

AValiação DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO INSETICIDA FIPRONIL, POR MEIO DO TESTE DO MICRONÚCLEO EM *Tradescantia pallida*

ASSESSMENT OF MUTAGENIC POTENTIAL OF THE INSECTICIDE FIPRONIL, BY MEANS OF THE MICRONUCLEUS TEST IN *Tradescantia pallida*

Patrícia Cristina Almeida Sousa¹
Cássio Resende de Moraes²

RESUMO: Fipronil (FP) é um inseticida neurotóxico com mecanismo formicida e cupinicida do grupo fenilpirazol. FP antagoniza os receptores GABA associados ao canal de cloro, danificando e/ou bloqueando os íons de Cl⁻, impedindo o influxo na via celular, anulando o efeito neuroregulador dos receptores, levando o inseto a hiperexcitação, paralisia severa e morte. Partindo da premissa que inseticidas podem estar associados a eventos mutagênicos e carcinogênicos, e pelo fato de FP ser comumente empregado no controle de pragas no Brasil, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar a capacidade mutagênica de FP por meio do Teste do micronúcleo em *Tradescantia pallida* (Trad-MCN). Após aclimatização (24h) em solução de Hoagland, *T. pallida* foram submetidas ao tratamento crônico com FP nas concentrações de 0,16; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 and 0,025g/L de solução por 24 h. Em seguida as hastes de *T. pallida* foram submetidas a solução de Hoagland para 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. FP nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,8 e 0,16 g/L diferiram estatisticamente do controle negativo, evidenciando por tanto, efeito genotóxico em *T. pallida*. Nas condições experimentais testadas e em *T. pallida*, FP apresentou atividade mutagênica nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,8 e 0,16 g/L. Mais estudos precisam ser feitos, objetivando a obtenção de mais dados sobre a toxicocinética do inseticida FP.

Palavras-chave: Genotoxicidade; Pesticida; Fenilpirazol.

-
1. Licenciada em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Mário Palmério - UNIFUCAMP
 2. Licenciado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Mário Palmério – UNIFUCAMP. Especialista e Biotecnologia Ambiental pelo Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. Especialista em Toxicologia e Bioquímica pela Faculdade Metropolitana do Estado de São Paulo – FAMEESP. Especialista em Biologia Celular e Molecular pelo Centro Universitário FAVENI - UNIFAVENI. Mestre e Doutor em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia – UFU. Docente e Pesquisador pelo UNIFUCAMP. cassio.1015@hotmail.com)

ABSTRACT: Fipronil (FP) is a neurotoxic insecticide with an ant and termiticide mechanism from the phenylpyrazole group. FP antagonizes GABA receptors associated with the chloride channel, damaging and/or blocking Cl⁻ ions, preventing their influx into the cellular pathway, nullifying the neuroregulatory effect of the receptors, leading to hyperexcitation, severe paralysis, and insect death. Based on the premise that insecticides may be associated with mutagenic and carcinogenic events, and because FP is commonly used in pest control in Brazil, this study aimed to evaluate the mutagenic capacity of FP through the micronucleus test in *Tradescantia pallida* (Trad-MCN). After acclimatization (24 h) in Hoagland's solution, *T. pallida* were subjected to chronic treatment with FP at concentrations of 0.16; 0.8; 0.4; 0.2; 0.1; 0.05 and 0.025g/L of solution for 24 h. Then, the stems of *T. pallida* were subjected to Hoagland's solution for recovery. Young inflorescences from stems were harvested and fixed in Carnoy's solution. After 24 hours, they were preserved in 70% ethanol until analysis. The anthers obtained from the collected buds were macerated on microscope slides, stained with acetic carmine dye, and then covered with coverslips for analysis under light microscopy. FP at concentrations of 0.2, 0.4, 0.8 and 0.16 g/L differed statistically from the negative control, thus evidencing a genotoxic effect on *T. pallida*. Under the experimental conditions tested and in *T. pallida*, FP showed mutagenic activity at concentrations of 0.2, 0.4, 0.8 and 0.16 g/L. Further studies are needed to obtain more data on the toxicokinetics of the insecticide FP.

Keywords: Genotoxicity; Pesticide; Phenylpyrazole

1. INTRODUÇÃO

Pesticidas são substâncias comumente utilizadas no campo, que objetivam matar ou repelir pragas. Dependendo da característica físico-química, dose administrada e persistência no meio, podem inferir impacto ambiental nos diferentes compartimentos do ecossistema (solo, água e ar), prejudicando as espécies nativas não-alvo de combate (Tsutsui; Maizumi; Barret, 1984).

Pesticidas foram desenvolvidos visando atuar em um cenário onde o controle eficiente de pragas é fundamental para garantir a demanda de alimento necessária para abastecer a população global (Moraes et al., 2017). Embora exista outros métodos alternativos para o controle de pragas no campo, a agricultura ainda continua dependente do controle químico (Ecobichon, 2000).

Desde a introdução no mercado, pesticidas tornaram se em um curto espaço de tempo, uma das tecnologias químicas mais recorrentes por parte dos agricultores. No entanto, os efeitos nocivos adversos desencadeados por inseticidas neurotóxicos tradicionais (organofosforados, organoclorados, piretróides e carbamatos) têm levantado polêmica no

meio científico em relação ao aspecto benefício x impacto toxicológico e ambiental (Moraes et al., 2016).

Segundo Çelik e colaboradores (2014), pesticidas precisam apresentar segurança alimentar, ocupacional e ambiental, apresentando por tanto, toxicidade seletiva, bem como, baixa persistência no meio, com ausência de capacidade de biomagnificação nos diferentes níveis tróficos.

Há muito se sabe que a exposição crônica, mesmo que em pequenas doses, pode gerar diversos efeitos negativos a nível molecular (citotoxicidade, disfunção nas vias bioquímicas e danos genéticos) e comportamental (Çelik *et al.*, 2014), havendo por tanto a necessidade de avaliar o risco de exposição a pesticidas pelas diferentes rotas de exposição e em diferentes organismos modelos (Houk, 1992).

Fipronil (5 - amino - 1 - [2,6 - dichloro - 4 - (trifluoromethyl) phenyl] - 4 - [(trifluoromethyl) sulfinyl] - 1H - pyrazole) (FP) é um inseticida, formicida e cupinicida do grupo fenilpirazol. Classificado como pesticida de segunda geração, FP foi descoberto por Rhone-Poulenc Agro em 1987, introduzido comercialmente em 1993 e registrado nos Estados Unidos em 1996 (Aajoud; Ravanel; Tissut, 2003).

FP apresenta atividade neurotóxica, interferindo com a hiperpolarização normal do neurônio ao se ligar aos receptores GABA do canal de cloro, agindo ao danificar e/ou bloqueando os íons de Cl⁻, impedindo o influxo na via celular (Connelly, 2001; Aajoud; Ravanel; Tissut, 2003; Stenersent, 2004). Ao anular o efeito neuroregulador dos receptores, o impulso nervoso é comprometido, resultando em uma atividade neural excessiva (Cole *et al.*, 1993), quebrando a homeostase neural do inseto, levando a episódios de hiperexcitação, paralisia severa e morte (Bobé *et al.*, 1998; Gunasekara e Troung, 2007).

No Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), FP é considerado altamente tóxico ao meio ambiente, sendo classificado, de acordo com os parâmetros toxicológicos, como pertencente à classe II. Em função da sua toxicidade, bem como a sua ampla utilização no campo, vários trabalhos têm demonstrado efeitos danosos em organismos não-alvo, como abelhas (El Hassani *et al.*, 2005; Le Faouder *et al.*, 2007; Lourenço *et al.*, 2012), peixes, aves e mamíferos (Ohi *et al.*, 2004; Stehr *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2006; Leghait *et al.*, 2009). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency* - EPA) FP é classificado como um possível carcinógeno (EPA, 2011).

Os efeitos adversos proporcionados por pesticidas na saúde humana são difíceis de serem mensurados, visto que em muitos casos não são rapidamente manifestados clinicamente. Informações sobre a toxicidade, fornecidos pela ANVISA e a determinação da dose diária admissível (IDA) são insuficientes para estimar o risco, uma vez que muitos pesticidas podem alterar direta ou indiretamente biomoléculas, resultando em danos genotóxicos e/ou mutagênicos (Bolognesi, 2003; 2014). Além disso, já foi demonstrado na literatura que os ingredientes inertes presentes na formulação do produto comercial, podem potencializar o efeito tóxico e mutagênico do ingrediente ativo (Moraes et al., 2017), subestimando a IDA, padrão de segurança alimentar adotado no país.

Muitas pesquisadas pautadas na toxicologia e ecotoxicologia, já relacionaram pesticidas com doenças associadas a instabilidade genética (câncer) e outras doenças crônicas (Bolognesi, 2003; Vidau *et al.*, 2009; Bhalli *et al.*, 2009; Bolognesi; Moretto, 2014).

Na literatura, existe um acervo considerável de trabalhos sobre a mutagenicidade proporcionada por inseticidas, mas poucos dados estão disponíveis sobre os efeitos genotóxicos e mutagênicos do inseticida FP (Guisi NDE *et al.*, 2011; Çelik *et al.*, 2014; Moraes et al., 2016), o que aponta para a necessidade de mais estudos direcionados à avaliação da molécula.

Dentre os diferentes organismos modelos usados no rastreio da genotoxicidade de diferentes xenobióticos, destaca-se a *Tradescantia pallida*, uma planta pertencente à família Commelinaceae, de origem mexicana, de aspecto herbáceo e com caule suculento. A planta tem em média 15 a 25 cm de altura, apresentando folhas e flores roxas, sendo as flores menores e mais claras que as folhas (Biasibetti; Rosin; Houssani, 2014). *T. pallida* é sensível a xenobióticos e é utilizado para identificar danos genéticos de diferentes substâncias (Xisto; Morgan; Freitas, 2017), incluindo inseticidas (Rodriguez, 2016), por meio do Teste do Micronúcleo (TMN).

O TMN em *Tradescantia*, possibilita a identificação de mutágenos que agem direta ou indiretamente no material genético causando danos exclusivamente clastogênico e/ou aneugênico. No intuito de contribuir com dados baseados na genética toxicológica, o presente trabalho tem como objetivo, avaliar o efeito mutagênico do inseticida FP, por meio do Teste do Micronúcleo em *Tradescantia pallida*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Agentes químicos

Fipronil Regent® 800 WG (CAS 120068-37-3) foi obtido da empresa BASF S.A, São Paulo, Brasil. A **Figura 1 (A)** ilustra a estrutura química do Fipronil Regent® 800 WG, que contém na sua formulação 80% de princípio ativo e 20% de ingredientes inertes.

Formaldeído (CAS 50-00-0) foi obtido da empresa SIGMA ALDRICH. A **Figura 1 (B)** apresenta a estrutura química da molécula.

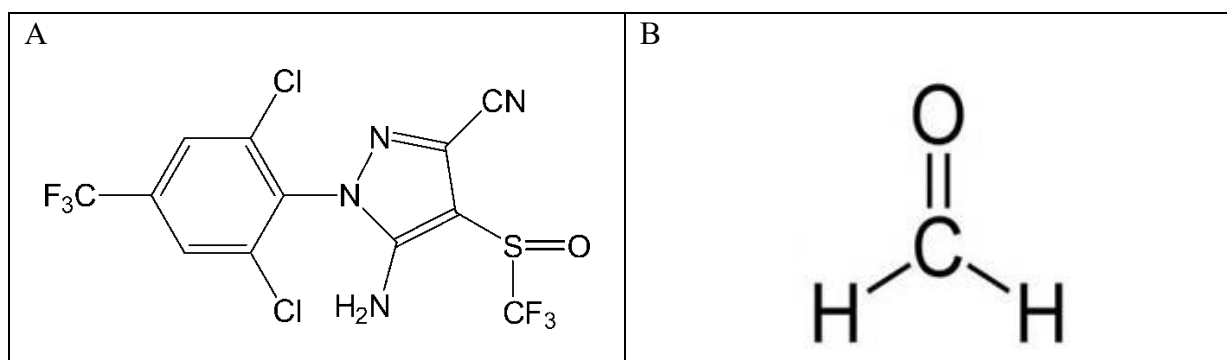


Figura 1. Estrutura química dos compostos. A. Fipronil; B: Formaldeído.

2.2 Material biológico

Tradescantia pallida (Rose) D.R. Hunt var. *purpurea* foram cultivadas em casa de vegetação do Centro Universitário Mário Palmério, em temperatura de 16°C noite e 26° C dia e umidade relativa de 60-80%.

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 por avaliação mensal do controle negativo, assegurando que a frequência de micronúcleos estivesse abaixo de 2 MN para 100 tétrades avaliadas. A temperatura foi mensurada, pois abaixo de 11 °C, a frequência de mutação espontânea e formação de micronúcleos pode aumentar 100 vezes.

2.3 Exposição de plantas

A produção de mudas a partir de uma mesma matriz garantiu a isogenicidade das amostras. O bioensaio foi executado conforme recomendações de Ma e colaboradores (1994) com modificações.

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

(Hoagland; Arnon, 1950) por 24 horas para aclimatização, seguido do tratamento por 24 horas.

As hastes foram expostas ao inseticida FP nas concentrações de 0,16; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,025 g/L. A escolha das concentrações foi baseada nas concentrações recomendadas pelo fabricante, onde para o tratamento de cana-de-açúcar é recomendado o uso de 250 a 500 g em 300L de calda/ha. Sendo assim, todas as concentrações avaliadas são menos concentradas quando comparada àquela indicada pelo fabricante. A exposição foi feita por 24 h.

Formaldeído 0,2% foi utilizado como controle positivo. Como controle negativo foram empregados tratamentos em água obtida por sistema de osmose reversa.

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

2.4 Teste do Micronúcleo

Cumpridas as etapas de aclimatização, tratamento e recuperação, as inflorescências jovens das hastes foram colhidas e fixadas em solução Carnoy (3:1 de etanol e ácido acético glacial). As amostras foram conduzidas para o Laboratório de Citologia e Microbiologia Centro Universitário Mário Palmério – UNIFUCAMP, e foram conservadas em etanol 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 para fixação do corante nas tétrades. A frequência de micronúcleos foi apresentada como número de micronúcleos por 100 tétrades analisadas.

Para cada concentração de FP, 20 botões florais com células de grão de pólen em estado de tétrades foram empregados. Para cada concentração, 10 lâminas foram confeccionadas, dentre as quais foram avaliadas 300 tétrades quanto à presença de micronúcleos em microscópio óptico de luz sob magnificação de 400 vezes, como proposto por Ma e colaboradores (1994).

2.5 Análise estatística

Análise de Variância (ANOVA) foi empregada para determinar a significância das concentrações de FP avaliadas. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados

estatisticamente significantes (Callegari-Jacques, 2006). O teste de Tukey foi aplicado para realizar comparações entre os pontos amostrais em relação aos grupos controle.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliado o potencial mutagênico de diferentes concentrações de FP por meio do teste do micronúcleo em *Tradescantia pallida* (Trad-MCN).

Na **Tabela 1** estão apresentados o resumo dos resultados obtidos pelo Trad-MCN. Foi evidenciado aumento na frequência de micronúcleos nas plantas tratadas com 0,16 g/L (dose indiscriminada – $7,80 \pm 1,58$), 0,8 g/L ($5,90 \pm 1,63$) 0,4 g/L ($5,80 \pm 0,59$) e 0,2 g/L ($5,40 \pm 1,12$) de FP, evidenciado por tanta diferença estatisticamente significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$) quando comparado ao controle negativo (água obtida por sistema de osmose reversa).

Tabela 1. Frequência de Micronúcleos em *Tradescantia pallida* tratada com diferentes concentrações de Fipronil (FP).

Tratamentos g/L	Tétrades analisadas	Frequência de micronúcleos/100 $\pm$ SD	Diagnóstico estatístico ^a
Controle negativo	3000	$1,20 \pm 0,52$	
Controle positivo	3000	$18,0 \pm 3,86$	+
FP			
0,025	3000	$1,45 \pm 1,18$	-
0,05	3000	$2,62 \pm 1,48$	-
0,1	3000	$2,11 \pm 1,25$	-
0,2	3000	$5,40 \pm 1,12$	+
0,4	3000	$5,80 \pm 0,59$	+
0,8	3000	$5,90 \pm 1,63$	+
0,16	3000	$7,80 \pm 1,58$	+

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

FP: Fipronil; Controle negativo: água obtida por sistema de osmose reverse; Controle Positivo: Formaldeído (0,2%).

Embora FP, assim como todos os inseticidas comercializados, apresentam licença emitida pelos órgãos competentes (ANVISA, IBAMA e MAPA), diferentes trabalhos tem demonstrado que FP pode causar danos genéticos em sistemas *in vivo* e *in vitro* (Ghisi NDE *et al.*, 2011; Çelik *et al.*, 2014).

Çelik *et al.* (2014) avaliaram as capacidades genotóxica e mutagênica da molécula *in vitro* por meio do Ensaio Cometa, Teste do micronúcleo (TMN) e o Teste de Troca de Cromátides Irmãs (TCI) em cultura de linfócitos. FP demonstrou ser genotóxico e mutagênico em todas as doses testadas (0,1; 0,3 e 0,7 µg/mL) e em todos os sistemas testes, exceto no TMN na dose de 0,1 µg/mL.

Ghisi *et al.* (2011) verificaram que nas concentrações de 0,10 e 0,23 µg/mL, FP é capaz de causar danos clastogênicos e/ou aneugênicos (identificado por meio do TMN) em *Rhamdia quelen*, evidenciando por tanto, danos mutagênicos.

Tanto no trabalho de Çelik *et al.* (2014), quanto o trabalho de Ghisi *et al.* (2011) foram constatadas a relação dose dependência na frequência de danos ao DNA, corroborando com os resultados do nosso estudo.

Morais *et al.*, (2017) avaliaram a capacidade mutagênica, recombinogênica e carcinogênica do FP em *Drosophila melanogaster*. Os resultados revelaram que FP apresenta atividade mutagênica antes (cruzamento ST) e após metabolização (cruzamento HB). Além disso, em todas as concentrações testadas (0,3; 0,7; 1,5 e 3 x 10⁻⁵ mM), FP foi capaz de incrementar alta frequência de tumores epiteliais nos diferentes apêndices da mosca. Vale destacar que os danos induzidos pelo FP em *D. melanogaster* foi devido principalmente a eventos recombinogênicos (Morais *et al.*, 2016), os quais são fundamentais para ativar mecanismos carcinogênicos (Nepomuceno *et al.*, 2015).

Embora não tenha sido avaliado no presente trabalho o mecanismo de indução de mutação no DNA de *T. pallida*, diferentes trabalhos na literatura sugerem um mecanismo pelo qual FP altera o material genético. Com base nos relatos sobre a toxicocinética do inseticida FP, a chave para a alteração do material genético induzida pela molécula não está associada à sua interação direta com o DNA, mas sim pela sua interferência no processo normal do estresse oxidativo, aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Lassiter *et al.*, 2009; Ki *et al.*, 2012; Badgujar *et al.*, 2015a; Badgujar *et al.*, 2015b; Park *et al.*, 2015).

Ki *et al.* (2012) demonstraram que células de neuroplasma humano SH-SY5Y expostas a diferentes concentrações de FP exibiram elevados níveis de ERO, levando à peroxidação de lipídeos da membrana celular, aumentando o estresse oxidativo. A liberação

de ERO foi dose-dependente, sendo gerada em maior intensidade na dose mais concentrada (100 μ M).

Acreditamos que o aumento da concentração de FP aumenta o estresse oxidativo. O estresse oxidativo é natural e fundamental nos organismos, estando envolvidos em diferentes processos biológicos (Barretos e David, 2006). No entanto, o aumento acima dos níveis normais pode gerar radicais livres altamente reativos, promovendo oxidação de biomoléculas, incluindo o DNA (Barretos e David, 2006; Abdullah, 2015).

ERO geradas por pesticidas são fortes candidatas ao surgimento de distúrbios neurodegenerativos, tais como a doença de Parkinson e de Alzheimer (Bogdanov *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004). Em adição, alguns estudos têm demonstrado o aumento do risco do parkisonismo em indivíduos expostos cronicamente a pesticidas (Brown *et al.*, 2006). Somado a estes eventos, o aumento da produção de ERO em organismos expostos a diferentes xenobióticos está diretamente associado a danos genotóxicos, o que aumenta as chances de instalação do câncer (Peluso *et al.*, 2015).

4. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais testadas e em *T. pallida*, FP apresentou atividade mutagênica nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,8 e 0,16 g/L. Mais estudos precisam ser feitos, objetivando a obtenção de mais dados sobre a toxicocinética do inseticida FP.

5. REFERÊNCIAS

AAJOUD, A.; RAVANEL, P., TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51:1347-1352, 2003.

ABDULLAH, A.H.; MOHAMMED, A.S.; RASEDEE, A.; MIRGHANI, M.E.S.; AL-QUBAISI, M.S. Induction of apoptosis and oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer, MDA-MB231 cells, by ethanolic mango seed extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 1: 3-17, 2015.

BADGUJAR, P.C.; CHANDRATRE, G.A.; PAWAR, N.N.; TELANG, A.G.; KURADE, N.P. Fipronil induced oxidative stress involves alterations in SOD1 and catalase gene expression in male mice liver: Protection by Vitamins E and C. **Environmental Toxicology**. 1-12: 2015b.

BADGUJAR, P.C.; PAWAR, N.N.; CHANDRATRE, G.A.; SHARMA, T.A.K. Fipronil induced oxidative stress in kidney and brain of mice: Protective effect of vitamin E and vitamin C. **Pesticides Biochemistry and Physiology**. 118: 10-18, 2015a.

BARRETOS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. 1: 113-123, 2006.

BHALLI, J. A.; ALI, T.; ASI, M. R.; KHALID, Z. M.; CEPPI, M.; KHAN, Q. M. DNA damage in Pakistani agricultural workers exposed to mixture of pesticides. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 50: 37-45, 2009.

BIASIBETTI, L., ROSIN, C. K., HOUSSANI, M. T. (2014). *MORFOLOGIA VEGETAL TRADESCANTIA PALLIDA PURPUREA*. ensaio teórico, universidade regional unijui, ciência, unijui. Acesso em 21 de maio de 2018, disponível em https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=MORFOLOGIA+VEGETAL+TRADESCANTIA+PALLIDA+PURPUREA&btnG=

BOBÉ, A.; COOPER, J.; COSTE, C.M.; MULLER, M. Behavior of fipronil in soil under sahelian plain field conditions. **Pest Management Science**. 52: 275-281, 1998.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**. 543: 251-272, 2003.

BOLOGNESI, C.; MORETTO, A. Genotoxic risk in rubber manufacturing industry: a systematic review. **Toxicology Letters**. 230: 345-355, 2014.

BOGDANOV, M.B., ANDREASSEN, O.A., DEDEOGLU, A., FERRANTE, R.J., BEAL, M.F. Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **Journal of Neurochemistry**. 6: 1246-1249, 2001.

BROWN, T.P., RUMSBY, P.C., CAPLETON, A.C., RUSHTON, L., LEVY, L.S. Pesticides and Parkinson's disease—is there a link? **Environmental Health Perspectives**. 114: 156-164, 2006

ÇELIK, A.; EKINCI, S. Y.; GULER, G.; YILDIRIM, S. *In vitro* genotoxicity of Fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test, and comet assay. **DNA and Cell Biology**. 33: 148-154, 2014.

ÇELIK, A.; EKINCI, S. Y.; GULER, G.; YILDIRIM, S. *In vitro* genotoxicity of Fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test, and comet assay. **DNA and Cell Biology**. 33: 148-154, 2014.

COLE, L. M.; NICHOLSON, R. A.; CASIDA, J. E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry Physiology**. 46, 47-54, 1993.

CONELLY, P. Environmental fate of fipronil. California environmental protection agency. **Department of Pesticide Regulation**. 01-17, 2001.

DAS, P. C., CAO, Y., CHERRINGTON, N., HODGSON, E., & ROSE, L. R. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemical Biological Interactions**. 164, 200-214, 2006.

ECOBICHON, D.J. Our changing perspectives on the benefits and risks of pesticides: a historical overview. **Neurotoxicology**, 21, 211-218, 2000.

EL HASSANI, A.K.; DACHER, M.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C. Effect of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 82: 30-39, 2005.

EUROPEAN COMMISSION. EU Pesticides database. 2010. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm>. Acesso em: 18 setembro. 2014.

GHISI NDE, C.; RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V.; DE ALMEIDA, M. I.; RIBEIRO, C. A.; CESTARI, M. M. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental Monitoring Assessment**. 180: 589-599, 2011.

GUNASEKARA, A.; TROUNG, T. Environmental fate of fipronil. **California Environmental Protection Agency**. 1-28, 2007.

HERNANDEZ, A. F.; LOPEZ, O.; RODRIGO, L.; GIL, F.; PENA, G.; SERRANO, J. L.; PARRON, T.; ALVAREZ, J. C.; LORENTE, J. A.; PLA, A. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: influence of several markers of individual susceptibility. **Toxicology Letters**. 159: 13-21, 2005.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**. 277: 91-138, 1992.

HUANG, X., MOIR, R.D., TANZI, R.E., BUSH, A.I., ROGERS, J.T. Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology. **Annals of New York Academy of Sciences**. 1012: 153-163, 2004.

KI, Y.; LEE, J.E.; PARK, J.H.; SHIN, I.C.; KOH, H.C. Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to Fipronil. **Toxicology Letters**. 211: 18-28, 2012.

LASSITER, T.L.; MACKILLOP, E.A.; RYDE, I.T.; SEIDLER, F.J.; SLOTKIN, T.A. Is Fipronil safer than chlorpyrifos? Comparative developmental neurotoxicity modeled in PC12 cells. **Brain Research Bulletin**. 78: 313-322, 2009.

LE FAUDER, J.; BICHON, E.; BRUNSCHWIG, P.; LANDELLE, R.; ANDRE, F.; LE BIZEC, B. Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. **Talanta**. 1: 710-717, 2007.

LOURENÇO, C. T.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. Oral toxicity of Fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bulletin Environmental Contamination Toxicology**. 89: 921-924, 2012.

LEGHAIT, J.; VÉRONIQUE, G.; NICOLE, P.H.; MARION, C.; ELISABETH, P.; PIERRE-LOUIS, T.; CATHERINE, V. Fipronil induced disruption of thyroid function in rats

is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**. 255: 38-44, 2009.

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.

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

MORAIS, C.R; CARVALHO, S.M; NAVES, M.P.C; ARAÚJO, 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, p. 163-172, 2017.

NEPOMUCENO, J.C. Using *Drosophila melanogaster* to assessment carcinogenic agents thought the test for detection of epithelial tumor clones (Warts). *Adv. Tech. Biol. Med.* V. 3, p. 2-8, 2015.

OHI, M.; DALSENTER, P. R.; ANDRADE, A. J. M.; NASCIMENTO, A. J. Reproductive adverse effects of fipronil in winstar rats. **Toxicology Letters**. 146: 121-127, 2004.

PARK, J.H.; PARK, Y.S.; LEE, J.B.; PARK, K.H.; PAIK, M.K.; JEONG, M.; KOH, H.C. Meloxicam inhibits Fipronil-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells. **Journal of Applied Toxicology**. 1-15: 2015.

PELUSO, M.E.M.; GIESE, R.W.; CHELLINI, E.; CEPPI, M.; CAPACCI, F. Oxidatively damaged DNA in the nasal epithelium of workers occupationally exposed to silica dust in Tuscany region, Italy. **Mutagenesis**. 1-7: 2015.

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=

STENERSEN, J. Chemical pesticides: Modes of action and toxicology. **CRC PRESS**. 1: 1-271, 2004.

STENERSEN, J. Chemical pesticides: Modes of action and toxicology. **CRC PRESS**. 1: 1-271, 2004.

TSUTSUI, T.; MAIZUMI, H.; BARRETI, J.C. Colcemid-induced neoplastic transformation and aneuploidy in Syrian hamster embryo cells. **Carcinogenesis**. 5: 89-93, 1984.

VIDAU, C.; BRUNET, J.; BADIOU, A.; BELZINCES, L.P. Phenypyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell mode Caco-2. **Toxicology in Vitro**. 23: 589-597, 2009.

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.