (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983); em seguida foram coradas com eosina aquosa por 5 minutos e lavadas em água. Após secagem, as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá para posterior análise.

As análises histológicas foram qualitativamente descritas e as alterações histopatológicas analisadas semi-quantitativamente para cada indivíduo. O protocolo seguido foi baseado no proposto por Bernet et al. (1999) e adaptado por Christofolletti et al. (no prelo). Cada alteração recebe um fator de importância (w) de acordo com sua importância patológica, classificadas como: (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível quando a exposição ao contaminante acaba; (2) importância patológica moderada, a versão é reversível na maioria dos casos quando o estressor é neutralizado; e (3) importância patológica acentuada, a lesão é irreversível, levando a perda parcial ou total da função do órgão. Escores de 0 a 6 foram utilizados para classificar as alterações histopatológicas quanto ao grau e extensão da alteração: (0) inalterado; (2) alteração pequena; (4) alteração moderada; (6) alteração severa. Os escores (a) foram multiplicados pelo fator de importância de cada

alteração (w) para definir o índice de dano (I) por indivíduo. Então, o índice de dano para cada alteração e para cada organismo foi calculado como segue:

$$I(\text{individual}) = a(\text{escore recebido}) \times w(\text{fator de importância})$$

Para definir o índice de dano, tanto do grupo controle quanto dos tratamentos, a soma dos índices de dano foi obtida para cada indivíduo e, então, a média e o desvio padrão foram calculados.

Os dados obtidos na avaliação histopatológica semi-quantitativa dos tratamentos foram comparados com o grupo controle pelo teste estatístico Kruskal-Wallis.

4.6.2 Histoquímica

Após a retirada do intestino médio dos animais, o material foi fixado em diferentes soluções e processado conforme o item 4.6.1 para a aplicação dos seguintes testes histoquímicos:

a. Técnica do Azul de Bromofenol, segundo Pearse (1985) – Detecção de Proteínas Totais: fixação em solução Bouin por 24 horas; coloração pela solução de azul de bromofenol à temperatura ambiente por 2 horas; lavagem dos cortes em água e banho em ácido acético por 5 minutos.

b. Técnica do PAS (Ácido Periódico de Schiff), segundo Junqueira e Junqueira (1983) – Detecção de Polissacarídeos Neutros: fixação em solução Bouin; oxidação por 30 minutos em ácido periódico 1%; exposição ao reativo de Schiff por aproximadamente 1 hora no escuro; passagem em água sulfurosa por 9 minutos; lavagem por 30 minutos em água corrente.

c. Método de von Kossa, segundo Junqueira e Junqueira (1983) – Detecção de Cálcio: fixação em solução Bouin por aproximadamente 24 horas; imersão dos cortes em nitrato de prata por 20 minutos; lavagem em água e transferência dos cortes para hidroquinona; imersão em fixador F-5 por 5 minutos; contracoloração dos núcleos com hematoxilina.

d. Técnica do Sudan Black B, segundo Junqueira e Junqueira (1983) – Detecção de Lipídeos Totais: Fixação em formolcálcio; coloração em sudan black B por 30 minutos; lavagem em água e montagem das lâminas em glicerina gélida.

4.6.3 Imunohistoquímica

O intestino médio foi desidratado em álcool gelado a 15, 30, 50, 70, 85, 90, e 95% durante 20 minutos cada banho. Em seguida, o material foi colocado em xilol + álcool por 20 minutos e, em seguida, xilol por 20 minutos, sendo esta última etapa realizada duas vezes. Após este procedimento, foi feita a embebição do material em parafina líquida (Paraplast). Três trocas de 8 horas cada foram realizadas e a inclusão final foi feita em parafina ultra-pura (Paraplast). Posteriormente, o material foi seccionado em secções de 6µm com auxílio do micrótomo Leica; as secções foram então hidratadas e recolhidas em lâminas.

Para a aplicação da técnica, foi seguido o protocolo adaptado proposto por Silva-Zacarin et al. (2012). Para marcação da HSP70 foram utilizados o anticorpo primário (monoclonal anti heat shock protein 70 - HSP70 produzido em camundongo, Sigma) e o anticorpo secundário (anti mouse IgG molécula inteira) acoplado com fosfatase alcalina. Para a revelação da imunomarcação foi utilizado o Kit Dako EnVision™ G|2 System/AP Rabbit/Mouse (Permanent Red).

Por meio do microscópio de luz, todas as lâminas foram qualitativamente analisadas nas objetivas de 10x, 20x e 40x; foi considerada marcação positiva quando se observa uma cor vermelho-rosada de intensidade maior ou menor conforme a quantidade de proteínas da família HSP70 presente nas células e, negativa, quando não se observa qualquer marcação nesta coloração.

Para complementar a análise qualitativa, imagens digitalizadas de todos os cortes obtidas a partir de uma câmera acoplada ao microscópio, fazendo-se uso de programa próprio para captura de imagens – Leica Qwin Standard v. 2.8, foram transferidas ao programa Image J. A partir dele, foi possível calcular a porcentagem de área imunomarcada intensamente em relação à área total do material analisado em cada secção histológica.

Os dados obtidos na avaliação quantitativa de cada tratamento foram comparados aos resultados obtidos para os indivíduos expostos à amostra de solo controle, por meio do teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$.

4.7 Teste de reprodução com *E. crypticus*

Os controles foram preparados com SAT + água destilada e SAT + solvente (acetona), uma vez que o metalo-inseticida $[Mg(5\text{-metil-phen})(hesperitina)(H_2O)_2](CH_3COO)$ foi adicionado a solvente. Uma solução mãe foi preparada a fim de distribuí-la no solo na seguinte série de concentrações: 0,175; 0,35; 0,7; 1,4; 2,8; 5,6 e 11,2 mg/kg. Após a mistura

da solução mãe nas diferentes concentrações com o solo, o mesmo permaneceu por 12 horas na capela para evaporação do solvente.

Os procedimentos adotados no teste de reprodução foram baseados no ISO 16387 (ISO 2004). Oito réplicas para os controles e cinco réplicas para as exposições foram preparadas em frascos cilíndricos de vidro (5 cm de diâmetro e 9 cm de altura) com 20 g de SAT 5% contendo diferentes concentrações do composto a ser testado. Dez indivíduos adultos com clitelo bem desenvolvidos e visíveis foram distribuídos nos frascos, os quais foram mantidos em BOD à 25°C durante o experimento. Aproximadamente 15mg de farelo de aveia foram colocados em cada frasco como alimento no início do teste. Os frascos foram abertos uma vez por semana para permitir aeração, ajustar a umidade adicionando água destilada e adicionar mais comida, se necessário. Após 28 dias, em cada frasco, foi adicionado etanol 96% até uma altura de 4 cm e adicionado 200-300µL de vermelho de Bengala (solução 1% de etanol). Os frascos foram suavemente agitados e, após 12 horas, foram peneirados em uma malha de 0,106 mm com água de torneira. O material foi transferido para placas de 24 poços a fim de contar os juvenis com ajuda de uma lupa. A validação do teste assumiu um número de juvenis maiores de 25 por frasco e um coeficiente de variação menor de 50% entre as réplicas. A normalidade foi calculada e a estatística realizada pelo teste-T ($p < 0,05$).

4.8 Teste de reprodução e mortalidade com *E. fetida*

Cinco réplicas para cada tratamento foram preparadas; cada uma consistia em uma embalagem cilíndrica plástica (4cm de diâmetro e 6 cm de altura) com 200 g de solo controle (SAT + água; SAT + solvente) e solo com diferentes concentrações do metalo-inseticida [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) (0,175; 0,35; 0,7; 1,4; 2,8; 5,6 e 11,2 mg/kg). Dez indivíduos adultos, previamente aclimatados no solo a ser utilizado no experimento, foram inoculados em cada réplica. A umidade do solo foi previamente ajustada para 50% de sua capacidade máxima de armazenamento de água. O teste foi realizado em BOD à 25°C e os animais foram alimentados com esterco orgânico no início do experimento e após 14 dias. Após 28 dias de exposição, as minhocas foram retiradas do solo, lavadas em água destilada, secas, pesadas e a mortalidade foi determinada. Após 8 semanas de exposição, as embalagens cilíndricas contendo o solo e os juvenis foram aquecidas em banho-maria à 60°C com o intuito de estimular a subida dos indivíduos à superfície e, assim, realizar a contagem. A normalidade foi calculada e a estatística realizada pelo teste-T ($p < 0,05$).

Os procedimentos para a preparação do solo foram os mesmos descritos no item 4.7.

4.9 Teste de reprodução *F. candida*

Os procedimentos adotados no teste de reprodução foram baseados no ISO 16387 (ISO 1999). Cinco réplicas para cada concentração foram preparadas utilizando frascos de vidro (4 cm de diâmetro e 7 cm de altura) com 20 g de SAT 5% contendo diferentes concentrações do metalo-inseticida a ser testado. Dez colêmbolos entre 10 e 12 dias de vida foram distribuídos em cada frasco e 2 mg de fermento foi adicionado como fonte de alimento. Após 28 dias de exposição, o conteúdo de cada frasco foi transferido para outro pote, onde foi adicionado água e três gotas de tinta azul. O conteúdo foi misturado com a ajuda de uma espátula para que os indivíduos flutuassem na superfície da água. A superfície dos potes foi fotografada e a contagem dos juvenis ocorreu com a ajuda do software ImageJ. A normalidade foi calculada e a estatística realizada pelo teste-T ($p < 0,05$).

Os procedimentos para a preparação do solo foram os mesmos descritos no item 4.7.

5. RESULTADOS

Durante a realização desta tese foram confeccionados artigos, os quais serão submetidos a revistas especializadas para publicação:

ARTIGO 1: Toxicity of two metallic-insecticides using the *Allium cepa* test system

Raphael Bastão de Souza; Odair Correa Bueno; Carmem Silvia Fontanetti

ARTIGO 2: Avaliação do efeito genotóxico de dois metalo-inseticidas por meio do teste Trad-MCN em *Tradescantia pallida*

Raphael Bastão de Souza; Cleiton Souza Pereira; Odair Correa Bueno; Carmem Silvia Fontanetti

ARTIGO 3: Utilização de marcadores morfológicos para avaliação da toxicidade de dois metalo-inseticidas em diplópodos

Raphael Bastão de Souza; Odair Correa Bueno; Carmem Silvia Fontanetti

ARTIGO 4: Indução de proteínas de estresse HSP70 por dois complexos metálicos inseticidas em intestino médio de diplópodos

Raphael Bastão de Souza; Cristina Moreira-de-Sousa; Yadira Ansoar Rodríguez; Maria Paula Mancini Coelho; Cleiton Pereira Souza; Odair Correa Bueno; Carmem S. Fontanetti

ARTIGO 5: Avaliação dos efeitos tóxicos de um complexo metálico inseticida por meio de protocolos internacionais para invertebrados de solo

Raphael Bastão de Souza; Tiago Natal-da-Luz; Nuno Capela; José Paulo Sousa; Odair Correa Bueno; Carmem S. Fontanetti

Toxicity of two metallic-insecticides using the *Allium cepa* test system

Raphael Bastão de Souza¹; Odair Correa Bueno¹; Carmem Silvia Fontanetti^{1*}

¹UNESP Univ Estadual Paulista, Institute of Biosciences, Department of Biology, Rio Claro,
São Paulo, Brazil

*Corresponding author: Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264136.

E-mail: fontanet@rc.unesp.br

Resumo

Com o intuito de combater as formigas cortadeiras, o ingrediente ativo mais utilizado era a sulfluramida, porém seu uso foi proibido pela Convenção de Estocolmo em 2009, sendo que alguns países receberam permissão para continuar utilizando-o. Como uma alternativa eficiente ao seu uso, pesquisadores desenvolveram um sistema metalo-inseticida, o qual é constituído por um produto natural ligado a complexos metálicos. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial tóxico destes novos metalo-inseticidas no material genético de *Allium cepa*. Para melhor entender os resultados, um dos componentes da sua fórmula também foi analisado de acordo com os mesmos parâmetros. Os resultados mostraram que um dos metalo-inseticidas induziram citotoxicidade e genotoxicidade em diferentes concentrações, enquanto que o outro apresentou instabilidade cromossômica na maior concentração. A análise do componente da fórmula revelou que ele pode estar relacionado com os resultados positivos, uma vez que efeitos genotóxicos foram induzidos.

Abstract

In order to combat leaf-cutting ants, the most widely utilized active ingredient used to be sulfluramid. However, its use was banned in 2009 by the Stockholm Convention, although some countries were allowed to continue using it. As an effective alternative to its replacement, researchers developed a metallic-insecticide system, which is a natural product linked to metal complexes. Thus, the aim of this study was to evaluate the toxic potential of two of these new metallic-insecticides in the genetic material of *Allium cepa*. To better understand the results, one of the components of the formula was also analyzed according to the same parameters. The results showed that one of the metallic-insecticides induced cytotoxicity and genotoxicity at different concentrations, while the other showed chromosomal instability only at the highest concentration. The analysis of the component of

the formula revealed that it can be related with the positive results, since genotoxic effects were induced.

Keywords: genotoxicity; chromosomal instability; ants; natural formicide

1. Introduction

Leaf-cutting ants of the genus *Atta* are one of the major pests responsible for economic damage in agricultural areas of tropical and subtropical regions of the Americas (SCHOEREDER et al., 2012).

The processes of tackling these organisms have been conducted, historically, through synthetic pesticides (SCHOEREDER et al., 2012). These methods have low specificity, are highly toxic and can cause insect populations to become resistant (HEBLING et al, 1996).

Since the pesticide dodecachlor was banned in 1993, sulfluramid became the most widely used active ingredient against such organisms (ZANUNCIO et al., 2000; ABRAISCA, 2011). However, both the production and degradation of sulfluramid involves perfluorooctanesulfonate (PFOS), a substance which is toxic to mammals (LUEBKER et al., 2005; FAN et al., 2005), birds (VERREAULT et al., 2005; OLIVERO-VERBEL, 2006), fish (TANIYASU et al., 2003) and other insects (BOTS et al., 2010).

Because of its risk to humans and the environment, in 2009, the Stockholm Convention decided to ban the production of PFOS, although countries were allowed to send proposals to keep its production when the use was justified (STOCKHOLM CONVENTION, 2009). In the US, all products containing sulfluramid have been banned, and stored products could be marketed until December 2012 (USEPA, 2008).

As an effective alternative to the use of sulfluramid, researchers developed a metallic-insecticide complex; it is a natural product linked to metallic inorganic complexes. Of all the formulations tested, the most effective were $[\text{Mg}(5\text{-Cl-phen})(\text{hesperetin})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ and $[\text{Mg}(5\text{-methyl-phen})(\text{hesperetin})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ (OLIVEIRA et al., 2013).

Theoretically, a good formicide cannot upset the balance of the environment and, at the same time, it should be effective only against the target organism. Although the soil is the first compartment affected by applying formicides, there are few ecotoxicological studies on new formicides that claim to be environmentally safe (TIEPO et al., 2010). Thus, tests that analyze the genotoxic potential of these substances are of utmost importance.

For the evaluation of these parameters, the *Allium cepa* test system can be used. Through it, it is possible to evaluate chromosomal aberrations and micronuclei to verify

genotoxic and chromosomal instability events, and mitotic index and nuclear abnormalities for detection of cytotoxicity (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

Therefore, this study aims to evaluate the cytotoxic, genotoxic, and mutagenic potentials of two metallic-insecticides at three different concentrations using the *A. cepa* test system. Additionally, for better understanding the results, the same tests were used to evaluate the toxicity of one of the components of the formula, 5-methyl-phen(5-methyl-phenanthroline).

2. Material and Methods

2.1 Metallic-insecticides

The metallic-insecticides used in the study, $[\text{Mg}(5\text{-Cl-phen})(\text{hesperetin})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ and $[\text{Mg}(5\text{-methyl-phen})(\text{hesperetin})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$, as well as one of the components of the formula, 5-methyl-phen, were supplied by the Laboratório de Produtos Naturais [Natural Products Laboratory], from the Federal University of São Carlos, Brazil.

2.2 Soil Samples

The soil, classified as latosol, was collected from the campus of the São Paulo State University, municipality of Rio Claro, São Paulo, Brazil (22°24'36"S/47°33'36"W). The samples were sieved (mesh<5 mm), homogenized and dried at room temperature.

2.3 Germination of *A. cepa* seeds

Approximately 100 seeds of *A. cepa* from the same lot and variety (Baia periform) were placed in Petri dishes with approximately 35 g of soil in order to evaluate the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials of the substances under test. The positive control group was conducted with seeds exposed to two compounds at potentially toxic concentrations: the herbicide trifluralin, aneugenic agent, at the concentration of 0.019 ppm (FERNANDES et al., 2007) and methyl methanesulfonate (MMS), clastogenic agent, at the concentration of 4×10^{-4} M (RANK; NIELSEN, 1997). The negative control (NC) was performed in Petri dish containing only control soil. The exposures to the substances under test were carried out at the following concentrations: 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, and 2.0 mg/mL. The tests were performed in duplicate.

2.4 Preparation of the slides of *A. cepa*.

After five days of exposure to the substances and to the positive and negative controls, the radicles, approximately 2 cm in length, were collected and fixed in Carnoy 3:1 (ethanol:acetic acid, v/v) for 6-12 hours. After this process, the radicles were transferred to a new Carnoy fixative and stored at 4°C until use. For the preparation of the slides, the radicles were hydrolyzed in 1M HCl at 60°C for 10 minutes and, then, submitted to Schiff's reagent for 2 hours (MELLO; VIDAL, 1978). Both the meristematic and the F₁ region were sectioned and placed on the slide. To enhance the coloration and improve cell spreading, one drop of 2% acetic carmine was added, and, shortly thereafter, the material was covered with a coverslip. The coverslips were removed in liquid nitrogen and the permanent slides were mounted with Entellan[®]. The slides were examined under a light microscope at 1000x magnification.

2.5 Evaluation of the toxic, cytotoxic and genotoxic potential in meristematic cells of *A. cepa*.

In total, approximately 10.000 cells were analyzed for each treatment and for the positive and negative controls. Toxicity was calculated through the seeds' germination index (GI). Cytotoxicity was assessed based on morphological alterations (evidence of cell death) and on the mitotic index [$MI = (\text{No. of dividing cells} / \text{total No. of cells observed}) \times 100$]. The genotoxicity was analyzed based on the number of cells carrying chromosomal aberrations (CA), such as nuclear buds, anaphasic and telophasic bridges and C-metaphases. The Genotoxicity Index (GenI) was calculated through the formula $GenI = (\text{No. of cells with chromosomal aberrations} / \text{No. of cells observed}) \times 100$. The Frequency of Micronuclei (FMN) was determined through the number of cells carrying micronuclei (MN) through the formula $FMN = (\text{No. of cells with MN} / \text{No. of cells observed}) \times 100$. The analysis of the presence of micronuclei can be used as a biomarker of genotoxic and chromosomal instability events (FENECH et al., 2011), which, if not repaired, indicate mutagenic effect.

The results were compared with the negative control through the Kruskal-Wallis test.

2.6 Evaluation of cells with micronuclei in the F₁ region of *A. cepa*.

The F₁ region was analyzed in order to determine the damage suffered by the meristematic cells when the FMN of the meristematic region was significant and, thus, confirm the indication of mutagenicity. For this purpose, 10.000 cells of the F₁ region of each treatment were analyzed and the number of cells with MN was counted in order to determine the FMN.

The statistical analysis was conducted by comparing the treatments with the negative control using the Kruskal-Wallis test.

3. Results

3.1 Metallic-insecticide [Mg(5-Cl-phen)(hesperetin)(H₂O)₂](CH₃COO) [1]

The compound did not affect the germination rate of the seeds and the mitotic index of the cells (Table 1). In the analysis of cytotoxicity, cell death characteristics were not observed in any treatment. Genotoxic effects were significant only at the highest concentration tested, 2.0 mg/mL (Table 1). The main aberrations observed were nuclear buds and anaphasic bridges. In the meristematic cells of the highest concentration, 2.0 mg/mL, the presence of micronuclei suggests chromosomal instability. In order to evaluate if the micronuclei were transferred and fixed to other regions of the organism and confirm the indication of mutagenicity, cells from the F₁ region were analyzed. The data demonstrated that no concentration of the compound had significant result in this region (Table 1).

3.2 Metallic-insecticide [Mg(5-methyl-phen)(hesperetin)(H₂O)₂](CH₃COO) [2]

The index of germination revealed no toxicity for this metallic-insecticide (Table 2). Statistically significant cytotoxicity was found at a concentration of 2.0 mg/mL and genotoxicity was found at concentrations of 0.5 mg/mL and 1.0 mg/mL, at which mainly metaphases with adherence were observed (Table 2). However, the statistical analysis revealed no significant number of micronuclei for any concentrations tested (Table 2).

3.3 Analysis of one of the components of the formula, 5-methyl-phenanthroline [3]

The metallic-insecticide [Mg(5-methyl-phen)hesperetin)(H₂O)₂](CH₃COO) induced statistically significant cytotoxic and genotoxic effects. Therefore, to better understand the results, one of the components of its formulation, 5-methyl-phenanthroline, was also evaluated in order to determine its potential toxicity and, thus, determine whether its presence may be related to the toxicity found. The analysis showed that 5-methyl-phen was cytotoxic and genotoxic at the concentrations of 2.0 mg/mL and 0.5 mg/mL, respectively (table 3).

4. Discussion

Higher plants enable detecting, cytologically, mutagens that cause cell inhibition, induction of chromosomal, numerical and structural aberrations, ranging from chromosome fragmentation to the disorganization of the mitotic spindle (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE,

2012). Thus, the *A. cepa* test enabled the evaluation of the toxicity, mutagenicity and chromosomal instability caused by the compounds [Mg(5-Cl-phen)(hesperetin)(H₂O)₂](CH₃COO) [1], [Mg(5-methyl-phen)(hesperetin)(H₂O)₂CH₃COO) [2] and 5-methyl-phenanthroline [3].

The analysis of mitotic index revealed that only product [2] can be cytotoxic. According to Fernandes et al. (2007), both the increase and the decrease of MI are important indicators of environmental pollution: when it is lower than in the control, there is alteration in the development of the organism; when it is higher, the increase of cell division can indicate a disorder in cell proliferation and, even, the formation of a tumor.

Using the *A. cepa* test system, a decrease in the number of mitosis was also found by Akdeniz e Özmen (2011), when studying the biopesticide oximatin, and by Anjana e Thoppil (2013) when studying aqueous extracts of the plant *Pogostemon auricularius*. In *Vicia faba*, the natural formicide Macex[®] was also responsible for decreasing the mitotic index (COTELLE et al., 2012). The decrease in mitotic activity may have been caused by the inhibition of DNA synthesis or by the blockage of the G2 phase of the cell cycle, preventing the cell from dividing (TÜRKÖGLÜ, 2008).

Regarding genotoxicity, compound [1] and [2] induced chromosomal aberrations. Compound [1] induced aberrations only at 2.0 mg/mL and compound [2] at 0.5 mg/mL and 1.0 mg/mL. These alterations, characterized both by changes in chromosome structure and in its total number, can occur spontaneously or as a result of exposure to chemical and physical agents (RUSSEL, 2002).

Among the aberrations induced by these compounds, anaphases with bridge were the most frequent. According to Hoffelder et al. (2004), anaphasic bridges are a common cause and an indicator of chromosomal instability. This phenomenon can occur as a result of chromosomal adherence (MARCANO et al., 2004; BROSSI, 2008), by telomere shortening (De LANGE, 2002) or by an unequal translocation or inversion of chromosome segments (GÖMÜRGEN, 2005).

According to the results obtained, the chromosomal bridges observed here were probably formed by chromosomal adherence, since this alteration was one of the most induced by the two compounds. According to Marcano et al. (1999) and Kurás (2004), chromosomal adherence is a type of abnormality that does not affect the DNA molecule itself, but the protein matrix of the chromatin, probably the amount of histones or other proteins that regulate its structure.

Adherent chromosomes have been observed in roots of *A. cepa* after treatment with various metals, such as Hg, Ni and Cu (FISKESJÖ, 1993; MONTE-EGITO et al., 2007). Although the tested compound contained the metal magnesium, studies have shown that it has no genotoxic effects at physiologically relevant doses. Once this substance is essential to the organism, magnesium plays an important role in genomic stability, such as in DNA replication and protein synthesis, having a function as a cofactor in repair proteins, in the maintenance of the anti-oxidant status of the cell and in the regulation of cell cycle and apoptosis (HARTWIG, 2001).

However, both histones and magnesium bind to DNA through the same site, the phosphate groups (NAORA et al., 1961). Therefore, a competition may have occurred between these two components, leading, consequently, to the formation of the aberrations found.

The presence of micronuclei, an indicative of chromosomal instability, was only observed in cells of the meristematic region at the highest concentration of the compound [1]. However, the analysis of the F₁ region demonstrated that such damage was not passed on to the other cells of the organism. According to Ma et al. (1995), after the end of mitotic division in the meristematic cells, the possible DNA damage of these cells would be visualized in the form of micronuclei in their daughter cells, which correspond to the F₁ cells in *A. cepa*. In the case of compound [1], the cellular repair mechanism was able to reverse the damage caused, preventing fixation of micronuclei in the F₁ region cells.

Genotoxic and mutagenic tests are extremely important in studies evaluating the efficacy and safety of molecules in the early stages of the development of new substances (JENA et al., 2009). Akhtar et al. (2012), when evaluating a herbo-metallic formulation in human lymphocytes, concluded that the highest concentrations tested are responsible for inducing genotoxicity. Vardhini et al. (2010) found no formation of micronuclei induced by another herbo-metallic formulation. Natural formicides were evaluated by Cotellet et al. (2012) and Tiepo et al. (2010), and they concluded that their respective products can be considered environmentally safe.

Considering the two metallic-insecticides evaluated, product [2] had significant cytotoxic and genotoxic results in different concentrations (2.0 mg/mL and 1.0 mg/mL), while product [1] showed genotoxicity only at the highest concentration. In order to better understand the results, one of the components of the formulation of compound [2], 5-methyl-phenanthroline [3], was assessed using the same parameters. The results demonstrate that compound [3] can be related to the toxicity found in compound [2], once it showed

cytotoxicity and genotoxicity. Studies with 1,10-phenanthroline complexed with Cu(I) and Cu(II) have indicated that these substances can be toxic (POPE; SIGMAN, 1984; FLORENCE et al., 1985; GOLDSTEIN; CZAPSKI, 1986).

Another component present in the formulas of metallic-insecticides corresponds to hesperetin, a flavonoid found in citrus fruits. However, it seems to have no relation to the positive results, although some flavonoids have shown genotoxicity in eukaryotic and prokaryotic systems (BOOS; STOPPER, 2000; HEO et al., 2001; MISRA et al., 2002). According to Snyder and Gillies (2002), hesperetin has no ability to intercalate with DNA, and in a 2003 study, the same authors demonstrated that hesperetin can reduce by 80% the induction to formation of micronuclei by other flavonoid, genistein.

However, it is important to consider that transition metals, such as copper and manganese, can affect the genotoxicity of some flavonoids, although for hesperetin no alteration has been verified (SNYDER; GILLIES, 2002).

Considering the two metallic-insecticides evaluated, the compound [Mg(5-methyl-phen)(hesperetin)(H₂O)₂](CH₃COO) obtained results that evidence some toxic action. The analysis of one of the components of its formula revealed that it can be related to the positive results, since it also has shown toxic effects for the parameters evaluated. Therefore, [Mg(5-Cl-phen)(hesperetin)(H₂O)₂](CH₃COO) is found to be an environmentally safer alternative to combat leaf-cutting ants.

Acknowledgements

The authors thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process No. 2012/12019-5) for the financial support, Prof. Dr. Cintya A. Christofolletti and biologist Cleiton Pereira de Souza for the assistance in preparing the bioassays.

References

ABRAISCA – Associação Brasileira das Empresas Fabricantes de Iscas Inseticidas.

ABRAISCA defende a sulfluramida. Disponível em:

<<http://www.abraisca.org.br/index.php/noticias/8-abraisca-defende-a-sulfluramida>>. Acesso em: 24 Ago 2015.

AKDENIZ, D.; ÖZMEN, A. Antimitotic effects of the biopesticide oxymatrine. **Caryologia**, v, 64, p. 117-120, 2011.

AKHTAR, K.; MALLA, T. M. D.; MALLA, B. A.; BHAT, H. K. Assessment of genotoxic potential of qurs kushta qalai: a unani herbo-metallic formulation. **Journal of Herbal Medicine e Toxicology**, v. 6, p. 49-54, 2012.

ANJANA, S.; THOPPILL, 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**, p. 562-566, 2013.

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

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.

BROSSI, M. J. L. **Ecotoxicologia de um sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto**. 2008. 85 f. Dissertação -(Mestrado)- Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

COTELLE, S.; TESTOLIN R. C.; FOLTÊTE A. S.; BOSSARDI-RISSARDI, G.; SILVEIRA R. A.; RADETSKI C. M. Genotoxicity potencial of a new natural formicide. **Environmental Science Pollution Research**, v. 19, p. 628-635. 2012

De LANGE, T. Protection of mammalian telomeres. **Oncogene**, 21:532–540, 2002.

EDWARDS N. T; TAYLOR G. E; ADAMS M. B; SIMMONS G. L; KELLY, J. M. Ozone, acidic rain and soil magnesium effects on growth and foliar pigments of *Pinus taeda* L. **Tree Physiology**, v. 6, p. 95-104, 1990.

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.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLS, 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 ,T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, p. 252-259. 2007.

FERNANDES, T. C. C.; PIZANO, M. A.; MARIN-MORALES, M.A. Characterization, Modes of Action and Effects of Trifluralin: A Review. In: Price, A.J; Kelton, J.A. (eds) **Herbicides - Current Research and Case Studies in Use**, Croatia, InTech, 2013, pp 489-515.

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

FLORENCE, T. M.; STAUBER, J. L.; MANN, K. J. The reaction of copper-2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline with hydrogen peroxide. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 24, p. 243-254, 1985.

GOLDSTEIN, S.; CZAPSKI, G. Mechanisms of the reactions of some copper complexes in the presence of DNA with superoxide, hydrogen peroxide, and molecular oxygen. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 108, p. 2244-2250, 1986.

GÖMÜRGEN, A. N. Cytological effect of the potassium metabisulphite and potassium nitrate food preservative on root tips of *Allium cepa* L. **Cytologia**, v. 70, p. 119-128, 2005.

HARTWIG, A. Role of magnesium in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 113-121, 2001.

HEBLING, M. J. A.; MAROTI, P. S.; BUENO, O. C.; SILVA, A. O.; PAGNOCCA, F. C. Toxic effects of leaves of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) to laboratory nest of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 86, p. 253-256, 1996.

HEO, M. Y; SOHN, S. J; AU, W. W. Antigenotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. **Mutation Research**, v. 488, p. 135-150, 2001.

HOFFELDER, D. R; LUO, L; BURKE, N. A; WATKINS, S. C; GOLLIN, S. M; SAUNDERS, W. S. Resolution of anaphase bridges in cancer cells. **Chromosoma**, v. 112, p. 389-397, 2004.

JENA, G. B; KAUL, C. L; RAMARAO, P. Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug Discovery and development: impact of ICH guidelines. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 34, p. 86-99, 2009.

KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ M.; GONZALEZ, L.; LOOCK, K. V.; DECORDER, I. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 85, p. 873–899, 2011.

KURÁS, L. Characterization of protein–DNA association *in vivo* by chromatin immunoprecipitation. In: Dickson RC, Mendenhall MD (eds) **Signal Transduction Protocols, Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press Inc, 2004. p. 147-62.

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

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; Mc CONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v.334, p.185-195, 1995.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; CAMPO, A. D.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, p. 221–226, 2004.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; MONTIEL X.; MORENO P. Inhibición de la actividad biosintética nucleolar inducidas por el plomo en meristemos radiculares de cebolla

(*Allium cepa*). **Revista de la Facultad de Agronomía Universidad del Zulia**, v. 16, p. 476-487, 1999.

MELLO, M. S.; VIDAL, B. C. **A reação de Fulgen**. Ciência e Cultura, São Paulo. v.30, p. 665-676, 1978.

MISRA, R. R.; HURSTING, S. D.; PERKINS, S. N.; SATHYAMOORTHY, N.; MIRSALIS, J. C.; RICCIO, E. S.; CROWELL, J. A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of soy isoflavones. **International Journal of Toxicology**, v. 21, p. 277-85, 2002.

MONTE-EGITO, L. C.; MEDEIROS, M. G.; MEDEIROS, S. R. B.; AGNEZ-LIMA, L. F. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 435-441, 2007.

NAORA, H.; NAORA, H.; MIRSKY, A. E.; ALLFREY, V. G. Magnesium and calcium in isolated cell nuclei. **The Journal of General Physiology**, v. 44, p. 713-742, 1961.

OLIVEIRA, R. M.; SOUZA-DANIEL, J. F.; DE AGUIAR, I.; DAS GRAÇAS FERNANDES SILVA, M. F.; FERNANDES, J. B.; CARLOS, R. M. Structural effects on the hesperidin properties obtained by chelation to magnesium complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.129, p. 35-42, 2013.

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

POPE, L. E.; SIGMAN, D. S. Secondary structure specificity of the nuclease activity of the 1,10-phenanthroline-copper complex. **PNAS**, v. 81, p. 3-7, 1984.

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. 90, p. 121-127, 1997.

RUSSEL, P.J. Chromosomal mutation. In: Cummings B (ed.) **Genetics**. São Francisco: Pearson Education Inc, 2002. p. 595–621.

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.

SNYDER, R. D.; GILLIES, P. J. Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative and topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 40, p. 266-276, 2002.

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.

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

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. **Environmental Science & Technology**, v. 37, p. 2634-2639, 2003.

TEDESCO S. B.; LAUGHINGHOUSE H. D. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. In: Srivastava JK (ed). **Environmental Contamination**. Croatia: InTech, 2012

TIEPO, E.N.; CORRÊA, A. X. R.; RESGALLA, C.; COTELLE, S.; FÉRARD, J. F.; RADETSKI, C. M. Terrestrial short-term ecotoxicity of a green formicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 939-943, 2010.

TURKOGLU, S. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2035-2041, 2008.

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 em: 24 Ago. 2015.

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 (*Larushyperboreus*) from the Norwegian arctic. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 7439-7445, 2005.

VHARDINI, N.; SATHYA, T. N.; MURTHY, P. Assessment of genotoxic potential of herbomineral preparations – bhasmas. **Current Science**, v. 99, p. 1096-1100, 2010.

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.

Table 1. GI and MI, GenI and FMN mean $\pm$ standard deviation in meristematic cells and in F₁ region after exposure to NC, TRIF, MMS and different concentrations of metallic-insecticide [Mg(5-Cl-phen)(hesperetin)(H₂O)₂](CH₃COO).

Treatments	Bioassays	GI (%)	MI	GenI	FMN	
					Meristematic region	F ₁ region
Control groups	NC	93.50	4.71 $\pm$ 14.49	0.10 $\pm$ 0.16	0	0
	TRIF	75.00	3.75 $\pm$ 10.32	0.76 $\pm$ 0.77*	0.57 $\pm$ 0.68*	0.30 $\pm$ 0.27*
	MMS	73.00	5.46 $\pm$ 13.00	0.72 $\pm$ 0.36*	1.69 $\pm$ 1.79*	0.29 $\pm$ 0.33*
Concentrations (mg/mL)	0.5	88.00	3.64 $\pm$ 10.64	0.15 $\pm$ 0.12	0.07 $\pm$ 0.10	0.01 $\pm$ 0.03
	1.0	94.00	3.27 $\pm$ 10.28	0.11 $\pm$ 0.11	0.05 $\pm$ 0.09	0.01 $\pm$ 0.04
	2.0	93.00	3.15 $\pm$ 6.23	0.29 $\pm$ 0.14*	0.07 $\pm$ 0.06*	0.01 $\pm$ 0.04

NC = negative control; GI = Germination Index; GenI = Genotoxicity Index; MI = Mitotic Index; MMS = methyl methanesulfonate; FMN = Frequency of micronuclei; TRIF = Trifluralin.

*p<0,05 statistically significantly when compared to NC using Kruskal-Wallis test.

Table 2. GI and MI, GenI and FMN mean $\pm$ standard deviation in meristematic cells after exposure to NC, TRIF, MMS and different concentrations of metallic-insecticide [Mg(5-methyl-phen)(hesperetin)(H₂O)₂](CH₃COO).

Treatments	Bioassays	GI (%)	MI	GenI	FMN
Control groups	NC	82.00	6.17 $\pm$ 2.65	0.02 $\pm$ 0.08	0.04 $\pm$ 0.11
	TRIF	54.00	4.98 $\pm$ 2.34	0.49 $\pm$ 0.53*	0.52 $\pm$ 0.59*
	MMS	88.50	4.99 $\pm$ 2.05	1.81 $\pm$ 1.30*	10.00 $\pm$ 4.34*
Concentrations (mg/mL)	0.5	92.50	4.53 $\pm$ 1.55	0.14 $\pm$ 0.21*	0.09 $\pm$ 0.25
	1.0	87.50	4.74 $\pm$ 1.68	0.18 $\pm$ 0.29*	0.09 $\pm$ 0.27
	2.0	89.50	3.60 $\pm$ 1.21*	0.13 $\pm$ 0.21	0.07 $\pm$ 0.17

NC = negative control; GI = Germination Index; GenI = Genotoxicity Index; MI = Mitotic Index; MMS = methyl methanesulfonate; FMN = Frequency of MN; TRIF = Trifluralin.

*p<0,05 statistically significantly when compared to NC using Kruskal-Wallis test.

Table 3. GI and MI, GenI and FMN mean $\pm$ standard deviation in meristematic cells after exposure to NC, TRIF, MMS and different concentrations of compound 5-methyl-phenanthroline found in metallic-insecticide [Mg(5-methyl-phen)(hesperetin)(H₂O)₂] (CH₃COO).

Treatments	Bioassays	GI (%)	MI	GenI	FMN
Control groups	NC	59.50	4.04 $\pm$ 1.58	0.08 $\pm$ 0.21	0.23 $\pm$ 0.36
	TRIF	28.00	4.8 $\pm$ 2.25	1.91 $\pm$ 2.11*	0.92 $\pm$ 0.91*
	MMS	47.50	6.67 $\pm$ 2.41*	1.39 $\pm$ 1.01*	5.91 $\pm$ 3.56*
Concentrations (mg/mL)	0.5	67.50	3.95 $\pm$ 1.16	0.23 $\pm$ 0.28*	0.52 $\pm$ 1.14
	1.0	76.50	3.76 $\pm$ 1.33	0.09 $\pm$ 0.14	0.18 $\pm$ 0.26
	2.0	66.50	2.52 $\pm$ 1.68*	0.09 $\pm$ 0.25	0.57 $\pm$ 0.65

NC = negative control; GI = Germination Index; GenI = Genotoxicity Index; MI = Mitotic Index; MMS = methyl methanesulfonate; FMN = Frequency of micronuclei; TRIF = Trifluralin.

*p<0,05 statistically significantly when compared to NC using Kruskal-Wallis test.

Avaliação do efeito genotóxico de dois metalo-inseticidas por meio do teste Trad-MCN em *Tradescantia pallida*

SOUZA, R.B.¹; SOUZA, C.P.¹; BUENO, O.C.¹; FONTANETTI, C.S.^{1*}

¹UNESP (Universidade Estadual Paulista), Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Rio Claro, São Paulo, Brasil

*Autor correspondente: Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264136.

E-mail: fontanet@rc.unesp.br

Resumo

A crescente conscientização ambiental a respeito dos efeitos negativos causados pelo uso de formicidas na agricultura tem levado ao desenvolvimento de produtos que possuam maior especificidade e menor toxicidade à organismos não alvos. Dentre eles, encontram-se dois novos metalo-inseticidas, [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂] (CH₃COO) e [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO), os quais são constituídos por um produto natural ligado a um metal inorgânico. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação genotóxica destes dois metalo-inseticidas em *Tradescantia pallida* por meio do teste Trad-MCN. De acordo com os resultados obtidos, nenhuma das três concentrações testadas para os dois metalo-inseticidas (0.5mg/mL; 1.0mg/mL e 2.0mg/mL) foi capaz de induzir a formação de micronúcleos. Portanto, o uso destes produtos seria uma alternativa ambientalmente mais segura no combate às formigas cortadeiras.

Palavras-chave: micronúcleo; formicida; bioindicador vegetal

1. Introdução

O uso de pesticidas na agricultura é responsável por causar sérios danos não apenas para a saúde humana, mas também para o meio ambiente. Para amenizar este problema, vários pesticidas conhecidamente tóxicos têm sido banidos. A sulfluramida, um dos principais princípios ativos utilizados no combate de formigas-cortadeiras, está entre os pesticidas que tiveram seu uso proibido pela Convenção de Estocolmo (2009).

Como uma alternativa eficaz à sulfluramida no combate às formigas cortadeiras, um novo sistema metalo-inseticida foi desenvolvido. Este novo formicida é composto por um produto natural ligado a diferentes metais inorgânicos. Dentre as fórmulas mais eficientes,

encontram-se $[\text{Mg}(5\text{-Cl-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ e $[\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ (OLIVEIRA et al., 2013).

Para evitar impactos ambientais, os pesticidas precisam ser analisados por meio de testes ecotoxicológicos antes de serem utilizados no meio ambiente; assim, protege-se a saúde humana e os ecossistemas, uma vez que suas moléculas têm a capacidade de interagir com qualquer ser vivo (KLAUSENER et al., 2007).

A avaliação dos riscos ambientais, realizada através de estudos ecotoxicológicos, tem como principal objetivo fornecer dados que serão utilizados para determinar a necessidade de precaução e limitação no uso de determinada substância. Com este propósito, ensaios com plantas podem ser utilizados para fornecer informações sobre a mutagenicidade e genotoxicidade (RODRIGUES et al., 1997), através de estudos citogenéticos, os quais são capazes de descrever possíveis alterações no material genético destes organismos (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012).

A utilização de plantas para o monitoramento ambiental de substâncias tóxicas possui muitas vantagens, uma vez que esses organismos são de fácil manuseio e manutenção, possuem ampla aplicabilidade e baixo custo (GRANT, 1994) e, em muitos casos, são ecologicamente mais relevantes para a avaliação de substâncias liberadas no solo (FONTANETTI et al., 2011).

O teste de micronúcleo em *Tradescatia pallida* (Trad-MCN) é considerado uma ferramenta eficiente por muitos pesquisadores devido sua simplicidade e sensibilidade a agentes potencialmente tóxicos (BATALHA, 1999). Recentemente, o teste foi utilizado com sucesso para a avaliação da genotoxicidade do pesticida imidacloprido (RODRÍGUEZ et al., 2015) e da vinhaça de cana-de-açúcar, utilizada como fertilizante na agricultura (PEDRO-ESCHER et al., 2014).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos tóxicos de dois metais-inseticidas, $[\text{Mg}(5\text{-Cl-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ e $[\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$, no material genético do vegetal *T. pallida* por meio do teste Trad-MCN.

2. Materiais e Métodos

2.1 Metalos-inseticidas

Os metalos-inseticidas utilizados no estudo, $[\text{Mg}(5\text{-Cl-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ [1] e $[\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ [2], foram fornecidos

pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil.

2.2 Bioensaio com *T. pallida*

Dez inflorescências jovens foram coletadas de canteiros padronizados situados na Universidade Estadual Paulista (UNESP) e expostas a três diferentes concentrações (0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 2,0 mg/mL) dos metalos-inseticidas [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) [1] e [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) [2] por 8 horas, seguidas de 24 horas de recuperação, sob constante aeração. O mesmo protocolo foi seguido para o controle negativo (exposição das inflorescências em água destilada) e positivo (exposição das inflorescências a 10 ppm de metil metano sulfonato). Após a recuperação, as inflorescências foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 por 48 horas.

2.3 Teste do micronúcleo com *T. pallida* (Trad-MCN)

Após a fixação, cada botão de tamanho intermediário foi colocado sobre uma lâmina. As anteras foram retiradas do interior do botão e maceradas suavemente com o auxílio de uma agulha para a liberação das células; para facilitar o processo e posterior observação, adicionou-se uma gota de carmim acético 2%; o material foi coberto por lamínula e a lâmina foi passada rapidamente sobre uma chama. As lâminas que continham células em estágio de tétrade foram imediatamente analisadas sob microscopia de luz com ampliação de 400 vezes; foram analisadas 300 tétrades por lâmina e 10 lâminas por tratamento, totalizando 3000 células por tratamento. O ensaio foi realizado em duplicata. O índice genotóxico foi avaliado de acordo com a frequência de micronúcleo observada por meio da fórmula $IG = (n^\circ \text{ de tétrades com MN} / n^\circ \text{ total de tétrades observadas}) \times 100$. Os resultados obtidos foram comparados com o controle negativo pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) utilizando o programa estatístico SPSS 22 de acordo com Marôco (2011).

3. Resultados

Os resultados obtidos revelaram que nenhuma concentração dos metalo-inseticidas [1] e [2] foi capaz de induzir a formação de micronúcleos (fig. 1) de forma significativa em relação ao controle negativo (fig. 2). Porém, a frequência de micronúcleos encontrada no metalo-inseticida [2] foi maior que a encontrada no metalo-inseticida [1] (fig. 2).

4. Discussão

O uso de tecidos vegetais e células mães do grão de pólen para avaliação da genotoxicidade ambiental é um método de avaliação simples, confiável e de baixo custo (GERAS'KIN; EVSEEVA; OUDALOVA, 2011). Entre as espécies vegetais mais utilizadas estão *Tradescantia* spp (MISIK et al., 2011) e *A. cepa* (TEDESCO; LAUGHINHOUSE, 2012).

Segundo Meravi e Prajapati (2015), o teste de micronúcleo em tétrades de *Tradescantia* (Trad-MCN) é, atualmente, um dos bioensaios com plantas mais utilizado para a detecção de substâncias tóxicas presentes no ambiente. O teste consiste na formação de micronúcleos como resultado da quebra cromossômica em células meióticas do grão de pólen. Aproximadamente 160 substâncias químicas já foram testadas por meio deste teste e 100 artigos com misturas ambientais complexas foram publicados.

Além de sua alta sensibilidade em relação à ação genotóxica, a espécie possui fácil cultivo, curto ciclo de vida e, principalmente, cromossomos com tamanho grande e número reduzido ($2n = 6$) (MERAVID; PRAJAPATI, 2015).

No presente estudo, o teste de Trad-MCN revelou que os dois metalo-inseticidas testados não foram capazes de induzir a formação de micronúcleos de modo significativo em relação ao controle negativo, embora o metalo-inseticida [2] tenha apresentado uma maior frequência.

Maior ação genotóxica também foi observada pelo metalo-inseticida [2] em células meristemáticas de *Allium cepa*. Neste organismo, o formicida foi responsável por induzir a formação de micronúcleos e aberrações cromossômicas em uma frequência maior que o metalo-inseticida [1], porém também não estatisticamente significativo quando comparado ao controle (SOUZA et al., em submissão).

A formulação dos metalos-inseticidas consiste na complexação de um produto natural, um flavonóide (hesperitina), com um metal inorgânico (magnésio). Estudos toxicológicos com estes dois componentes da fórmula não evidenciaram ação tóxica.

Apesar de muitos flavonóides apresentarem ação mutagênica (SAHU; GREY, 1993), Snyder e Gillies (2002) observaram que a hesperitina não é capaz de intercalar com o DNA e nem apresenta clastogenicidade. Além disso, em estudo de 2003, os mesmos autores demonstraram que a hesperitina pode reduzir em 80% a indução de formação de micronúcleos por outro flavonóide, a genisteína.

É esperado que o magnésio, por ser um elemento essencial ao organismo (HARTWIG, 2001), não apresente efeitos citotóxicos nem genotóxicos ao material genético, como

observaram Oguma et al. (1998) em bactérias e células de hamster chinês, e Conway et al. (1987) também em linhagem celular de hamster chinês. Porém, estudo recente realizado por Sanders et al. (2014) revelou que mesmo os metais considerados essenciais, entre eles o magnésio, pode ter ação genotóxica e citotóxica. Virgílio et al. (2011) também observaram maior frequência de micronúcleos induzida pelo magnésio em células de rato. Os autores atribuem a formação de micronúcleos pela presença de partículas de magnésio no aparato mitótico, o qual pode ter afetado o processo de divisão. Constataram, porém, que partículas de magnésio possuem comportamento diferente do magnésio puro.

Outro componente presente na fórmula dos dois metalo-inseticidas, a fenantrolina, possui efeitos tóxicos quando complexados com Cu(I) e Cu(II) (POPE; SIGMAN, 1984; FLORENCE et al., 1985; GOLDSTEIN; CZAPSKI, 1986). Segundo Whittaker (2001), a fenantrolina, mesmo sem ser complexada com outra substância, apresenta ação mutagênica.

Deste modo, não é possível afirmar que algum dos componentes da fórmula seja o responsável pela formação dos micronúcleos, como nos observados no metalo-inseticida [2]. Porém, em estudos ecotoxicológicos, a interação entre as substâncias (efeitos aditivo, efeito sinérgico, potenciação e antagonismo) deve ser considerada. Nestes casos, a ação de um composto pode interferir na ação do outro, alterando o efeito que teriam caso estivessem isolados (AZEVEDO; CHASIN, 2004). A maior frequência de micronúcleos encontrada no metalo-inseticida [2] pode ter ocorrido devido à interação entre seus componentes, como na potenciação, onde uma substância pode aumentar o efeito tóxico de outra.

Por ser uma alternativa ao uso da sulfluramida, a qual é reconhecidamente tóxica para vários organismos (LUEBKER et al., 2005; FAN et al., 2005; VERREAULT et al., 2005; OLIVERO-VERBEL, 2006; TANIYASU et al., 2003; BOTS et al., 2010), é de grande relevância o fato destes dois novos formicidas não apresentarem ação genotóxica no teste aqui utilizado. O desenvolvimento de pesticidas menos tóxicos tornou-se uma necessidade mundial com a crescente preocupação ambiental e regulações governamentais mais rígidas (KÄHKÖNEN; NORDSTRÖM, 2008; PAULUS, 2005). Deste modo, novos pesticidas devem possuir maior especificidade e menor impacto ambiental (HEBLING et al., 2000).

Os metalo-inseticidas aqui testados não apresentaram efeito genotóxico no organismo testado, tornando-os uma alternativa ambientalmente segura no combate contra as formigas cortadeiras. Dentre os dois produtos testados, a aplicação do [1] é mais aconselhável, uma vez que apresentou menores danos ao material genético.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo 2012/12019-5) pelo apoio financeiro, à Msc Yadira Ansoar Rodríguez e Vinicius Daguano Gastaldi pela ajuda nos experimentos, ao Prof. Dr. João Batista Fernandes e à Prof. Dra. Rose Maria Carlos pela síntese e disponibilização dos metalo-inseticidas testados.

5. Referências

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, n 3, p 901-905, 2010.

CONWAY, K.; WANG, X.W.; XU, L.; COSTA, M. Effect of magnesium on nickel-induced genotoxicity and cell transformation. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1115–1121, 1987.

FAN, Y.O.; JIN, Y.H.; MA, Y.X.; ZHANG, Y.H.. Effects of perfluorooctane sulfonate on spermiogenesis function of male rats. **Wei Shehg Yan Jiu**. v.34, n. 1, p. 37-39, 2005.

FLORENCE, T.M.; STAUBER, J.L.; MANN, K.J. The reaction of copper-2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline with hydrogen peroxide. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 24, p. 243-254, 1985.

FOLTÊTE, A.S.; DHYÈVRE, A.; FÉRARD, J.F.; COTELLE, S. Improvement of *Vicia*-micronucleus test for assessment of soil quality: A proposal for international standardization. **Chemosphere**. v. 85, p. 1624-1629, 2011.

GOLDSTEIN, S.; CZAPSKI, G. The role and mechanism of metal ions and their complexes in enhancing damage in biological systems or in protecting these systems from the toxicity of O₂. **Journal of Free Radicals in Biology & Medicine**. v. 2, p. 3-11, 1986.

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

HARTWIG, A. Role of magnesium in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 113-121, 2001.

HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; SILVA, O.A.; MAROTI, P.S. Toxic effects of *Canavalia ensiformis* L. (Leguminosae) on laboratory colonies of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Applied Journal of Entomology**. v. 124, p. 33-35, 2000.

KÄHKÖNEN, E.; NORDSTRÖM, K. Toward a nontoxic poison: current trends in (European Union) biocides regulation. **Integr. Environ. Assess. Manag.**, v. 4, 471–477, 2008.

KLAUSENER, A.; RAMING, K.; STENZEL, K. Modern tools for drug discovery in agricultural research. In: OHKAWA, H.; MIYAGAWA, H.; LEE, P.W. **Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety**. Alemanha: Wiley, 2007. p. 55-63.

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.

MARÔCO, J. Análise Estatística com o SPSS Statistics. 5º ed. **Pero Pinheiro: Report Number, 2011. 992p.**

MERAVI, N.; PRAJAPATI, S.K. Biomonitoring the Genotoxicity of Heavy Metals/Metalloids Present in Soil Contaminated by Fly Ash from Coal-Fired Thermal Power Plant Using *Tradescantia pallida*. **Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants**. v. 1, p. 169-176, 2015.

OGUMA, Y.; YOKOTA, F.; INOUE, K.; SHIMAMURA, K. Mutagenicity studies of magnesium sulfate — reverse mutation test with bacteria and chromosomal aberration test with mammalian cells in culture. **J. Toxicol. Sci.** v. 23, p. 81–90, 1998.

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, p. 367-372, 2006.

PAULUS, W. Introduction to microbiocides. In: PAULUS, W. **Directory of microbiocides for the protection of materials**. Nova York: Springer, 2005, p. 3–8, 2005.

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.

POPE, L.E.; SIGMAN, D.S. Secondary structure specificity of the nuclease activity of the 1,10-phenanthroline-copper complex. **PNAS**, v. 81, p. 3-7, 1984.

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.

SAHU, S.C.; GRAY, G.C. Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. **Cancer Letters**. v. 70, p. 73-79, 1993.

SANDERS, T.; LIU, Y.M.; TCHOUNWOU, P.B. Cytotoxic, Genotoxic, and Neurotoxic Effects of Mg, Pb, and Fe on Pheochromocytoma (PC-12) Cells. **Environmental Toxicology**, p. 1-14, 2014.

SNYDER, R.D.; GILLIES, P.J. Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative and topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 40, p. 266-276, 2002.

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.

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

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, n 12, 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.

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.

VIRGILIO, A.; REIGOSA, M.; DE MELE, M. Biocompatibility of magnesium particles evaluated by in vitro cytotoxicity and genotoxicity assays. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** v. 99, p. 111–119, 2011.

WHITTAKER, P.; SEIFRIED, H.E.; SAN, R.H.C.; CLARKE, J.J.; DUNKEL, V.C. Genotoxicity of Iron Chelators in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 38, p. 347-356, 2001.

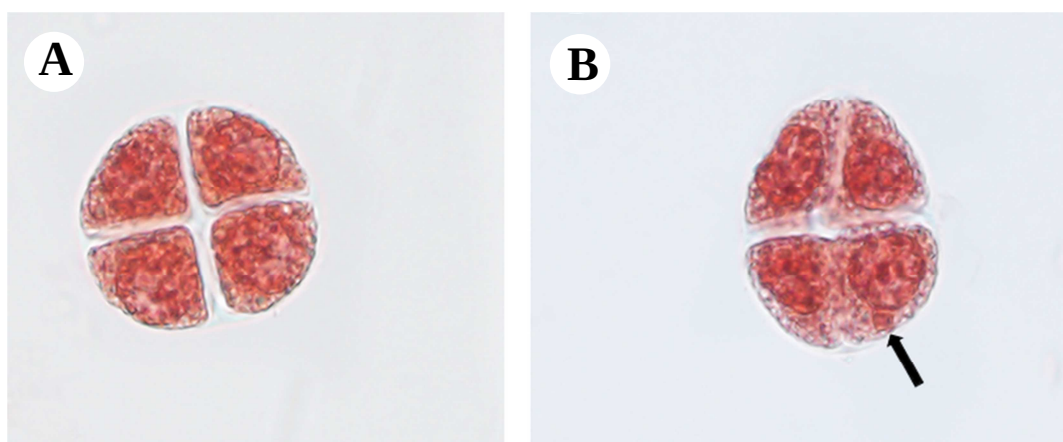


Figura 1. Tétrade de *T. pallida*. A: sem alteração; B: com micronúcleo (seta). A = 400x

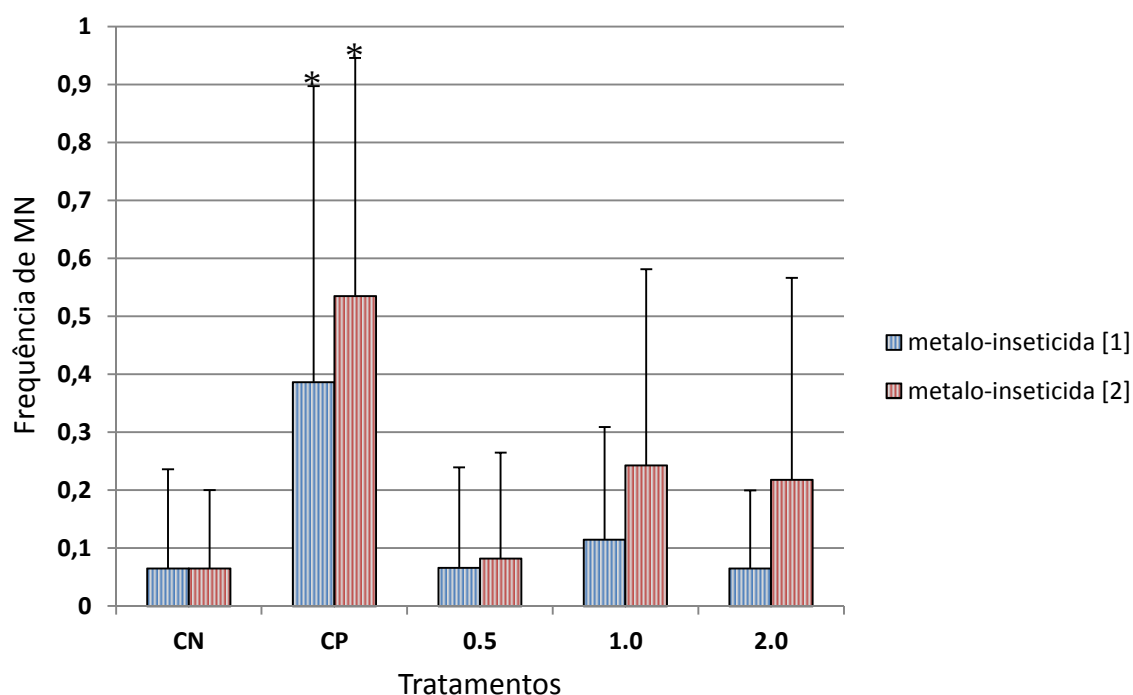


Figura 2. Frequência de micronúcleos em 3.000 tétrade de *T. pallida* por tratamento. CN = controle negativo; CP = controle positivo com metilmetanossulfonato; metalo-inseticida [1] = $[\text{Mg}(5\text{-Cl-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$; metalo-inseticida [2] = $[\text{Mg}(5\text{-metilphen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$

* $p < 0.05$ estatisticamente significativo comparado ao CN por meio do teste Kruskal-Wallis.

Utilização de marcadores morfológicos para avaliação da toxicidade de dois metalo-inseticidas em diplópodos

SOUZA, R.B.¹; BUENO, O.C.¹; FONTANETTI, C.S.^{1*}

¹UNESP - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Rio Claro, São Paulo, Brasil

*Autor correspondente: Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264136.

E-mail: fontanet@rc.unesp.br

Resumo

Diplópodos, animais da fauna edáfica, têm sido utilizados como animais bioindicadores para a avaliação de substâncias liberadas no solo, uma vez que estão em constante contato com ele. Neste sentido, o presente estudo utilizou o milípede *Rhinocricus padbergi* para a avaliação da toxicidade de dois metalo-inseticidas utilizados no combate às formigas-cortadeiras. Terrários contendo os metalo-inseticidas em três diferentes concentrações (0.5mg/mL, 1.0mg/mL e 2.0mg/mL) foram montados. Dez indivíduos foram expostos em cada terrário e, após períodos de 21 e 90 dias, três indivíduos de cada terrário foram dissecados para a retirada do intestino médio. Para a análise qualitativa e semi-quantitativa das alterações morfofisiológicas, o material foi submetido à técnicas histológicas e histoquímicas. Os resultados demonstraram que os metalo-inseticidas não foram capazes de induzir alterações histológicas e histoquímicas significativas nos animais expostos em nenhum período de exposição. Portanto, o uso destes produtos apresenta-se como uma alternativa ambientalmente segura para estes organismos.

Palavras-chave: milípedes; histologia; histoquímica; histopatologia; formicida

1. Introdução

Em muitos países industrializados, a contaminação do solo tornou-se um grave problema. Dentre as muitas fontes de poluição destacam-se os resíduos de pesticidas provenientes de anos de aplicação em solos agrícolas (VAN STRAALLEN, 2002), responsáveis por afetar diretamente o ecossistema terrestre (TIEPO et al., 2010). Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, 2011), a perda da qualidade do solo é uma das maiores ameaças que o mundo terá que enfrentar. Deste modo, a

proteção do solo e de suas comunidades deve tornar-se uma das metas principais nas políticas ambientais dos governos (RÖMBKE et al., 2005).

Neste sentido, muitos países têm adotado políticas de restrição no uso de pesticidas. A Europa, por exemplo, já eliminou mais de 75% das substâncias utilizadas na agricultura desde 1991, de acordo com sua ineficiência e toxicidade (KARABELAS et al., 2009). Em 2009, a Convenção de Estocolmo banuiu a comercialização da sulfluramida, uma das principais substâncias utilizadas no combate às formigas-cortadeiras (ZANETTI et al., 2014).

Como uma alternativa eficaz ao uso da sulfluramida, pesquisadores desenvolveram complexos metalo-inseticidas, os quais são formados por um produto natural (flavonóide) complexados com metais inorgânicos (OLIVEIRA et al., 2013). Para um formicida ser ambientalmente seguro, ele não pode perturbar o equilíbrio ecológico e deve ser efetivo apenas para seu alvo (KÄHKÖNEN; NORDSTRÖM, 2008). Para assegurar isso, os pesticidas necessitam ser avaliados em estudos ecotoxicológicos antes de sua utilização no ambiente com o intuito de proteger a saúde humana e ambiental (KLAUSENER et al., 2007).

Os invertebrados terrestres são os organismos mais apropriados para a avaliação dos efeitos de substâncias presentes no solo devido ao seu íntimo contato com ele (FONTANETTI et al., 2011). Diplópodos ganharam atenção nos estudos ecotoxicológicos nos últimos 20 anos devido a vários fatores: (a) estão expostos continuamente aos contaminantes do solo; (b) são abundantes e com distribuição mundial; (c) muitas espécies são grandes e fáceis de manusear e, portanto, podem ser utilizados em laboratório e em campo; e (d) os efeitos biológicos dos contaminantes ambientais podem ser avaliados em vários níveis de sua organização biológica (SOUZA et al., 2014; FRANCISCO; FONTANETTI, 2015).

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos de dois novos metalo-inseticidas, $[\text{Mg}(5\text{-Cl-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ e $[\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$, em um representante da fauna edáfica, o diplópodo *Rinocricus padbergi*. Para isso, foram realizadas análises histológicas e histoquímicas no intestino médio do animal, órgão responsável pela absorção de nutrientes e, consequentemente, substâncias tóxicas.

2. Materiais e métodos

2.1 Metalo-inseticidas

Os metalo-inseticidas utilizados no 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 fornecidos pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil.

2.2 Bioensaios

Espécimens adultos de *R. padbergi* foram coletados manualmente na cidade de Rio Claro (22°24'36''S; 47°33'36''W), São Paulo, Brasil. Em laboratório, após um período de aclimação por 20 dias à $21 \pm 2^\circ\text{C}$, foram montados quatro bioensaios para cada metalo-inseticida: um bioensaio controle com terra oriunda do local de coleta e outros três bioensaios contendo terra do local de coleta com os metalo-inseticidas em diferentes concentrações (0.5 mg/mL; 1.0 mg/mL e 2.0 mg/mL). Em cada bioensaio foram expostos 10 indivíduos por períodos de 21 e 90 dias. Após cada período de exposição, três animais de cada bioensaio foram anestesiados com éter sulfúrico e dissecados em solução fisiológica.

2.3 Análises morfológicas

Para as análises histológicas e histoquímicas, fragmentos do intestino médio foram fixados em Boiun (hematoxilina-eosina, azul de bromofenol, PAS e von Kossa) e formolcálcio 10% (sudan black B), colocado em tampão fosfato de sódio pH=7,4, desidratado em bateria de álcool e transferido para uma solução de resina durante 24 horas em geladeira. Após esse processo, o material foi colocado em moldes contendo resina com catalisador. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com auxílio de micrótomo. As lâminas obtidas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). O método de von Kossa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) e de sudan black B (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) e as técnicas de azul de bromofenol (PEARSE, 1985) e PAS (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) foram realizados para a detecção de cálcio, lipídios, proteínas totais e polissacarídeos neutros, respectivamente.

2.4 Análises dos resultados

As análises histológicas foram qualitativamente descritas e as alterações histopatológicas analisadas semi-quantitativamente para cada indivíduo. O protocolo seguido foi baseado no proposto por Bernet et al. (1999) e adaptado por Christofolletti et al. (no prelo). Cada alteração recebe um fator de importância (w) de acordo com sua importância patológica, classificadas como: (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível quando a exposição ao contaminante cessa; (2) importância patológica moderada, a versão é

reversível na maioria dos casos quando o estressor é neutralizado; e (3) importância patológica acentuada, a lesão é irreversível, levando a perda parcial ou total da função do órgão. A tabela 1 apresenta estas classificações adaptadas à histopatologia do intestino médio de diplópodos, utilizadas neste estudo. Escores de 0 a 6 foram utilizados para classificar as alterações histopatológicas quanto ao grau e extensão da alteração: (0) inalterado; (2) alteração pequena; (4) alteração moderada; (6) alteração severa. Os escores (*a*) foram multiplicados pelo fator de importância de cada alteração (*w*) para definir o índice de dano (*I*) por indivíduo. Então, o índice de dano para cada alteração e para cada organismo foi calculado como segue:

$$I(\text{individual}) = a(\text{escore recebido}) \times w(\text{fator de importância})$$

Para definir o índice de dano, tanto do grupo controle quanto dos tratamentos, a soma dos índices de dano foi obtida para cada indivíduo e, então, a média e o desvio padrão foram calculados.

Os dados obtidos na avaliação histopatológica semi-quantitativa dos tratamentos foram comparados com o grupo controle pelo teste estatístico Kruskal-Wallis de acordo com Marôco (2011).

3. Resultados

3.1 Metaloinseticida [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO)

O grupo controle apresentou o padrão histológico (figura 1A) descrito para a espécie (FANTAZZINI et al., 2002). O epitélio dos indivíduos dos dois períodos de exposição apresentou células absorptivas e regenerativas íntegras, com alguns pontos de renovação epitelial. As células hepáticas apresentaram núcleos íntegros e citoplasma heterogêneo com a presença de poucos grânulos citoplasmáticos nos indivíduos da exposição por 21 dias.

Nos indivíduos expostos ao metaloinseticida por 21 dias foi observado aumento na renovação epitelial (figura 1B) e na liberação de vesículas de secreção nos indivíduos expostos a concentração 0.5 mg/mL. As análises histoquímicas revelaram pequena redução na quantidade de polissacarídeos nas células hepáticas (comparar figuras 2A e 2B) dos indivíduos expostos nas concentrações de 0.5 mg/mL e 1.0 mg/mL (figura 3). Os outros testes não revelaram alterações no padrão observado no grupo controle (figura 2C-H).

No período de 90 dias, os indivíduos expostos ao metaloinseticida apresentaram aumento de grânulos citoplasmáticos nas células hepáticas das concentrações 1.0 mg/mL e 2.0 mg/mL; pequeno aumento na liberação de vesículas de secreção foi observado nos indivíduos da concentração 0.5 mg/mL e aumento no número de hemócitos por entre as células hepáticas

foi observado nos indivíduos da concentração 2.0 mg/mL. Na análise histoquímica, houve pequena redução de polissacarídeos nas células hepáticas dos animais expostos nas concentrações de 0.5 mg/mL e pequeno aumento nos animais expostos na concentração de 1.0 mg/mL (figura 4). Proteínas, cálcio e lipídios não sofreram alterações.

3.2 Metalo-inseticida [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO)

O grupo controle também apresentou o padrão histológico descrito para a espécie (FANTAZZINI et al., 2002). O epitélio apresentou células absorptivas e regenerativas íntegras, com alguns pontos de renovação epitelial nos indivíduos expostos por 21 dias e liberação de poucas vesículas de secreção nos indivíduos expostos por 90 dias. As células hepáticas apresentaram núcleos íntegros e citoplasma heterogêneo com a presença de poucos grânulos citoplasmáticos nos indivíduos expostos por 90 dias.

Os indivíduos expostos ao metalo-inseticida por 21 dias, da concentração de 1.0 mg/mL apresentaram aumento na renovação epitelial, na liberação de vesículas de secreção, na quantidade de grânulos citoplasmáticos e de hemócitos presentes entre as células hepáticas. Os indivíduos da concentração de 0.5 mg/mL também apresentaram aumento na quantidade de hemócitos (figura 1D). A análise histoquímica revelou que houve depleção de polissacarídeos em um indivíduo exposto à concentração 1.0 mg/mL (figura 5). Não houve alteração no padrão de proteínas, lipídios e cálcio encontrado nos indivíduos expostos em relação ao controle (figura 2).

Nos indivíduos expostos por 90 dias foi observado aumento de grânulos citoplasmáticos nas células hepáticas em todos os tratamentos (figura 1C). Os indivíduos expostos à concentração 2.0 mg/mL apresentaram aumento na liberação de vesículas de secreção (figura 1E). Aumento no número de hemócitos foi observado nos indivíduos expostos às concentrações 1.0 mg/mL e 2.0 mg/mL (figura 6). Na análise histoquímica não foi observado nenhuma alteração.

A análise semi-quantitativa demonstrou que as alterações observadas não são estatisticamente significativas quando comparados grupos controles com grupos expostos (figuras 3, 4, 5 e 6).

4. Discussão

Análises morfológicas em tecidos de invertebrados têm sido utilizadas na identificação de diversos tipos de alterações, as quais podem indicar evidências qualitativas de uma adaptação funcional ao meio externo e fornecem informações sobre estágios iniciais de

intoxicação (FONTANETTI et al., 2010; NOGAROL; FONTANETTI, 2010; TRIEBSKORN et al., 1999).

Os resultados aqui obtidos por meio de análises histológicas e histoquímicas demonstraram que os metalo-inseticidas não foram capazes de induzir alterações significativas no intestino médio do diplópodo *R. padbergi*. As poucas alterações observadas no intestino médio dos animais expostos aos metalo-inseticidas não representam indício de toxicidade dos produtos, uma vez que suas ocorrências foram semelhantes às observadas no grupo controle.

Utilizando o mesmo órgão de *R. padbergi*, Merlini et al. (2012) avaliaram a toxicidade do herbicida trifluralina. Os autores observaram várias alterações induzidas pelo herbicida, tais como vacuolização citoplasmática, dilatação do espaço intercelular, aumento na renovação epitelial e liberação de vesículas de secreção. O intestino médio da espécie também já foi utilizado com sucesso para a avaliação de misturas ambientais complexas, como lodo de esgoto (BOZZATTO et al., 2012).

Porém, nestes estudos, foi realizada apenas uma avaliação qualitativa das alterações encontradas. De acordo com Dittbrenner et al. (2011), é imprescindível a conciliação das análises histológicas qualitativas com análises semi-quantitativas com intuito de melhor classificar e entender as alterações encontradas. Estudos utilizando análises semi-quantitativas são realizadas, principalmente, em vertebrados (GLASSON et al., 2010; ALHABSHI et al., 2013; ZOTTI et al., 2015), porém, em invertebrados, é ainda incipiente.

O intestino médio dos diplópodos é formado por epitélio pseudoestratificado, camada muscular e por uma camada de células hepáticas (FANTAZZINI et al., 2002; CAMARGO-MATHIAS et al., 2004). Nesta região é onde ocorre a absorção e digestão dos alimentos, portanto é por onde as possíveis substâncias tóxicas presentes no solo também são absorvidas. O epitélio deste órgão atua como uma primeira barreira à entrada de substâncias tóxicas no organismo do animal. Os mecanismos de armazenamento e excreção devem ser extremamente eficientes, uma vez que estes animais não tem a capacidade de eliminar substâncias da hemolinfa para o meio exterior quando estão em excesso (HOPKIN, 1990).

Porém, muitas vezes, o epitélio falha como barreira, permitindo a entrada das substâncias tóxicas, como ocorreu em estudos realizados por Köhler e Alberti (1992), Perez e Fontanetti (2011) e Bozzatto et al. (2012). Quando isso ocorre, é possível observar alterações morfológicas decorrentes da contaminação, como aumento de grânulos citoplasmáticos nas células epiteliais e hepáticas, aumento da renovação epitelial, vacuolização celular e aumento de hemócitos entre as células hepáticas.

Apesar destas alterações também terem sido observadas nos grupos expostos, elas não foram provocadas pelos produtos, uma vez que estas alterações são normais mesmo em animais encontrados nos habitats naturais. Só seria possível afirmar que as alterações foram causadas pela exposição caso elas fossem significativas em relação ao controle e observadas na maioria dos indivíduos analisados.

As respostas encontradas aqui sugerem que os metalo-inseticidas não foram tóxicos à espécie utilizada, uma vez que não foram observadas alterações significativas nos animais expostos. Portanto, a sua utilização não deve causar problemas ambientais, principalmente para outros invertebrados terrestres, os quais são essenciais para a manutenção do solo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo 2012/12019-5) pelo apoio financeiro, à bióloga Msc. Cristina Moreira de Sousa pela ajuda nos experimentos, ao Prof. Dr. João Batista Fernandes e à Prof. Dra. Rose Maria Carlos pela síntese e disponibilização dos metalo-inseticidas testados.

5. Referências

ALHABSHI, S.M.I.; RAHMAT, K.; HALIM, N.A.; AZIZ, S.; RADHIKA, S.; GAN, G.C.; MUHAMMAD, R. Semi-Quantitative and Qualitative Assessment of Breast Ultrasound Elastography in Differentiating Between Malignant and Benign Lesions. **Ultrasound in Medicine & Biology**. v. 39, p. 568-578, 2013.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish diseases**. v. 22, p. 24-34, 1999.

BOZZATTO, V.; FONTANETTI, C.S. Sewage sludge toxicity in edaphic organism: Analysis of midgut responses in the diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Microscopy Research Technique**. v. 75, p. 869-875, 2012.

CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). **Braz. J. Morphol. Sci.** v. 21, p. 65-71, 2004.

CHAMPMAN, R. F. **The insects: Structure and Function**. Elsevier: New York, 4ed, 769, 1998.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; FRANCISCO, A.; PEDRO-ESCHER, J.; GASTALDI, V.D.; FONTANETTI, C.S. Diplopods as soil bioindicators toxicity after application of residues from sewage treatment plants and ethanol industry **Microscopy and Microanalysis** (no prelo).

CORREIA, A. A. Histofisiologia do canal alimentar e hemócitos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepdoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Dissertação, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005.

DITTBRENNER, N.; CAPOWIEZ, Y.; KÖHLER, H.R.; TRIEBSKORN, R. Stress protein response (Hsp70) and avoidance behavior in *Eisenia fetida*, *Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris* when exposed to imidacloprid. **Journal of Soils and Sediments**. v. 12, p. 437, 2011.

FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Midgut of the millipede, *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida): Histology and histochemistry. **Arthropoda Selecta**, v. 11, n.2, p. 135-142, 2002.

FAO - **Scarcity and Degradation of Land and Water: Growing Threat to Food Security** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, 2011, pp. 1–4.

FONTANETTI, C.S.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; PINHEIRO, T.G.; SOUZA, T.S.; PEDRO-ESCHER, J. Microscopy as a tool in toxicological evaluations. In: MÉNDEZ-VILAS, A.; DIAZ, J. (Eds.). **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**. Badajoz: Formatex Research Center, p. 1001-1007, 2010.

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: PASCUCCHI, S. (Ed.). **Soil Contamination**, p. 143-168, 2011.

FRANCISCO, A.; FONTANETTI, C.S. Diplopods and Agrochemicals — a Review. **Water, Air, & Soil Pollution**. v. 226, p. 53, 2015.

GLASSON, S.S.; CHAMBERS, M.G.; VAN DEN BERG, W.B.; LITTLE, C.B. The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. v. 18, p. s17-s23, 2010.

GODOY, J.A.P.; FONTANETTI, C.S. Diplopods as Bioindicators of Soils: Analysis of Midgut of Individuals Maintained in Substrate Containing Sewage Sludge. **Water, Air & Soil Pollution**. v. 210, p. 389-398, 2010.

HOPKIN, S.P. Critical concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial arthropods. **Functional Ecology**. v. 4, p. 321–327, 1990.

HUBERT, M. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In: M. CAMATINI. **Myriapodbiology**. Londres: Academic Press, p. 127-134, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. 123p.

KÄHKÖNEN, E.; NORDSTRÖM, K. Toward a nontoxic poison: current trends in (European Union) biocides regulation. **Integr. Environ. Assess. Manag.**, v. 4, 471–477, 2008.

KARABELAS, A.J.; PLAKAS, K.V.; SOLOMOU, E.S.; DROSSOU, V.; SARIGIANNIS, D.A. Impact of European legislation on marketed pesticides — A view from the stand point of health impact assessment studies. **Environment International**. v. 35, p. 1096-1107, 2009.

KLAUSENER, A.; RAMING, K.; STENZEL, K. Modern tools for drug discovery in agricultural research. In: OHKAWA, H.; MIYAGAWA, H.; LEE, P.W. **Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety**. Alemanha: Wiley, 2007. p. 55-63.

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.

MARÔCO, J. **Análise Estatística com o SPSS Statistics**. 5° ed. Pero Pinheiro: Report Number, 2011. 992p.

MAYRAND, E.; ST-JEAN, S.D.; COURTENAY, S. C. Haemocytes responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: Can the immune system recuperate? **Aquaculture Research**. v. 36, p. 962–971, 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 padbergi* (Diplopoda). **Microscopy Research and Technique**. v. 75, p. 1361-1369, 2012.

NARDI, J.B., BEE, C.H.M., MILLER, L.A. Stem cells of the beetle midgut epithelium. **J. Ins. Physiol.** v. 56, p. 296-303, 2010.

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

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.

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

PEREZ, D.G.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the Toxic Potential of Sewage Sludge in the Midgut of the Diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Water, Air & Soil Pollution**. v. 218, p. 1-4, 2011.

RÖMBKE, J.; FÖSTER, B.; JÄNSCH, S.; SCHEFFCZYK, A.; GARCIA, M. Terrestrischeökotoxikologische Testmethodenfür die Tropen. **Z Umweltchem Okotox.**v. 17, p. 85-93, 2005.

ROST-ROSZKOWSKA, M.M., VILIMOVA, J., SOSINKA, A., SKUDLIK, J., FRANZETTI, E. The role of autophagy in the midgut epithelium of *Eubranchi pusgrubii* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca). **Arthropod Struct. Dev.**, v.41, p. 271-279, 2012.

SOUZA, R.B.; FONTANETTI, C.S. Alterations in the Fat Body Cells of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda) Resulting from Exposure to Substrate Containing Sewage Sludge. **Microsc. Microanal.** v. 18, p. 317-323, 2013.

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.; FONTANETTI, C.S. Morphological biomarkers in the *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil. **Ecotoxicology and environmental safety.** v. 74, p. 10-18, 2011.

TIEPO, E.N.; CORRÊA, A.X.R.; RESGALLA, C.; COTELLE, S.; FÉRARD, J.F.; RADETSKI, C.M. Terrestrial short-term ecotoxicity of a green formicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v. 73, p. 939-943, 2010.

van STRAALLEN, N.M. Assessment of soil contamination – a functional perspective. **Biodegradation.** v. 13, p. 41-52, 2002.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J.C.; SANTOS, J.C.; SILVA, W.L.P.; RIBEIRO, G.T.; LEMES, P.G. An Overview of Integrated Management of Leaf-Cutting Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian Forest Plantations. **Forests.** v. 5, p. 439-454, 2014.

ZOTTI, A.; BANZATO, T.; GELAIN, M.E.; CENTELLEGHE, C.; VACCARO, C.; ARESU, L. Correlation of renal histopathology with renal echogenicity in dogs and cats: an *ex-vivo* quantitative study. **Veterinary Research.** v. 11, p. 99, 2015.

Tabela 1. Classificação das alterações histopatológicas no intestino médio de diplópodos.

Região examinada	Importância patológica mínima (1)	Importância patológica moderada (2)
Epitélio	Aumento da renovação epitelial	_____
	Aumento na liberação de secreção	_____
Células hepáticas	_____	Aumento no número de grânulos citoplasmáticos
	_____	Aumento no número de hemócitos entre as células
	Depleção/acúmulo de polissacarídeos	_____

Fator de importância: (1) a lesão é facilmente reversível quando a exposição ao contaminante acaba; (2) a lesão é reversível na maioria dos casos quando o estressor é neutralizado.

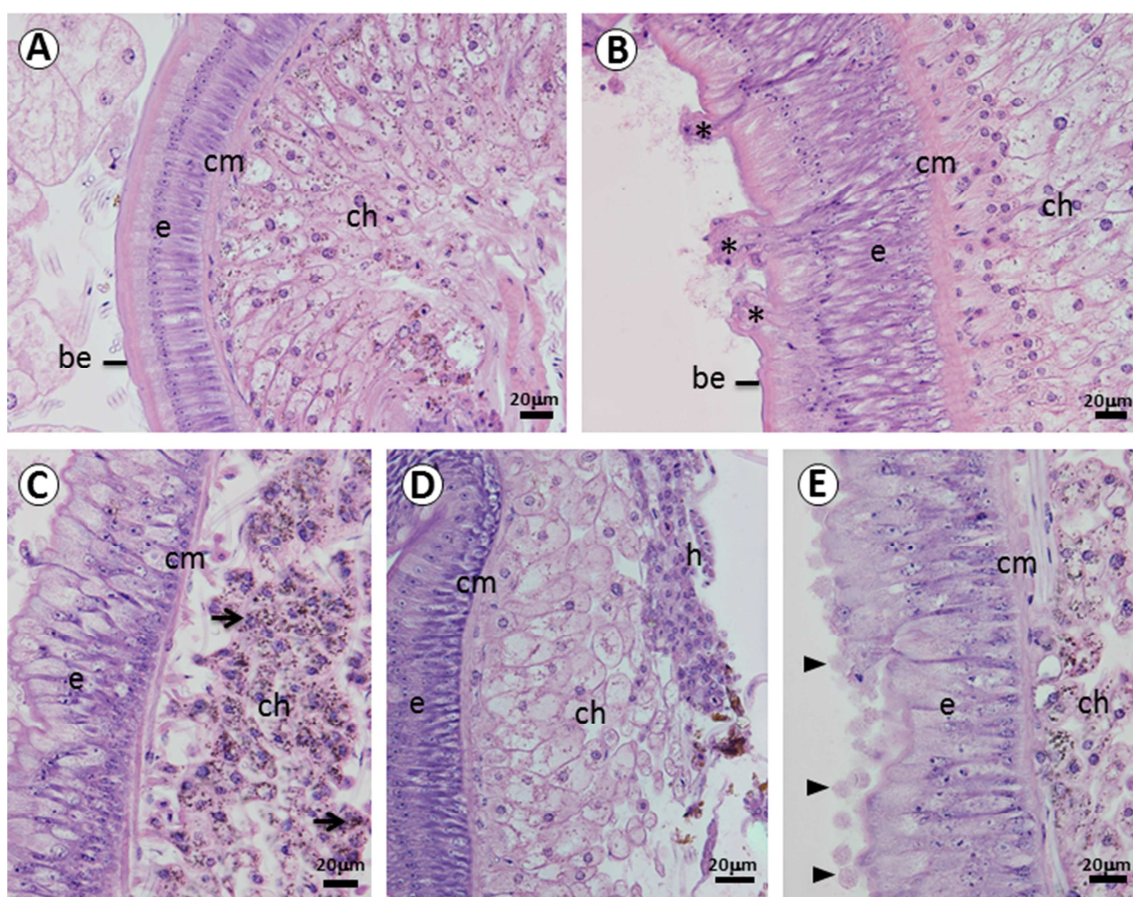


Figura 1. Alterações histológicas observadas no intestino médio de *R. padbergi* corados com hematoxilina-eosina. (A) grupo controle; (B) metalo-inseticida [1] 0.5 mg/mL, 21 dias; (C) metalo-inseticida [2] 2.0 mg/mL, 90 dias; (D) metalo-inseticida [2] 0,5 mg/mL, 21 dias; (E) metalo-inseticida [2] 2.0 mg/mL, 90 dias.

be = bordo em escova; ch = células hepáticas; cm = camada muscular; e = epitélio; h = hemócitos; cabeça de seta em (E) = vesículas de secreção; * = renovação epitelial; setas = grânulos citoplasmáticos

Metaloinseticida [1] = $[\text{Mg}(\text{5-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$

Metaloinseticida [2] = $[\text{Mg}(\text{5-Cl-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$

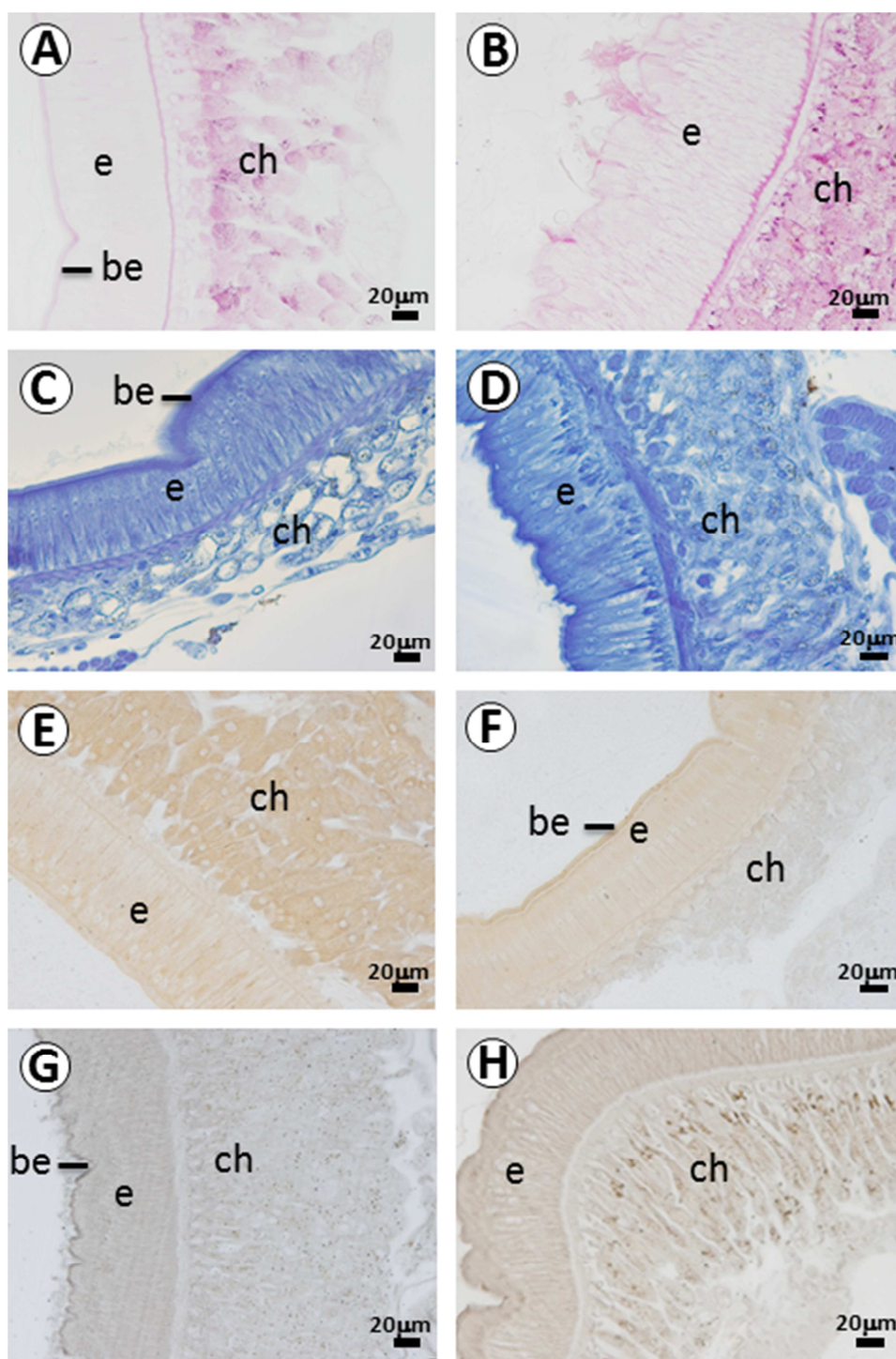


Figura 2. Cortes histológicos do intestino médio de *R. padbergi* submetidos às técnicas de PAS (A e B), azul de bromofenol (C e D), von Kossa (E e F) e sudan black (G e H). (A) grupo controle; (B) metalo-inseticida [1] 1.0 mg/mL, 21 dias; (C) grupo controle; (D) metalo-inseticida [2] 0.5 mg/mL, 90 dias; (E) grupo controle; (F) metalo-inseticida [1] 1.0mg/mL, 21 dias; (G) grupo controle; (H) metalo-inseticida [2] 1.0 mg/mL, 90 dias.

be = bordo em escova; ch = células hepáticas; e = epitélio; h = hemócitos
 Metalo-inseticida [1] = $[Mg(5\text{-metil-phen})(hesperitina)(H_2O)_2](CH_3COO)$
 Metalo inseticida [2] = $[Mg(5\text{-Cl-phen})(hesperitina)(H_2O)_2](CH_3COO)$

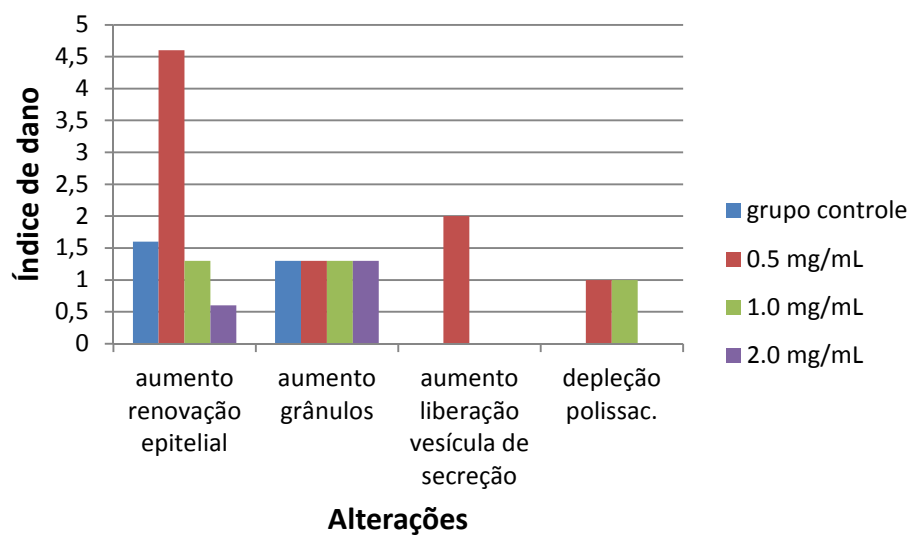


Figura 3. Média das alterações histopatológicas observadas no intestino médio de *R. padbergi* exposto ao metalo-inseticida $[\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ por 21 dias.

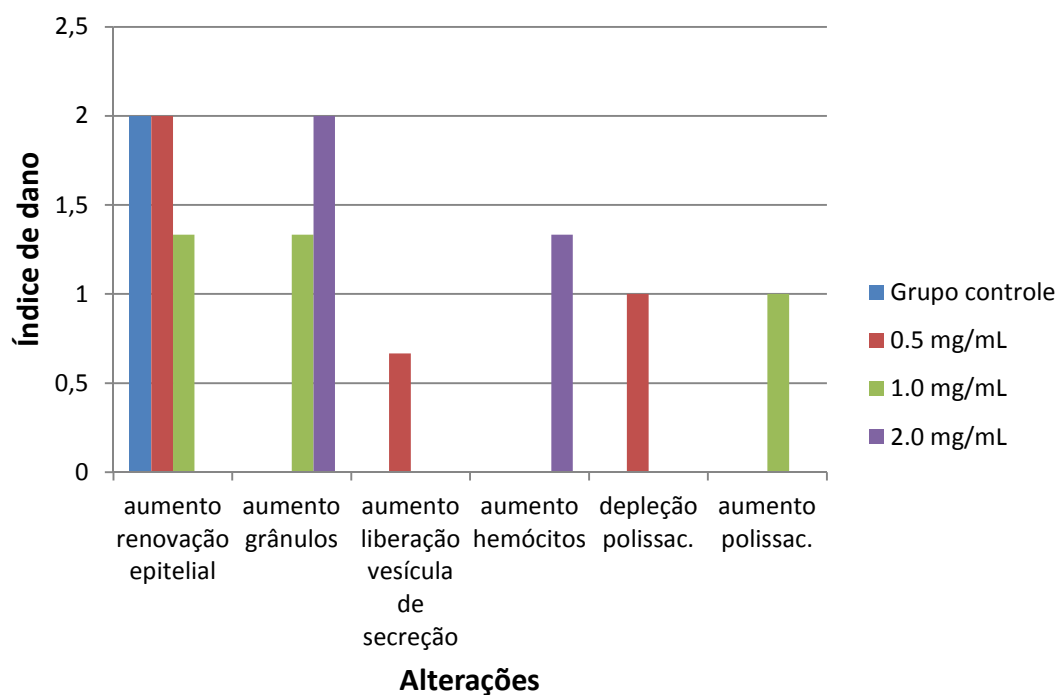


Figura 4. Média das alterações histopatológicas observadas no intestino médio de *R. padbergi* exposto ao metalo-inseticida [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) por 90 dias.

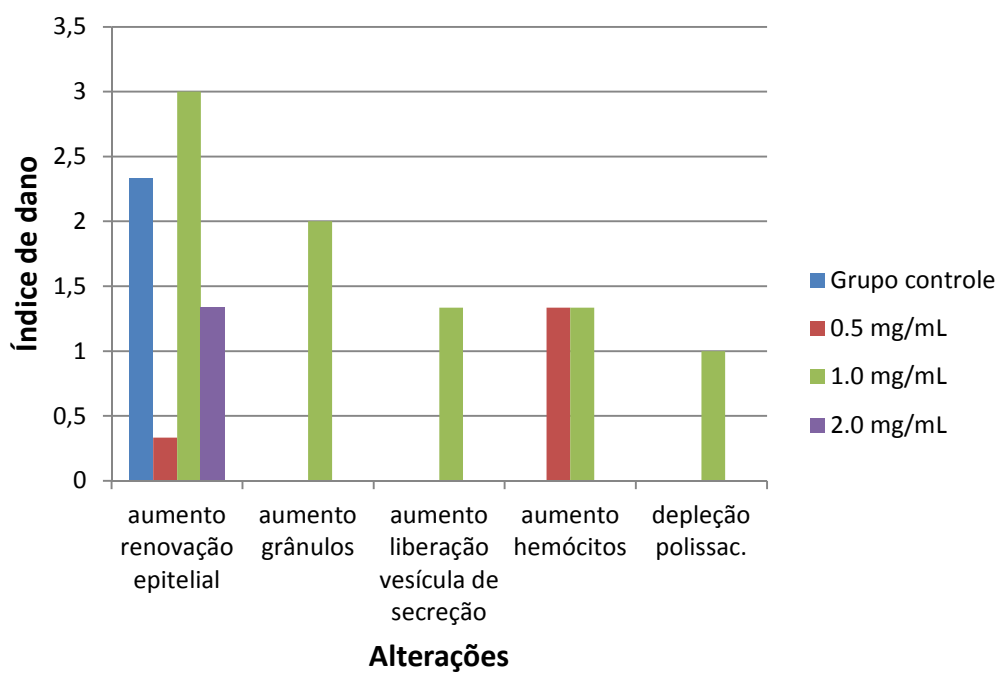


Figura 5. Média das alterações histopatológicas observadas no intestino médio de *R. padbergi* exposto ao metalo-inseticida [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) por 21 dias.

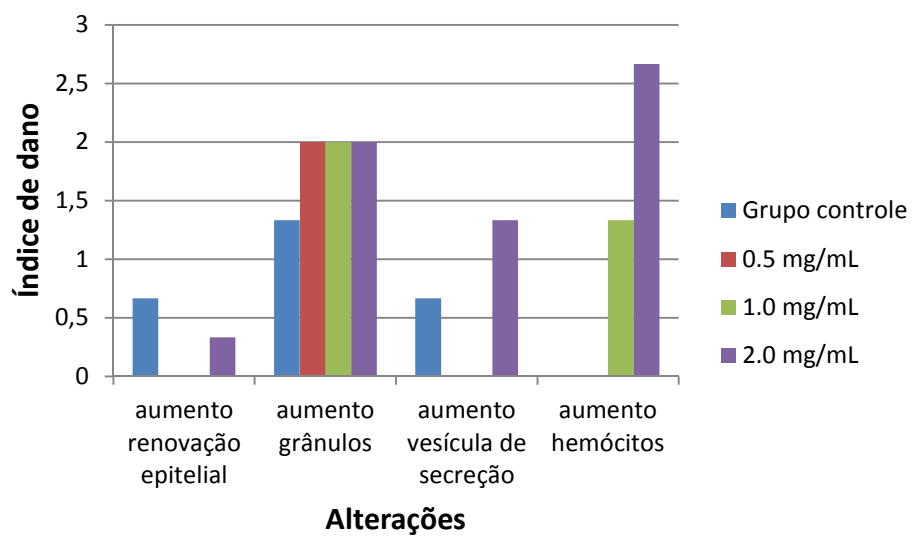


Figura 6. Média das alterações histopatológicas observadas no intestino médio de *R. padbergi* exposto ao metalo-inseticida $[\text{Mg}(5\text{-Cl-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ por 90 dias.

Indução de proteínas de estresse HSP70 por dois complexos metálicos inseticidas em intestino médio de diplópodos

Raphael Bastão de Souza¹; Cristina Moreira-de-Sousa¹; Yadira Ansoar Rodríguez¹; Maria Paula Mancini Coelho¹; Cleiton Pereira Souza¹; Odair Correa Bueno¹; Carmem S. Fontanetti^{1*}

¹UNESP – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Rio Claro, SP, Brasil

*Autor correspondente: Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264136.

E-mail: fontanet@rc.unesp.br

Resumo

A proibição no uso de inseticidas sintéticos obrigou o desenvolvimento de novas fórmulas capazes de substituí-los com a mesma eficácia. Como uma alternativa, complexos metálicos associados a produtos naturais podem ser utilizados no combate às formigas cortadeiras. Com o objetivo de avaliar a toxicidade de duas diferentes fórmulas de complexos metálicos foram realizadas análises qualitativas e quantitativas por meio da imunomarcção de proteínas de estresse HSP70 em intestino médio de *Rhinocricus padbergi*. Os animais foram expostos por períodos de 21 e 90 dias a três diferentes concentrações dos complexos. De acordo com os resultados, as duas fórmulas podem induzir a expressão de HSP70 no tecido analisado, embora não em todas as concentrações e períodos, indicando uma possível toxicidade para a espécie testada.

Palavras-chave: milípedes; formicida; imunohistoquímica; proteína de choque térmico

1. Introdução

No passado, o uso de inseticidas sintéticos era o principal meio de proteção contra pragas na agricultura, porém, apesar de ter beneficiado a população humana em termos de produtividade, seu uso indiscriminado resultou no desenvolvimento de pragas resistentes, toxicidade para organismos não alvos e efeitos nocivos para o meio ambiente (JEYASANKAR; JESUDASAN, 2005). Portanto, nos últimos anos, vários países passaram a adotar ações com o objetivo de reduzir os danos e impactos relacionados aos pesticidas, incluindo a proibição do uso de algumas fórmulas (BABUT et al., 2013; STOCKOLM

CONVENTION, 2009). Com isso, surgiu a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas para o controle de pragas (CHITWOOD, 2002).

A tendência atual é que pesticidas com origem em compostos naturais substituam os pesticidas sintéticos que foram proibidos com as novas regulamentações (COPPING; DUKE, 2007), as quais tornaram o processo de registro mais rigoroso (FQPA, 1996) e/ou limitaram seu uso (UNEP, 2001). Além disso, o interesse no uso destes produtos aumentou nos últimos anos, principalmente na agricultura orgânica e no controle “ecológico” de pragas (COPPING; DUKE, 2007).

Dentre os pesticidas banidos encontra-se a sulfluramida, largamente utilizada no combate de formigas-cortadeiras, devido aos seus conhecidos efeitos nocivos à organismos não alvos (STOCKOLM CONVENTION, 2009). Como uma alternativa a sua utilização, complexos metálico-inseticidas ligados a produtos naturais foram desenvolvidos. Trata-se de um sistema metalo-inseticida em que um centro metálico está coordenado a uma ou mais moléculas de uma flavanona, sendo o sistema capaz de atuar como agente tóxico para o controle e/ou combate das formigas cortadeiras (OLIVEIRA et al., 2013).

Com o intuito de evitar impactos ambientais, os pesticidas precisam ser analisados por meio de testes ecotoxicológicos antes de serem utilizados no meio ambiente (KLAUSENER et al., 2007). Deste modo, estudos ecotoxicológicos têm como principal objetivo fornecer dados que serão utilizados para determinar a necessidade de precaução e limitação no uso de determinada substância.

A utilização de marcadores moleculares, como as proteínas de choque térmico ou proteínas de estresse (HSPs), são um dos principais marcadores celulares utilizados na avaliação da toxicidade de diferentes compostos e são amplamente utilizadas para monitorar o ambiente (BIERKENS, 2000). Níveis elevados de HSPs podem ser encontrados em invertebrados coletados em locais contaminados quando comparados com animais de áreas sem contaminação (BIERKENS, 2000; MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006).

As proteínas de estresse podem ser classificadas de acordo com seu peso molecular em quatro famílias: HSP90, HSP70, HSP60 e pequenas HSPs, sendo que a família HSP70 é a mais estudada (NADEAU et al., 2001; ZANGER et al., 1996). Estas proteínas atuam como chaperonas moleculares, uma vez que se ligam a outras proteínas, regulando sua conformação, o transporte através da membrana ou organelas e a atividade enzimática (CALABRESE et al., 2005).

Invertebrados terrestres, como diplópodos, estão entre os organismos mais apropriados para avaliar os efeitos de substâncias presentes no solo, uma vez que possuem contato direto

com o contaminante (SOUZA et al., 2014). O intestino médio de diplópodos, além de participar do processo de digestão, atua como uma barreira, prevenindo que substâncias tóxicas atinjam o resto do organismo, e como um órgão de detoxicação de xenobióticos. Assim, ele tem sido utilizado em testes de toxicidade de solo para detectar alterações celulares (FONTANETTI et al., 2015).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a toxicidade de dois metalo-inseticidas no intestino médio do diplópodo *Rhinocricus padbergi*, por meio da análise qualitativa e quantitativa da imunomarcação de proteínas de estresse HSP70.

2. Materiais e métodos

2.1 Metalo-inseticidas

Os metalo-inseticidas utilizados no estudo, [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) [1] e [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) [2], foram fornecidos pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

2.2 Bioensaios

Espécimens adultos de *R. padbergi* foram coletados manualmente na cidade de Rio Claro (22°24'36''S; 47°33'36''W), SP, Brasil. Em laboratório, após um período de aclimação por 20 dias à 21 ± 2°C, foram montados quatro bioensaios para cada metalo-inseticida: um bioensaio controle com terra oriunda do local de coleta dos animais e outros três bioensaios contendo terra do local de coleta com o metalo-inseticida em diferentes concentrações (0.5mg/L; 1.0mg/L e 2.0mg/L). Em cada bioensaio foram expostos 10 indivíduos por períodos de 21 e 90 dias.

2.3 Dissecção dos animais

Após cada período de exposição, três animais de cada bioensaio foram anestesiados com éter sulfúrico e dissecados em solução fisiológica para a remoção do intestino médio. Em seguida, porções do órgão foram fixadas em paraformaldeído 4% para a aplicação da técnica. Após a fixação de 24 horas, o material foi colocado em tampão fosfato de sódio pH 7,4 e armazenado em frigorífico a 4°C.

2.4 Imuno-histoquímica do intestino médio

O material fixado foi desidratado em álcool gelado a 15, 30, 50, 70, 85, 90, e 95% durante 20 minutos cada banho. Em seguida, o material foi colocado em xilol + álcool por 20

minutos e, em seguida, xilol por 20 minutos, sendo esta última etapa realizada duas vezes. Após este procedimento, foi feita a embebição do material em parafina líquida (Paraplast). Três trocas de 8 horas cada foram realizadas e a inclusão final foi feita em parafina ultra-pura (Paraplast). Posteriormente, o material foi seccionado em secções de 6µm com auxílio do micrótomo; as secções foram então hidratadas e recolhidas em lâminas.

Para a aplicação da técnica, foi seguido o protocolo adaptado proposto por Silva-Zacarin et al. (2012). Para marcação da HSP70 foram utilizados o anticorpo primário (monoclonal anti heat shock protein 70 - HSP70 produzido em camundongo, Sigma) e o anticorpo secundário (anti mouse IgG molécula inteira) acoplado com fosfatase alcalina. Para a revelação da imunomarcação foi utilizado o Kit Dako EnVision™ G|2 System/AP Rabbit/Mouse (Permanent Red).

2.5 Análises imuno-histoquímicas

Por meio do microscópio de luz, todas as lâminas foram qualitativamente analisadas nas objetivas de 10x, 20x e 40x; foi considerado marcação positiva quando se observa uma cor vermelho-rosada de intensidade maior ou menor conforme a quantidade de proteínas da família HSP70 presente nas células e negativa quando não se observa qualquer marcação nesta coloração.

Para complementar a análise qualitativa, imagens digitalizadas de todos os cortes obtidas a partir de uma câmera acoplada ao microscópio, fazendo-se uso de programa próprio para captura de imagens – Leica Qwin Standard v. 2.8, foram transferidas ao programa Image J. A partir dele, foi possível calcular a porcentagem de área imunomarcada intensamente em relação à área total do material analisado em cada secção histológica.

Os dados obtidos na avaliação quantitativa de cada tratamento foram comparados aos resultados obtidos para os indivíduos expostos à amostra de solo controle, por meio do teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) [1]

Após 21 dias de exposição, os animais do grupo controle apresentaram imunomarcação moderada, principalmente na região apical do epitélio e nas células hepáticas. Imunomarcação fraca foi observada na região basal do epitélio e ausência de imunomarcação na camada muscular, logo abaixo do epitélio. Nos animais expostos ao metalo-inseticida nas três concentrações, a imunomarcação foi semelhante ao observado no controle:

imunomarcção moderada na região apical do epitélio e células hepáticas; fraca na região basal do epitélio e ausente na camada muscular. De acordo com a análise quantitativa, os animais expostos às diferentes concentrações apresentaram porcentagem média de área marcada semelhante ao controle (figura 1).

O grupo controle da exposição por 90 dias apresentou imunomarcção igual ao controle da exposição por 21 dias. Os animais dos grupos expostos às três concentrações apresentaram maior intensidade de imunomarcção quando comparado ao controle. As regiões do intestino médio com maior intensidade de imunomarcção foram as células hepáticas e a região apical do epitélio. A análise quantitativa revelou aumento estatisticamente significativo de imunomarcção nas três concentrações testadas quando comparadas ao controle (figura 2).

3.2 [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) [2]

Os animais do grupo controle da exposição por 21 dias apresentaram imunomarcção moderada na região apical do epitélio e nas células hepáticas; região basal do epitélio e camada muscular apresentaram imunomarcção fraca e ausente, respectivamente. Nos grupos expostos ao metalo-inseticida, apenas os animais da concentração de 0,5 mg/mL apresentaram imunomarcção semelhante ao controle. Nas concentrações de 1.0 e 2.0 mg/mL, houve aumento na intensidade da imunomarcção nas células hepáticas e região apical do epitélio. De acordo com a análise quantitativa, as concentrações de 1.0 e 2.0 mg/mL apresentaram aumento estatisticamente significativo da porcentagem de área marcada em relação ao controle (figura 3).

Na exposição por 90 dias, os animais do grupo controle apresentaram imunomarcção moderada na região apical do epitélio e células hepáticas, fraca na região basal e ausente na camada muscular. Os animais expostos ao metalo-inseticida sofreram um pequeno aumento na intensidade de imunomarcção, principalmente na concentração de 2.0 mg/mL. Porém, a análise quantitativa revelou que o aumento não foi significativo em relação ao controle (figura 4).

4. Discussão

Um grupo de 44 proteínas altamente conservadas e encontradas em todos os seres vivos está relacionado com o estresse celular. O grupo mais conhecido e estudado destas proteínas são as proteínas de choque térmico (HSPs), também conhecidas como chaperonas moleculares. As chaperonas são responsáveis por manter a conformação funcional das

proteínas, como prevenir a formação de agregados proteicos e desnaturação, até que as condições normais se estabilizem (HARTL et al., 2011; BENARROCH, 2011; EVANS et al., 2010). Tal função é extremamente necessária em condições normais, porém, em condições de estresse, quando aumenta a possibilidade de mau funcionamento de proteínas e outras macromoléculas, a necessidade da presença de chaperonas torna-se ainda mais importante. Nas últimas duas décadas, devido a suas características, as proteínas de choque térmico, principalmente as HSP70, tem sido consideradas um bom biomarcador de estresse (MORRIS et al., 2013).

No presente estudo, todos os animais analisados apresentaram alguma intensidade de imunomarcção. Os animais do grupo controle apresentaram imunomarcção moderada, principalmente nas regiões do órgão relacionadas ao processo de detoxicação do organismo. Além de participar no estresse celular, as HSP70 possuem diversas funções no metabolismo celular, como auxiliar no dobramento de proteínas recém-sintetizadas, no transporte de proteínas e vesículas, na formação e dissociação de complexos e na degradação de proteínas desnecessárias (FRYDMAN 2001; PRATT; TOFT, 2003; YOUNG et al., 2003; CHIANG et al., 1989). Deste modo, espera-se que seja encontrada em todo o tecido, com diferentes intensidades de marcações, como observado nos animais do grupo controle.

Tanto nos animais do grupo controle quanto nos animais expostos aos metaloinseticidas, as maiores intensidades de imunomarcção foram observadas nas células hepáticas e epitélio. De acordo com Köhler et al. (1995), milípedes podem acumular e metabolizar substâncias tóxicas nestas regiões do organismo e, assim, mantê-las inertes no organismo.

Em diplópodos, as células hepáticas estão diretamente relacionadas com o processo de detoxicação, uma vez que podem acumular metais e outros compostos na forma de grânulos intracelulares para posterior excreção (HUBERT, 1978a; b; 1979a; b); caso a quantidade das substâncias tóxicas seja muito alta, as células podem sofrer danos. Células hepáticas repletas de grânulos citoplasmáticos foram observadas em estudos com exposição de diplópodos à lodo de esgoto (GODOY; FONTANETTI, 2010; NOGAROL; FONTANETTI, 2010; PEREZ; FONTANETTI, 2011) e trifluralina (MERLINI et al., 2012).

O epitélio do intestino médio é composto por três tipos de células: principal, secretora e regenerativa. As células principais e secretoras também podem acumular substâncias tóxicas. Neste caso, se a quantidade ultrapassar o máximo suportado, pode haver liberação de vesículas secretoras ou a célula em si pode ser inteiramente descartada para o lúmen. Quando

isso ocorre, ela é repostada pelas células regenerativas, as quais se encontram na base do epitélio (FONTANETTI et al., 2015).

Como o aumento da expressão das proteínas de estresse está relacionado com a presença de substâncias tóxicas (ERATA et al., 2005), a imunomarcagem observada nos animais analisados está relacionada com a função de detoxificação inerente ao intestino médio. No epitélio, a região apical, onde se encontram as células absorptivas e secretoras, foi a qual apresentou maior intensidade de imunomarcagem. Na região basal, onde se encontram as células regenerativas, a imunomarcagem foi fraca. Estas células, por serem consideradas células tronco unipotentes (SOSINKA et al., 2014), ainda não participam ativamente do processo de detoxificação. A imunomarcagem das proteínas de estresse nas células absorptivas é mais um indício de sua função citoprotetora, enquanto que as células regenerativas não estão diretamente associadas à detoxificação.

A localização das HSP70 na região apical do epitélio também pode ser explicada pela localização das mitocôndrias no citoplasma. A região apical da célula possui muitas mitocôndrias devido à presença das microvilosidades, responsáveis pela absorção e excreção de materiais. De acordo com Gupta et al. (2010), as HSP70 são encontradas e atuam preferencialmente dentro desta organela, apesar de também serem encontradas em outras.

Apesar da presença do flavonóide hesperitina nas fórmulas, os compostos analisados podem aumentar a expressão das HSP70, como ocorreu em alguns dos grupos expostos. Hosokawa et al. (1990) foram os primeiros a relatarem que flavonoides têm a capacidade de inibir a expressão das proteínas de estresse, incluindo HSP70. Entre os flavonoides, a ação da quercetina sobre as proteínas de estresse é a mais conhecida (HOSOKAWA et al., 1992; BUDAGOVA et al., 2003; YANG et al., 2016). Este flavonóide é capaz de inibir a expressão da proteína ao inibir a atividade transcricional do HSF-1, o principal fator transcricional das HSPs (POWERS; WORKMAN, 2007). Porém, o flavonoide naringina, também extraído de frutos cítricos assim como a hesperitina, pode induzir a expressão de HSPs, como HSP72 e HSP27 (SHARMA et al., 2011).

Uma vez que a hesperitina pode estar relacionada com a expressão das HSP70, o magnésio, também presente na fórmula, atua como um agente citoprotetor. Killilea e Maier (2008) observaram que células endoteliais super-expressam HSP70 na presença de baixas concentrações de magnésio. De acordo com Birch e Walker (2000), o efeito protetor do magnésio nas células é devido à inibição da síntese de proteínas de estresse.

Embora os compostos aqui testados não tenham induzido a expressão das proteínas de estresse em todas as concentrações e períodos de exposição, os dados obtidos demonstram

que os mesmos podem atuar como agentes proteotóxicos para os animais da espécie *R. padbergi*. Deste modo, apesar de ser um inseticida de origem natural, ele pode ser prejudicial para a espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 2012/12019-5) pelo apoio financeiro e ao Prof. Dr. João Batista Fernandes e à Prof. Dra. Rose Maria Carlos pela síntese e disponibilização dos metalo-inseticidas testados.

5. Referências Bibliográficas

BABUT, M.; ARTS, G.H.; CARACCILO, A.B.; CARLUER, N.; DOMANGE, N.; FRIBERG, N.; GOUY, V.; GRUNG, M.; LAGADIC, L.; MARTIN-LAURENT, F.; MAZZELLA, N.; PESCE, S.; REAL, B.; REICHENBERGER, S.; ROEX, E.W.M.; ROMIJN, K.; RÖTTELE, M.; STENRØD, M.; TOURNEBIZE, J.; VERNIER, F.; VINDIMIAN, E. Pesticide risk assessment and management in a globally changing world—report from a European interdisciplinary workshop. **Environ Sci Pollut Res**, v. 20, p. 8298–8312, 2013.

BENARROCH, E. Heat shock proteins. **Neurology**, v. 76, p. 660–667, 2011.

BIERKENS, J.G.E.A. Applications and pitfalls of stress proteins in biomonitoring. **Toxicology**, v.153, p.61-72, 2000.

BIRCH, R.M.; WALKER, G.M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 678–687, 2000.

BUDAGOVA, K.R.; ZHMAEVA, S.V.; GRIGOREV, A.N.; GONCHAROVA, A.Y.A.; KABAKOV, A.E. Flavonoid Dihydroquercetin, unlike quercetin, fails to inhibit expression of heat shock proteins under conditions of cellular stress. **Biochemistry**, v. 68, p. 1055- 1061, 2003.

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.

CHIANG, H. L.; TERLECKY, S. R.; PLANT, C. P.; DICE, J. F. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. **Science**, v. 246, p. 382–385, 1989.

CHITWOOD, D.J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 40, p. 221-249, 2002.

COPPING, L.G.; DUKE, S.O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Manage. Sci.**, v. 63, p. 524-554, 2007.

ERATA, G.O.; KANBAĞLI, O.; DURLANIK, O.; BULUT, T.; TOKER, G.; UYSAL, M. Induced Oxidative Stress and Decreased Expression of Inducible Heat Shock Protein 70 (HSP70) in Patients with Colorectal Adenocarcinomas. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 35, p. 74-78, 2005.

EVANS, C.G.; CHANG, L.; GESTWICKI, J.E. Heat Shock Protein 70 (Hsp70) as an emerging drug target. **J. Med. Chem.**, v. 53, p. 4585-4602, 2010.

FONTANETTI, C.S.; MOREIRA-DE-SOUSA, C.; PINHEIRO, TG.; 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, 2011, p. 143-168.

FQPA - Food Quality Protection Act - House Resolution, 1627, 1996. Disponível em: <http://www.epa.gov/pesticides/regulating/laws/fqpa/>. Acesso: 01/05/2013.

FRYDMAN, J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 70, p. 603–647, 2001.

GODOY, J.A.P.; FONTANETTI, C.S. Diplopods as Bioindicators of Soils: Analysis of Midgut of Individuals Maintained in Substrate Containing Sewage Sludge. **Water, Air & Soil Pollution**. v. 210, p.389-398, 2010.

GUPTA, S.C.; SHARMA, A; MISHRA, M; MISHRA, R.K.; CHOWDHURI, D.K. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far?. **Life Sciences**, v. 86, p. 377-384, 2010.

HARTL, F.U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, p. 324–332, 2011.

HOSOKAWA, N.; HIRAYOSHI, K.; KUDO, H.; TAKECHI, H.; AOIKE, A.; KAWAI, K.; NAGATA, K. Inhibition of the Activation of Heat Shock Factor *In Vivo* and *In Vitro* by Flavonoids. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, p. 3490-3498, 1992.

HOSOKAWA, N.; HIRAYOSHI, K.; NAKAI, A.; HOSOKAWA, Y.; MARUI, N.; YOSHIDA, M.; SAKAI, T.; NISHINO, H.; AOIKE, A.; KAWAI, K.; NAGATA, K. Flavonoids Inhibit the Expression of Heat Shock Proteins. **Cell Structure and Function**, v. 15, p. 393-401, 1990.

HUBERT, M. Données histophysiologiques complémentaires sur les bio-accumulations minérales et puriques chez *Cylindroiulus londinenseis* (Leach, 1914), (Diplópode, Iuloidea). **Archives de Zoologie Experimentale et Générale**, v.119, p. 669-683, 1978a.

HUBERT, M. L'intestin moyen de *Cylindroiulus londinensis* Leach (Diplopoda, Iuloidea): observations ultrastructurales en relation avec la fonction d'accumulation. **Ibid.**, p.749-752, 1979b.

HUBERT, M. Les cellules hépatiques de *Cylindroiulus londinensis* (Leach, 1814), (Diplopode, Iuloidea). **Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences**, p. 627-630, 1978b.

HUBERT, M. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In CAMATINI, M. (Ed). **Myriapod Biology**. London: Academic Press, 1979a, p.127- 134.

JEYASANKAR, A.; JESUDASAN, R.W.A. Insecticidal properties of novel botanicals against a few lepidopteran pests. **Pestology**, v. 29, p. 42-44, 2005.

KILLILEA, D.W.; MAIER, J.A.M. A connection between magnesium deficiency and aging: new insights from cellular studies. **Magnesium Research**, v. 21, p. 77-82, 2008.

KLAUSENER, A.; RAMING, K.; STENZEL, K. Modern tools for drug discovery in agricultural research. In: OHKAWA, H.; MIYAGAWA, H.; LEE, P.W. **Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety**. Alemanha: Wiley, 2007. p. 55-63.

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.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E.C.M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Braz. J. morphol. Sci.**, v. 23, n. 3-4, p. 129-136, 2006.

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 padbergi* (Diplopoda). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1361–1369, 2012.

MORRIS, J.P.; THATJE, S.; HAUTON, C. The use of stress-70 proteins in physiology: a re-appraisal. **Molecular Ecology**, p. 1-9, 2013.

NADEAU, D.; CORNEAU, S.; PLANTE, I.; MORROW, G.; TANGUAY, R.M. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. **Cell Stress & Chaperones**, v. 6, p. 153–163, 2001.

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

NOGAROL, L.R.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural Alterations in the Midgut of Diplopods after Subchronic Exposure to Substrate Containing Sewage Mud. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 218, p. 539-547, 2011.

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.

PEREZ, D.G.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the Toxic Potential of Sewage Sludge in the Midgut of the Diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 218, p. 437-444, 2011.

POWERS, M.V. AND WORKMAN, P. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. **FEBS Lett.** v. 581, p. 3758-69, 2007.

PRATT, W. B.; TOFT, D. O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. **Exp. Biol. Med.**, v. 228, p. 111–133, 2003.

SHARMA, A.K.; BHARTI, S.; OJHA, S.; BHATIA, J.; KUMAR, N.; RAY, R. Up-regulation of PPARgamma, heat shock protein-27 and -72 by naringin attenuates insulin resistance, beta-cell dysfunction, hepatic steatosis and kidney damage in a rat model of type 2. **Br. J. Nutr.**, v. 106, p. 1713–1723, 2011.

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.

SOSINKA, A.,M.M.; ROST-ROSZKOWSKA, J.; VILIMOVA, K.; TAJOVSKÝ, M.; KSZUK- JENDRYSIK, L.; CHAJEC, L.; SONAKOWSKA, K.; KAMINSKA, M.H.Y.R.A. The ultrastructure of the midgut epithelium (Myriapoda, Diplopoda). — **Arthropod Structure & Development**, v. 43, p. 477-492, 2014.

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

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

YANG, W.; CUI, M.; LEE, J.; GONG, J.; WANG, S.; FU, J.; WU, G; YAN, K. Heat shock protein inhibitor, quercetin, as a novel adjuvant agent to improve radiofrequency ablation-induced tumor destruction and its molecular mechanism. **Chin. J. Cancer Res.**, v. 28, p. 19–28, 2016.

YOUNG, J. C.; BARRAL, J. M.; ULRICH HARTL, F. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. **Trends Biochem. Sci.**, v. 28, p. 541–547, 2003.

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

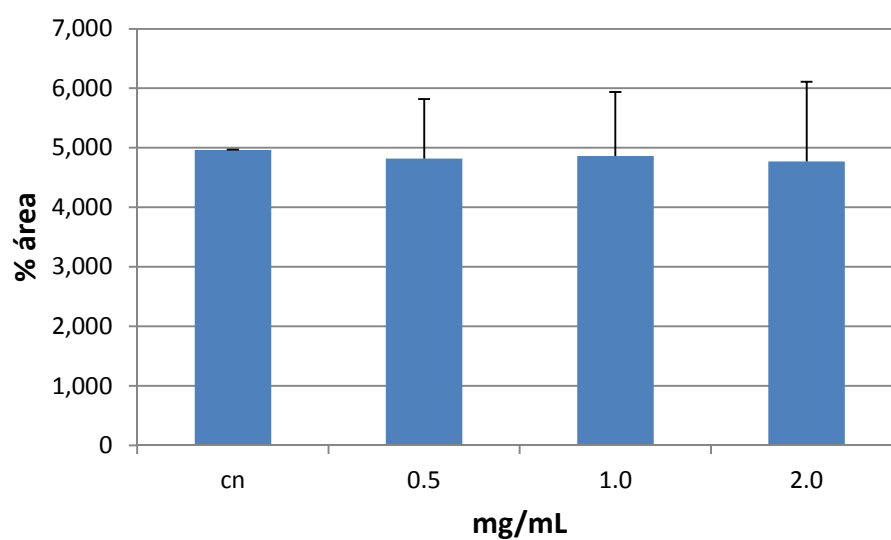


Figura 1. Porcentagem de área do intestino médio de *R. padbergi* imunomarcada após exposição por 21 dias ao metalo-inseticida [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂] (CH₃COO). cn = grupo controle

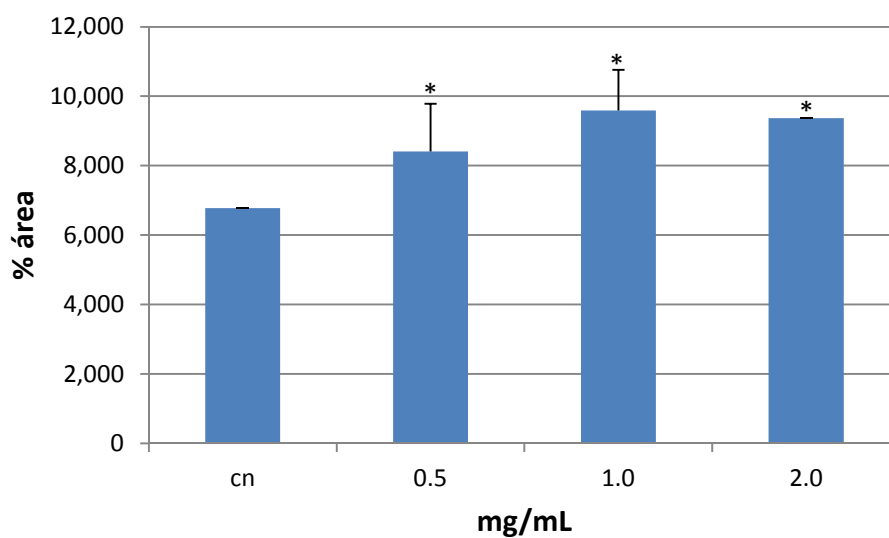


Figura 2. Porcentagem de área do intestino médio de *R. padbergi* imunomarcada após exposição por 90 dias ao metalo-inseticida [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂] (CH₃COO).

cn = grupo controle

*p > 0.05

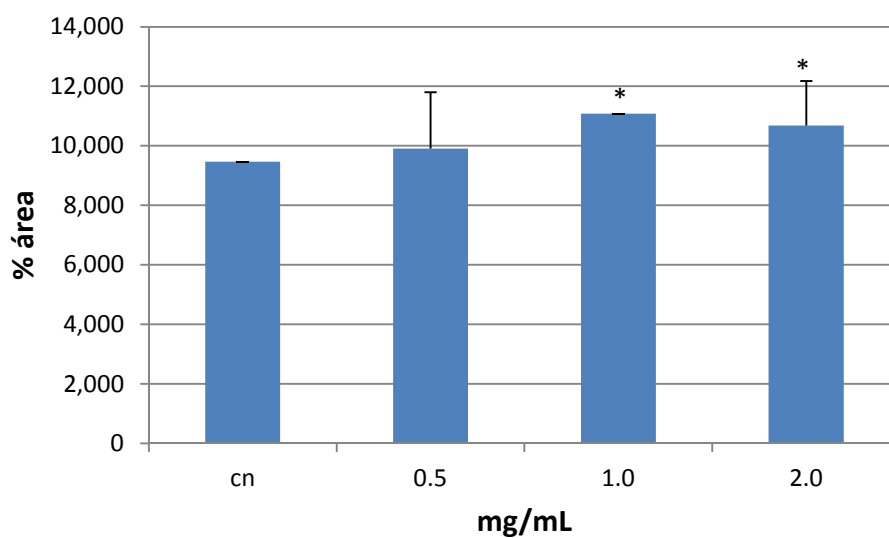


Figura 3. Porcentagem de área do intestino médio de *R. padbergi* imunomarcada após exposição por 21 dias ao metalo-inseticida [Mg(5-metil-phen)(hesperitina) (H₂O)₂](CH₃COO). cn = grupo controle
*p > 0.05

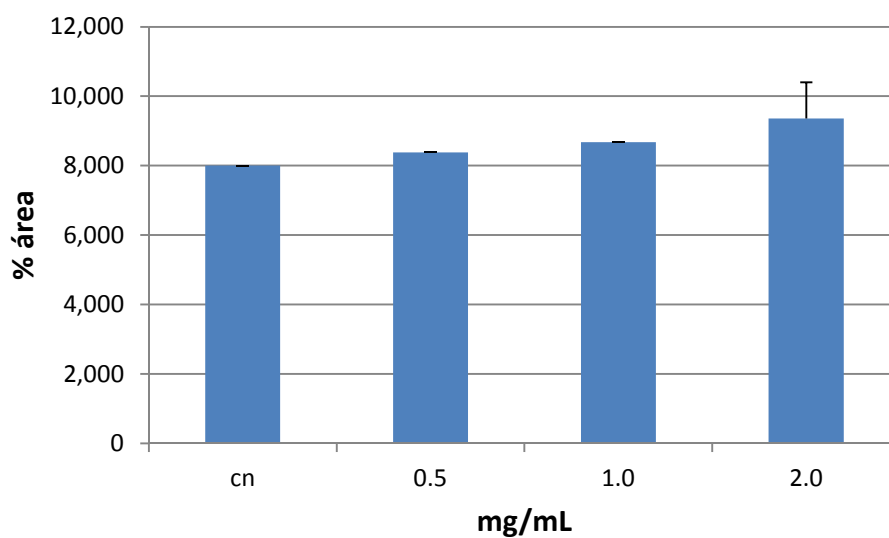


Figura 4. Porcentagem de área do intestino médio de *R. padbergi* imunomarcada após exposição por 90 dias ao metalo-inseticida [Mg(5-metil-phen)(hesperitina) (H₂O)₂](CH₃COO). cn = grupo controle

Avaliação dos efeitos tóxicos de um complexo metálico inseticida por meio de protocolos internacionais para invertebrados de solo

Raphael Bastão de Souza¹; Tiago Natal-da-Luz²; Nuno Capela²; José Paulo Sousa²;
Odair Correa Bueno¹; Carmem S. Fontanetti^{1*}

¹UNESP – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de
Biologia, Rio Claro, São Paulo, Brasil

²Universidade de Coimbra, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Departamento de Ciências da
Vida, Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia de Solos, Coimbra, Portugal

*Autor correspondente: Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264136.

E-mail: fontanet@rc.unesp.br

Resumo

O uso de invertebrados terrestres é fortemente recomendado por diversas organizações internacionais a fim de avaliar o impacto de pesticidas no solo. Entre estes organismos, os mais indicados para estudos ecotoxicológicos são minhocas da espécie *Eisenia fetida* e enquitreídeos da espécie *Enchytraeus crypticus* devido a sua relevância ecológica. Testes de reprodução e mortalidade com enquitreídeos e minhocas, respectivamente, foram realizados a fim de analisar o possível efeito tóxico de um complexo metálico-inseticida. Os testes foram realizados em Solo Artificial Tropical com sete diferentes concentrações do complexo. O complexo analisado é composto por um produto natural, o flavonóide hesperitina, ligado a um metal e apresenta ação formicida. Os resultados obtidos demonstraram que o produto não apresenta toxicidade para minhocas, uma vez que sua biomassa, sua mortalidade e sua reprodução não foram afetadas. O teste de reprodução com colêmbolos revelou que apenas a maior concentração reduziu estatisticamente o número de juvenis. Para os enquitreídeos foi observado três níveis de toxicidade, nula, média e alta, sendo que as duas maiores concentrações testadas foram as que apresentaram maior redução no número de juvenis.

Palavras-chave: enquitreídeos; minhocas; colêmbolos; teste de reprodução; formicida

1. Introdução

Pesticidas e outros agroquímicos têm sido amplamente utilizados em todo o mundo devido seus benefícios para a produção agrícola. Estas substâncias constituem uma das

principais fontes de contaminação de organismos não alvos, principalmente os terrestres, uma vez que o solo representa o primeiro compartimento a receber estas substâncias (PEREIRA et al., 2009).

Com o intuito de prever os efeitos dos pesticidas nas comunidades de invertebrados terrestres, as informações obtidas de estudos ecotoxicológicos devem ser extrapoladas de um pequeno subconjunto de espécies, uma vez que é impossível a realização de testes com grande número de espécies (FRAMPTON et al., 2006). Deste modo, algumas espécies ecologicamente relevantes são recomendadas para a realização dos testes. Na Europa, testes com minhocas (*Eisenia* spp) e enquitreídeos (*Enchytraeus* spp) são exigidos para a avaliação de risco de pesticidas, sobretudo para a proteção de invertebrados terrestres (EPPO, 2003).

Minhocas são importantes macro-invertebrados de solo e são frequentemente utilizados para verificar o impacto de pesticidas (OECD, 1984). Elas representam mais de 80% da biomassa do solo e possuem importante função ecológica no ciclo de nutrientes (YASMIN; SOUZA, 2010). *Eisenia fetida* é a espécie padrão utilizada em estudos ecotoxicológicos de solo, pois pode ser facilmente alimentada com uma variedade de detritos orgânicos e possui curto período de procriação (ISO, 1998; OECD, 2004). Estes organismos permitem a avaliação de vários parâmetros, como reprodução, fisiologia, morfologia e comportamento (LEE et al., 2008), além de ser utilizada para a caracterização das propriedades de produtos químicos (RIEPERT et al., 2009).

Anelídeos terrestres do gênero *Enchytraeus* também são ecologicamente relevantes, uma vez que são abundantes em muitos solos onde minhocas são escassas, ao mesmo tempo em que podem atingir alta densidade em solos onde elas são muito encontradas. A vantagem em sua utilização está no fato de serem de fácil manuseio e alimentação e por apresentarem período de procriação menor em relação às minhocas, de 4 a 6 semanas e 12 semanas, respectivamente (ISO 16387, 2003). A espécie *E. albidus* é a indicada pelos protocolos internacionais (ISO 16387, 2003; OECD 220, 2004) para a realização dos testes, porém também é sugerido o uso da espécie *Enchytraeus crypticus* por apresentar algumas vantagens, como menor período de procriação.

Assim como os anelídeos, os colêmbolos têm sido utilizados como organismos testes há mais de 40 anos a fim de avaliar os efeitos de pesticidas e poluentes em organismos de solo não alvos. A espécie *F. candida* é a mais utilizada (FOUNTAIN; HOPKIN, 2005) devido à padronização dos testes de fuga e reprodução pela ISO (1999), seu curto ciclo de vida e a capacidade de reprodução partenogenética, tornando-os excelentes organismos para estudar

diferentes parâmetros individuais e populacionais em um único experimento (CROMMENTUIJN, et al. 1993).

O composto a ser avaliado trata-se de um complexo de metal inorgânico ligado a um produto natural, a flavonona hesperitina. Sua formulação, $\text{Mg}_6[\text{Mg}(\text{5-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$, é capaz de atuar como inseticida para formigas cortadeiras quando adicionada às iscas. Os ensaios *in vivo* com insetos pragas realizados com este sistema metalo-inseticida apresentaram tempo de ação retardado, semelhante ao tempo de ação do inseticida comercial sulfluramida (OLIVEIRA, 2012), o qual teve sua comercialização proibida pela Convenção de Estocolmo, realizada em 2009.

Deste modo, o objetivo deste estudo é contribuir com dados ecotoxicológicos acerca deste novo complexo metálico-inseticida, utilizando as espécies *E. crypticus*, *E. fetida* e *F. candida* como organismos testes para a realização de testes de reprodução e mortalidade.

2. Materiais e Métodos

2.1 Metalo-inseticidas

O metalo-inseticida utilizado no estudo, $\text{Mg}(\text{5-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$, foi fornecido pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

2.1 Material Biológico

Os animais utilizados foram obtidos no Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia de Solos da Universidade de Coimbra, Portugal. A cultura de *E. cryptus* foi mantida em placas de Petri preenchidas com ágar, mantidas à 22°C e alimentadas com farelo de aveia até o início dos testes. Os colêmbolos foram mantidos à 25°C e alimentados com fermento. As minhocas foram mantidas como descrito por Natal-da-Luz et al. (2008).

2.2 Testes ecotoxicológicos

2.2.1 Solo

Solo Tropical Artificial à 5% (SAT 5%), composto por 75% de areia, 20% de caulino e 5% de fibra de côco foi preparado e misturados com diferentes concentrações do composto. Os controles foram preparados com SAT + água destilada e SAT + solvente (acetona), uma vez que o composto foi adicionado a solvente para melhor diluição. Uma solução mãe foi preparada a fim de distribuí-la no solo na seguinte série de concentrações: 0,175; 0,35; 0,7;

1,4; 2,8; 5,6 e 11,2 mg/kg. Após a mistura da solução mãe nas diferentes concentrações com o solo, o mesmo permaneceu por 12 horas na capela para evaporação do solvente.

2.2.2 Teste com *E. fetida*

Os testes foram baseados no ISO 11268-2. Cinco réplicas para cada tratamento foram preparadas; cada uma consistia em uma embalagem cilíndrica plástica (4 cm de diâmetro e 6 cm de altura) com 200g de solo controles (SAT + água; SAT + solvente) e solo com diferentes concentrações do composto, como mencionado no item 2.2.1. Dez indivíduos adultos, previamente aclimatados no solo a ser utilizado no experimento, foram inoculados em cada réplica. A umidade do solo foi previamente ajustada para 50% de sua capacidade máxima de armazenamento de água. O teste foi realizado em BOD a 25°C e os animais foram alimentados com esterco orgânico no início do experimento e após 14 dias. Após 28 dias de exposição, as minhocas foram retiradas do solo, lavadas em água destilada, secas, pesadas e a mortalidade foi determinada. Após 8 semanas, foi realizada a contagem dos juvenis. Para tal, as embalagens plásticas foram colocadas em banho-maria à 60°C para fazer os juvenis subirem à superfície. A normalidade foi calculada e a estatística para determinar diferenças entre os pesos iniciais e finais foi realizada pelo teste-T ($p < 0,05$).

2.2.3 Teste com *E. cryptus*

Os procedimentos adotados no teste de reprodução foram baseados no ISO 16387. Oito réplicas para os controles e cinco réplicas para as exposições foram preparadas em frascos cilíndricos de vidro (5 cm de diâmetro e 9 cm de altura) com 20g de SAT 5% contendo diferentes concentrações do metalo-inseticida a ser testado. Dez indivíduos adultos com clitelos bem desenvolvidos e visíveis foram distribuídos nos frascos, os quais foram mantidos em BOD a 25°C durante o experimento. Aproximadamente 15mg de farelo de aveia foram colocados em cada frasco como alimento no início do teste. Os frascos foram abertos uma vez por semana para permitir aeração, ajustar a umidade adicionando água destilada e adicionar mais comida, se necessário. Após 28 dias, em cada frasco, foi adicionado etanol 96% até uma altura de 4 cm e adicionado 200-300 µL de vermelho de Bengala (solução 1% de etanol). Os frascos foram suavemente agitados e, após 12 horas, foram peneirados em uma malha de 0,106 mm com água de torneira. O material foi transferido para placas de 24 poços a fim de contar os juvenis com ajuda de uma lupa. A validação do teste assumiu um número de juvenis maiores de 25 por frasco e um coeficiente de variação menor de 50% entre as réplicas. A normalidade foi calculada e a estatística realizada pelo teste-T ($p < 0,05$).

2.2.4 Teste com *F. candida*

Os procedimentos adotados no teste de reprodução foram baseados no ISO 16387 (ISO 1999). Cinco réplicas para cada concentração foram preparadas utilizando frascos de vidro (4 cm de diâmetro e 7 cm de altura) com 20 g de SAT 5% contendo diferentes concentrações do metalo-inseticida a ser testado. Dez colêmbolos foram distribuídos em cada frasco e 2 mg de fermento foi adicionado como fonte de alimento. Após 28 dias de exposição, o conteúdo de cada frasco foi transferido para outro pote, onde foi adicionado água e 3 gotas de tinta azul. O conteúdo foi misturado para que os indivíduos flutuassem na superfície da água e fossem fotografados e contados. A normalidade foi calculada e a estatística realizada pelo teste-T ($p < 0,05$).

3. Resultados

O critério de validação do teste de mortalidade com minhocas foi atingido, uma vez que nenhuma morte foi observada nos controles. Assim como nos controles, os tratamentos expostos ao metalo-inseticida também não apresentaram nenhuma morte. As minhocas não apresentaram redução no peso corpóreo após os 28 dias de exposição (figura 1). Após oito semanas de exposição, não foi observada redução significativa no número de juvenis, embora as maiores concentrações terem apresentado redução em relação ao controle (figura 2).

Para o teste de reprodução com *E. cryptus*, o critério de validação também foi atingido. Não houve diferença significativa no número de juvenis entre o controle com água e o controle com solvente. Observou-se diminuição no número de juvenis nos tratamentos expostos ao metalo-inseticida, sendo que as maiores concentrações foram as que apresentaram menores números de descendentes. Diferença significativa foi observada a partir da concentração 0,7 mg/kg quando comparada com os dois controles, porém a concentração 0,175 mg/kg, a menor testada, foi estatisticamente significativa em relação ao controle com água (figura 3).

De acordo com o teste de reprodução com o colêmbolo da espécie *F. candida*, todas as concentrações apresentaram diminuição no número dos juvenis em relação ao controle, porém apenas a maior concentração, 11,2 mg/kg, foi estatisticamente significativa (figura 4).

4. Discussão

De acordo com Shi et al. (2007), a mortalidade é o parâmetro mais frequente na avaliação da toxicidade de substâncias tóxicas em minhocas e pode ser utilizada como um parâmetro confiável de poluição ambiental. Os dados deste estudo sugerem que o metalo-inseticida analisado, mesmo nas maiores concentrações, não apresenta efeito letal sobre a

espécie *E. fetida*. A falta de toxicidade pode ser explicada pela presença do flavonóide hesperitina na formulação, conhecido por possuir efeito protetor contra várias substâncias químicas (IRANSHANI et al., 2015).

Testes de mortalidade com os pesticidas carbaril, clorpirifós e ciflutrin (MOSTERT et al., 2000) e com o extrato da planta *Apodytes dimidiata* (BRACKENBURY; APPLETON, 1997) também não apresentaram toxicidade letal para a espécie. No entanto, nem todos os compostos de origem natural, como o complexo metálico aqui analisado, são seguros para a espécie. Produtos derivados da planta *Camellia oleífera*, ricos em saponinas, têm a capacidade de aumentar sua mortalidade (POTTER et al., 2009).

Segundo Mostert et al. (2000; 2002), o tempo e o comportamento tem influência no efeito de inseticidas sobre a mortalidade de minhocas. Uma exposição de 24 horas não é indicada para obter dados confiáveis de mortalidade. A partir de 7 dias de exposição, os dados passam a indicar resultados mais precisos, porém é sugerido um mínimo de 21 dias de exposição para obter resultados confiáveis. Em relação ao comportamento, quanto mais ativa estiverem, maior a probabilidade de entrarem em contato com o contaminante. No teste aqui realizado, os organismos permaneceram ativos durante todo experimento, uma vez que foi necessário repor o alimento nos períodos determinados.

Em minhocas, a redução do peso corporal pode estar relacionada com o comportamento de alimentação ou com alterações fisiológicas. Capowiez e Berard (2006) e Gomez-Eyles et al. (2009) observaram que as minhocas revolviam menos o solo na presença do agrotóxico imidacloprido, o que sugere uma diminuição no hábito alimentar. De acordo com Luo et al. (1999), o imidacloprido também é responsável por reduzir a atividade da enzima celulase em *E. fetida*, ocasionando perda de peso, uma vez que a redução na atividade da enzima compromete a eficiência alimentar do organismo. Como nos resultados aqui apresentados, a falta de letalidade e perda de peso também foi observada por NRA (2001) e Mostert et al. (2002) em minhocas expostas aos inseticidas fipronil e tiametoxam.

Nos testes de reprodução, o solvente onde foi diluído o metalo-inseticida não apresentou toxicidade para os animais, uma vez que o número de juvenis não diferiu estatisticamente dos controles onde foi adicionada água destilada. Deste modo, a toxicidade encontrada nas exposições é derivada exclusivamente do metalo-inseticida analisado. Para os enquitreídeos, os resultados demonstram que o metalo-inseticida possui três níveis de toxicidade para a espécie, nula, média e alta. As menores concentrações, 0,175 mg/kg e 0,35 mg/kg, não afetaram sua reprodução; a partir da concentração 0,7 mg/kg, o número de juvenis foi estatisticamente menor em relação aos controles, sendo que as concentrações 0,7 mg/kg,

1,4 mg/kg e 2,8 mg/kg apresentaram comportamento semelhantes, com número de juvenis parecidos entre si; as duas maiores concentrações, 5,6 mg/kg e 11,2 mg/kg, foram as que apresentaram maior redução no número de juvenis e, portanto, com maior toxicidade.

Efeitos diretos dos pesticidas em enquitreídeos ocorrem, principalmente, através da absorção da substância por meio da água presente no solo. Isto implica que substâncias com alta solubilidade entrem em maior contato com os animais (DEZI et al., 2013). Mesmo o composto analisado não possuindo alta solubilidade em água, os resultados obtidos demonstraram que ele é responsável por afetar a reprodução a partir da concentração 0,7 mg/kg. Porém, além da absorção, os enquitreídeos também podem entrar em contato com substâncias possivelmente tóxicas a partir da ingestão do solo (DEZI et al., 2013).

O processo de absorção de substâncias em minhocas e enquitreídeos são semelhantes, através de difusão passiva através da pele ou da ingestão (STYRISHAVE et al., 2008). Apesar disso, o metalo-inseticida não afetou a reprodução das minhocas em nenhuma das concentrações testadas. Em estudo conduzido por Yasmin e D'Souza (2007), o pesticida glifosato também não afetou significativamente a reprodução das minhocas. Porém, assim como no teste com enquitreídeos, foi possível observar que as maiores concentrações testadas diminuiu o número de juvenis gerados pelas minhocas.

A reprodução dos colêmbolos foi afetada significativamente apenas pela concentração mais alta, corroborando os resultados encontrados com *E. crypticus* e *E. fetida*, onde as maiores concentrações foram as que mais afetaram a reprodução. Embora seja esperado que artrópodos sejam mais sensíveis a inseticidas, os resultados aqui encontrados sugerem uma maior sensibilidade dos enquitreídeos, seguida pelos colêmbolos e pelas minhocas. De acordo com Frampton et al. (2006), colêmbolos são mais sensíveis em relação às minhocas, principalmente quando expostos à biocidas, herbicidas, fungicidas e inseticidas.

Levando em consideração os testes de reprodução realizados com as três espécies de invertebrados de solo, sugerimos que o metalo-inseticida analisado é uma opção mais segura para aplicação no solo e controle de formigas-cortadeiras. Os resultados sugerem que apenas as maiores concentrações apresentam efeito significativo, principalmente para enquitreídeos. Para colêmbolos, apenas a maior concentração foi tóxica, enquanto que nenhuma concentração afetou os parâmetros analisados para as minhocas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. n. 2012/12019-5) pelo apoio financeiro, ao Prof. Dr. João Batista Fernandes e à Prof.

Dra. Rose Maria Carlos pela síntese e disponibilização dos metalo-inseticidas testados e à Universidade de Coimbra por tornar possível a realização dos experimentos.

5. Referências Bibliográficas

BRACKENBURY, T.D.; APPLETON, C.C. Acute toxicity evaluation of the plant molluscicide, *Apodytes dimidiata* (Icacaceae), to *Eisenia fetida* (Oligochaeta) and *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) in South Africa. **Acta Tropica**, v. 63, p. 1–14, 1997.

CAPOWIEZ, Y., BERARD, A. Assessment of the effects of imidacloprid on the behavior of two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica*) using 2D terraria. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 64, p. 198–206, 2006.

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.

DEZI, S.L.; LAL, D.; LAL, V.B. Enchytraeids sustainability and tolerance against agro-chemicals in zea mays cropland. **The Bioscan**, v. 8, p. 213-217, 2013.

EPPO - Environmental risk assessment scheme for plant protection products. **Bulletin**, v. 33, 2003.

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

FRAMPTON, G.K.; JANSCH, S.; SCOTT-FORDSMAND, J.J.; ROMBKE, J.; VAN DEN BRINK, P.J. Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: a review and analysis using species sensitivity distributions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, p. 2480–2489, 2006.

GOMEZ-EYLES, J.L.; SVENDSEN, C.; LISTER, L.; MARTIN, H.; HODSON, M.E.; SPURGEON, D.J. Measuring and modeling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 72, p. 71–79, 2009.

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.

ISO 11268-2 - Soil quality: Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 2: Determination of effects on reproduction, 1998.

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

ISO 16387 - Soil quality — Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) — Determination of effects on reproduction and survival, 2003.

LEE, B.T.; SHIN, K.H.; KIM, J.Y.; KIM, K.W. Progress in earthworm ecotoxicology. **Advanced Environmental Monitoring**, p. 248-258, 2008.

LUO, Y.; ZANG, Y.; ZHONG, Y.; KONG, Z. Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia fetida*. **Chemosphere** 39, 2347–2356, 1999.

MOSTERT, M.A.; SCHOEMAN, A.S.; MERWE, M.V.D. The relative toxicities of insecticides to earthworms of the Pheretima group (Oligochaeta). **Pest Manag Sci**, v. 58, p. 446-450, 2002.

MOSTERT, M.A.; SCHOEMAN, A.T.S.; MERWE, M.V.D. The toxicity of five insecticides to earthworms of the Pheretima group, using an artificial soil test. **Pest Manag Sci**, v. 56, p. 1093-1097, 2000.

NATAL-DA-LUZ, T.; ROMBKE, J.; SOUSA, J.P. Avoidance tests in site-specific risk assessment—Influence of soil properties on the avoidance response of collembolan and earthworms. **Environ Toxicol Chem**, v. 27, p. 1112–1117, 2008.

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.

NRA. Evaluation of the new active thiametoxam in the product Cruiser 350 FS insecticide seed treatment. National registration authority for agricultural and veterinary chemicals, Canberra, 2001.

OECD - Guideline for the testing of chemicals: earthworm reproduction test, 2004.

OECD – Guidelines for the testing of chemicals. Test n. 220: Enchytraeid reproduction test, 2004.

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.

PEREIRA, J.L.; ANTUNES, S.C.; CASTRO, B.B.; MARQUES, C.R.; GONÇALVES, A.M.M.; GONÇALVES, F.; PEREIRA, R. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 455–463, 2009.

POTTER, D.A.; REDMOND, C.T.; MEEPAGALAB, K.M.; WILLIAMS, D.W. Managing earthwormcasts (Oligochaeta: Lumbricidae) in turfgrass using a natural byproduct of tea oil (*Camellia* sp.) manufacture. **Pest Manag Sci**, v. 66, p. 439–446, 2010.

ROBIDOUX, P.Y.; HAWARI, J.; THIBOUTOT, S.; AMPLEMAN, G.; SUNAHARA, G.I. Acute Toxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene in Earthworm (*Eisenia Andrei*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, p. 311-321, 1999.

SHI, Y.; SHI, Y.; WANG, X.; LU, Y.; YAN, S. Comparative effects of lindane and deltamethrin on mortality, growth, and cellulase activity in earthworms (*Eisenia fetida*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 89, p. 31–38, 2007.

STYRISHAVE, B.; MORTENSEN, M.; KROGH, P.H.; ANDERSEN, O.; JENSEN, J.; Solid-phase microextraction (SPME) as a tool to predict the bioavailability and toxicity of pyrene to the springtail *Folsomia candida*, under various soil conditions. **Environ. Sci. Technol.**, v. 42, p. 1332–1336, 2008.

VAN GESTEL, C.A.M.; VAN DIS, W.A.; VAN BREEMEN, E.M.; SPARENIXJRG, P.M. Development of a standardized reproduction toxicity test with the earthworm species *Eisenia fetida andrei* using copper, pentachlorophenol, and 2,4-dichloroaniline. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 18, p. 305-312, 1989.

YASMIN, S.; D'SOUZA, D. Effects of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 79, p. 529–532, 2007.

YASMIN, S.; D'SOUZA, D. Effects of pesticides on the growth and reproduction of earthworm: a review. **Applied and Environmental Soil Science**, p. 1-10, 2010.

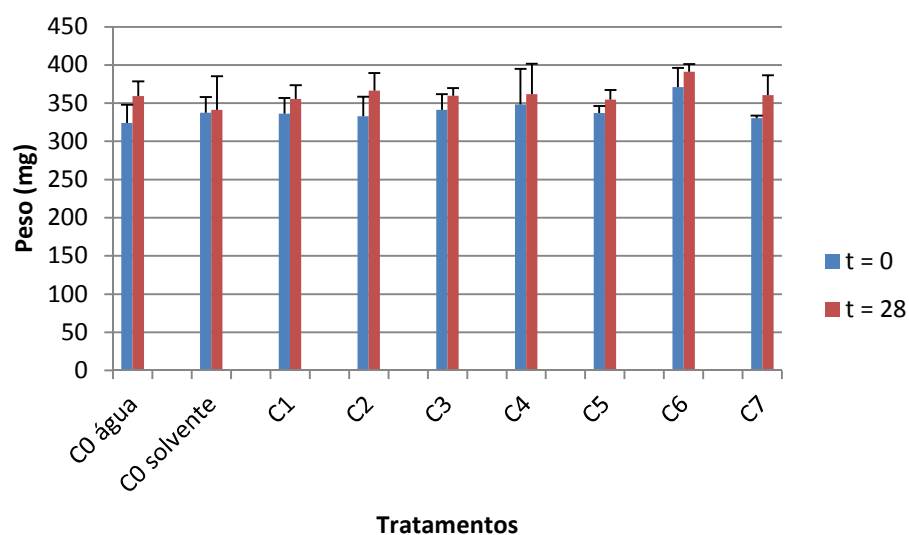


Figura 1. Peso médio das minhocas por tratamento, no início da exposição ($t = 0$) e após 28 dias ($t = 28$). C0 água e C0 solvente = controles; C1 = 0,175 mg/kg; C2 = 0,35 mg/kg; C3 = 0,7 mg/kg; C4 = 1,4 mg/kg; C5 = 2,8 mg/kg; C6 = 5,6 mg/kg; C7 = 11,2 mg/kg

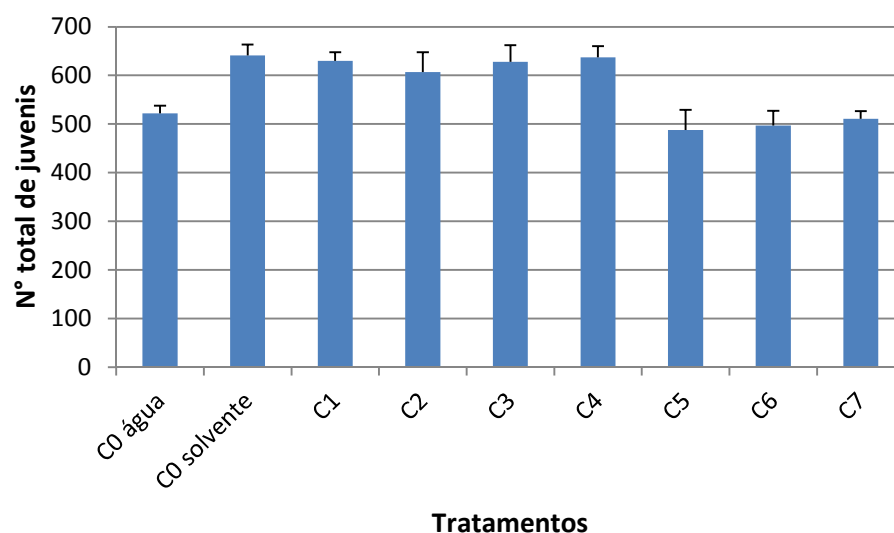


Figura 2. Número total de juvenis de *E. fetida* gerados após oito semanas de exposição à diferentes concentrações do metalo-inseticida $\text{Mg}(\text{5-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$. C0 água e C0 solvente = controles; C1 = 0,175 mg/kg; C2 = 0,35 mg/kg; C3 = 0,7 mg/kg; C4 = 1,4 mg/kg; C5 = 2,8 mg/kg; C6 = 5,6 mg/kg; C7 = 11,2 mg/kg

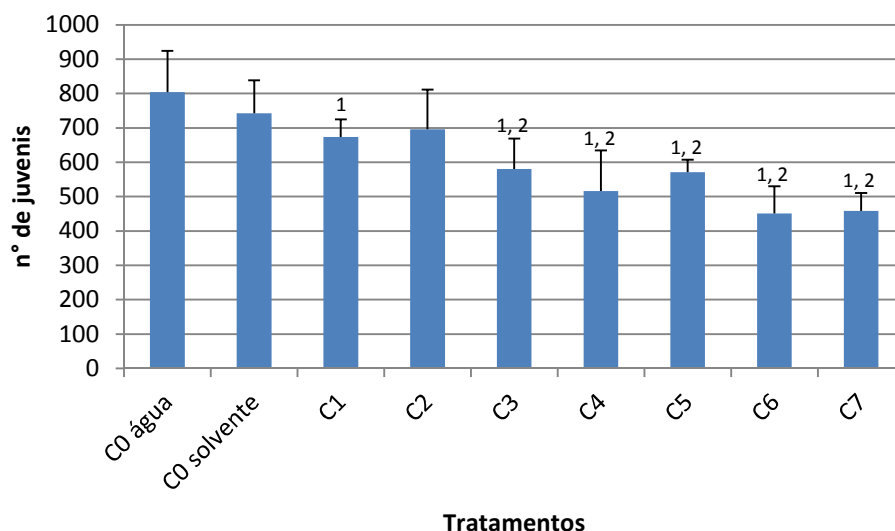


Figura 3. Número total de juvenis de *E. crypticus* gerados após 4 semanas de exposição à diferentes concentrações do metalo-inseticida $\text{Mg}(\text{5-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$. C0 água e C0 solvente = controles; C1 = 0,175 mg/kg; C2 = 0,35 mg/kg; C3 = 0,7 mg/kg; C4 = 1,4 mg/kg; C5 = 2,8 mg/kg; C6 = 5,6 mg/kg; C7 = 11,2 mg/kg
1: número de juvenis significantes menores em relação ao controle com água.
2: número de juvenis significantes menores em relação ao controle com solvente.

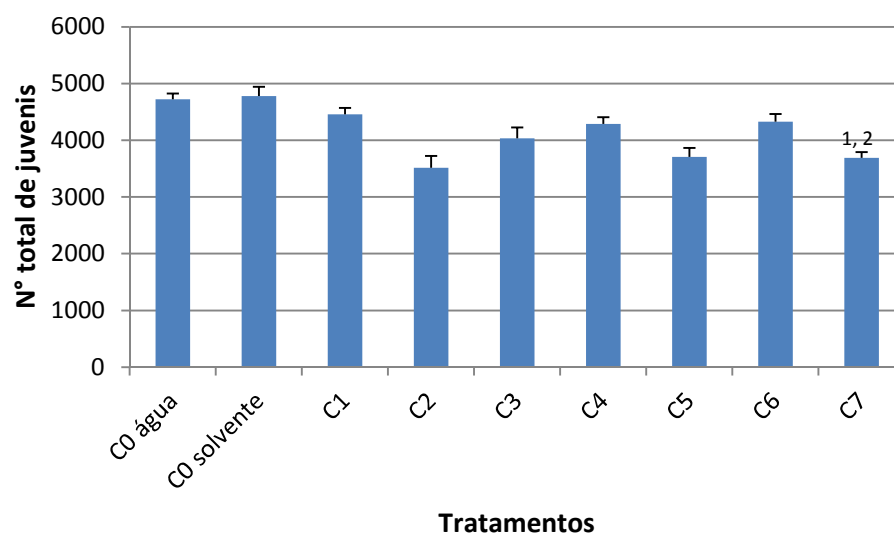


Figura 4. Número total de juvenis de *F. candida* gerados após quatro semanas de exposição à diferentes concentrações do metalo-inseticida $\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$. C0 água e C0 solvente = controles; C1 = 0,175 mg/kg; C2 = 0,35 mg/kg; C3 = 0,7 mg/kg; C4 = 1,4 mg/kg; C5 = 2,8 mg/kg; C6 = 5,6 mg/kg; C7 = 11,2 mg/kg
1: número de juvenis significantes menores em relação ao controle com água.
2: número de juvenis significantes menores em relação ao controle com solvente.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A demanda de alimento pela crescente população humana faz com que o uso de agrotóxicos na agricultura, com o intuito de aumentar sua produção, seja inevitável. Após décadas de uso descontrolado destas substâncias, principalmente a partir da II Guerra Mundial, hoje sabe-se que elas são capazes de produzir efeitos adversos no meio ambiente, principalmente em organismos não alvos, sejam de solo ou aquáticos. Nos últimos anos, esta questão surgiu como uma das principais pautas mundiais no empenho em proteger a biodiversidade do planeta.

Conferências internacionais, como as Convenções de Roterdã e de Estocolmo, têm ocorrido periodicamente para que governos possam discutir e implementar tratados internacionais sobre a utilização de substâncias tóxicas na agricultura. Diferentemente da Convenção de Roterdã, a Convenção de Estocolmo tem o poder de proibir a utilização de agrotóxicos, como ocorreu com o formicida sulfluramida, amplamente utilizado no combate às formigas cortadeiras.

Como uma alternativa ao seu uso, os metalo-inseticidas aqui testados, compostos por um produto natural ligado a um metal inorgânico, possuem alta eficácia no controle de formigas. Por ser um produto novo, é recomendável que testes ecotoxicológicos, com diferentes espécies, sejam desenvolvidos a fim de minimizar os possíveis efeitos adversos causados ao ambiente. Neste sentido, o presente estudo utilizou cinco espécies de organismos bioindicadores e diferentes parâmetros para avaliar a ecotoxicidade de duas formulações do metalo-inseticida para organismos não alvos.

Análises toxicogenéticas foram realizadas com duas espécies de vegetais superiores, *A. cepa* e *T. pallida*. A partir da observação de seu material genético, sobretudo alterações cromossômicas e indução de micronúcleos, é possível determinar se a substância tem a capacidade de interagir e modificar o DNA.

Nos testes realizados com *A. cepa* foi observado que o metalo-inseticida com fórmula $[\text{Mg}(\text{5-metil-phen})(\text{hesperetina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$ apresentou maior toxicidade, uma vez que foi responsável por induzir citotoxicidade e aberrações cromossômicas nas concentrações de 0,5 mg/L e 1,0 mg/L. Apesar da outra formulação ter induzido instabilidade cromossômica, evidenciada pela presença de micronúcleos, ela não foi repassada para as células filhas (F_1), não caracterizando, portanto, mutagenicidade. Para melhor compreensão dos dados obtidos, um dos componentes da fórmula que apresentou maior toxicidade foi analisado de acordo com os mesmos parâmetros. De acordo com os resultados, este componente pode estar

relacionado com a toxicidade do produto, uma vez que ele induziu citotoxicidade e genotoxicidade.

A exposição de *T. pallida* aos metalo-inseticidas revelou que nenhum dos dois, em nenhuma concentração analisada, induziu a formação de micronúcleos nas tétrades. Porém, a frequência de micronúcleos encontrada nas plantas expostas ao [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO) foi maior que nas expostas ao [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO). Assim como no teste com *A. cepa*, o teste com *T. pallida* indicou maior toxicidade do metalo-inseticida [Mg(5-metil-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO).

O uso dos bioindicadores vegetais utilizados já é amplamente conhecido por fornecer ótimos resultados nas análises de toxicidade de diferentes substâncias, como o observado neste estudo. É indicada a utilização de mais de uma espécie na realização dos testes, pois elas podem apresentar sensibilidades diferentes à substância testada. Apesar dos resultados aqui encontrados tenham sido semelhantes para as duas espécies, a espécie *A. cepa* apresentou maior sensibilidade.

A morfologia pode ser utilizada como uma ferramenta nos estudos ecotoxicológicos por indicar níveis subcelulares de toxicidade e, assim, ajudar a prever efeitos negativos antes que parâmetros comportamentais sejam afetados. As análises morfológicas do intestino médio de diplópodos têm mostrado ótimos resultados neste aspecto.

Estes animais estão em contato direto com o solo e, portanto, são um dos primeiros a serem atingidos por substâncias tóxicas lançadas nele. Como ingerem solo para conseguir alimento, o intestino médio, local de absorção de nutrientes, torna-se a primeira barreira entre as substâncias tóxicas e o resto do organismo. Deste modo, este órgão apresenta processos de detoxicação a fim de impedir que as substâncias se espalhem pelo corpo do animal. Por meio da histologia, histoquímica e imunohistoquímica, os processos de detoxicação podem ser avaliados com o intuito de analisar possíveis efeitos tóxicos de substâncias.

Os testes histológicos e histoquímicos realizados com os metalo-inseticidas revelaram ausência de alterações morfológicas no intestino médio, sugerindo que são seguros para a espécie. Algumas alterações condizentes com o processo de detoxicação foram visualizadas, mas não foram estatisticamente significativas quando comparadas ao controle. Entre estas alterações encontram-se aumento de grânulos citoplasmáticos, de liberação de vesículas de secreção, maior presença de hemócitos e de pontos de renovação epitelial.

De acordo com o teste de imunohistoquímica, diplópodos expressam proteínas de estresse no intestino médio mesmo em condições normais, como observado no controle. Este

fato, porém, é esperado, uma vez que as proteínas de estresse possuem várias outras funções celulares. Diferentemente do observado pelas análises histológicas e histoquímicas, a detecção de HSP70 revelou que os metalo-inseticidas podem ser tóxicos, principalmente o $[\text{Mg}(5\text{-Cl-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$.

Para a realização de testes a fim de analisar a toxicidade para organismos de solo, entidades internacionais recomendam a utilização de espécies de minhocas e enquitreídeos, invertebrados terrestres com grande relevância ecológica, os quais possuem metodologias de exposição e análise padronizadas. Portanto, neste estudo as espécies *E. fetida*, *E. crypticus* e *F. candida* foram utilizadas a fim de determinar a toxicidade do metalo-inseticida $[\text{Mg}(5\text{-metil-phen})(\text{hesperitina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})$.

Os dados obtidos por meio dos parâmetros avaliados no teste com as minhocas (peso corpóreo, mortalidade e reprodução) não revelaram toxicidade para a espécie. O teste de reprodução realizado com enquitreídeos revelou que o metalo-inseticida não interfere na reprodução em baixas concentrações, porém é capaz de reduzir a geração de juvenis, principalmente nas maiores concentrações. Os resultados do teste de reprodução com colêmbolos corroboram os resultados encontrados no teste com enquitreídeos, uma vez que apenas a concentração mais alta alterou significativamente sua reprodução.

Apesar dos metalo-inseticidas não terem apresentado alta toxicidade quando comparados a agrotóxicos que são reconhecidamente nocivos a organismos não alvos nem toxicidade para todos os bioindicadores testados, os resultados aqui apresentados sugerem cautela na sua aplicação. Observou-se, ainda, que diferentes espécies e parâmetros possuem diferentes respostas aos metalo-inseticidas testados, evidenciando a necessidade da realização de ensaios com espécies distintas.

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)(H₂O)₂](CH₃COO) 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)(H₂O)₂](CH₃COO), 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)(H₂O)₂](CH₃COO) apresenta maior potencial tóxico quando comparado ao metalo-inseticida [Mg(5-Cl-phen)(hesperitina)(H₂O)₂](CH₃COO), 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.; PEÑAFLO, 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.; PEÑAFLO, M.F.G.V.; BUENO, O.C.; ELLENA, J. Leaf-cutting ants toxicity of limonexic 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.; SARA, 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-BUKHSI, 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.; STRAALLEN, 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.; SURRALLS, 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: PASCUCCHI, 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.; OUAZZANI, 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: EIJSSACKERS, 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 SO₂ 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 pidgei* (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 Cu²⁺ and Cd²⁺ 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: Tissular 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. Schädlingkunde**, 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 antimitotic 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 therapeutical 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. **Toxicon**, 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 Pollutants, 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.