



Fundação Carmelitana Mário Palmério
Faculdade de Ciências Humanas e Sociais
“Educação de Qualidade ao seu alcance”

TARCÍSIO PAIVA MENDONÇA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO LARVICIDA SPINOSAD SOBRE O
MATERIAL GENÉTICO DE *Tradescantia pallida* e *Drosophila melanogaster***

MONTE CARMELO
2018



Fundação Carmelitana Mário Palmério
Faculdade de Ciências Humanas e Sociais
“Educação de Qualidade ao seu alcance”

TARCÍSIO PAIVA MENDONÇA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO LARVICIDA SPINOSAD SOBRE O
MATERIAL GENÉTICO DE *Tradescantia pallida* e *Drosophila melanogaster***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Fundação Carmelitana Mário Palmério como requisito parcial para a conclusão da disciplina de Iniciação a Pesquisa Científica II.

MONTE CARMELO
2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, que me deu forças e perseverança nos momentos de turbulência e por permitir que meus sonhos se tornassem realidade.

Agradeço minha mãe **Antônia Paula Paiva Mendonça**, heroína e guerreira, que sempre me deu apoio e incentivo nas horas difíceis, meu pai **João Bonifácio Mendonça**, pela presença e orientação, sempre me conduzindo a trilhar o caminho da honestidade e seriedade. Agradeço minha irmã **Thalita Paiva Mendonça** que muitas vezes cumpriu minhas tarefas em casa para que eu pudesse concluir minhas obrigações acadêmicas.

Ao meu orientador Msc. **Cássio Resende de Moraes** que sem o qual não seria possível a conclusão do TCC. Agradeço o suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções, incentivos e também críticas que sempre vieram a acrescentar no processo de aprendizagem.

Aos amigos em geral e em especial minha grande amiga **Andrea Pereira Ferreira da Cunha** que tanto me apoiou e ajudou, em todos os momentos difíceis, e pelos incentivos a procurar mais conhecimento e ir em busca dos meus sonhos, meu amigo **Weverson Junio da Silva** que tanto contribuiu com seu esforço e conhecimento para a ajuda na conclusão deste trabalho e minha amiga **Jéssica Davi de Aquino** outra amiga que tanto contribuiu com muito empenho e esforço, auxiliando também no término deste trabalho.

Aos professores que tanto contribuíram para minha formação e a conclusão deste trabalho. Em especial às Professoras Dra. **Cristina Soares** que tanto auxiliou em minhas pesquisas, com apoio, sempre me incentivando a buscar sempre mais, e a Dra. **Fernanda Fernandes** que sempre esteve pronta pra ajudar nos momentos de angústia e por me proporcionar o conhecimento não apenas científico, mas a manifestação do caráter e afetividade no processo de formação profissional e pessoal.

Agradeço também a **Fundação Carmelitana Mário Palmério** (FUCAMP), pelo ambiente de aprendizagem e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais** (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

AValiação ECOTOXICOLÓGICA DO LARVICIDA SPINOSAD SOBRE O MATERIAL GENÉTICO DE *Tradescantia pallida* e *Drosophila melanogaster*.

RESUMO: Spinosad é um produto químico com ação larvicida usado no controle químico de *Aedes aegypti*, obtido por processos fermentativos por *Saccharopolyspora spinosa*. Spinosad age preferencialmente nos receptores nicotínicos da acetilcolina e de maneira secundária aos receptores γ -amino-butírico, resultando em eventos neutotóxicos. Por ser um inseticida novo no mercado, poucos dados estão disponíveis sobre os efeitos genotóxicos em organismos não alvos de combate. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito mutagênico de Spinosad por meio do Teste do micronúcleo em *Tradescantia pallida* (Trad-MCN) e o Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster* (SMART). No Trad-MCN, após aclimatização (24h), *T. pallida* foram submetidas ao tratamento crônico com Spinosad nas concentrações de 0,156; 0,312; 0,625; 1,25 e 2,5 g/L de solução por 24 h. Em seguida as hastes de *T. pallida* foram submetidas a fase de recuperação. As inflorescências jovens das hastes foram colhidas e fixadas em solução Carnoy e, após 24 horas, foram conservadas em etanol 70% até o momento das análises. As anteras obtidas dos botões coletados foram maceradas sobre lâminas para microscopia, coradas com corante carmim acético e em seguida cobertas com lamínulas e analisadas em microscopia óptica. No SMART, larvas de 3º estágio, descendentes do cruzamento ST e HB, foram submetidas ao tratamento crônico (48 h) com 0,039; 0,078 e 0,156 $\mu\text{g/mL}$ de solução de Spinosad. Após metamorfose, as moscas foram fixadas em etanol e em seguida as asas foram dissecadas e montadas sobre a lâminas, e posteriormente submetidas para análise em microscopia óptica. Não foi observado efeito mutagênico em nenhuma das concentrações avaliadas no SMART. Spinosad na concentração de 0,625; 1,25 e 2,5 g/L foi capaz de incrementar alta frequência de micronúcleos em *T. pallida*. Nestas condições experimentais e em *T. pallida*, Spinosad apresentou atividade mutagênica.

PALAVRAS-CHAVE: Genotoxicidade; Pesticida; Spinosad

1. INTRODUÇÃO

Devido as características de clima tropical, no Brasil, as arbovíroses configuram -se um problema de grande interesse de saúde pública. Devido a este cenário, políticas públicas são adotadas no país visando sobretudo o extermínio de populações de *Aedes aegypti*, principal mosquito transmissor de agentes etiológicos causadores de doenças. Tais doenças incluem, dengue, febre amarela, Chikungunya e febre via zika vírus (PEREIRA et al., 2016).

As políticas adotadas para eliminação de focos (criadouros) de *A. aegypti* incluem conscientização da população, controle químico de mosquitos adultos/larvas e controle biológico, na maioria das vezes em um contexto integrado (WILLIAMS et al., 2003; PEREIRA et al., 2016).

Larvicidas são comumente empregados no controle populacional de larvas de *A. aegypti*. Neste sentido, compostos biológicos representam uma alternativa viável para o controle de larvas. Spinosad é um produto químico com ação larvicida, obtido por processos fermentativos por *Saccharopolyspora spinosa*, o qual produz metabólitos secundários denominados spinosyn. A combinação de Spinosyn A e D são usados em conjunto com ingredientes inertes (não declarados pelo fabricante) na formulação do Spinosad (WILLIAMS et al., 2003).

Spinosad age de maneira seletiva em insetos, provocando efeitos toxicológicos por contato ou ingestão, agindo preferencialmente nos receptores nicotínicos da acetilcolina e de maneira secundária aos receptores γ -amino-butírico (GABA), levando insetos na fase larval a episódios de hiperexcitação, paralisia e finalmente a morte (SNYDER et al., 2007; ORR et al., 2009; HERTLEIN et al., 2011).

Devido a sua ação seletiva, spinosad demonstrou ser seguro para vertebrados e insetos não vetoriais (MILES e DUTTON, 2000; ELZEN; MALDONADO; ROJAS, 2000). Segundo a U.S *Environmental Protection Agency* spinosad apresenta baixo risco ambiental e toxicológico.

Trabalhos pautados na toxicologia e ecotoxicologia de spinosad estão presentes na literatura (LUMARET et al., 2012; ABDU-ALLAH e PITTENDRIGH, 2017; YANG et al., 2017; MULLENS et al., 2017; NOZAD-BONAB et al., 2017). No entanto existe uma carência considerável de dados sobre avaliações voltadas para genética toxicológica, principalmente ao que diz respeito a possíveis efeitos genotóxicos, mutagênicos,

carcinogênicos e teratogênicos (YANO et al., 2002; STEBBINS et al., 2002; AKMOUTSOU et al., 2011; ACIOLE et al., 2014; PEREIRA et al., 2016).

Mesmo sendo destinado ao controle de larvas em sistema aquático, spinosad e seus metabólitos podem direta ou indiretamente entrar em contato com espécies não - alvo, as quais também podem gerar respostas adversas, por meio dos efeitos toxicológicos do ingrediente ativo e seus produtos de metabolização. Spinosad já foi descrito como causando efeitos negativos em vertebrados (ORR et al., 2009; PEREIRA et al., 2016).

A relevância em estudar mudanças citológicas, genéticas, é de grande importância, visto que as mesmas tendem a se manifestar antes que os efeitos deletérios na população ocorram, possibilitando a adoção de medidas mitigatórias (DORR et al., 2014).

A escolha de organismos modelos no rastreio da genotoxicidade de compostos isolados e substâncias complexas é fundamental no intuito de identificar a capacidade de indução de danos no DNA. Em destaque, *Tradescantia pallida* e *Drosophila melanogaster* têm sido amplamente utilizados em pesquisas de genética toxicológica, demonstrando sensibilidade a uma grande variedade de xenobióticos ambientais e sintéticos (KIM et al., 2011; SANTOS-CRUZ et al., 2012; DANESI et al., 2012; DEMIR et al., 2013; 2013; REZENDE et al., 2013; MACHADO et al., 2013; REIS et al., 2015; MORAIS et al., 2016; RODRIGUEZ, 2016; MORAIS et al., 2017; XISTO; MORGAN; FREITAS, 2017).

Em *T. pallida* um dos ensaios genéticos mais bem padronizados é o Teste do Micronúcleo (Trad-MCN) (MA et al., 1994). O Teste possibilita a identificação de danos genéticos em células em divisão, gerados por meio de eventos clastogênicos ou aneugênicos, por ação direta ou indireta de xenobióticos.

Realizado em *D. melanogaster*, o Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) é um teste baseado na análise fenotípica dos pelos (tricomas) das células das asas da mosca. Este Teste foi desenvolvido por Graf et al (1984) e posteriormente melhorado por Graf e Van Shaick (1992), e possibilita a identificação de danos genéticos pela perda de heterozigose de genes marcadores, por alterações pontuais ou aberrantes (eventos clastogênicos e/ou aneugênicos) por mutação ou recombinação. Este teste permite avaliar a toxicocinética dos xenobióticos antes e após metabolização via CYP6A2 do complexo citocromo P450 (GRAF e VAN SHAICK, 1992).

Partindo da premissa que existe poucos dados sobre os efeitos genotóxicos de Spinosad em organismos não alvos de controle, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade mutagênica de diferentes concentrações de Spinosad, por meio do

Trad-MCN e o SMART, em *T. pallida* e *D. melanogaster*, respectivamente. Avaliar os efeitos do inseticida em diferentes níveis tróficos é crucial no intuito de obter dados ecotoxicológicos, que podem outrora, serem extrapolados para outras espécies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Agentes químicos

Spinosad larvicida (CAS 131929-60-7) (**Figura 1A**) possui 1,25 g/Kg de ingrediente ativo (7,48%). O composto foi obtido pelo Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia, MG, Brasil.

Carbamato de etila – Uretano (CAS 51-79-6) (**Figura 1B**) foi obtido da empresa Fluka AG (Buchs, Switzerland).

Formaldeído (CAS 50-00-0) (**Figura 1C**) foi obtido da empresa SIGMA ALDRICH.

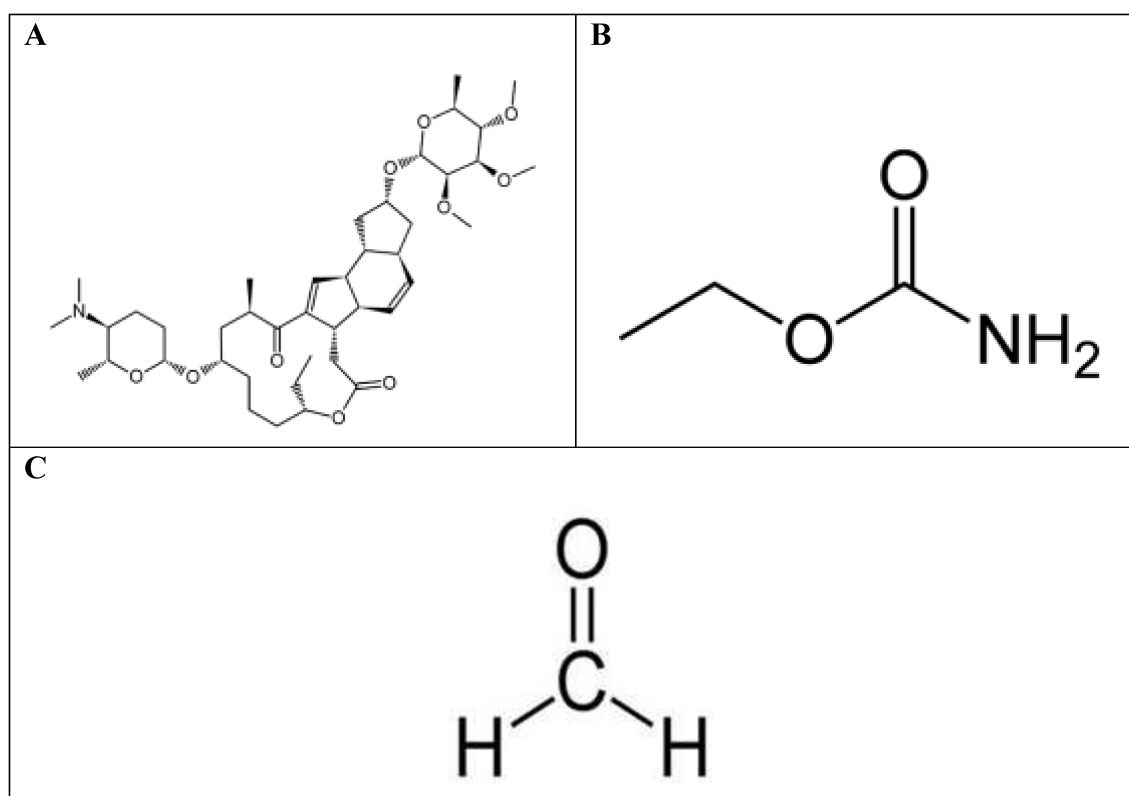


Figura 1. Estrutura química do Spinosad (A), Uretano (B) e C: Formaldeído.

2.2 Teste do Micronúcleo em *Tradescantia pallida* (Trad-MCN)

2.2.1 Material biológico

Tradescantia pallida (Rose) D.R. Hunt var. *purpurea* foram cultivadas em casa de vegetação na Universidade Federal de Uberlândia – UFU, em temperatura de 16°C noite e

26° C dia e umidade relativa de 60-80%. Fotoperíodo de 16 horas diárias de luz foi aplicado para induzir a floração.

As plantas foram cultivadas em vasos com volume de 1L, adaptados para o método de exposição. A fertilização e irrigação foram sistematicamente controladas, assim como a taxa de mutação espontânea do estoque de plantas. A taxa de mutação espontânea foi controlada pelo monitoramento mensal das plantas, onde a taxa de mutação espontânea não excedeu 2 MN para 100 tétrades avaliadas.

2.2.2 Exposição de plantas

Todas as plantas usadas no experimento foram conseguidas a partir de uma planta matriz por propagação vegetativa. A utilização de plantas clones garantiu a isogenicidade das amostras, bem como a confiabilidade dos resultados. O bioensaio foi executado conforme recomendações de MA et al (1994) com adaptações de acordo com Campos et al (2015).

Floreiras com no mínimo 15 plantas foram utilizadas no bioensaio. Hastes de 15 centímetros, com inflorescências jovens foram cortadas e submetidas à solução de Hoagland por 24 horas para aclimatização, seguido do tratamento por 24 horas.

As hastes foram expostas ao larvicida Spinosad nas concentrações de 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 e 0,156 g/L de solução. A escolha das concentrações foi baseada nas concentrações recomendadas pelo fabricante, em que o controle de *A. aegypti* é recomendado o uso de 1 pastilha em 1 a 200 L de água. Neste sentido todas as concentrações usadas são compatíveis com as indicadas pelo fabricante, sendo estas concentrações ditas como realísticas (encontradas no meio ambiente), exceto a concentração de 2,5 g/L. Esta concentração foi selecionada objetivando avaliar o uso indiscriminado do larvicida.

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

Após o período de exposição, as hastes foram transferidas para Beckers contendo água obtida por sistema de osmose reverse, onde permaneceram em etapa de recuperação por 24 h.

2.2.3 Montagem de lâminas e análise

Após aclimatização, exposição e recuperação, as inflorescências jovens das hastes foram colhidas e fixadas em solução Carnoy (3:1 de etanol e ácido acético glacial), por 24 h. Em seguida as inflorescências foram lavadas com água obtida por sistema de osmose reverse e em seguida armazenadas em etanol a 70% até o momento das análises.

As anteras obtidas dos botões coletados foram maceradas com bastão de vidro sobre lâminas para microscopia após gotejamento com o corante carmim acético. Após a maceração e limpeza (descarte dos fragmentos das anteras), as lâminas foram cobertas com lamínulas e rapidamente aquecidas a 80°C por 4s, para fixação do corante nas tétrades. A frequência de micronúcleos (MN) foi apresentada como número de MN por 100 tétrades analisadas.

Para cada concentração de Spinosad, 20 botões florais com células de grão de pólen em estado de tétrades foram empregados. Para cada concentração, 5 lâminas foram confeccionadas, dentre as quais foram avaliadas 300 tétrades quanto à presença de MN em microscópio óptico de luz sob magnificação de 400 vezes, como proposto por Ma et al (1994), totalizando 1500 células analisadas por concentração.

2.3 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*

2.3.1 Material biológico

No SMART, três linhagens de *D. melanogaster* foram usadas. A saber, linhagem *multiple wing hairs (mwh, 3-0,3)*, *flare (flr³, 3-38,9)* e ORR (Oregon resistente ao DDT - *flr³, 3-38,9)*. A descrição completa das linhagens usadas no presente trabalho foram descritas previamente por Graf et al (1984) e Graf e Van Shaik (1992).

Todas as linhagens foram mantidas em frascos contendo ¼ de meio de cultura à base de banana (1230 mL de água; 16,5 g de ágar; 234 g de banana; 37,5 g de fermento biológico e 1,5 g de nipagin em pó) em estufa incubadora para *B.O.D* (SOLAB), em ciclos luz/escuro (12h:12h) na temperatura de 25±2°C e 65% de umidade relativa.

2.3.2 Ensaio de sobrevivência

No SMART, a escolha das concentrações foram baseadas no ensaio de sobrevivência, sendo selecionado uma concentração letal e duas concentrações subletais.

Para determinação da toxicidade do larvicida Spinosad em *D. melanogaster*, 100 larvas (3º estágio) de ambos os sexos foram transferidas para *vials* contendo 1,5 g de purê de batata hidratado com 5 mL de larvicida em diferentes concentrações, onde permaneceram por 48 h.

Decorrido 48 h de exposição, bem como todo o processo de metamorfose (5±2 dias) a frequência de imagos que sobreviveram a exposição crônica foi quantificada em porcentagem e comparada ao controle negativo.

2.3.3 Cruzamentos e tratamento

No SMART foram realizados dois cruzamentos. O primeiro cruzamento (Cruzamento Padrão – ST) feito com machos da linhagem *mwh/mwh* e fêmeas virgens *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx34^e Bd^s* (GRAF *et al.* 1984; 1996). A prole gerada deste cruzamento apresenta níveis basais de expressão de genes do complexo enzimático citocromo P450 (CYP6A2), possibilitando a identificação de mutágenos diretos.

O segundo cruzamento foi feito entre machos da linhagem *mwh/mwh* e fêmeas virgens da linhagem *ORR/ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx34^e Bd^s*, conforme descrito por Graf e Van Shaik (1992). Este cruzamento é conhecido como cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), devido à alta expressão do complexo citocromo P450 (CYP6A2), sendo altamente eficiente no rastreio de pró-mutágenos.

As moscas ficaram cruzando em meio de cultura a base de banana por 24 h e posteriormente foram transferidas para meio de cultura a base de ágar (4%) e fermento biológico suplementado com sacarose, onde permaneceram por 8h. Decorridos 72 ± 4 h, larvas de 3º estágio foram coletadas com auxílio de água ultrapura MiliQ (Millipores) e peneira de malha fina.

Em seguida as larvas foram submetidas ao tratamento crônico por 48 h em vials contendo 1.5 g de purê de batatas (Yoki® Alimentos S.A) e 5 mL do larvicida Spinosad. Após metamorfose, os imagos geradas pelo cruzamento ST e HB foram coletados e fixados em etanol a 70%, até o momento das análises.

Uretano (Carbamato de etila) (URE) – foi usado como controle positivo, na concentração de 10 mM, conforme descrito na literatura (SILVA *et al.* 2006; FRAGIORGE *et al.* 2008; REZENDE *et al.* 2013; MORAIS *et al.* 2016; MORAIS *et al.* 2017). Água ultrapura foi usada como controle negativo.

2.3.4 Montagem de lâminas e análise

As asas foram removidas e montadas em lâminas de microscopia com solução de *Faure* (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato de cloral e 50 mL de água destilada). A análise foi feita em microscópio óptico de luz, com ampliação de 400X. Para cada concentração de Spinosad testada foram analisadas 40 moscas (20 machos e 20 fêmeas), totalizando 976 000 células por concentração. As frequências de manchas *mwh*, *flr*³ e gêmeas foram registradas em um diagrama padrão, expressando o tamanho das manchas, em classes.

2.4 Análise estatística

No Trad-MCN a análise de Variância (ANOVA) foi empregada para determinar a significância das concentrações de spinosad avaliadas. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. O teste de Tukey foi aplicado para realizar comparações entre as concentrações de spinosad em relação aos grupos controle.

Comparações estatísticas referentes às taxas de sobrevivência de *D. melanogaster* foram feitas por meio do teste do Chi-quadrado para razões de amostras independentes.

No SMART, para cada série tratada, 40 moscas foram analisadas. O procedimento de decisão múltipla (FREI e WÜRGLER, 1988) foi utilizado para analisar os dados, resultando em três diferentes diagnósticos: negativo, positivo ou inconclusivo. As frequências de cada tipo de mancha (simples pequenas, simples grandes e gêmeas) e o total de manchas por mosca, de cada tratamento, foram comparadas aos pares (exemplo, controle negativo contra tratamento Spinosad) de acordo com Kastenbaum e Bowman (1970), com $p = 0,05$ (FREI e WÜRGLER, 1988).

3. Resultados

3.1 Análise de Micronúcleos em *T. pallida*

No presente trabalho foi verificada relação dose dependência para a frequência de micronúcleos em *T. pallida* (**Tabela 1**). Spinosad nas concentrações de 2,5 ($5,40 \pm 1,14$), 1,25 ($5,20 \pm 0,83$) e 0,625 g/L ($5,20 \pm 1,30$) induziram alta frequência de MN, deferindo estatisticamente do controle negativo (Tukey, $p < 0,05$).

Formaldeído na concentração de 0,2 % induziu alta frequência de MN ($15,40 \pm 3,36$) em *T. pallida*, enquanto as plantas tratadas com água não apresentaram mutações acima do limite tolerável basal ($1,20 \pm 0,83$). Os resultados referentes aos controles

negativo e positivo demonstraram a fidelidade do Trad-MCN no rastreio de xenobióticos com atividade mutagênica.

Tabela 1. Frequência de micronúcleos em *Tradescantia pallida* tratadas com diferentes concentrações do larvicida Spinosad.

Tratamentos g/L	Tetrádes analisadas	Frequência de micronúcleo/100 ± SD	Diagnóstico estatístico ^a
Controle negativo	1500	1,20 ± 0,83	
Controle positivo	1500	15,40 ± 3,36	+
Spinosad			
0,156	1500	2,80 ± 1,48	-
0,312	1500	4,20 ± 2,16	-
0,625	1500	5,20 ± 1,30	+
1,25	1500	5,20 ± 0,83	+
2,5	1500	5,40 ± 1,14	+

^aDiagnóstico estatístico: + Médias estatisticamente diferentes quando comparado ao controle negativo de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$); - Médias que não diferem do controle negativo.

Controle negativo: Água obtida por sistema de osmose reversa; Controle positivo: Formoldeido (0,2%).

3.2 Toxicidade em *D. melanogaster*

Na **Figura 2** estão representados os resultados referentes a toxicidade do larvicida Spinosad em Larvas de 3º estágio de *D. melanogaster*. Os resultados revelaram que Spinosad nas concentrações de 0,156; 0,3125; 0,625 e 1,25 µg/mL apresentaram toxicidade significativa em *D. melanogaster* (cruzamento ST) ($p < 0,05$). Além destas concentrações, foi verificado toxicidade significativa nas moscas resultantes do cruzamento HB na concentração de 0,078 µg/mL.

Não foi verificado mortalidade significativa nos grupos tratados com água (controle negativo) e Uretano a 10 mM (controle positivo).

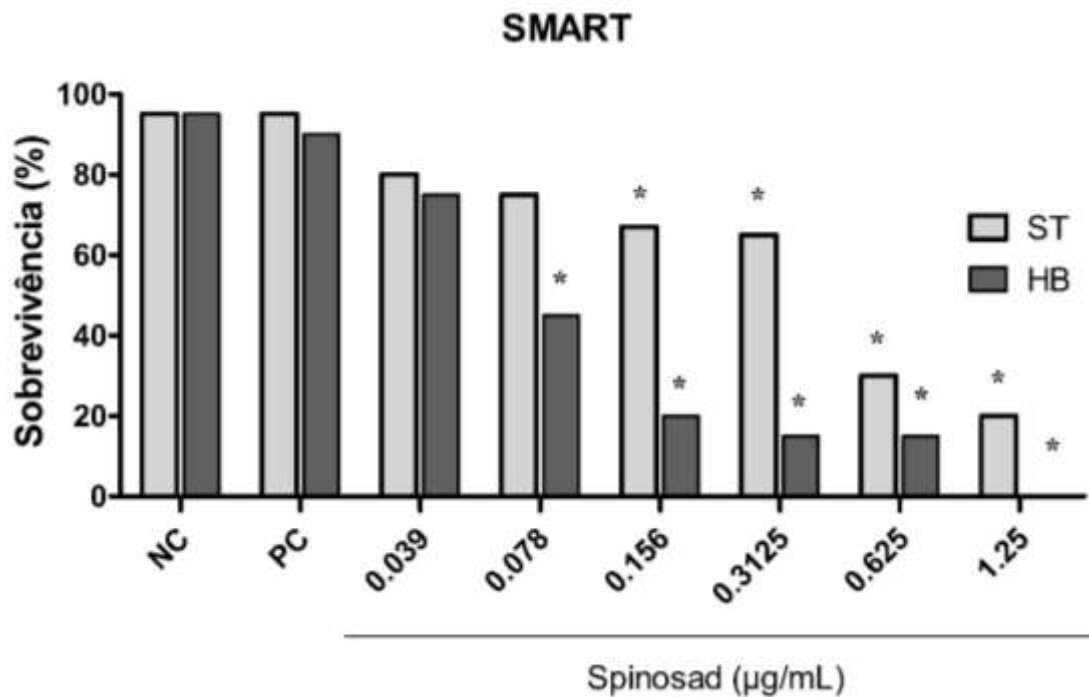


Figura 2. Taxa de sobrevivência de *D. melanogaster* descendentes do cruzamento ST e HB.

3.3 Análise de manchas mutantes em *D. melanogaster*

O resumo dos resultados referente a análise de manchas mutantes na prole gerada por meio do cruzamento ST e HB, estão apresentados na **Tabela 2**. Nenhuma das concentrações analisadas diferiram estatisticamente do controle negativo (água ultrapura) ($p > 0,05$).

Tanto no cruzamento ST quanto no cruzamento HB, Uretano na concentração de 10 mM induziu alta frequência de manchas mutantes, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) em todas as categorias analisadas (manchas simples pequenas, grandes e manchas gêmeas), exceto manchas gêmeas no cruzamento ST.

Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos por meio do Teste para detecção de Mutação e Recombinação somática (SMART) na progênie trans-heterozigoto marcado (MH) do cruzamento padrão (ST) e de bioativação metabólica (HB), após tratamento crônico de larvas com diferentes concentrações de Spinosad.

Cruzamento e tratamentos (µg/mL)	Manchas por moscas (número de manchas); diagnóstico estatístico ^a						Frequência de formação de clones/10 ⁵ células por divisão ^d	
	Número de moscas (N)	Manchas simples pequenas (1-2 células) ^b (m = 2)	Manchas simples grandes (> 2 células) ^b (m = 5)	Manchas gêmeas (m = 5)	Total de manchas (m = 2)	Manchas com clones <i>mwh</i> ^c (n)	Observado	Corrigido
ST								
<i>Controle negativo</i>	40	0,38 (15)	0,05 (02)	0,00 (00)	0,43 (17)	16	0,81	
URE	40	2,30 (92) +	0,33 (13) +	0,05 (02) i	2,68 (107) +	102	5,22	4,41
<i>Spinosad</i>								
0,039	40	0,43 (17) i	0,03 (01) i	0,00 (00) i	0,45 (18) -	18	0,92	0,11
0,078	40	0,43 (17) i	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,43 (17) -	17	0,87	0,06
0,156	40	0,33 (13) -	0,03 (01) i	0,00 (00) i	0,35 (14) -	14	0,71	-0,10
HB								
<i>Controle negativo</i>	40	0,43 (17)	0,03 (01)	0,03 (01)	0,48 (19)	19	0,97	
URE	40	13,90 (556) +	1,98 (79) +	1,08 (43) +	16,95 (678) +	655	33,55	32,53
<i>Spinosad</i>								
0,039	40	0,40 (16) -	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,40 (16) -	16	0,81	- 0,16
0,078	40	0,43 (17) -	0,03 (01) i	0,00 (00) i	0,45 (18) -	18	0,92	- 0,05
0,156	40	0,38 (15) -	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,38 (15) -	14	0,87	- 0,10

Somente moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr^s*) foram avaliadas.

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Wurgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m: fator de multiplicação com nível de significância de $\alpha = \beta = 0,05$.

^b Incluindo manchas simples *flr^s*.

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

^d Frequência de formação de clones mutantes: clones/moscas/48,800 células (sem correção).

4. Discussão

Spinosad é um larvicida biológico obtido por processos fermentativos por *S. spinosa*. Este composto é formado pela combinação de metabólitos secundários do tipo Spinosyn A e D (Williams et al. 2003), agindo nos receptores nicotínicos da acetilcolina e aos receptores amino-butírico (GABA) de insetos pragas (ORR et al., 2009; HERTLEIN et al., 2011). No Brasil, a principal utilização do composto recorre ao controle químico de *A. aegypti* na fase larval, reduzindo o número de fêmeas transmissoras de doenças (KONENDAN et al., 2012). Mesmo apresentando benefícios no controle de viroses fatais, Spinosad já foi relacionado a diferentes eventos ecotoxicológicos (JONE e OTTEA, 2013; PEREIRA et al., 2016; TOLEDO et al., 2018).

No presente trabalho, o potencial mutagênico de diferentes concentrações de Spinosad foi avaliado pelo SMART em *D. melanogaster* e o Trad-MCN em *T. pallida*. Os resultados observados no Trad-MCN evidenciaram que concentrações realísticas de Spinosad (concentrações encontradas no meio ambiente), podem causar danos ao material genético, quer seja por eventos clastogênicos ou aneugênicos (**Tabela 1**).

Os resultados de mutagenicidade do SMART não são concordantes com o Trad-MCN, visto que não foi observado diferenças estatisticamente significativas nas frequências de manchas mutantes em moscas trans-heterozigotas marcadas descendentes do cruzamento ST ou HB. A diferença nos resultados, podem ser justificados por dois motivos:

(1) As concentrações utilizadas no SMART, podem ter desencadeado eventos citotóxicos em *D. melanogaster*. Está hipótese é sustentada pela curva de sobrevivência (**Figura 2**) sendo evidente a redução da taxa de sobrevivência em moscas expostas as concentrações de 0,156; 0,078 e 0,039 µg/mL (ST e HB). Vale destacar, que após metabolização via CYP6A2, os metabólitos do Spinosad passam a apresentar natureza mais tóxica.

Além disso, na **Tabela 2**, a frequência de formação de clones células/10⁵ por divisão, do controle corrigido evidenciam que a frequência de manchas mutantes dos grupos tratados com Spinosad estão abaixo do limite tolerável basal (<0,81). Eventos citotóxicos poderiam estar interferindo com a identificação de manchas mutantes, já que as células ao morrer não permitem a visualização dos pelos mutantes em nível de fenótipo.

(2) Os eventos mutagênicos observados no Trad-MCN sugerem que este teste apresenta maior sensibilidade aos efeitos genotóxicos do Spinosad quando comparado ao

SMART. Danos genéticos do tipo MN se instalam devido a alterações clastogênicas ou aneugênicas não específicas. Os MN formados, segundo Fenech (2000) são fragmentos cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros que desprendem do núcleo principal representado alterações citogenéticas mais aberrantes. O SMART identifica mutações específicas em marcadores genéticos localizados no cromossomo 3 (*mwh* e *flr³*) da *D. melanogaster*. Neste sentido, o SMART fica restrito a identificação de mutações que ocorrem nestes marcadores, não sendo, portanto, suficientes para identificar qualquer outro tipo de alteração em outros cromossomos.

Embora não tenha sido avaliado diretamente o mecanismo pela qual Spinosad causa danos no DNA de *T. pallida*, os autores sugerem que a chave para alteração do material genético está envolvida com o aumento do estresse oxidativo, via liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Vários inseticidas estão relacionados com a geração significativa de ERO (WANG et al., 2016; HUNG et al., 2016; LIU et al., 2017; WANG et al., 2018), incluindo o Spinosad (PINER e UNER, 2013).

Poucos dados estão disponíveis na literatura sobre os efeitos mutagênicos/genotóxicos de Spinosad (AKMOUTSOU, 2011; ACIOLE 2014; PEREIRA et al., 2016). Os resultados do nosso trabalho demonstram concordância com o trabalho de Akmoutsou et al (2011). Estes autores avaliaram o efeito de Spinosad e Deltametrina sobre a toxicidade e instabilidade genética de *Bactrocera oleae* e *D. melanogaster*. Spinosad demonstrou ser mais tóxico em *D. melanogaster* quando comparado ao Deltametrina e a toxicidade foi mais evidente quando a exposição foi feita em larvas de terceiro estágio em relação a toxicidade em imagos. Em larvas a CL₅₀ foi de 0,130 mg/L⁻¹. Em nenhuma das concentrações avaliadas foi observado efeito mutagênico em *D. melanogaster* por meio do SMART (cruzamento ST).

Pereira et al (2016) avaliaram o efeito de doses subletais de Spinosad sobre o material genético de *Poecilia reticulata* e *Xiphophorus maculatus*. Os peixes foram expostos a concentrações subletais (6,3; 12,6; 25,3; 50,5; 101 e 202 mg/L⁻¹) de spinosad por 14 dias e os eritrócitos foram analisados quanto a frequência de MN e anomalias nucleares. Não foi verificado aumento na frequência de danos genéticos em nenhuma das concentrações avaliadas e em nenhum dos organismos testes.

Embora estes trabalhos tem demonstrado experimentalmente a ausência de efeitos mutagênicos de Spinosad, Aciole e colaboradores identificam danos no DNA de moscas (*D. melanogaster*) tratadas com diferentes concentrações do larvicida. Nesse estudo, foi

observado aumento na frequência de manchas mutantes nas concentrações de 0,32 e 1,6 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, sendo os danos gerados preferencialmente por mecanismo de recombinação homóloga (85,71%) (ACIOLE et al., 2014). Vale mencionar que os autores verificaram a toxicocinética de Spinosad sobre o material genético de *D. melanogaster* apenas em condições de níveis basais de expressão de CYP6A2 (cruzamento ST).

Nossos resultados diferem dos de Aciole et al (2014) visto que no presente trabalho não foi evidenciado efeito mutagênico em *D. melanogaster* descendentes do cruzamento ST. Além disso, Spinosad demonstrou ser mais tóxico quando comparado aos resultados de Aciole et al (2014).

Efeitos ecotoxicológicos já foram observados em insetos aquáticos (Jones e Ottea, 2013) e terrestres não alvos de combate (LAWER e DRITZ, 2013; ABDU-ALLAH e PITTENDRIGH, 2018) expostos ao larvicida Spinosad. Além disso, Spinosad já foi relacionado com diversos eventos toxicológicos em peixes (PINER e UNER, 2012, 2013, 2014; PEREIRA et al., 2016; TOLEDO et al., 2018)

Em peixes, spinosad é capaz de induzir o aumento de ERO e conseqüentemente ativação de morte celular por apoptose (PINER e UNER, 2013; 2014). Além disso, Spinosad é capaz de inibir a atividade da acetilcolinesterase, aumentando o tempo de abertura dos canais de sódio dependentes de ligantes (PINER e UNER, 2012). Efeitos de doses subletais do larvicida (25,3; 50,5; 101 e 202 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) já foram avaliados por meio de marcadores comportamentais, e os resultados revelaram nado errático, perda de equilíbrio e letargia em peixes expostos durante 96 h (PEREIRA et al., 2016).

Mesmo apresentando relevantes dados na literatura, a quantidade de trabalhos voltados para a ecotoxicologia permanecem escassos sobre os efeitos de Spinosad, principalmente em vertebrados. Dados de resistência desenvolvida por espécies alvos de combate já foram documentadas (AHAMAD e IQBAL ARIF, 2009; AFZAL et al., 2015), levando em muitos casos a adoção de doses cada vez mais concentradas para eliminação de insetos pragas, expondo cada vez mais os organismos em diferentes níveis tróficos.

Finalmente os autores destacam para a necessidade de mais pesquisas conduzidas com o Spinosad, principalmente os efeitos proporcionados pelo larvicida a nível molecular, visando a obtenção de mais dados toxicológicos, sendo estes fundamentais para mensurar o real perigo do uso indiscriminado do larvicida no meio ambiente.

5. Conclusão

Os resultados apresentados permitem concluir, que nestas condições experimentais e nas concentrações de 0,626; 1,25 e 2,5 µg/mL Spinosad apresenta efeito mutagênico em *T. pallida*. Além disso, *T. pallida* demonstrou ser um potente organismo modelo no rastreio de xenobióticos com atividade genotóxica.

6. Referências

ABDU-ALLAH, G. A. M; PITTENDRIGH, B. R. Lethal and sub-lethal effects of select macrocyclic lactones insecticides on forager worker honey bees under laboratory experimental conditions. *Ecotoxicology*, In Press, 2017.

ACIOLE, E. H; GUIMARAES, N. N; SILVA, A. S; AMORIM, E. M; NUNOMURA, S. M; GARCIA, A. C; CUNHA, K. S; ROHDE, C. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Pest Management Science*, v. 70, n. 4, p. 559-565, 2014.

AHMAD, M.; IQBAL ARIF, M. Resistance of Pakistani field populations of spotted bollworm *Earias vittella* (Lepidoptera: Noctuidae) to pyrethroid, organophosphorus and new chemical insecticides. *Pest Manag Sci.* v. 65, n. 4, p. 433-439, 2009.

AKMOUTSOU, P; MADEMTZOGLOU, D; NAKOU, I; ONOUFRIADIS, A.; PAPADOPOULOU, X; KOUNATIDIS, I; FRANTZIOS, G; PAPADAKIS, G; VASILADIS, K; PAPADOPOULOS, N. T; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Evaluation of toxicity and genotoxic effects of spinosad and deltamethrin in *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae*. *Pest Management Science*, v. 67, n. 12, p. 1534-1540, 2011.

AFZAL, M. B.; SHAD, S. A.; ABBAS, N. Genetics, realized heritability and preliminary mechanism of spinosad resistance in *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Homoptera: Pseudococcidae): an invasive pest from Pakistan. *Genetica*. V. 143, n. 6, p. 741-749, 2015.

CAMPOS, C. F.; PEREIRA, B. B.; CAMPOS-JUNIOR, E. O.; SOUSA, E. F.; SOUTO, H. N.; MORELLI, S. Genotoxic evaluation of the River Paranaíba hydrographic basin in Monte Carmelo, MG, Brazil, by the *Tradescantia micronucleus*. *Genet Mol Biol*. V. 38, n.4, p. 507-512, 2015.

DORR, F; GUARATINI, T; CARDOZO, K.H.M; PAVANELLI, D.D; COLEPICCOLO, P; PINTO, E. *Ecotoxicologia*. In: OGA, S; CAMARGO, M.M.A; BATISTURZZO, J.A.D (Eds), *Fundamentos de Toxicologia*. Atheneu, São Paulo, pp. 135-147, 2014.

ELZEN, G.W; MALDONADO, S.N; ROJAS, M.G. Lethal and sub-lethal effects of selected insecticides and an insect growth regulator on the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) ectoparasitoid *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal Economic of Entomology*, v. 93, p. 300-303, 2000.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, 455, 81-95, 2000.

FRAGIORGE, E.J.; REZENDE, A.A.A.; GRAF, U.; SPANÓ, M.A. Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 393-401, 2008.

FREI, H.; WURGLERWÜGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research*, v. 203, p. 297-308, 1988.

GRAF, U., WURGLER, F. E; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G . Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, v. 6, p. 153-188, 1984.

GRAF, U., SCHAIK, N.V. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, v. 271, n.1, p. 59-67, 1992.

GRAF, U.; SPANÓ, M.A.; GUZMÁN, J. R.; ABRAHAM, S. K.; ANDRADE, H. H. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixture as well as for studies of antigenotoxicity. *African Newsletter on Occupational Health and Safety*, v. 6, n.1, p. 9-13, 1996.

HERTLEIN, M.B; GARY, T.D; BHADRIRAJU, S; CHRISTOS, A.G. Spinosad: A new natural product for stored grain protection. *Journal Stored Products Research*, v. 47, n.3, p. 131-146, 2011.

HUNG, J.H; CHEN, C.Y; OMAR, H.A; HUANG, K.Y; TSAO, C.C; CHIU, C.C; CHEN, Y.L; CHEN, P.H; TENG, Y.N. Reactive oxygen species mediate Terbufos-induced apoptosis in mouse testicular cell lines via the modulation of cell cycle and pro-apoptotic proteins. *Environ. Toxicol. V. 331*, n.12, p. 1888-1898, 2016.

JIANG, Y.; MULLA, M. S. Laboratory and field evaluation of spinosad, a biorational natural product, against larvae of *Culex* mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* v. 25, n. 4, p. 456-466, 2009.

KASTENBAUM, M.A.; BOWMAN, K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*, v. 9, p. 527-549, 1970.

KIM, S. I., J.W. JUNG, J.W.; AHN, Y.J.; RESTIFO, L.L.; KWON, H.W. *Drosophila* as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v.14, n.1, p. 509-517, 2011.

KOVENDAN, K.; MURUGAN, K.; NARESH KUMAR, A.; VINCENT, S.; HWANG, J. S. Bioefficacy of larvicidal and pupicidal properties of *Carica papaya* (Caricaceae) leaf extract and bacterial insecticide, spinosad, against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* V. 110, n. 2, p. 669-678, 2012.

JIRJIS, F. Flochlay-Sigognault, A. Comparative in vitro evaluation of contact activity of fluralaner, spinosad, phoxim, propoxur, permethrin and deltamethrin against the northern fowl mite, *Ornithonyssus sylviarum*. *Parasit Vectors*, v. 10, n. 1, p. 2017.

JONES, O. M.; OTTEA, J. The effects of spinosad on *Culex quinquefasciatus* and three nontarget insect species. *J Am Mosq Control Assoc.* v. 29, n. 4, p. 346-351, 2013.

LAWLER, S. P.; DRITZ, D. A. Efficacy of spinosad in control of larval *Culex tarsalis* and chironomid midges, and its nontarget effects. *J Am Mosq Control Assoc.* v. 29, n. 4, p.352-357, 2013.

LIU, T; WANG, X; YOU, X; CHEN, D; LI, Y; WANG, F. Oxidative stress and gene expression of earthworm (*Eisenia fetida*) to clothianidin. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* V. 142, p. 489-496, 2017.

LUMARET, J.P., ERROUSSINI, F., FLOATE, K., ROMBKE, J., WARDHAUGH, K. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Curr Pharm Biotechnology*, v. 13, n. 6, p. 1004-1060, 2012.

MA, T. H., CABRERA, G. L., CHEN, R., GILL, B. S., SANDHU, S. S., VANDENBERG, A. L., ALAMONE, M. F. 1994. *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mutat. Res.* 310: 221–230.

MILES, M; DUTTON, R. Spinosad - a naturally derived insect control agent with potential for use in integrated pest management systems in greenhouses The BCPC Conference: Pests and diseases Vol 1 Proceedings of International Conference held at the Brighton Hilton Metropole Hotel, Brighton, UK, 13-16 November, p. 339-344, 2000.

MORAIS, C.R.; BONETTI, A.N.; CARVALHO, S.M.; REZENDE, A.A.A; ARAUJO, G.R.; SPANÓ, M.A. Assessment of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of Fipronil insectide in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, v. 165, p. 342-351, 2016.

MORAIS, C.R; CARVALHO, S.M; NAVES, M.P.C; ARAUJO, G; REZENDE, A.A.A; BONETTI, A.M; SPANÓ, M.A. Mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of thiametoxam insecticide and formulated product in Somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *Chemosphere*, v. 187, n.1, p. 163-172, 2017.

NOZAD-BONAB, Z; HEJAZI, M. J; IRANIPOUR, S; ARZANLOU, M. Lethal and Sublethal Effects of Some Chemical and Biological Insecticides on *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Eggs and Neonates. *Journal Economic and Entomolpgy*, v. 110, n. 3, p. 1138- 1144, 2017.

ORR, N; ANDREW S.J; RICHEY, K; CROUSE, G.D. Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 95, n.1, p. 1-5, 2009.

ORR, N; SHAFFNER, A. J; RICHEY, K; CROUSE, G. D. Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 95, n.1, p. 1–5, 2009.

Organization for Economic Cooperation and Development. 1997. Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems. Test number 203: Acute toxicity for fish. Paris, France: OECD.

PEREIRA, B.B; CAIXETA, E.S; FREITAS, P.C; SANTOS, V.S.V; LIMONGI, J.E; CAMPOS JÚNIOR, E.O; CAMPOS, C.F; SOUTO, H.N., RODRIGUES, T.S; MORELLI, S. Toxicological assessment of spinosad: Implications for integrated control of *Aedes aegypti* using larvicides and larvivorous fish. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 79, n. 12, p. 477-481, 2016.

PINER, P.; UNER, N. Oxidative stress and apoptosis was induced by bio-insecticide spinosad in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Environ Toxicol Pharmacol*. V. 36, n.3, p. 956-963, 2013.

PINER, P.; UNER, N. Organic insecticide spinosad causes in vivo oxidative effects in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environ Toxicol*. V. 29, n. 3, p. 253-260, 2014.

PINER, P.; UNER, N. In vivo acetylcholinesterase inhibition in the tissues of spinosad exposed *Oreochromis niloticus*. *Environ Toxicol Pharmacol*. V. 34, n. 2, p. 473-477, 2012.

REZENDE, A.A.A.; MUNARI, C.C.; DE OLIVEIRA, P.F.; FERREIRA, N.H.; TAVARES, D.C.; ANDRADE E SILVA, M.L.; REZENDE, K.C.S.; SPANÓ, M.A. A comparative study of the modulatory effects of (-)-cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. *Food and Chemical Toxicology*, v. 55, p. 645-652, 2013.

RODRIGUEZ, Y. A. (2016). POTENCIAL TÓXICO E GENOTÓXICO DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO EM ORGANISMOS NÃO ALVOS. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Instituto de biociências Rio Claro, Biologia Celular e Molecular, Rio Claro. Acesso em 06 de Maio de 2018, disponível em https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=POTENCIAL+T%3%93XICO+E+GENOT%3%93XICO+DO+INSETICIDA+IMIDACLOPRIDO+EM+ORGANISMOS+N%3%83O+ALVOS&btnG=

SILVA, L. P.; COSTA-CRUZ, J. M.; SPANO, M. A.; GRAF, U. Genotoxicity of vesicular fluid and saline extract of *Taenia solium* metacestodes in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 47, p. 247-253, 2006.

SNYDER, D.E; MEYER, J; ZIMMERMANN, A.G; QIAO, M; GISSENDANNER, S.J; CRUTHERS, L.R; SLONE, R.L; YOUNG, D.R. *Preliminary Studies on the effectiveness of the novel pulicide, spinosad, for the treatment and control of fleas on dogs*. *Veterinary Parasitology*, v.150, n.4, p. 345–351, 2007.

TOLEDO-IBARRA, G. A; RODRIGUEZ-SANCHEZ, E. J.; VENTURA-RAMON, H.G.; DIAZ-RESENDIZ, K. J. G.; GIRON-PEREZ, M. I. Cholinergic alterations by exposure to pesticides used in control vector: Guppies fish (*Poecilia reticulata*) as biological model. *Int J Environ Health Res*. V. 28, n. 1, p. 79-89, 2018.

WILLIAMS, T; VALLE, J; VIÑUELA, E. Is the naturally derived insecticide Spinosad® compatible with insect natural enemies? *Biocontrol Science and Technology*, v. 13, n. 1, p. 459-475, 2003.

XISTO, Luana Aparecida DUARTE; MORGAN, Nicolle MARTINS TEBET; FREITAS, Nobel PENTEADO DE. UTILIZAÇÃO DA ESPÉCIE *Tradescantia pallida* cv. *purpurea* COMO BIOINDICADORA DA QUALIDADE DO AR, ATRAVÉS DE BIOENSAIO DE MICRONÚCLEO. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 15, n. 2, p. 812-821, ago./dez. 2017.

YANG, Y; WANG, C; XU, H; LU, Z. Sublethal effects of four insecticides on folding and spinning behavior in the rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee)(Lepidoptera:Pyralidae). *Pest Management Science*, 2017.

YANO, B.L; BOND, D.M; NOVILLA, M.N; McFADDEN, L.G; REASOR, M.J. Spinosad insecticide: subchronic and chronic toxicity and lack of carcinogenicity in Fischer 344 rats. *Toxicology Science*, v. 65, n.2, p. 288-298, 2002.

WANG, X; ANADON, A; WU, Q; QIAO, F; ARES, I; MARTINEZ-LARRANAGA, M.R; YUAN, Z; MARTINEZ, M.A. Mechanism of neonicotinoid toxicity: Impact on oxidative stress and metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* V. 58, p. 471-507, 2018.

WANG, X; MARTINEZ, M.A; DAI, M; CHEN, D; ARES, I; ROMERO, A; CASTELLANO, V; MARTINEZ, M; RODRIGUEZ, J.L; MARTINEZ-LARRANAGA, M.R; ANADON, A; YUAN, Z. Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. *Environ. Res.* V. 149, p. 86-104, 2016.