

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Análises cromatográficas, efeitos citotóxicos e oxidativos
do piriproxifeno no controle de *Aedes aegypti* L.**

PATRÍCIA E SILVA ALVES

ORIENTADOR(A): PROF. DR. JOAQUIM SOARES DA COSTA JÚNIOR

Teresina – PI
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Análises cromatográficas, efeitos citotóxicos e oxidativos
do piriproxifeno no controle de *Aedes aegypti* L.**

PATRÍCIA E SILVA ALVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Bioprospecção Fitoquímica.
Orientador(a): Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior.

Teresina – PI

2018

**Análises cromatográficas, efeitos citotóxicos e oxidativos do piriproxifeno
no controle de *Aedes aegypti* L.**

PATRÍCIA E SILVA ALVES

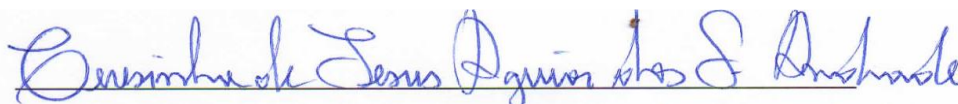
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestra em Química – Bioprospecção Fitoquímica.

Aprovado em 30 de Maio de 2018.

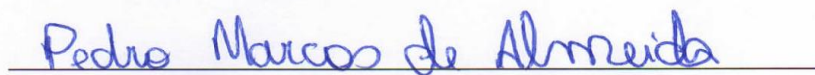
Membros da Banca:



Prof (a). Dr (a). Joaquim Soares da Costa Júnior
(Presidente da Banca – IFPI)



Prof (a). D r(a). Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade
(Membro Titular – IFMA)



Prof (a). Dr (a). Pedro Marcos de Almeida
(Membro Titular – UESPI)

Teresina – PI

2018

Dedico este trabalho à Deus que me fortalece, ajuda e me sustenta com a sua destra da justiça. Aos meus amados pais Maridete e Ramos pelo apoio diário, ao meu namorado Ernane por está sempre presente, a minha amiga Nayane pelas ajudas e a todos que contribuíram direto ou indiretamente para concretização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

- ❖ A Deus, gratidão a ti somente.
- ❖ Aos meus pais, Maridete e Ramos pelo apoio incondicional.
- ❖ Ao meu namorado, Ernane Santos, pelos amor e ajudas constantes.
- ❖ A meu orientador Prof. Dr. Joaquim Soares, pelos ensinamentos transmitidos.
- ❖ A minha grande parceira de laboratório Maria das Dores, por todas ajudas experimentais e práticas no laboratório.
- ❖ Ao Prof. Dr. Pedro Marcos, pelos ensinamentos e reuniões nas discussões sobre a genética.
- ❖ A Prof. Dra. Teresinha Aguiar pelo conhecimento transmitido.
- ❖ A Prof. Dra. Valdiléia Texeira, pela experiência de estágio à docência e apoio.
- ❖ A Prof. Dra. Ana Amélia por ceder seu laboratório para execução de teste farmacêutico.
- ❖ Ao Prof. Dr. José Luiz Sá, pelos reagentes cedidos.
- ❖ A Prof Dra. Dinara Jaqueline - UFCSPA, por auxilio do seu laboratório para testes biológicos.
- ❖ A minha amiga Nayane Santos, pela ajuda nas correções de minha pesquisa.
- ❖ A Regina e Herbert, pela ajuda no teste de *Allium cepa*.
- ❖ Aos meus amigos Maciel, Denise e João por ajudarem nas análises do CG-EM.
- ❖ Ao Raphael, Jonathas e Antonielle pelo apoio nos testes biológicos e farmacêutico.
- ❖ Ao Programa de Pós Graduação em Química-UESPI, em especial, aos professores doutores por todos os ensinamentos cedidos.
- ❖ As Instituições de Ensino, UESPI (GERATEC e LABGENE), IFPI, UFPI (LAPGENIC), UFPE, UFCSPA e UFC por fornecerem seus laboratórios de Pesquisas.
- ❖ Ao financiamento da bolsa institucional UESPI.
- ❖ E a todos que direto ou indiretamente fizeram parte da minha formação de pós-graduação, o meu muito obrigada.

*“Mas os que esperam no Senhor renovarão as forças,
subirão com asas como águias; correrão, e não se
cansarão; caminharão, e não fadigarão. ”*

(Isaías 40:31)

RESUMO

O piriproxifeno (PFF) é um larvicida utilizado no combate das larvas de *Aedes aegypti*. A finalidade do estudo foi realizar propostas de identificação do piriproxifeno e piridallil a partir de Cromatografia Líquida (CLAE-DAD) e Cromatografia Gasosa (CG-EM), além de avaliar efeitos citotóxicos e oxidativos do piriproxifeno. O larvicida comercial foi submetido a maceração e extrações metanólicas por um período de três semanas. A metodologia em (CLAE-DAD) foi usada no método isocrático, o (CG-EM) com coluna *Rtx-5MS*, a toxicidade de *Artemia salina* pela concentração letal (CL_{50}), a citogenotoxicidade de *Allium cepa* pelo índice mitótico e alterações cromossômicas e a *Saccharomyces cerevisiae* através do potencial oxidativo. Na CLAE-DAD para o PFF e piridallil (PYL) foram obtidos os comprimentos de onda $\lambda_{\text{máx}}$ (271 nm) e (208 nm) do espectro UV, com tempos de retenção (T_R) (3,39min) e (4,04min), respectivamente. O CG-EM apresentou os fragmentos massa/carga (m/z) (96, 136, 186 e 226). O potencial toxicológico mostrou-se significativo para as concentrações 1; 10; 100 e 1000 ppm, com uma CL_{50} de 48 h (0,5 ppm). O *A. cepa*, apresentou efeito citotóxico para todas as doses (0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 e 1000 ppm), efeito genotóxico apenas nas concentrações (0,0001; 0,1; 1; 100 e 1000 ppm), e mutagênicos para as doses (0,1; 100 e 1000 ppm). Em relação a *S. cerevisiae* todas as linhagens (SODWT, *Sod1*, *Sod2*, *Sod1Sod2*, *Cat1* e *Sod1Cat1*) induziram danos oxidativos nas concentrações 100 e 1000 ppm. Portanto, a CLAE-DAD e CG-EM permitiram a identificação do PFF e PYL no larvicida comercial, em que estes, produziram efeitos citotóxicos e oxidativos que poderiam causar riscos à saúde e ao ecossistema.

Palavras-chave: Piriproxifeno, Cromatografia, *Allium cepa*, *Artemia salina*, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Pyriproxyfen (PFF) is a larvicide used to combat *Aedes aegypti* larvae. The purpose of the study was to make proposals for the identification of pyriproxyfen and pyridalyl from Liquid Chromatography (HPLC-PDA) and Gas Chromatography (GC-MS), as well as to evaluate the cytotoxic and oxidative effects of pyriproxyfen. The commercial larvicide was subjected to maceration and methanolic extractions for a period of three weeks. The methodology in HPLC-PDA was used in the isocratic method, the *Rtx-5MS* column (GC-MS), the toxicity of *Artemia salina* by lethal concentration (LC_{50}), the cytotoxicity of *Allium cepa* by mitotic index and chromosomal alterations and to *Saccharomyces cerevisiae* through oxidative potential. The wavelengths $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (271 nm) and (208 nm) of the UV spectrum were obtained in the HPLC-PDA for PFF and piridalil (PYL), with retention times (R_T) (3.39min) and (4.04min), respectively. GC-MS presented the mass/ charge fragments (m/z) (96, 136, 186 and 226). The toxicological potential was significant for concentrations 1; 10; 100 and 1000 ppm, with a 48 hour LC_{50} (0.5 ppm). The *A. cepa* showed a cytotoxic effect at all doses (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 100 and 1000 ppm), genotoxic effect at concentrations only (0.0001; 0.1; 1; 100 and 1000 ppm), and mutagenic for doses (0.1, 100 and 1000 ppm). Regarding *S. cerevisiae*, all strains (SODWT, *Sod1*, *Sod2*, *Sod1Sod2*, *Cat1* and *Sod1Cat1*) induced oxidative damages at concentrations of 100 and 1000 ppm. Therefore, HPLC-PDA and GC-MS allowed the identification of PFF and PYL in the commercial larvicide, in which they produced cytotoxic and oxidative effects that could cause health and ecosystem risks.

Keywords: Pyriproxyfen, chromatography, *Allium cepa*, *Artemia salina*, *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> L.: fase aquática (ovos, larvas, pupas) e fase terrestre (adultos).....	19
Figura 02 – Mecanismo de ação do PFF de como matar inseto no tratamento público de água do Brasil.....	22
Figura 03 – <i>Artemia salina</i> L.....	29
Figura 04 – <i>Artemia salina</i> L. – Ciclo de vida	30
Figura 05 – Alterações celulares observadas pela análise de células meristemáticas de raízes de <i>Allium cepa</i> . A: intérfase normal; B: prófase normal; C: metáfase normal; D: anáfase normal; E: telófase normal; F: intérfase com broto nuclear; G: intérfase com micronúcleo; H: prófase com broto nuclear (cabeça de seta) e micronúcleo (seta); I: prófase com micronúcleo; J: núcleo lobulado; K: célula binucleada; L: anáfase com ponte cromossômica; M: anáfase com quebra cromossômica; N: anáfase com quebra cromossômica; O: telófase com ponte e diferentes tamanhos de quebras (seta e cabeça de seta); P: telófase com cromossomo retardatário; Q: metáfase com aderência cromossômica (viscosidade); R: metáfase poliploide; S-T: C-metáfase.....	33
Figura 06 – Mecanismos moleculares em resposta às espécies reativas de oxigênio	36
Figura 07 – Amostras de larvicida comercial utilizadas no estudo	39
Figura 08 – Modelo experimental e posicionamento das linhagens utilizadas no ensaio com <i>S. cerevisiae</i>	44
Figura 09 – Cromatograma analítico do larvicida comercial em CLAE-DAD, modo isocrático ACN:CH ₃ OH 80:20% em 60min, solução de 1 mg. mL ⁻¹ , fluxo 1 mL. min ⁻¹ , C ₁₈ fase reversa, comprimento de onda 272 nm, inserte observado os espectros no UV os comprimentos de onda 209 nm e 258 nm do piriproxifeno no tempo de retenção 3,338min, e espectros no UV em λ 203 nm e 271 nm no T _R 4,036min para o piridalil.	47
Figura 10 – Cromatograma analítico do larvicida comercial em CLAE-DAD, modo isocrático ACN: CH ₃ OH 80:20 % em 60min, solução de 1 mg. mL ⁻¹ , fluxo 1 mL. min ⁻¹ , C ₁₈ fase reversa, comprimento de onda 208 nm, inserte observado os espectros no UV os comprimentos de onda 209 nm e 258 nm do piriproxifeno no tempo de retenção 3,338min, e espectros no UV em λ 203 nm e 271 nm no T _R 4,036min para o piridalil	48
Figura 11 – Estrutura química do piriproxifeno	49
Figura 12 – Estrutura química do piridalil	49
Figura 13 – Cromatograma da análise do larvicida comercial injetado em CG-EM.	50

Figura 14 – Espectros de massas do composto Piriproxifeno	51
Figura 15 – Proposta de fragmentações do piriproxifeno	51
Figura 16 – Percentual mortalidade das larvas de <i>A. salina</i> no tempo de incubação de 24 h e 48 h expostos as doses do larvicida comercial. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão, pelo teste não paramétrico de <i>Kruskal-Wallis</i> , pós-teste <i>Student-Newman-Keuls</i> . Valores de significância para $***(P<0,001)$, $**(P<0,01)$ e $*(P<0,05)$, quando comparados ao CN (água destilada)	54
Figura 17 – Potencial oxidativo das doses do larvicida comercial em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> . Os gráficos representam os halos de inibição mensurados em mm nas <i>linhagens</i> SODWT, <i>Sod1</i> , <i>Sod2</i> , <i>Sod1Sod2</i> , <i>Cat1</i> e <i>Sod1Cat1</i> . Valores em média ± desvio padrão dos halos de inibição (0-40 mm). ANOVA, pós-teste de <i>Bonferroni</i> . Valores de significância para $***(P<0,001)$, $**(P<0,01)$ e $*(P<0,05)$, quando comparados ao CN (solução salina)	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Linhagens e genótipos de <i>S. cerevisiae</i> usadas no estudo	43
Tabela 02 – Análise cromatográfica em camada delgada do larvicida comercial com solventes de diferentes polaridades e diferentes proporções	52
Tabela 03 – Média do índice mitótico e das alterações cromossômicas em células meristemáticas de radículas de <i>A. cepa</i> , após a exposição por 24 h em diferentes concentrações do larvicida comercial	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A. albopictus** – *Aedes albopictus*;
- AC** – Alteração Cromossômica;
- AC** – Aderência Cromossômica;
- A. cepa** – *Allium cepa*;
- ANOVA** – Análise de Variância;
- A. salina** – *Artemia salina*;
- BN** – Broto Nuclear;
- CBM** – Controlador de sistema;
- CCD** – Cromatografia em Camada Delgada;
- CGAR** – Cromatografia Gasosa de Alta Resolução;
- CG-EM** – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas;
- CHO-k1** – Proveniente de ovário de hamster chinês;
- CLAE-DAD** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Cm** – C-metáfase;
- CN** – Controle negativo;
- CP** – Cromatografia em Papel;
- CP** – Controle positivo;
- Cat1A** – Enzima Catalase;
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico;
- DP** – Desvio Padrão;
- EROs** – Espécies reativas de oxigênio;
- EUA** – Estados Unidos da América;
- GERATEC** – Núcleo Interinstitucional de Estudo e Geração de Novas Tecnologias;
- IFPI** – Instituto Federal do Piauí;
- LABGENE** – Laboratório de Genética;
- LAPGENIC** – Laboratório de Genética Toxicológica;
- LQMTA** – Laboratório de Química dos Materiais & Tecnologias Ambientais;
- MN** – Micronúcleos;
- NIST** – Instituto nacional de normas e tecnologia;
- OMS** – Organização Mundial de Saúde;
- PA** – Padrão Analítico;
- PC** – Perda Cromossômica;

PFF – Piriproxifeno;

PYL – Piridilil;

PT – Ponte Cromossômica;

QC – Quebra Cromossômica;

Rtx-5MS – Coluna sílica fundida;

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*;

Sod1A – Linhagens da enzima Superóxido Dismutase do Citoplasma Mutada;

Sod2A – Linhagens da enzima Superóxido Dismutase da Mitocôndria Mutada;

Sod1A Cat1A – Linhagens das enzimas Superóxido Dismutase e Catalase do Citoplasma Mutadas;

Sod1A Sod2A – Linhagens da enzima Superóxido Dismutase do Citoplasma e Mitocôndrias Mutadas;

SODWT– Linhagem selvagem;

sf9 – Clone 9 da linhagem de célula *Spodoptera frugiperda*;

TLC – Cromatografia em Camada Fina;

UESPI – Universidade Estadual do Piauí;

UFC – Universidade Federal do Ceará;

UFCSPA – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre;

UFPI – Universidade Federal do Piauí;

UV-Vis – Ultravioleta Visível;

WHO – World Health Organization;

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celcius;

C₁₈ – Coluna octadecil;

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio;

CH₃ – Metil;

CH₃OH – Metanol;

CL₅₀ – Concentração letal mediana;

Cm/ s – Centímetros/ segundo;

dm – Distância percorrida pelo solvente desde a origem;

ds – Distância percorrida pela mancha desde a origem;

G – Formulação granular;

g/kg – gramas/ quilogramas;

g/L – Grama por litro;

h – Horas;

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio;

KCl – Cloreto de Potássio;

K₂Cr₂O₇ – Dicromato de Potássio;

kPa – Kilopascal;

m – Metros;

mg – Miligrama;

mg/ mL – Miligramas por litro;

MgSO₄ – Sulfato de Magnésio;

mL/ min – Mililitros por minutos;

mm – Milímetro;

mM – Milimolar;

MMS – Metanosulfonato de metila;

m/z – Fragmentação Massa/carga;

n – Número de transição;

NaCl – Cloreto de Sódio;

NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio;

nm – Nanômetros;

O₂ – Oxigênio;

pH – Potencial Hidrogeniônico;

PPM – Parte por milhão;

R_f – Fator de retenção;

T_R – Tempo de Retenção;

v/v – Volume/ volume;

W – Watts;

x – Vez;

YEL – Meio de cultura líquido;

π – Ligação Pi;

σ – Ligação Sigma;

μg/ kg – Micrograma por kilograma;

μL – Microlitro;

μm – Micrômetro;

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	18
1.1 <i>Aedes aegypti</i> L.	18
1.2 Breve história do uso de pesticidas.....	19
1.3 Larvicida comercial	21
1.3.1 Piriproxifeno.....	21
1.3.1 Piridallil	23
1.4 Química: Cromatografia - tipos	24
1.4.1 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE</i>	24
1.4.2 <i>Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa CG-EM</i>	26
1.4.3 <i>Cromatografia em camada delgada - CCD</i>	27
1.5 Testes biológicos e farmacêuticos	29
1.5.1 <i>Artemia salina</i> L.	29
1.5.2 <i>Allium cepa</i> L.....	31
1.5.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
1.6 Objetivos	38
1.6. Gerais.....	38
1.6.2 Específicos.....	38
CAPÍTULO 2 – METODOLOGIA EXPERIMENTAL	39
2.1 Amostra	39
2.2 Preparação das amostras	39
2.3 Química e Reagentes	40
2.4 Análise Instrumental.....	40
2.4.1 <i>CLAE-DAD</i>	40
2.4.2 <i>CG-EM</i>	41
2.4.3 <i>CCD</i>	41
2.5 <i>Artemia salina</i>	42
2.6 <i>Allium cepa</i>	42
2.7 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
2.8 <i>Análise Estatística</i>	45
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	46

3.1 Cromatografia.....	46
3.1.1 <i>Cromatografia líquida em alta eficiência - CLAE-DAD</i>	46
3.1.2 <i>Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas - CG-EM</i>	50
3.1.3 <i>Cromatografia em camada delgada - CCD</i>	51
3.2 <i>Artemia salina</i>	53
3.3 <i>Allium cepa</i>	56
3.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXO A*	76

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

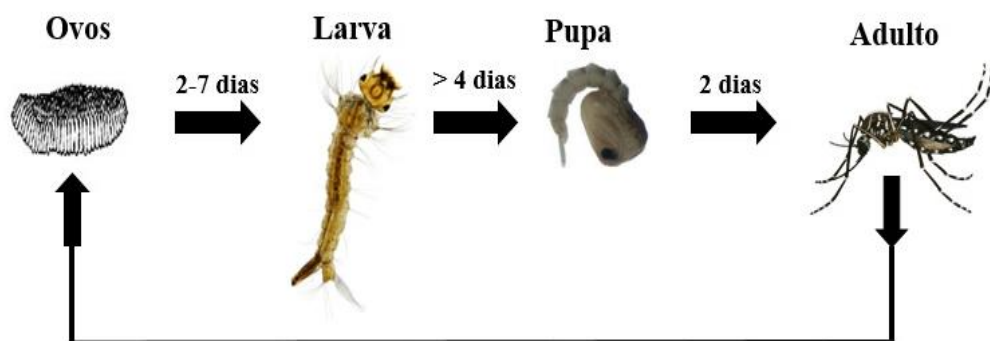
Essa pesquisa encontra-se na área de Química Orgânica com ênfase em Bioprospecção Fitoquímica, e tem como tema fazer uma análise química, farmacêutica e biológica do larvicida comercial (piriproxifeno e piridilil).

1.1 *Aedes aegypti* L.

O controle do *A. aegypti* L. tem constituído um importante desafio, especialmente nos países em desenvolvimento. O Brasil, a partir do século XXI passou por profundas mudanças econômicas que propiciaram enorme crescimento populacional. Aspectos relacionados a problemas de infraestrutura das cidades, associadas ao processo de industrialização, geraram modificações nas condições de saúde da população, aumentando o índice de doenças infecciosas e parasitárias, como por exemplo, as doenças transmitidas por insetos vetores ^[1].

Devido essa proliferação de mosquitos, doenças virais como, Dengue, Zika e Chikungunya têm se tornado um grande problema na saúde pública, sendo o vetor responsável por sua transmissão o *Aedes aegypti* ^[2]. Mosquito originário da África, descoberto pela primeira vez no Egito e classificado como da família *Culicidae* ^[3]. É o principal vetor urbano, devido ao seu comportamento sinantrópico, também encontrado dentro e ao redor das residências ^[4].

Um fator decisivo para a proliferação da espécie é a temperatura ambiente, que tem um efeito direto sobre sua taxa vital. Além disso, existem outros fatores climáticos que também afetam o seu desenvolvimento, como a umidade e a chuva ^[5]. O ciclo de vida do mosquito *A. aegypti* L. (Figura 01) é um processo que dura 1,5 semana (períodos de intensa luz solar) ou 3 semanas (períodos frios), e compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. Varia com a temperatura, disponibilidade de alimento e quantidade de reprodução de larvas, podendo ser dividido em duas fases: fase aquática (ovo, larva e pupa) e fase terrestre (fase adulta). Após a eclosão dos ovos em condições ambientais favoráveis, o desenvolvimento de mosquitos na forma adulta pode levar até um período de 10 dias ^[6].



Fonte: Adaptada de (DOS REIS et al., 2018) ^[6].

Figura 01. Ciclo de vida do *Aedes aegypti* L.: fase aquática (ovos, larvas e pupas) e fase terrestre (adultos).

Seus criadouros preferenciais são recipientes artificiais, tanto aqueles abandonados ao céu aberto, que servem como reservatório de água de chuva, como os utilizados para armazenar água para uso doméstico. O controle vetorial é feito através da eliminação mecânica de criadouros e quando não era possível a eliminação, tratavam-se os mesmos com larvicida e ainda aplicavam-se outros tipos de inseticidas ^[1].

Além disso, o controle das doenças transmitidas pelo *A. aegypti* está relacionada a um conjunto de ações ligadas a atenção primária a saúde, vigilância em saúde, educação em saúde e participação social ^[7]. Existem ainda avanços no desenvolvimento de vacinas voltados ao combate do *A. aegypti* L., porém, devido a circulação de seus múltiplos vírus transmitidos (DENV1-4, CHIKV, KIKV), não há vacinas para todos os mosquitos ^[8].

O uso de inseticidas químicos tem sido o principal método de controle do *A. aegypti* L., porém o meio ambiente vem sofrendo consequências nocivas com essa utilização descontrolada que poderão se manifestar nas próximas décadas ^[9]. Entretanto, isso não tem sido muito bem sucedido devido a recursos humanos, técnicos, operacionais, fatores ecológicos e econômicos, uma vez que o uso excessivo de pesticidas sintéticos provoca o surgimento de resistência a inseticidas, e é um dos maiores obstáculos no controle de pragas de insetos ^[10].

1.2 Breve história do uso de pesticidas

Os pesticidas são também denominados agrotóxicos, grupo de compostos químicos orgânicos que possuem propriedades físico-químicas empregados abundantemente na

agricultura para o controle de drogas e prevenção de ervas daninhas ^[11]. Assim como também atuam efetivamente na prevenção de doenças e pragas das culturas ^[12].

Segundo a sua classificação, podem ser designados quanto ao seu uso, associado a ação tóxica do produto a um ou mais organismos alvo, sendo as classes mais conhecidas acaricidas, bactericidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, nematocidas, raticidas, larvicida, moluscicidas e algicidas ^[13]. Os pesticidas possuem ingrediente ativos que podem ser empregados para distintas aplicações, podendo atuar em diferentes alvos biológicos e, portanto, enquadrar-se em mais de uma classe. Podem ser formulados como pó seco, apresentando geralmente 1 a 10% dos ingredientes ativos, e é aplicado diretamente nas culturas; pó molhável, diluído preliminarmente em água dando origem a uma suspensão; pó solúvel, é a formulação mais incomum, pois a maioria dos ingredientes ativos não são solúveis em água; granulados, utilizada apenas para inseticidas e alguns herbicidas; concentrado emulsionável, é a formulação líquida mais antiga, composta pelo ingrediente ativo, um solvente e um emulsificante ^[14]. Quanto a sua origem, têm-se os compostos orgânicos (organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides) ^[15]. Como também os inorgânicos, tais como (compostos de mercúrio, bário, enxofre e cobre), além de origem botânica (piretrinos, antibióticos e fitocidas) ^[16].

As suas aplicações em décadas produziram efeitos negativos para os seres humanos e meio ambiente devido a sua persistência e bioacumulação. Com a sintetização desses pesticidas, são necessárias análises de toxicidade para uma proteção do meio ambiente e saúde humana, em que para analisar as suas propriedades de toxicidade há limitações, pois existem uma diversidade de estruturas químicas (toxinas) e sistemas biológicos (alvos). Além disso, pouca informação é conhecida sobre os mecanismos de toxicidade dos pesticidas a nível celular e molecular. Portanto, é fundamental desenvolver métodos para a investigação de sua toxicidade ^[17].

Dentre os pesticidas, destaca-se o piriproxifeno (PPF), que vem sendo utilizado no controle do vetor *A. aegypti* L. através da disseminação em partículas de PPF aderidas ao mosquito. Essa abordagem de auto disseminação respalda-se na montagem de uma estação disseminadora (ovitrampa) absorvida com o PPF ^[18]. Na qual a fêmea do mosquito *A. aegypti* L. é estimulada a realizar oviposição nesta ovitrampa, dessa forma, o mosquito há de se manter na parede da armadilha durante esse processo e assim impregna-se de partículas de PPF. Por realizar diversas oviposições em seu período gonotrópico o vetor permite a contaminação de diferentes criadouros quando pousa nestes ^[19]. O mosquito então executa a

contaminação da água com PPF, exercendo sua atividade larvicida quando as larvas atingirem ao estágio pupal ^[20].

Do mesmo modo ABAD-FRANCH et al. (2015) ^[20] e SUMAN et al. (2014) ^[21] realizaram testes com o uso de PPF nos Estados Unidos e Brasil. SUMAN et al. (2014) ^[21] utilizaram sítios diferentes para instalação das estações, porém análogos em características socioeconômicas. Houve o uso da técnica UBV (Ultra Baixo Volume) para a sua disseminação nas áreas de interesse, que apresentaram resultados positivos quanto a disseminação do pesticida e mortalidade de mosquitos. ABAD-FRANCH et al. (2015) ^[20] utilizou o PPF em estações sentinelas (100) espalhadas em Manaus (Amazonas). Em que apresentaram níveis de contaminação entre 75,5% e 100% durante 4 meses, com percentual de mortalidade de 100% em mais da metade das estações sentinelas. Por consequência, ambos os autores ^[20,21], consideram a técnica de autodisseminação de PPF por mosquitos uma estratégia válida e vantajosa no controle do vetor de mosquitos.

1.3 Larvicida comercial

1.3.1 Piriproxifeno

O PPF é um composto de nomenclatura na IUPAC 2- [1- (4-fenoxifenoxi) propan-2-iloxi]-piridina, possui fórmula molecular $C_{20}H_{29}NO_3$, com peso molecular de 321,5 g. mol⁻¹, sua solubilidade em água é de 0,367 mg. L⁻¹ em 25 °C e pH 6 ^[22]. O PPF é um pesticida, classificado como larvicida ou inseticida, origem orgânica a base de carbamato, e análogo de hormônio juvenil ^[23]. Além disso, é um composto aromático relativamente estável, com intervalo de meia-vida entre 16 e 21 dias ^[24].

A partir de 2014, utilizou-se o larvicida no abastecimento de água no Brasil para combater a proliferação de larvas dos mosquitos ^[25]. Pois segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), este atua como um agente inibidor do crescimento de larvas de *Aedes aegypti* L. e *A. albopictus* L. ^[26].

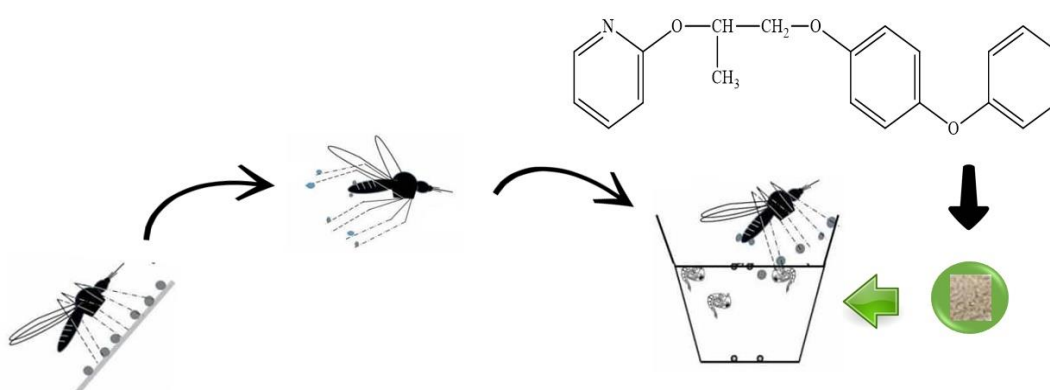
Foi sintetizado e desenvolvido pela *Sumitomo Chemical* (Japão) na década de 1990 ^[27], é aplicado em casas agrícolas, horticultura e tratamento de água corrente ^[24]. Na sua composição se incluem areia de origem vulcânica (pedra-pomes ou púmice) associada a um surfactante ^[28]. Por outro lado, a dose recomendada pela OMS e o fabricante do PPF (SUMITOMO© CHEMICAL, 2012) ^[29] é de 0,01 ppm, dose considerável por provocar uma

inibição de larvas, nesta caracteriza-se por não ser tóxico, não cancerígeno ou genotóxico. Sua atividade varia com a espécie do mosquito, e o seu uso é sozinho ou combinado com adulticidas químicos [21]. Além disso, uma vantagem do PFF é que requer uma menor concentração do que outros larvicidas, como temephos e *Bacillus thuringiensis israelenses* [30].

O inseticida possui modo de ação singular que afeta a metamorfose, reprodução e embriogênese de insetos, além de inibir o surgimento de pupas adultas. Como consequência, a morte geralmente ocorre no estágio pupal (Figura 02). Afetando também as ninfas e resultando em sua mortalidade antes da fase adulta. [30].

Normalmente, quando há um crescimento suficiente de insetos a produção de hormônio juvenil cessa e dispara a mudança para o estágio adulto. O PFF imita a ação de hormônio juvenil e mantém o inseto em um estado imaturo. Todavia, por ser um potente agonista hormonal, o inseticida é classificado como um disruptor endócrino. Um disruptor endócrino é definido como uma substância ou mistura exógena que altera a função do sistema endócrino e, conseqüentemente, provoca efeitos adversos para a saúde provocando efeitos num organismo intacto ou numa população. O PFF atua assim no sistema endócrino em insetos imitando o hormônio juvenil, impedindo assim a muda e subsequentemente inibindo a reprodução [31].

Mecanismo de ação do piriproxifeno



Fonte: Adaptada de (Fundação Oswaldo Cruz - Ministério da Saúde, 2015).

Figura 02. Mecanismo de ação do PFF de como matar inseto no tratamento público de água do Brasil.

Destaca-se como um agente promissor em estratégias de manejo integrado em pragas com importância na saúde, incluindo *Musca domestica*, devido a sua baixa toxicidade em mamíferos ^[32]. No entanto, pode causar mortalidade em invertebrados aquáticos e pequenos peixes. A sua toxicidade tem sido amplamente estudada em espécies de invertebrados, enquanto que no modelo de vertebrados é restrito a poucos estudos. Não havendo relatos de sua toxicidade em aspecto fisiológico, bioquímico e genotóxico, particularmente em vertebrados aquáticos ^[24]. Além disso, tem sido utilizado no controle de mosquitos de *Aedes sp.*, *Culex sp.* e *Anopheles sp.* ^[33].

1.3.2 Piridalil

O larvicida comercial também contém o Piridalil (PYL), pertencente a uma recente classe química de inseticidas sintéticos ^[34]. Possui nomenclatura piridalil [2,6-dicloro-4- (3,3-dicloroaliloxi) fenilo 3- [5- (trifluorometil) -2- piridiloxi] éter propil]. Apresentando os grupos dicloropropenil, diclorofenil e piridil na sua estrutura, além de fórmula molecular $C_{18}H_{14}Cl_4F_3NO_3$ ^[35]. Foi produzido pelo Laboratório de Pesquisa em Química de *Sumitomo Chemical*, agente causador de cicatrizes ou queimaduras na epiderme, e além disso, inibidor de moscas ^[36]. O inseticida também atua no controle contra pragas lepidópteras e thysanopterous em algodão, vegetais e frutas ^[37].

O composto dispõe de uma nova estrutura química não associada a quaisquer outros inseticidas existentes e mostra alta atividade inseticida contra larvas de lepidópteros. Fazendo-se útil para o manejo da resistência de inseticidas e para a proteção no uso de cultura de pragas. Entretanto, detalhes da ação do seu mecanismo em insetos-alvo não são descritos na literatura ^[38].

O PYL possui toxicidade mínima em mamíferos e artrópodes, mostrando atividade inseticida contra mosquitos dípteros, como *Liriomyza spp* ^[39]. Apresenta citotoxicidade e atua na inibição da síntese de proteínas em células de insetos que podem contribuir significativamente para sua seletividade. Age através de exposição cutânea e ingestão (contato e veneno do estômago), é persistente no solo, sedimentos e água, podendo se acumular ao longo do tempo com sua aplicação repetida ^[40].

O composto não atua no sistema nervoso como fazem os pesticidas organofosfóricos e piretróides sintéticos, como também não inibe o sistema respiratório. Possui efeito tóxico para

células de insetos, inibindo o seu crescimento celular ^[41]. Estudos de toxicidade do inseticida, incluindo oncogenicidade aguda, crônica, mutagenicidade e reprodução foram conduzidos anteriormente por possuírem baixa toxicidade aguda, sem oncogenicidade mutagenicidade e teratogenicidade observadas ^[42].

1.4 Química: Cromatografia – tipos

1.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

Cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) tem suas raízes por volta do início do século 20 ^[43]. Também conhecida como cromatografia líquida de alta pressão, é utilizada principalmente para a separação e quantificação dos componentes de uma mistura, e para compostos orgânicos semi-volátil ou não volátil ^[44]. Método avançado em que o solvente flui através da coluna com a ajuda da gravidade, sendo forçado sob altas pressões para que a amostra consiga eluir os diferentes constituintes com auxílio da distinção de suas afinidades ^[45].

No tempo de separação o volume do injetor é capaz de influenciar na eficiência e resolução. No entanto, pode ser um problema sério para o cromatógrafo, pois pode gerar um alargamento de picos, comprometendo sua separação e quantificação. Ao minimizar os volumes indesejados através da diminuição global do tamanho dos sistemas, espera-se uma melhor separação global ^[43].

No sistema em CLAE, compreende uma fase estacionária e uma fase móvel. A fase estacionária é comumente uma coluna sólida com alguns centímetros de comprimento contendo partículas de sílica ligada a uma substância baseada em suas polaridades relativas. Enquanto que a fase móvel é composta por dois solventes de diferentes polaridades, com modo em gradiente, onde a polaridade global pode ser aumentada ou diminuída conforme o desejado. Na fase estacionária, a interação dos compostos em uma mistura é dependente da polaridade do solvente, quanto maior for a diferença da polaridade de diferentes compostos, maior será o tempo de retenção para removê-los da coluna ^[46].

Na CLAE de fase normal, o analito adsorve mais fortemente a fase estacionária com os componentes mais polares, e, portanto, exigem uma fase móvel mais polar para deslocá-los e eluí-los da coluna. Em fase reversa, o analito absorve mais rapidamente os componentes lipofílicos, gerando uma melhor separação quando a polaridade do solvente diminui ^[46].

As fases estacionárias mais utilizadas na CLAE para separação de compostos orgânicos são do tipo fase reversa a base de sílica com grupos C₁₈. Nesta etapa, as fases móveis aplicadas são misturas de metanol:água (CH₃OH:H₂O) ou acetonitrila:água (ACN:H₂O) com ajuste da força cromatográfica e seletividade da fase móvel, até a obtenção da resolução em tempo mínimo de análise ^[47].

As bombas são consideradas como o coração do sistema em CLAE, devido à sua responsabilidade de gerar não apenas altas pressões exigidas, mas também o gradiente na separação da amostra. Em sua maior parte são convencionais ou combinadas com um fluxômetro, a fim de se obter uma redução na taxa de fluxo desejada. Pequenas colunas utilizam pouca fase móvel e assim geram desperdício mínimo, podem representar desafios na geração de um gradiente estável a baixas taxas de fluxo, encontrando detectores adequados e bombas aplicáveis ^[43].

Em suas aplicações, elas passam solvente líquido pressurizado, incluindo uma mistura de amostras que é permitida para entrar em uma coluna com material adsorvente sólido. A interação de cada componente de amostra é variável, e isso causa diferença nas taxas de fluxo em cada componente, dando início a separação dos componentes da coluna ^[45].

Os detectores em CLAE são localizados no final da coluna, distingue os analitos à medida que eluem na coluna cromatográfica ^[45]. Projetados em torno da detecção de uma classe específica de compostos, tornam-se apto para suprir as necessidades dos outros. A classe mais simples de detectores para miniaturizar e, portanto, integrar no sistema em CLAE são os detectores de absorbância, porém há outros, tal como a fluorescência, massa-espectrométrica e identificadores eletroquímicos. Embora a absorbância possa gerar detalhes de informação, o pesquisador é limitado a um subconjunto específico de substâncias baseado em comprimento de onda de luz definidos por este ^[43]. Vale ressaltar que detectores de absorção espectrofotométrica na faixa do UV foram a princípio utilizados nos equipamentos em CLAE para analisar compostos que absorvem na região do ultravioleta, incluindo os surfactantes ^[47].

A CLAE é uma das técnicas analítica que possuem diversos campos de pesquisa ^[48]. Incluindo a indústria farmacêutica, principal técnica analítica, vanguarda da pesquisa de medicamentos; Biomedicina, na separação e análise de amostras biológicas para a detecção de doenças e infecções; Forense, envolvendo a detecção de drogas ilícitas, metabólitos e venenos; Meio Ambiente e Agricultura, na análise de águas residuais das fábricas ou

mineração, estudos dos solos depois de uma fonte de contaminação, além do setor agrícola em pesquisas referentes a herbicidas e pesticidas ^[43].

1.4.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas - CG-EM

A cromatografia gasosa (CG) é um método de separação de misturas de gases (ou vapor), baseada no movimento dos componentes de uma mistura entre as fases móvel e estacionária. Há dois tipos de fases estacionárias que podem ser usadas em CG: adsorventes (cromatografia de adsorção) ou com líquidos viscosos de alta ebulição imobilizados num transportador sólido (cromatografia gás-líquido) ^[49].

Uma análise por CG geralmente requer a confirmação dos resultados obtidos, especialmente ao examinar amostras complicadas, tais como, ambiental, alimentícia, farmacêutica e moléculas incluindo contaminantes agrícolas (pesticidas). Em alguns casos, existem a possibilidade de erros qualitativos e quantitativos causados pela co-eluição, interferências de matriz e mudança dos tempos de retenção. Muitos métodos diferentes foram desenvolvidos para superar esses problemas e confirmar os resultados. Métodos tradicionais para a confirmação em CG são baseados em análises adicionais usando uma coluna de fase com polaridade diferente ^[50]. No modo de eluição a amostra analisada é injetada na coluna e, em seguida, movida ao longo da cromatografia pelo gás de arraste. Neste modo, o cromatograma (ou curva de eluição) consiste em um grupo de picos, em que cada pico é correspondente a um único componente da amostra. Na pesquisa foi realizado na coluna capilar a técnica de injeção sem divisão de fluxo (“*splitless*”). Essa técnica de injeção “*splitless*” é o método escolhido para a análise de soluções diluídas, com transferência da maior parte da amostra vaporizada contida no injetor para o interior da coluna, se difere do método de injeção “*split*” por ser usada para a análise de soluções diluídas, e “*split*”, soluções concentradas ^[49].

Os detectores de CG possuem suas próprias características, sendo específicos para parâmetros operacionais, além disso, fornecem informações valiosas sobre os elementos presentes nas substâncias analisadas. Ressalta-se ainda que a finalidade dos detectores, é identificar os compostos e comparar suas concentrações entre as amostras. Para atingir esse objetivo, o processamento de dados devem atender a dois critérios: (I) determinar corretamente a massa do espectro dos compostos individuais para identificação e; (II) calcular com precisão a abundância de picos cromatográficos correspondentes a esses compostos em

cada amostra. Essas duas tarefas são muitas vezes desafiadora e demoradas, em virtude da co eluição de picos cromatográficos dentro de um único cromatograma, e do deslocamento no tempo de retenção (T_R) dos picos em amostras ^[51].

O detector universal de Espectrometria de massa (EM), é uma técnica analítica chave que permite a identificação de diferentes substâncias em uma amostra, tendo aplicação em análises de pesticidas, possibilita examinar a sua ação devido a sua alta sensibilidade, seletividade, e capacidade de verificar muitos pesticidas de várias classes químicas em matrizes muito complexas em uma única corrida ^[52].

Independentemente do uso e designação, um espectrômetro de massa mede a fragmentação massa/carga (m/z) de moléculas carregadas. Consistindo em três componentes básicos: fonte de íons, analisador onde os íons são separados de acordo com sua relação (m/z), e um detector nos quais os íons são contados. O (s) analisador (es) e o detector de um EM são mantidos em alto vácuo para evitar colisões acidentais ^[51]. E além disso, a medida precisa do (m/z) permite o acesso a uma característica única das moléculas, isto é, seu peso molecular, que muitas vezes é combinado com dados gerados pela fragmentação de moléculas selecionadas ^[53].

A técnica EM permite o uso de pequenas quantidades de amostra (picogramas), assim como em baixas concentrações (parte por trilhão). Suas propriedades como método, no entanto, são parcialmente reduzidas, pela complexidade, custo do aparelho e ocasionalmente quando o analista não compreende suas limitações ^[54]. A EM desempenha atualmente um grande papel na ciência analítica, pois é frequentemente associada a outros detectores em sistemas de multi-deteção. Um detector seletivo adicional é regularmente adicionado ao sistema CG/ EM para a determinação do tempo exato de eluição do analito progredindo a capacidade de identificação ^[50].

1.4.3 Cromatografia em camada delgada - CCD

A cromatografia em camada fina (TLC) ou cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica analítica poderosa devido a sua confiabilidade, simplicidade e reprodutibilidade. Além de que é econômica, uma vez que utiliza menores quantidades de solventes com limpeza mínima na amostra ^[55]. Possui algumas vantagens importantes, como a redução significativa de custo, tempo de análise e capacidade de lidar simultaneamente com

dezenas de amostras ^[56]. Podendo ser preparadas em diferentes adsorventes (por exemplo, sílica, amido, alumina), proporcionando assim uma boa resolução e sensibilidade ^[57].

O método de CCD faz uso de equipamentos acessíveis de laboratório e amplamente disponíveis com aprendizado simples. É dependente de placas prontas, executando todas as operações manualmente. As amostras são aplicadas em placas de CCD em solvente adequado como bandas de tamanho mínimo e com uma distribuição amostral homogênea dentro da zona aplicada. Para camadas finas de partículas, tamanhos pequenos de amostra são necessários para evitar sobrecarga de massa ou volume da camada. Solventes adequados para aplicação de amostra têm baixa viscosidade e são voláteis. Água e outros solventes de alta viscosidade/baixa volatilidade, em geral, não são boas escolhas para aplicação de amostra. Soluções aquosas podem ser diluídas com um solvente orgânico miscível e volátil para facilitar sua aplicação. Suspensões não podem ser aplicadas de forma reproduzível a camadas, pois podem causar o bloqueio de aplicadores da amostra ^[58].

É uma técnica que executa separação de substâncias químicas dissolvidas em virtude de sua migração diferencial sobre placas de vidro revestidas com uma camada fina de um adsorvente. O método, que se tornou uma ferramenta analítica padrão em laboratórios alimentícios e farmacêuticos, é útil para separar os componentes de substâncias que ocorrem naturalmente, como aquelas encontradas em tecidos animais e vegetais, incluindo componentes voláteis e aromáticos. Os componentes da amostra tornam-se separados uns dos outros devido aos seus diferentes graus de fixação ao material de revestimento na placa. O solvente é então evaporado, e a localização dos componentes separados é identificada, geralmente pela aplicação de reagentes que formam compostos coloridos com as substâncias ^[59].

As aplicações importantes de CCD incluem determinação de resíduos de pesticidas, ensaio de formulações, caracterização de pesticidas sintetizados, separação e caracterização de constituintes ativos dos extratos de plantas, fungos e bactérias (biopesticidas), propriedades com estudos de pesticidas como metabolismo e degradação, mecanismo de ação, entre outras. As vantagens da análise de pesticidas por CCD em comparação com outros métodos incluem simplicidade, velocidade, custo relativamente baixo e habilidade de análise múltiplas amostras em uma única placa (alto rendimento) usando pequenas quantidades de solventes como fase móvel, não sendo limitado a compostos alvo voláteis como para CG ^[60].

1.5 Testes biológicos e farmacêuticos

1.5.1 *Artemia salina* L.

A *Artemia salina* L. (camarões de salmoura) é definida como um zooplâncton e crustáceo ramificado com forte flexibilidade para ambientes hipersalinos, com capacidade de sintetizar pigmentos respiratórios eficientes para lidar com os baixos níveis de O₂ em altas salinidades, além de apresentar a capacidade para produzir embriões dormentes (cistos) dependendo da concentração do sal no meio ambiente. Ressaltam-se que a composição do meio aquoso em termos de natureza e concentração de eletrólitos é fundamental para sua sobrevivência e reprodução [61,62]. Pertencente à família Artemiidae, é um artrópode aquático (Figura 03), com idade de aproximadamente 100 milhões de anos. Espécie endêmica de origem mediterrâneo, mas encontrada em todos continentes [63].



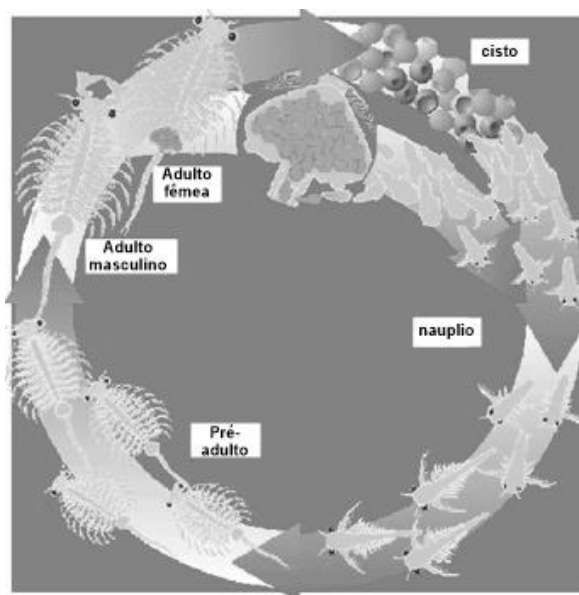
Fonte: (DUMITRASCU, 2011) [63].

Figura 03. *Artemia salina* L.

Utilizados regularmente para avaliar a contaminação de ambientes e analisar a toxicidade de substâncias químicas, são conhecidos por sua geração de tempo curta, incubação de cistos rápidos e alto grau de sensibilidade com variabilidade reduzida. Seus testes também são usados para detectar a toxicidade de moléculas biologicamente ativas [64].

Um aumento na produtividade de cistos deste crustáceo, da mesma forma que a sua uniformização, está no controle dos fatores ambientais, como concentração de oxigênio na

água, flutuação, tipo de comida, bem como salinidade. Seu mecanismo de reprodução, envolvem a produção de ovos que flutuam na água e podem desenvolver em nauplios (larvas) ou em condições desfavoráveis ambientais (secagem da água) que são transformados em cistos. Em condições naturais, este alimenta-se com algas, protozoários e detritos. No seu ciclo de vida (Figura 04), o óvulo fertilizado se desenvolve até o estágio da gástrula, em que ovos eclodem e nauplios (larvas) terão uma cor esbranquiçada, em seguida, cistos (0,2 - 0,3 mm) se transformam em nadadores aquáticos de larvas, ou seja, em nauplios (0,45 mm) por período de 24 a 36 horas, onde o cisto completo por hidratação é de aproximadamente 1 h, contudo, este é dependente da disponibilidade de alimentos em que os nauplios alcançará adultos no máximo 12 mm em 3 semanas. Posteriormente, os nauplios se transformam em adultos reprodutivos que produzem pré-adultos em rápida sucessão quando as condições são favoráveis. A fim de resultar em nódulos de nadadeiras livres de cistos, eles precisam de água (hidratação) e oxigênio para iniciar e completar o metabolismo [63].



Fonte: (DUMITRASCU, 2011) [63].

Figura 04. *Artemia salina* L. - Ciclo de vida.

Por serem amplamente utilizados como alimento vivo para peixes e outros crustáceos, seus ovos podem ser facilmente encontrados em lojas de aquaristas. Os ovos não eclodidos são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos se mantidos desidratados, em vácuo e a baixas temperaturas. Quando úmidos, seus ovos eclodem em cerca de 24 horas, em condições ambientais adequadas, chegando à fase adulta com 20 a 30 dias de

vida. Esse ciclo de vida relativamente curto favorece seu uso em testes de toxicidade aguda e crônica [65].

Características fisiológicas, tais como como disponibilidade pronta, vários estágios de vida e cultura de laboratório simples, faz da *A. salina* L. um organismo modelo adequado para estudos em toxicologia. Recentemente, um número crescente de estudos usou *A. salina* L. como organismo de modelo adequado para investigar a toxicidade através de experiências laboratoriais [66].

Esse bioensaio tem suas vantagens de forma geral por ser um método simples, rápido, sensível e de baixo custo, em que consiste na estimativa da concentração de uma substância através da medida de uma resposta biológica, na qual existe apenas um parâmetro envolvido: vida ou morte. O ensaio de letalidade permite assim a avaliação da toxicidade aguda e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica, sendo aceito pela comunidade científica [67].

1.5.2 *Allium cepa* L.

Uma das técnicas mais utilizadas para detecção de genotoxicidade tem sido o *A. cepa* L., espécie constituída por um dos materiais pioneiro no estudo de alterações cromossômicas causados pela ação de agentes químicos [68]. O *A. cepa* L. caracteriza-se por ser uma planta pertencente à família Liliaceae, uma das mais importantes culturas hortícolas com produção mundial de aproximadamente 55 milhões de toneladas [69].

O gênero *Allium* compreende várias espécies de plantas aromáticas, incluindo cebola, esta possui potencial antioxidante, fornecendo proteção contra os radicais livres. Caracterizada por ser uma planta com longa história de uso medicinal e, adicionalmente, fonte de possíveis fitoquímicos promotores da saúde, incluindo compostos organosulfurados, frutooligossacarídeos e flavonoides [70].

De acordo com o estudo de MALAKAHMAD et al. (2018) [71], células vegetais de *A. cepa* L. são testadas por verificarem efeitos tóxicos e genotóxicos sobre o material genético podendo ser direcionadas a estudos de análise do câncer, frequentemente ligado a danos no DNA.

Ressalta-se ainda que testes derivados de plantas, são excelentes bioindicadores de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de ambientes contaminados por substâncias tóxicas. No entanto, esse recurso é devido a possibilidade de avaliar parâmetros genéticos que

variam de mutação pontual a alterações cromossômicas em células ^[72]. O teste é de fácil execução para avaliar danos cromossômicos e distúrbios no ciclo mitótico porque as células de *A. cepa* L. têm grandes cromossomos em números reduzidos ^[73].

O uso do teste é favorecido por características, tais como rápido crescimento da raiz, baixo custo, alta tolerância a distintas condições de cultivo, elevado número de células em divisão, notável cinética de proliferação, número reduzido de grandes cromossomos, cromossomos em bom estado para estudar danos ou distúrbios na divisão, incluindo a avaliação dos riscos aneuplóides, bem como a fácil disponibilidade e gerenciamento ^[74].

Além disso, é um bioensaio sensível para avaliar a citogenotoxicidade de amostras ambientais, no qual os resultados do teste mostram boas correlações com os sistemas de teste de mamíferos ^[75]. Utilizado para detectar toxicidade de pesticidas, herbicidas e outros xenobióticos. É um ensaio simples e confiável usado para todas as alterações cromossômicas nas células mitóticas, em que a taxa de crescimento da raiz pode ser correlacionada com o índice mitótico ^[76].

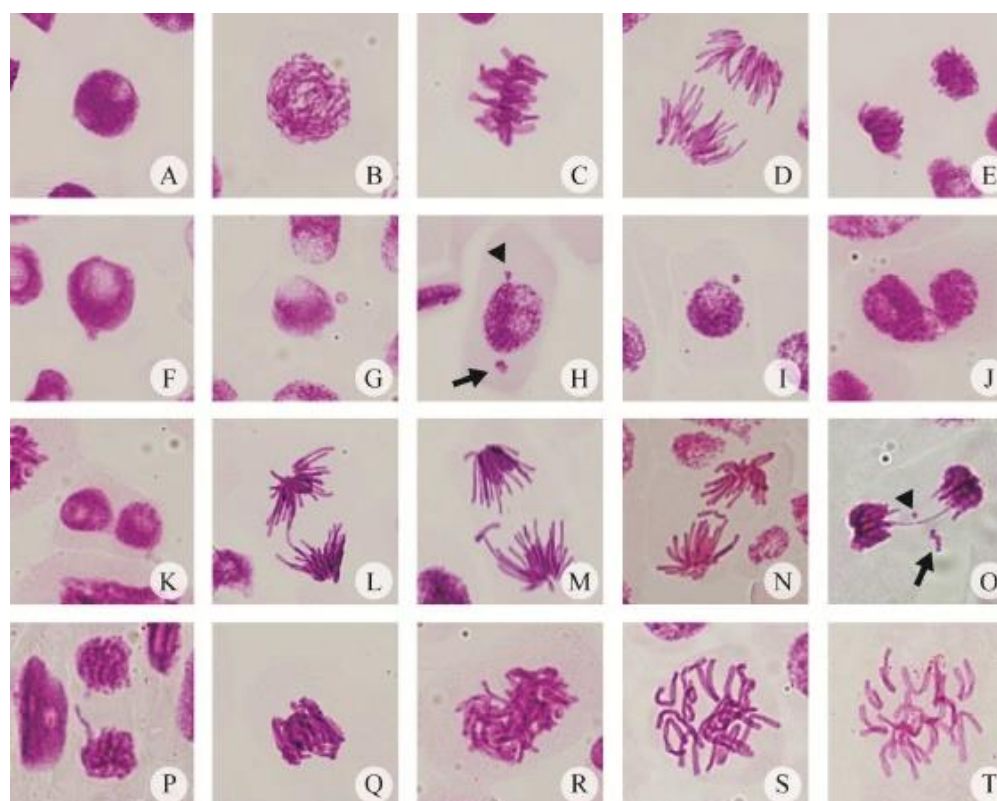
Nesse contexto, os pesticidas são organismos importantes para testes genéticos e monitoramento ambiental, por serem receptores biológicos. Estudos como o de BIANCHI et al., (2015) ^[77] avaliam a ação genotóxica de pesticidas por testes de alteração cromossômica (AC) e micronúcleos (MN). Utilizando-se células meristemáticas de *A. cepa*, encontraram-se resultados positivos com a indução de diferentes tipos de alterações, incluindo os de clastogênicos (quebras de cromossomos e pontes) e origem aneugênica (perda cromossômica), mostrando que este sistema de teste é um modelo apropriado para essas avaliações .

Os danos genéticos são indicativos da presença de substâncias clastogênicas (indutoras de quebras). Pontes anafásico e telofásico são exemplos clássicos desse mecanismo. Alterações cromossômicas como atrasos podem indicar problemas no fuso mitótico. A interrupção do fuso ou a sua formação incompleta pode promover uma segregação incorreta dos cromossomos para as células filhas, gerando anormalidade cromossômica numérica ^[78].

Os compostos considerados aneugênicos, ou seja, aqueles que interferem no fuso mitótico, não afetam diretamente o DNA, mas podem causar erros durante a segregação cromossômica ^[79]. As substâncias aneugênicas caracterizam-se por associar-se às moléculas celulares envolvidos com a segregação das cromátides ou a moléculas que fazem parte das estruturas de DNA, como centrômeros e telômeros. Também são aneugênicas as moléculas

que se associam às estruturas envolvidas no controle do ciclo celular e as moléculas que fazem parte do aparato do fuso mitótico ^[80].

Em relação as alterações cromossômicas (AC), estas são mudanças na estrutura cromossômica, resultante de uma pausa ou troca de material cromossômico. O máximo de alterações cromossômicas observadas nas células são letal, mas há muitas alterações correspondentes que são viáveis e podem causar efeitos somáticos ou hereditários, algumas destas AC se encontram na Figura 05 ^[81].



Fonte: (ANACLETO et al., 2017) ^[82].

Figura 05. Alterações celulares observadas pela análise de células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. A: intérfase normal; B: prófase normal; C: metáfase normal; D: anáfase normal; E: telófase normal; F: intérfase com broto nuclear; G: intérfase com micronúcleo; H: prófase com broto nuclear (cabeça de seta) e micronúcleo (seta); I: prófase com micronúcleo; J: núcleo lobulado; K: célula binucleada; L: anáfase com ponte cromossômica; M: anáfase com quebra cromossômica; N: anáfase com quebra cromossômica; O: telófase com ponte e diferentes tamanhos de quebras (seta e cabeça de seta); P: telófase com cromossomo retardatário; Q: metáfase com aderência cromossômica (viscosidade); R: metáfase poliploide; S-T: C-metáfase.

As quebras cromossômicas podem ser decorrentes de pontes anafásico, sendo originadas por translocações ou por terminações cromossômicas coesivas. É possível que as pontes resultem, também, de aderências cromossômicas, podendo, neste caso, serem múltiplas e persistirem até a telófase, entretanto, quando as pontes cromossômicas resultam de rearranjos estruturais elas podem ocasionar fragmentações cromossômicas [83].

A C-metáfase pode ocorrer devido a produção de números cromossômicos variáveis, isto é, a produção de células diploides. Onde, um desvio muito grande em relação ao número cromossômico normal induzirá a um desbalanço cromossômico, com perda da viabilidade, inativação parcial ou completa do fuso nuclear e aumento da contração cromossômica, esta pode ser referida como um mecanismo causador de sérios danos, podendo ser incluída entre os parâmetros para um *screening* dos efeitos genotóxicos e mutagênicos [83].

A aderência cromossômica, sua atuação na célula possivelmente impede a migração cromossômica para os pólos, devido à sua ação aneugênica. Há então um estacionamento da divisão celular em metáfase, o que provoca uma continuidade na condensação dos cromossomos, que acaba promovendo uma força de contração do conjunto cromossômico total, decorrendo assim em aderências cromossômicas [84].

Os micronúcleos podem ser formados pelos atrasos cromossômicos na anáfase e por fragmentos acêntricos, além disso, micronúcleos derivados de fragmentos acêntricos devem corresponder às regiões terminais dos cromossomos, que foram perdidas durante a quebra cromossômica. A presença desses podem ser originados através de um atraso cromossômico na anáfase, caracterizado por um mau funcionamento do fuso ou ainda devido à presença de fragmentos acêntricos, derivados de uma resposta clastogênica. Assim, agentes químicos podem induzir micronúcleos, por meio de distúrbios do fuso ou de quebras cromossômicas [85].

Portanto, os resultados apresentados nesses testes de citotoxicidade e genotoxicidade podem ser considerados como um indicativo de que a amostra representa também uma ameaça biológica para outros organismos [74].

1.5.3 Saccharomyces cerevisiae

A utilização da levedura *S. cerevisiae* é um dos melhores sistemas unicelulares eucarióticos para estudos de estresse oxidativo [86]. Isso se deve a semelhança da sua

maquinaria celular e aos processos metabólicos desempenhados pela levedura, como sua fácil manipulação genética [87].

As linhagens de *S. cerevisiae* proficientes ou mutadas em suas defesas antioxidantes são comumente utilizadas na avaliação da atividade de compostos, naturais ou sintéticos, frente aos mecanismos de defesa antioxidante destes organismos. As linhagens utilizadas no estudo, foram a SODWT, *Sod1Δ*, *Sod2Δ*, *Sod1Sod2*, *Cat1Δ* e *Sod1Cat1*.

Em relação as linhagens, a *Sod1Δ*, caracteriza-se como um homodímero de cobre e zinco, presente no citoplasma intracelular; a *Sod2Δ*, como um tetrâmero que contém manganês em seu sítio ativo, existente em mitocôndrias de alguns tecidos de animais e leveduras e a *Cat1Δ*, como um tetrâmero constituído por monômeros que possui grupos prostéticos heme no centro catalítico [88].

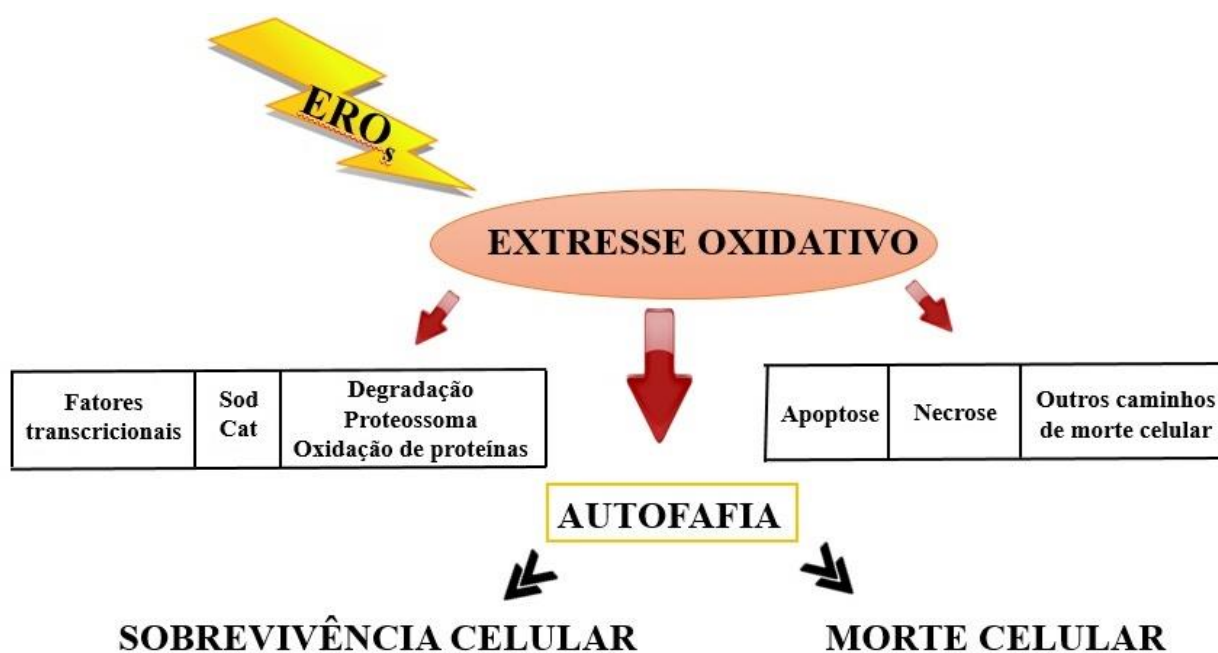
Tendo em vista a existência de enzimas antioxidantes funcionalmente semelhantes à de humanos, a extrapolação de resultados comparativos quanto a segurança na liberação do uso de fármacos e a consolidação de protocolos terapêuticos torna-se mais eficaz [89]. O seu uso é de fácil manuseio, cultivo e rápida multiplicação celular, onde são modelos de pesquisa para análise de propriedades tóxicas e/ou oxidantes em compostos, medicamentos, extratos ou substâncias isoladas [90]. Esta espécie apresenta crescimento ideal entre 25 °C e 30 °C e se reproduz assexuadamente por brotamento ou por cissiparidade [91].

Várias características tornam a levedura um modelo ideal para realizar estudos toxicológicos funcionais, tais como como: falta de patogenicidade; facilidade de manipulação genética, juntamente com condições laboratoriais rápidas e de baixo custo; sistema de armazenamento; sua robustez e resiliência a uma ampla faixa de pH e força, condições comumente encontradas em amostras ambientais; informação disponível para cada gene; possibilidade de reduzir os testes em animais, uma vez que a levedura já foi proposto como um bom organismo modelo para avaliar a toxicidade de poluentes ambientais [91].

Por possuir as mesmas características genéticas que testes empregando animais de laboratório, a levedura *S. cerevisiae* é considerada um dos melhores modelos, podendo ser substituídas por testes *in vivo*, que são de forma geral, de difícil execução e necessitam de um número elevado de animais para assegurar resultados estatisticamente significativos [88].

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são um dos fatores de risco para a carcinogênese, podendo, assim, desempenhar um papel de iniciação e progressão tumoral. Os radicais livres induzem danos oxidativos diretos e indiretos ao DNA contribuindo para a mutagênese, que é essencial para a iniciação do processo tumoral [92,93]. Além de danos no

DNA, os radicais livres podem induzir danos em diferentes tipos de biomoléculas, incluindo as proteínas, lipídios, carboidratos e aminoácidos ^[94]. O estresse oxidativo (Figura 06), induz a acumulação de radicais livres tais como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), H_2O_2 e o radical OH^\bullet que em leveduras ativam fatores transcricionais aumentando a expressão de genes que codificam as enzimas antioxidantes tais como a catalase e a glutatona reduzida (GSH). Estes mecanismos degradam proteossomas e atuam em caminhos citoprotetivos de autofagia, podendo também mediar a morte programada, apoptose e necrose ^[95].



Fonte: Adaptada de (FARRUGIA e BALSZAN 2012) ^[95].

Figura 06. Mecanismos moleculares em resposta às espécies reativas de oxigênio.

Em condições normais, todos os organismos vivos aeróbicos são inevitavelmente expostos a espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo o radical superóxido aniônico ($\text{O}_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$), todos nos quais desempenham papéis significativos na sinalização celular e homeostase. O sistema de resposta antioxidante consiste em enzimas antioxidantes, como a *superóxido dismutase* (SOD), *catalase* (CAT) e antioxidantes não enzimáticos, que participam na ação contra a EROs ^[87]. Os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio são constantemente geradas através de muitos processos biológicos no organismo. A capacidade dos antioxidantes em reduzir o risco de certos tipos de câncer está ligada à sua capacidade de eliminar os radicais livres, reduzir o estresse oxidativo e diminuir a divisão celular anormal ^[96].

Algumas espécies de EROs, potencialmente prejudiciais podem surgir como subprodutos do metabolismo normal e de acidentes químicos. O superóxido é um produto de redução de um elétron de oxigênio molecular que é formado durante a respiração normal nas mitocôndrias e por reações de auto-oxidação. Sua função é atuar como um sistema coordenado e equilibrado para proteger os tecidos e fluidos corporais dos danos causados por EROs, produzidos fisiologicamente ou como resposta à inflamação, infecção e/ ou doença [97].

Já os antioxidantes provavelmente regulam a fase de ativação da apoptose induzida por oxidantes, estes que induzem a transição da permeabilidade mitocondrial e liberam proteínas intermembranas mitocondriais, como o citocromo, o fator indutor de apoptose (AIF) e a caspase mitocondrial [97].

Os estudos sobre radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Embora existam ensaios químicos relativamente simples para avaliação da capacidade antioxidante, estes não são representativos das condições celulares do homem. E, tendo em vista que antioxidantes assumem papel importante na medicina preventiva, é necessário que as informações sejam obtidas a partir de sistemas biológicos [98].

Portanto, esse trabalho de dissertação de mestrado tem como finalidade fazer uma abordagem do comportamento químico do larvicida comercial, em que realizou-se propostas de identificação das substâncias piriproxifeno e piridilil a partir de técnicas cromatográficas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD), Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Na análise biológica e farmacêutica foram executadas por testes de *Artemia salina*, *Allium cepa* e *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes concentrações, baseadas na dose recomendada pela OMS, pois não há relatos sobre estudos em testes de citogenotoxicidade, efeitos oxidativos e ações antioxidantes nesta dose na literatura. Logo, esses testes são necessários, uma vez que o uso de larvicida é um dos principais métodos de controle do *Aedes aegypti* L., além do que, não existem vacinas “eficientes” contra o vírus, por outro lado, efeitos citogenotóxicos podem gerar consequências prejudiciais para o meio ambiente (ecossistema) e saúde.

1.6 Objetivos

1.6.1 Gerais

Realizar propostas de identificação das substâncias piriproxifeno e piridalil a partir de métodos cromatográficos por CLAE-DAD, CG-EM e CCD, além de avaliar efeitos citotóxicos e oxidativos do piriproxifeno no controle de *Aedes aegypti* L

1.6.2 Específicos

- Realizar testes químicos para possível identificação do piriproxifeno e piridalil no larvicida comercial, por meio de técnicas cromatográficas (CLAE-DAD, CG-EM e CCD);
- Verificar os efeitos de toxicidade em diferentes concentrações do inseticida no crustáceo *Artemia salina*;
- Analisar os danos citogenotóxicos em células meristemáticas de *Allium cepa*;
- Avaliar os possíveis efeitos oxidativos/ antioxidantes induzidos pelo larvicida comercial em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

Capítulo 2

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

2.1 Amostra

Larvicida comercial lote 5A42F4 (Figura 07), possui formulação granular (G), sólido, contém 5,1 g. kg⁻¹ de piriproxifeno puro, fabricante *Sumitomo© chemical*, fornecido pela Secretaria Municipal de Saúde de Água Branca no período de agosto de 2016 (Anexo 01).



Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

Figura 07. Amostras de larvicida comercial utilizadas no estudo.

2.2 Preparação das amostras

O larvicida comercial, foi submetido a maceração e extrações sucessivas por partição seguidas de roteovaporações por um período de três semanas, com o objetivo de separar o PFF dos constituintes arenosos. Essa extração foi feita a partir de 100 g de amostra na qual obteve-se uma massa final de 2,44 g, utilizou-se como solvente o metanol (CH₃OH). As

amostras foram preparadas no Laboratório de Química Orgânica – Produtos Naturais do Instituto Federal do Piauí – IFPI.

O larvicida comercial foi avaliado em formulação comercial, onde as concentrações testadas foram baseadas na dose de campo do pesticida, seguidas de diluições em água. Em que a concentração de campo do inseticida PFF da OMS é de 0,01 ppm ^[99]. Assim as concentrações propostas para o estudo do pesticida nos testes biológicos *A. salina*, *A. cepa* e *S. cerevisiae* foram de (0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 e 1000 ppm).

2.3 Química e Reagentes

O solvente utilizado no processo de extração foi o metanol pertencente a marca Synth e Dinâmica, P.A. Os padrões como CP $K_2Cr_2O_7$ (Dicromato de Potássio), MMS (Metanosulfonato de metila) e H_2O_2 (Peróxido de Hidrogênio), foram utilizados para os testes de *A. salina*, *A. cepa* e *S. cerevisiae*. Os demais, NaCl (Cloreto de Sódio), $MgSO_4$ (Sulfato de Magnésio), $CaCl_2$ (Cloreto de Cálcio), KCl (Cloreto de Potássio), $NaHCO_3$ (Bicarbonato de Sódio), foram comprados comercialmente de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), o carmim acético é da marca Vetec®. Para as análises em CLAE-DAD e CG-EM, utilizou-se metanol e acetonitrila de grau espectroscópico das marcas Vetec® e AppliChem Panreac®. A água ultrapura empregada foi obtida através do aparelho Elga Purelab Option-Q.

2.4 Análise Instrumental

2.4.1 CLAE-DAD

A análise CLAE-DAD foi realizada a temperatura ambiente usando um cromatógrafo líquido analítico *Shimadzu*, modelo LC20A e controlador CBM- 20. Foi injetado 1 mg do larvicida comercial, com método isocrático de 30 minutos, o isocrático consistia em uma mistura de (80% acetonitrila e 20% metanol), em seguida submetidos ao processo de *clean up* em cartucho Chromabond® C_{18} (previamente ativado com CH_3OH), fase estacionária coluna C_{18} fase reversa (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 μm), marca *Macherey-Nagel* e filtrada com membrana 0,45 μm , o forno da coluna foi aquecido a 40 °C e taxa de fluxo de 1,0 mL. min^{-1} , utilizando um cromatógrafo de detector UV-vísivel ^[100]. A análise foi realizada no Laboratório de Química Orgânica – Produtos Naturais do Instituto Federal do Piauí – IFPI.

2.4.2 CG-EM

A análise por GC-EM foi realizada num cromatógrafo a gás Shimadzu (modelo TQ8030, Shimadzu ®, Kyoto, no Japão) acoplado a um espectrômetro de massa equipado com um analisador quadrupolo (modelo CGEM-QP2010, com injetor automático, Tocantins, Brasil). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna capilar Rtx-5MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. A temperatura do injetor foi de 250 °C, as injeções (10 µL larvicida comercial) foram feitas em modo de injeção *splitless*. O gás de arraste foi hélio (99,999%) a um fluxo constante de 1 mL/min, com velocidade linear de 44.5 cm.s⁻¹, e pressão inicial de 100 KPa. O programa de temperatura do forno foi de (80 °C (2min) → (20 °C/ min) → 180 °C → (5 °C/ min) → 280 °C (3min). Os espectros de massa foram obtidos no modo de ionização de elétrons (EI) a 70 elétron-volts (eV) e faixa de massa de 50 a 290 Da, usando o *software Data analysis*. A linha de transferência e as temperaturas da fonte de ionização foram 280 °C e 150 °C, respectivamente ^[101]. Os resultados das análises foram expressos em abundância relativa. A identificação dos compostos foi realizada comparando os espectros de massa obtidos com os espectros da NIST 2.0 Library, 2012 (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, Gaithersburg, Md, EUA).

2.4.3 CCD

Foi realizada utilizando cromatoplasmas de camada fina de sílica gel 60f254 (20 cm x 20 cm, 0,25 mm de espessura). Os sistemas solventes utilizados para desenvolvimento bidimensional foram: clorofórmio/ metanol, 9:1 (v/v); clorofórmio/ metanol, 95:05 (v/v); clorofórmio/ metanol, 99:1 (v/v); clorofórmio, 100 (v/v); clorofórmio/ hexano, 8:2 (v/v); clorofórmio/ acetato de etila, 8:2 (v/v); clorofórmio/ acetato de etila, 7:3 (v/v). Foram utilizados os reveladores Vapores de Iodo e Molibdato Cérico de Amônio. Os resultados foram expressos com a intensidade de coloração após revelação das cromatoplasmas. Em que o teste foi executado no Laboratório de Química Orgânica – Produtos Naturais do Instituto Federal do Piauí – IFPI.

2.5 *Artemia salina*

Para o experimento foram utilizados ovos de *A. salina* adquiridos em loja especializada em produtos para aquário no município de Teresina, Piauí, Brasil.

Os ovos de camarão (20 mg) foram incubados em água salgada artificial (15,15 g.L⁻¹ de NaCl, 1,88 g.L⁻¹ de MgSO₄, 0,65 g.L⁻¹ de CaCl₂, 0,41 g.L⁻¹ de KCl em 1000 mL de água) a 25 °C e iluminação 9 W. Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) foi utilizado como tampão a pH 10,0 da solução de salmoura. Depois de 48 h de incubação, 10 nauplios vivos (*A. salina*) foram transferidos para cada tubo de ensaio ^[102]. O volume final de cada amostra foi ajustado para 5 mL com solução salina artificial (solução de salmoura) e 1 mL do larvicida comercial em cada dose. As amostras foram mantidas sob incubação por 24 h e 48 h. Nauplios vivos foram contados para determinar o número de mortes por amostra. Água salina artificial e K₂Cr₂O₇ foram utilizados como controles negativo (CN) e controle positivo (CP), respectivamente. Cada tratamento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de mortalidade. Teste feito em Laboratório de Química Orgânica – Produtos Naturais do Instituto Federal do Piauí – IFPI.

2.6 *Allium cepa*

Os testes de citogenotoxicidade realizados com o *A. cepa* foram baseados no protocolo estabelecido por LEME e MARIN-MORALES (2009) ^[103], com pequenas adaptações. Utilizaram-se 100 sementes de *A. cepa* (Vale ouro IPA 11) de um mesmo lote e variedade germinaram à temperatura ambiente (25 °C) em placas de Petri contendo água destilada por período de quatro dias, até que as radículas atingiram 2 cm de comprimento. Então, estas radículas foram expostas a diferentes concentrações do larvicida comercial, onde permaneceram um período de 24 h à temperatura ambiente. O CP foi feito com MMS (Sigma-Aldrich, CAS No. 66-27-3) com concentração 10 ppm e CN com água destilada.

Depois de um período de exposição, as raízes foram fixados em Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético; v:v) e mantidas sob refrigeração a -20 °C. Para a preparação das lâminas, as radículas foram submetidas à três lavagens de cinco minutos em água destilada. A hidrólise das radículas foi realizada em frascos de âmbar imersos com ácido clorídrico HCl (1 M) e aquecidos em banho maria, durante um tempo de 10 minutos e temperatura de 60 °C. Após a hidrólise, as radículas foram introduzidas por três lavagens com água destilada e transferidas para frascos de vidro âmbar. Em seguida, submetidas ao reativo de Schiff, por 2 h no escuro.

As radículas foram lavadas novamente e as regiões meristemáticas separadas, cobertas com lamínulas e esmagadas cuidadosamente em uma gota de carmim acético 2% (Vetec), para análise microscópica subsequente em microscópio de luz (aumento de 400 x).

A citogenotoxicidade foi avaliada pela contagem, em microscópio de luz (aumento de 400 x), de 5.000 células meristemáticas (500 células/lâmina; total de 10 lâminas analisadas) para cada tratamento e para os controles (negativo e positivo). Foram avaliados: (1) índice mitótico (citotoxicidade) e (2) índice de alterações cromossômicas (genotoxicidade). Executados no Laboratório de Genética- LABGENE/ UESPI.

2.7 *Saccharomyces cerevisiae*

Trata-se de um estudo experimental de caráter analítico descritivo, no qual foram utilizadas seis linhagens de leveduras da *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e mutadas em suas defesas antioxidantes. As cepas do teste de *S. cerevisiae* utilizadas neste estudo são mostradas na Tabela 01. As linhagens foram gentilmente fornecidas pelo Dr. E. Gralla (Universidade da Califórnia, Los Angeles, EUA).

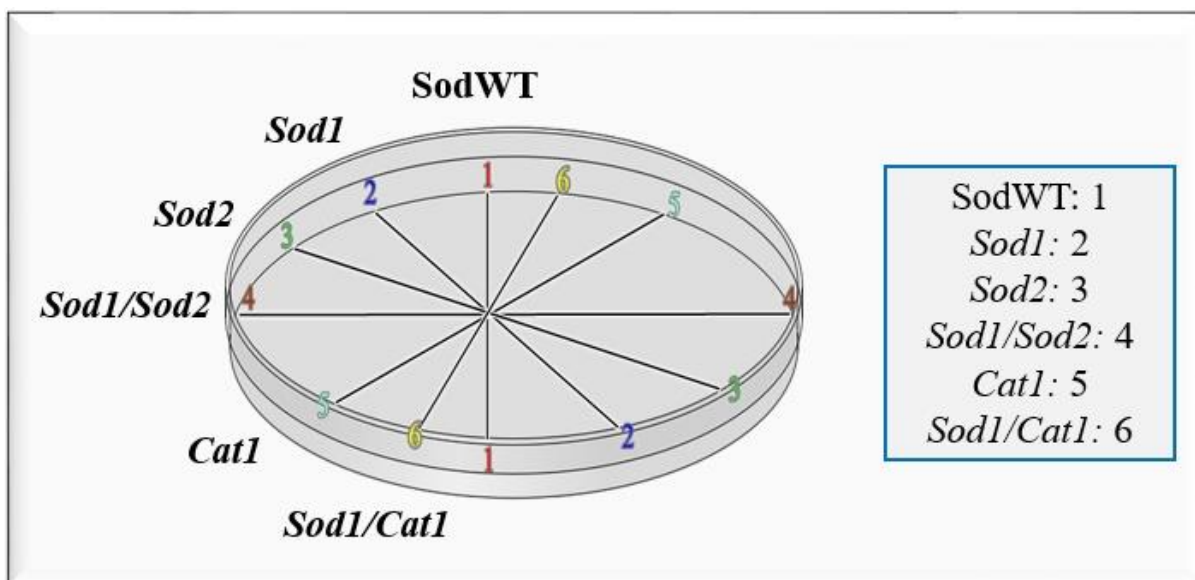
Tabela 01. Linhagens e genótipos de *S. cerevisiae* usadas no estudo.

Descrição	Genótipo	Deficiência em defesas enzimáticas	Origem
EG103 (SODWT)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52	Nenhum	Edith Gralla, Los Angeles
EG118 (<i>Sod1Δ</i>)	Sod1::URA3 todos os outros marcadores como EG103	Cu-Zn superóxido dismutase (citoplasmático)	Edith Gralla, Los Angeles
EG110 (<i>Sod2Δ</i>)	Sod2::TRP1 todos os outros marcadores como EG103	Mn superóxido dismutase (mitocondrial)	Edith Gralla, Los Angeles
EG133 (<i>Sod1ΔSod2Δ</i>)	Sod1::URA3 Sod2::TRP1 mutante duplo todos os outros marcadores como EG103	Superóxido dismutase citoplasmático e mitocondrial	Edith Gralla, Los Angeles
EG223 (<i>Cat1Δ</i>)	EG103, except Cat1::TRP1	Catalase citoplasmático	Edith Gralla, Los Angeles
EG (<i>Sod1ΔCat1Δ</i>)	EG103, exceto Sod1::URA3 e Cat1::TRP1	Cu-Zn superóxido dismutase e catalase citoplasmático	Edith Gralla, Los Angeles

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

O crescimento das células foi feito em meio de cultura líquido (YEL) contendo 0,5% de fermento extrato de levedura, 2% de bacto-peptona e 2% de glicose a 28 °C em um agitador orbital até atingir a fase de crescimento estacionária, de acordo com ROSA et al. (2006) [104]. Uma suspensão contendo 1×10^8 células. mL⁻¹ foram agitados durante 3 h a 30 °C, as células foram então colhidas por centrifugação e lavadas duas vezes com tampão fosfato. A densidade celular foi determinada usando uma câmara de contagem de Neubauer e as linhagens foram então manchadas em placas de petri contendo os agentes oxidantes.

Em um ciclo de inoculação das células de suspensão foram adicionados 10 µL de cada concentração do larvicida comercial e espalhados do centro para a borda de uma placa de Petri em um curso contínuo, para ambos os lados da placa (Figura 08). As placas foram incubadas por 2 dias a 30 °C. Para o (CN) foi adicionado 10 µL de solução fisiológica (0,9 %) e para o (CP) foi adicionado 10 µL do agente oxidante H₂O₂ (10 mM) sobre o disco central em placas de Petri, com posterior direcionamento à estufa por 48 h. O crescimento foi medido em centímetro da inibição do crescimento da borda do filtro-disco ao início do crescimento celular. Valores podem variar de 0 cm (crescimento completo para o filtro-disco) para 4 cm (ausência de crescimento para a borda do Placa de Petri). Todos os ensaios foram realizados em quadruplicada no Laboratório de Genética Toxicológica, LAPGENIC/ UFPI.



Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

Figura 08. Modelo experimental e posicionamento das linhagens utilizadas no ensaio com *S. cerevisiae*.

2.8 Análise Estatística

Em *A. salina* L. e *A. cepa* L. os valores foram expressos em médias e desvio padrão (DP), e os dados verificados pelo teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, seguido do teste “*a posteriori*” de *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$), do programa *GraphPad Prism* versão 6.00 para Windows, *GraphPad Software*, San Diego California USA, Copyright ©, posteriormente realizado a comparação entre as médias dos controles e grupos tratados.

Para *S. cerevisiae*, os resultados obedeceram a uma distribuição normal e foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA), pelo teste *Bonferroni* através do programa *GraphPad Prism* versão 6.00 para Windows, *GraphPad Software*, San Diego California USA, Copyright ©.

Capítulo 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cromatografia

3.1.1 *Cromatografia líquida em alta eficiência – CLAE-DAD*

O *screening* do larvicida comercial por CLAE-DAD foi obtido nos dois comprimentos de onda de 272 nm e 208 nm. Pode-se verificar a presença de dois picos intensos com tempo de retenção de 3,338min e 4,036min, respectivamente, no qual é possível identificar os comprimentos de ondas característicos do piriproxifeno e piridalil, de acordo com as figuras 09 e 10 ^[100].

As figuras 09 e 10 apresentam cromatograma e os espectros de UV do larvicida comercial, modo isocrático com ACN:CH₃OH 80:20% em 272 nm, observado o espectro no UV para o tempo de retenção do piriproxifeno os seguintes comprimentos de onda 209 e 258 nm. E para o piridalil comprimento de onda máximo foi de 271 nm, inserte absorvido no ultravioleta e observado o espectro no UV para o tempo de retenção do piridalil os comprimentos de onda 203 nm e 271 nm.

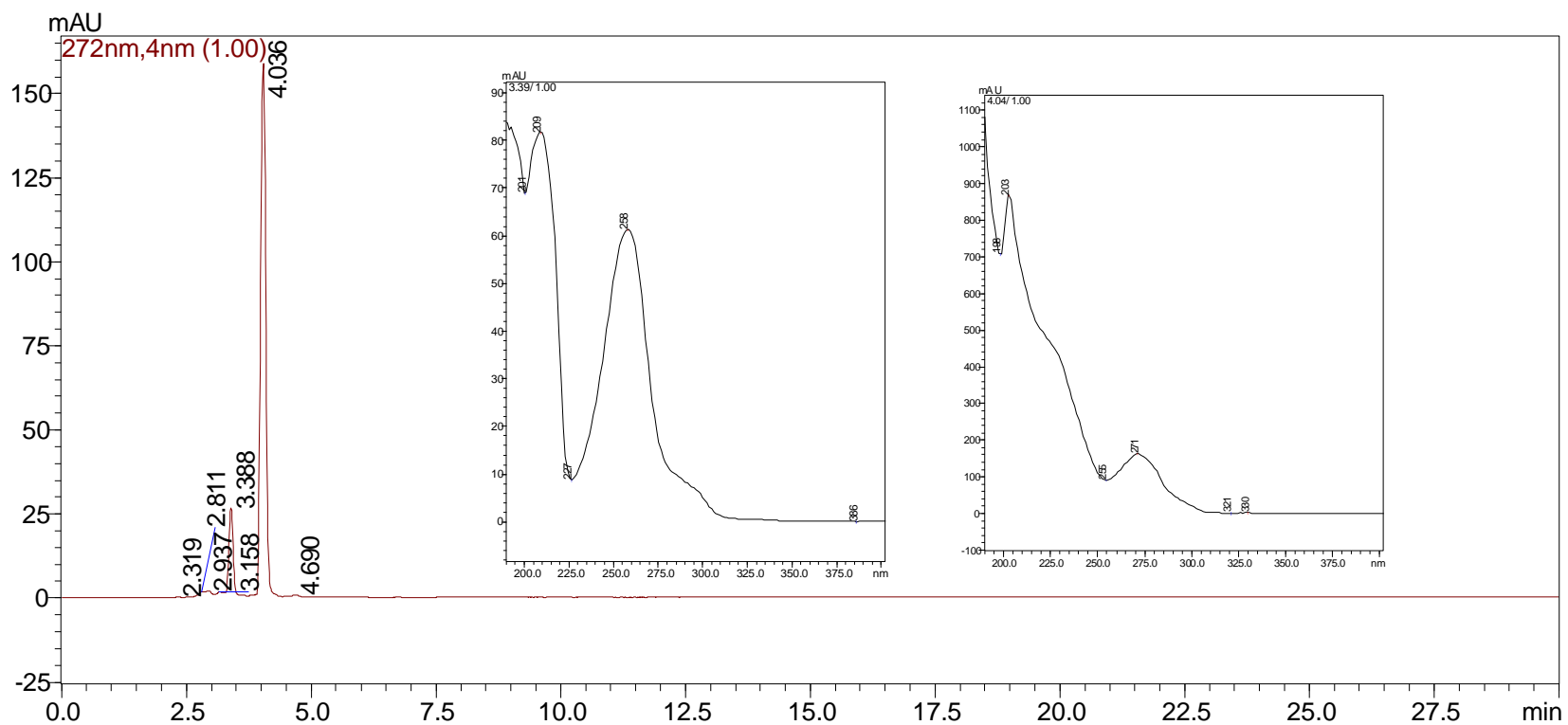


Figura 09. Cromatograma analítico do larvicida comercial em CLAE-DAD, modo isocrático ACN:CH₃OH 80:20% em 60min, solução de 1 mg. mL⁻¹, fluxo 1 mL. min⁻¹, C₁₈ fase reversa, comprimento de onda 272 nm, inserte observado os espectros no UV os comprimentos de onda 209 nm e 258 nm do piriproxifeno no tempo de retenção 3,338min, e espectros no UV em λ 203 nm e 271 nm no T_R 4,036min para o piridalil.

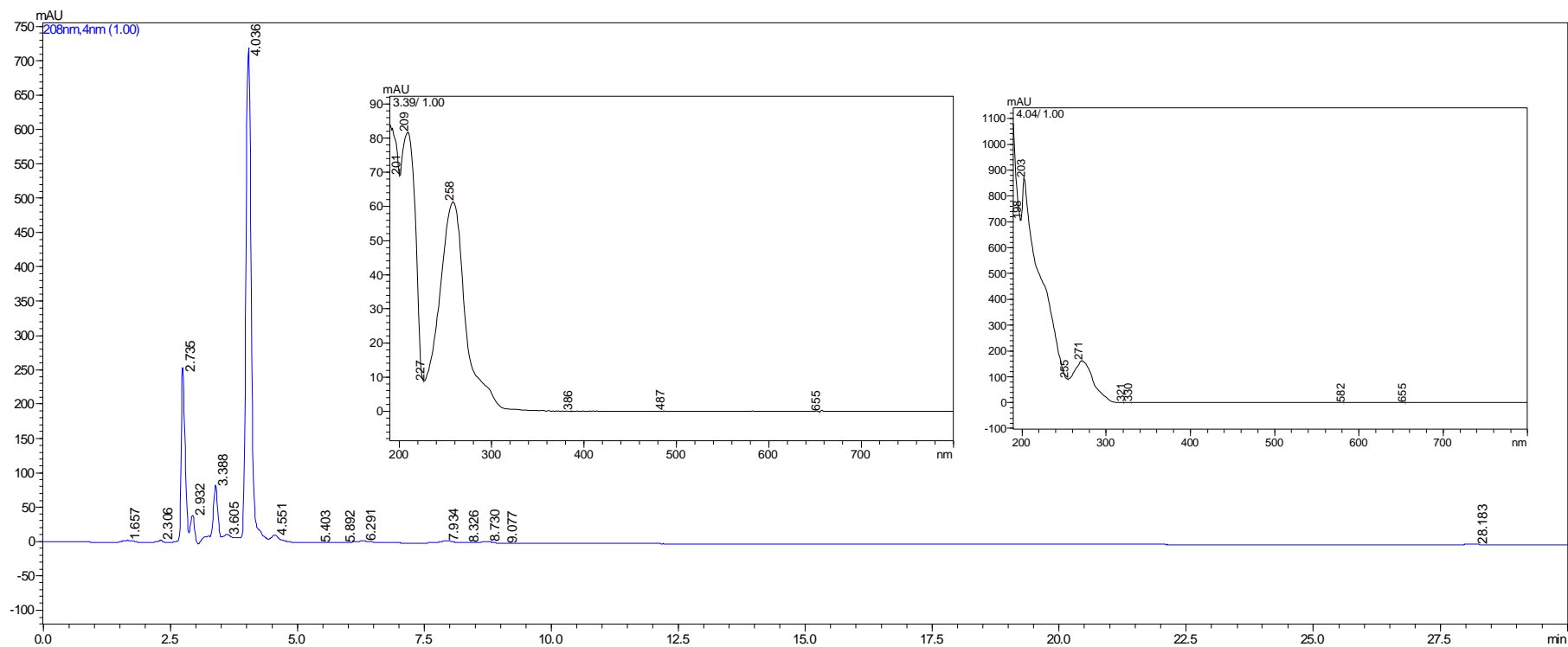


Figura 10. Cromatograma analítico do larvicida comercial em CLAE-DAD, modo isocrático ACN:CH₃OH 80:20% em 60min, solução de 1 mg. mL⁻¹, fluxo 1 mL. min⁻¹, C₁₈ fase reversa, comprimento de onda 208 nm, inserte observado os espectros no UV os comprimentos de onda 209 nm e 258 nm do piriproxifeno no tempo de retenção 3,338min, e espectros no UV em λ 203 nm e 271 nm no T_R 4,036min para o piridaliil.

O comportamento dos inseticidas piriproxifeno e piridaliil expostos à luz UV é mostrado pelos espectros. Onde os espectros observados para o piriproxifeno de 209 nm e 203 piridaliil podem indicar em geral uma transição $n \rightarrow \sigma^*$, segundo PAVIA et al. (2012) ^[105], uma única banda de intensidade baixa para média em comprimentos de onda menores que 220 nm nessa transição, indica, em geral, uma possibilidade do grupo funcional éter no composto. Para o espectro de absorção máximo do piriproxifeno de 258 nm e 271 nm piridaliil, indicam, em geral, uma transição $n \rightarrow \pi^*$, em que uma única banda de intensidade baixa e média na região entre 250 nm e 360 nm, sem nenhuma absorção forte em comprimentos de onda menores (de 200 nm a 250 nm), indica um cromóforo simples não conjugado, normalmente um que contenha um átomo oxigênio, nitrogênio, enxofre, como também inclui os espectros ultravioletas da piridina ^[105].

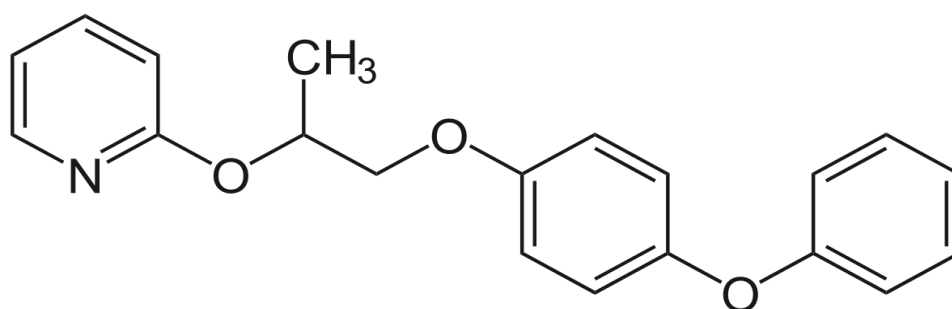


Figura 11. Estrutura química do piriproxifeno.

Além disso, para radiações de UV-Vis com comprimentos de onda máximo acima de 200 nm, também são indicativos da presença de sistemas aromáticos ^[105], o que pode ser observado nas estruturas químicas do piriproxifeno e piridaliil (Figura 11 e 12).

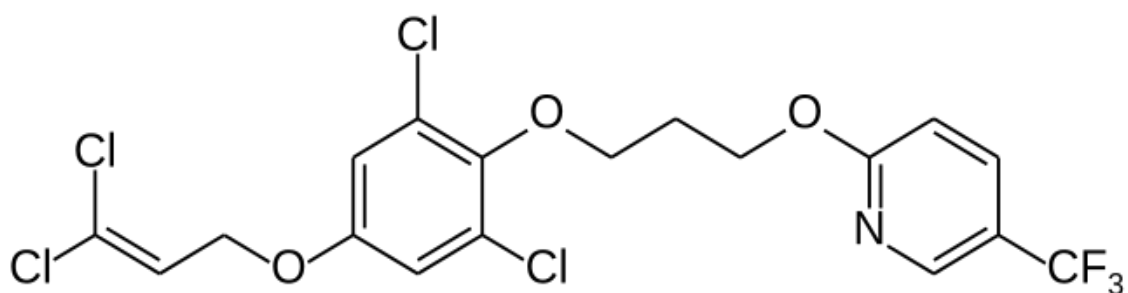


Figura 12. Estrutura química do piridaliil.

Assim, a CLAE-DAD foi aplicada para propor a possível identificação do piriproxifeno no larvicida comercial. FAROUK et al. (2014) ^[100] determinou o uso destes

pesticidas em tomates através de técnicas com análises cromatográficas em CLAE, monitorados 272 nm para piriproxifeno e 208 nm piridalil, obteve picos nos tempos de retenção de 3,3min e 4,0min para piriproxifeno e piridalil, respectivamente. Além disso, também foi relatado pela literatura de (SULLIVAN e GOH, 2008) ^[31], o espectro no ultravioleta do piriproxifeno em comprimento de onda máximo em 270 nm.

3.1.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Na análise do larvicida comercial por GC-EM foi possível propor a identificação do piriproxifeno, no qual verificou a presença majoritária do PFF no tempo de retenção (T_R) de 22.137 min, apresentando índice de similaridade de 92, 8% (Figura 13).

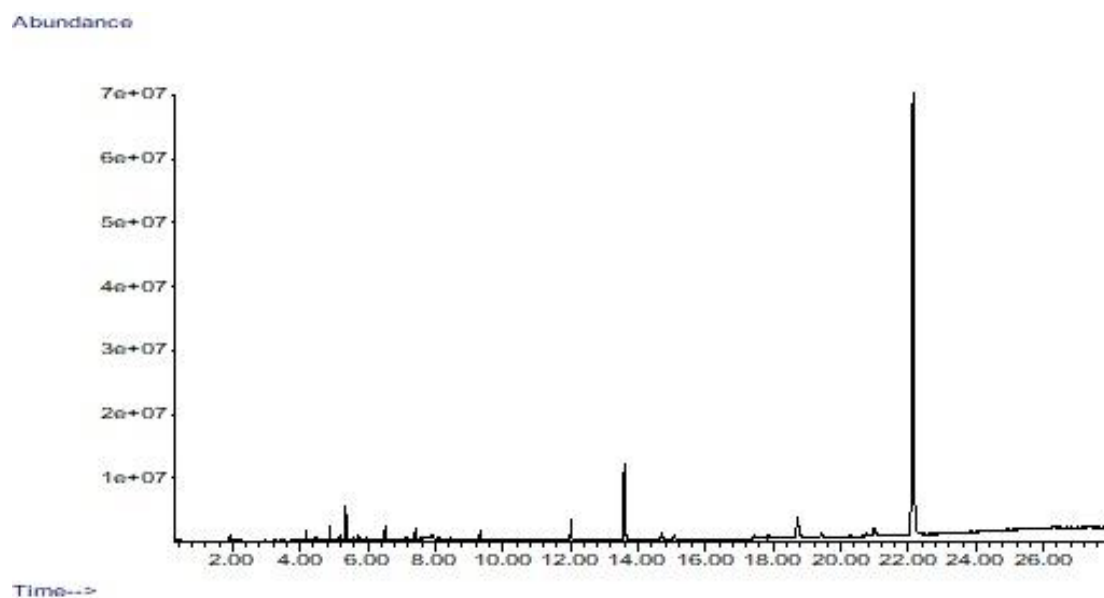


Figura 13. Cromatograma da análise do larvicida comercial injetado em CG-EM.

A proposta de identificação também foi baseada na análise do padrão de fragmentação observado no espectro de massa do Piriproxifeno (Figura 14). Para o composto majoritário piriproxifeno os fragmentos de massa característicos são: m/z 96, 136, 186 e 226. Onde o fragmento m/z (136) corresponde pico-base (ABDU et al., 2001) ^[106] (Figura 15).

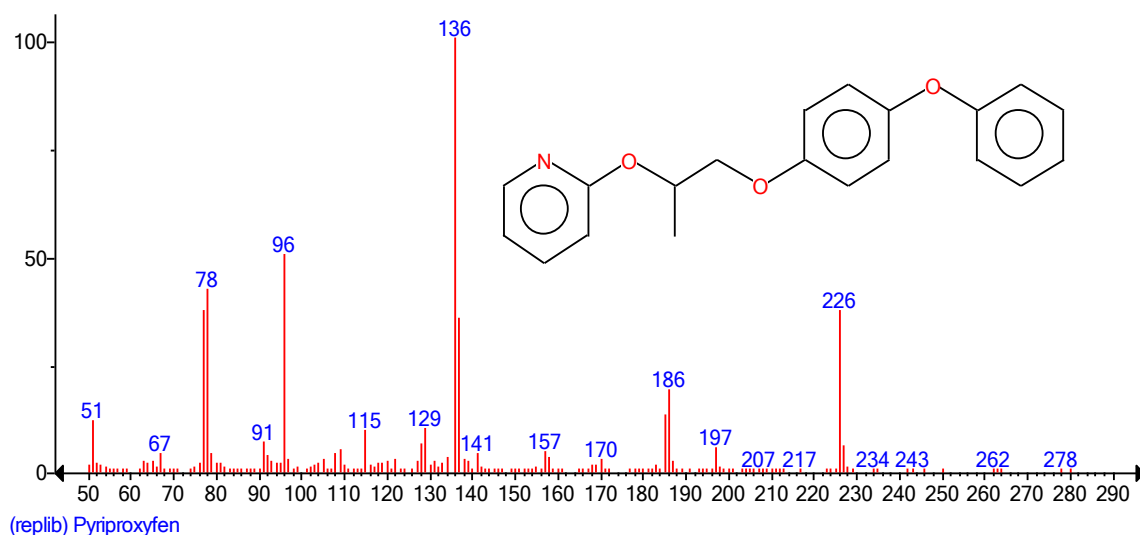


Figura 14. Espectros de massas do composto Piriproxifeno.

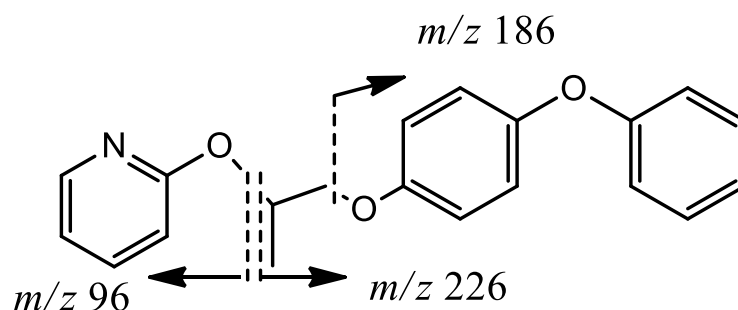


Figura 15. Proposta de fragmentações do piriproxifeno.

3.1.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD é uma técnica simples, rápida, robusta e de baixo custo, utilizada para identificação ou separação das substâncias que acontecem devido à diferença de polaridade que cada uma apresenta, ou seja, o composto que interage mais com a fase estacionária (sílica gel, alumina, celulose), onde este percorre uma distância menor do que o composto que tem uma maior interação pela fase móvel ou sistema solvente. Assim, uma boa separação depende do sistema solvente escolhido e da polaridade do material, tendo em vista que uma mistura de solventes para a fase móvel garante uma melhor separação dos compostos [107, 108].

Segundo LINI et al. (2014) [109], essa técnica está fundamentada na separação de

substâncias através das suas diferentes velocidades de migração em razão da afinidade relativa com solventes, fixando-se na fase sólida. Desse modo, a eficiência da extração depende da natureza química do solvente de eluição, onde no referente estudo solventes de diferentes polaridades foram verificados (Tabela 02).

Tabela 02. Análise cromatográfica em camada delgada do larvicida comercial com solventes de diferentes polaridades e diferentes proporções.

Mistura soluções	Proporção	Eluição	Fator de Retenção (Rf)
Clorofórmio/ metanol	9: 1	+	-
Clorofórmio/ metanol	95:05	+++	-
Clorofórmio/ metanol	99: 1	++++	-
Clorofórmio	100	-	-
Clorofórmio/ hexano	8: 2	++++	² 0,41 ¹ 0,38
Clorofórmio/ hexano	7:3	+++++	² 0,41 ¹ 0,30
Clorofórmio/ acetato de etila	8: 2	+++	-
Clorofórmio / acetato de etila	7: 3	-	-

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

Legenda: (+++++): melhor eluição (separação); (+++) – boa eluição; (++) ruim eluição; (+) regular eluição; (-) não separou.

A fase móvel utilizada em CCD não deve ser pouco polar, incapaz de remover os compostos do ponto de aplicação, e nem muito polar, capaz de arrastar os compostos até o topo da placa cromatográfica. Sendo assim, melhores resultados são obtidos com misturas de solventes ^[110].

O eluente escolhido para iniciar a eluição foi a mistura de hexano acetato de etila (8:2), uma vez que os constituintes menos polares ficaram distribuídos na placa com Rf menor que 0,5 (ideal eluição). Entretanto, procedimentos foram usados através de CCD de gel de sílica usando como fase móvel: hexano-AcOEt, clorofórmio-AcOE, clorofórmio-CH₃OH,

clorofórmio e Clorofórmio/Hexano em diferentes proporções. Contudo, foi possível observar que a partir da mistura dos solventes utilizados com clorofórmio/hexano foi obtido um maior “arraste” do piriproxifeno, tendo como adstringente a sílica gel, e o fator de retenção. Então, após a revelação por Molibdato Cérico de Amônio, essa mistura de clorofórmio/hexano houve um maior deslocamento da substância. A partir desse “arraste” foi possível calcular o fator de retenção para cada placa cromatográfica. Onde apresentou resultados satisfatórios de Rf (mais próximo a 0,50). Sendo assim, a melhor eluição foi a mistura clorofórmio/hexano (7:3) (“menos” polar), o que é coerente, pois o piriproxifeno na sua composição há areia de origem vulcânica (pedra-pomes ou pumice) associada a um surfactante, apresentando uma ligeira solubilidade em água, tendo assim “pouca” afinidade com substâncias polares.

A posição de cada molécula na mistura pode ser medida pelo cálculo da relação entre as distâncias percorridas pela molécula e o solvente. Este valor de medição é chamado de mobilidade relativa ou fator de retenção e expresso com um símbolo Rf, este valor é usado para a descrição qualitativa das moléculas, pode ser definido como a relação entre as distâncias percorridas pelo composto em uma amostra, dividido pelas distâncias percorridas pelo solvente. Um Rf sempre estará na faixa de 0 a 1, porém, o valor ideal da posição de um soluto é quando este se encontra em 0,50. Assim, outros componentes dessa amostra teriam possibilidade de se separar acima ou abaixo do mesmo. Estes valores também seriam mais confiáveis já que as duas distâncias seriam medidas com maior precisão ^[107,111].

3.2 *Artemia salina*

Segundo EL FELLS et al. (2016) ^[64], conceitua este, como um teste biológico utilizado para verificar a toxicidade de várias substâncias químicas. Desse modo, o presente estudo no tempo de exposição de 24 h, foi significativo para quase todas as concentrações analisadas, exceto, as três maiores doses (10; 100 e 1000 ppm), porém, apesar da significância, não apresentaram toxicidade para nenhuma das concentrações nesse período. Já para o tempo de incubação de 48 h, pode-se verificar um maior percentual de mortalidade das larvas de *A. salina* em todas as concentrações, contudo, foram significativas apenas para as maiores doses (1; 10; 100 e 1000 ppm), quando comparadas ao controle negativo (CN). Ressalta-se ainda que para a maior concentração testada (1000 ppm), observa-se morte em mais de 80% das larvas em 48 h de exposição (Figura 16).

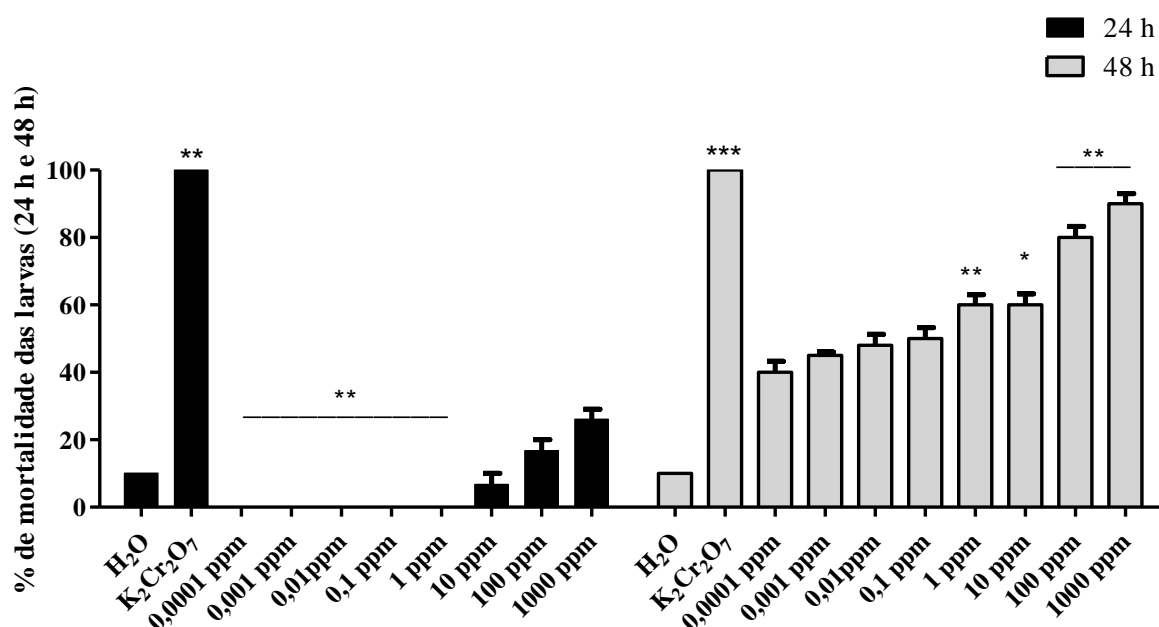


Figura 16. Percentual de mortalidade das larvas de *A. salina* no tempo de incubação de 24 h e 48 h expostos as doses do larvicida comercial. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão, pelo teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, pós-teste *Student-Newman-Keuls*. Valores de significância para ***($P < 0,001$), **($P < 0,01$) e *($P < 0,05$), quando comparados ao CN (água destilada).

Em relação as menores concentrações no tempo de 24 h, estas não apresentaram mortalidade das larvas, contudo, foram significativas as concentrações (0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 ppm). Os resultados obtidos revelaram um efeito não tóxico nestas concentrações em *A. salina* L., quando combinado com o larvicida comercial, denotando um efeito protetor deste inseticida em 24 h de exposição. De acordo com GAMBARDELLA et al. (2018)^[112], os inseticidas a base de carbamatos como o piriproxifeno no estudo são eficazes na inibição da incubação em *A. salina*. Além disso, segundo (RAND et al., 1995)^[113], a toxicidade depende da concentração e das propriedades da substância química à qual o organismo é exposto, como também do tempo de exposição. Ensaio de toxicidade revelam o tempo e/ou a concentração em que o material em estudo é potencialmente prejudicial, em que para qualquer produto o contato com a membrana ou sistema biológico pode não produzir um efeito adverso se a concentração do produto for baixa, ou o tempo de contato for insuficiente^[114].

Por outro lado, os resultados também indicaram que a medida que o tempo de exposição aumenta, cresce a taxa de mortalidade dos nauplios em doses elevadas, observando um efeito dose-resposta ao tempo de exposição de 48 h. Segundo GAMBARDELLA et al.

(2018) ^[112], a exposição de tempo em concentrações de pesticidas afeta significativamente a eclosão e sobrevivência larval, o que causa a morte dos nauplios de *A. salina*. Além disso, o efeito tóxico dos pesticidas pode ser devido a efeitos sinérgicos que aumentam a taxa de mortalidade ^[115].

Segundo SHAH et al. (2016) ^[116] em um estudo sobre toxicidade larval de 25 inseticidas sintéticos contra as larvas do quarto instar do mosquito *Culex quinquefasciatus* retratou o piriproxifeno como sendo um dos larvicidas mais tóxicos entre todos os inseticidas testados. Além disso, o piriproxifeno também mostrou toxicidade elevada utilizando diflubenzuron e metopreno contra *A. albopictus* ^[116]. Entretanto, a sua toxicidade não deve limitar-se somente aos insetos, apresentando efeitos tóxicos para peixes através de concentrações baixas e médias ^[117].

Por outro lado, a CL₅₀ foi obtida a partir da regressão linear entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração dos compostos testados, observou-se que a CL₅₀ de 48 h foi de 0,5 ppm, valor este com alto percentual de toxicidade. Conforme a OMS, valores de CL₅₀ abaixo de 1000 ppm em *A. salina*, são consideradas tóxicas ^[118]. Resultado semelhante foi apresentado por VIEIRA SANTOS et al. (2017) ^[119], ao estudar os efeitos ecotoxicológicos do piriproxifeno, obtendo efeito de toxicidade em CL₅₀-48 h (2,5 ppm). Porém, foram utilizadas concentrações menores (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63 ppm), contudo, não relata a dose recomendada pela OMS.

Esses efeitos toxicológicos, também podem ser devido a presença do piridilil na mistura de larvicida comercial. Em que, segundo SAKAMOTO et al., (2005) ^[37] relata propriedades biológicas do piridilil contra pragas lepidópteras, onde encontraram-se valores de CL₅₀ próximos ao nosso estudo (0,5 ppm). Em que na atividade inseticida para *Spodoptera litura* obteve um valor de 0,77 ppm, e para a *Plutella xylostella* (0.93 ppm), em testes cujos métodos pulverizador foliar e imersão foliar, respectivamente ^[37].

Por outro lado, segundo a OMS, o inseticida piriproxifeno não tem ações tóxicas na concentração de 0,01 ppm ^[99]. O que corrobora com o estudo nos tempos de exposição de 24 h e 48 h, uma vez que, estes não apresentaram efeitos de toxicidade nesta dose recomendada. Por outro lado, pode-se observar que o efeito dose-resposta não foi obtido já que não houveram alterações nos níveis de mortalidade das artemias mediante o aumento da maioria das concentrações durante um período de 24 h.

3.3 *Allium cepa*

O teste *A. cepa* avalia o índice mitótico e alterações cromossômicas de uma grande variedade de poluentes ambientais como os pesticidas [73]. Assim, o presente estudo avaliou o efeito citogenotóxico do larvicida comercial no bioensaio *A. cepa*.

No presente estudo, observou-se uma diminuição significativa do índice mitótico (IM) para todas as concentrações avaliadas quando comparadas com o CN (Tabela 03). Essa diminuição no crescimento das células em comparação do CN para todas as doses pode ser atrelada a efeitos adversos causados aos cromossomos, danos ao maquinário de replicação, transcrição, síntese proteica ou citocinese [120]. Além disso, essa diminuição do IM segundo SUMITHA e THOPPIL (2016) [121] e YUZBASIOGLU et al. (2009) [122], pode ser ocorrência do efeito mitodepressivo, neste ocorre uma inibição da síntese do DNA, impedindo o início da divisão celular e/ou desacelerando a progressão celular. Resultados semelhantes ao presente estudo foram observados em vários herbicidas (Isoproturon, Diuron®, Sulcotrione®, Garlon®, Racer®, Sindone B, Trifluralin®, Gramoxone®, Quizalofop-P-etilo (QPE), Illoxan® (diclofop-metilo), Arsênico) revisados por DE SOUZA et al. (2016) [123], que provocaram, em geral, uma diminuição do IM em *A. cepa*.

A avaliação dos efeitos citotóxicos do piriproxifeno em *A. cepa* relatou uma diminuição do índice mitótico com soluções de concentrações 0,25; 0,5; 1 e 2 ppm [124]. Resultados similares foram obtidos mediante o uso das concentrações (0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 ppm) onde também foi observado uma diminuição do índice mitótico com o aumento das concentrações. Segundo LIMAN et al. (2011) [125], esses efeitos em relação à diminuição nas fases mitóticas das soluções de piriproxifeno podem estar ligados à inibição da prófase ou detenção nas fases mitóticas em resposta ao estresse mitótico. Por outro lado, devido às atividades biológicas dos pesticidas, o uso destes podem causar efeitos indesejáveis para a saúde humana como danos no DNA, o que conduz ainda a efeitos adversos como o câncer e muitas outras doenças crônicas [126].

O piridialil também pode ter contribuído para citotoxicidade no estudo, uma vez que este apresentou uma alta citotoxicidade em linhagens celulares para *Spodoptera frugiperda*. O inseticida tem causado um aumento no nível de expressão na enzima antioxidante citocromo P450, levando à hipótese de que o piridialil, ou até mesmo um metabolito reativo deste gerou uma produção de EROs, no qual levou danos às macromoléculas celulares (por exemplo,

proteínas), aumentando a atividade de degradação do proteassoma e morte celular necrótica, e possivelmente isto pode ter sido a causa desses efeitos citotóxicos [34].

Estudo sugere que a formação de EROs por poluentes ambientais estão além da capacidade dos sistemas antioxidantes, contribuindo para a modificação oxidativa do DNA. Segundo (BIANCHI et al. 2016) [127] as EROs causam peroxidação lipídica e alterações na fluidez da membrana induzindo assim danos no DNA das células, levando a apoptose espontânea em células expostas a pesticidas. Vale ressaltar ainda que a peroxidação lipídica é um dos principais resultados da lesão mediada pelo radical que danifica diretamente as membranas e contribui para danos no DNA [128].

Em relação à genotoxicidade (média total das alterações cromossômicas), observou-se no presente estudo que todas as concentrações induziram efeitos genotóxicos, exceto 0,001; 0,01 e 10 ppm. A genotoxicidade ocorre devido ao mecanismo de ação de cada inseticida, no qual leva à produção de radicais livres (EROs) na célula, que causam ruptura e consequente necrose do tecido afetado [129]. Esse estresse oxidativo ocorre quando a taxa na qual as EROs geradas por pesticidas excedem a capacidade da célula para removê-los por antioxidantes, pois as enzimas antioxidantes são parte de um mecanismo de defesa vital contra o tecido induzido por danos provocados por EROs, além disso, muitos pesticidas são capazes de induzir estresse oxidativo por modulação de sistemas de metabolização de drogas celulares [128]. Resultados semelhantes foram encontrados por KARAISSMAILIOLU, (2016) [124], em que a exposição ao piriproxifeno apresentou uma ação genotóxica em todas as concentrações ao material genético de *Allium cepa*, com doses (2,5, 0,5, 1 e 2 ppm), concentrações estas corroborando com as doses (0,0001, 0,1, 1, 100 e 1000 ppm) utilizadas no estudo.

Tabela 03. Média do índice mitótico e das alterações cromossômicas em células meristemáticas de radículas de *A. cepa*, após a exposição por 24 h em diferentes concentrações do larvicida comercial.

Tratamento	Dose (ppm)	Índice Mitótico (Média ± DP)	Alterações Cromossômicas (Média ± DP)							Alterações Cromossômicas (Média ± DP)
			AC	Cm	PC	BN	MN	PT	QC	
CN	H ₂ O	156,44 ± 42,73	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,28	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,28	0,16 ± 0,35	0,39 ± 0,55	0,73 ± 0,66
CP	10	75,80 ± 42,91**	4,77 ± 6,25**	1,13 ± 1,18	4,14 ± 3,79**	0,00 ± 0,00	17,53 ± 11,61**	2,82 ± 1,58**	1,15 ± 1,46	33,61 ± 17,71**
	0,0001	69,54 ± 33,72**	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,37	0,00 ± 0,00	1,04 ± 1,50	0,76 ± 0,81	0,88 ± 1,31	5,52 ± 3,71**
	0,001	60,40 ± 14,67**	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,25	0,00 ± 0,00	0,87 ± 1,56	0,25 ± 0,41	0,74 ± 0,89	2,15 ± 2,14
	0,01	57,17 ± 18,15**	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,65 ± 0,64	0,38 ± 0,66	0,55 ± 0,86	1,60 ± 1,34
	0,1	56,43 ± 14,94**	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,49 ± 1,05	0,00 ± 0,00	1,80 ± 1,55*	0,55 ± 0,66	0,94 ± 0,88	3,79 ± 2,78**
	1	50,41 ± 9,17**	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,63 ± 0,96	0,00 ± 0,00	1,21 ± 1,79	0,43 ± 0,61	1,05 ± 1,18	3,51 ± 2,59*
	10	57,34 ± 11,53**	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,29	0,19 ± 0,41	0,00 ± 0,00	0,39 ± 0,50	0,53 ± 0,63	0,55 ± 0,66	2,13 ± 1,83
	100	62,30 ± 12,37**	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,23	0,51 ± 1,06	0,00 ± 0,00	4,26 ± 3,99**	0,45 ± 0,78	1,38 ± 1,18	7,33 ± 4,33**
Larvicida comercial	1000	54,29 ± 7,40**	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,56	0,00 ± 0,00	3,4 ± 3,97**	0,46 ± 0,67	0,97 ± 0,96	6,81 ± 5,66**

CN: Controle Negativo (H₂O destilada). **CP:** Controle Positivo (MMS, metilmetanosulfonato). **AC:** Aderência Cromossômica. **Cm:** C-metáfase. **PC:** Perda Cromossômica. **BN:** Broto Nuclear. **MN:** Micronúcleo. **PT:** Ponte Cromossômica. **QC:** Quebra Cromossômica. **DP:** Desvio-padrão. *Comparado estatisticamente com o controle negativo para avaliar a genotoxicidade. *Significativo no teste de Kruskal-Wallis com teste de Student-Newman-Keuls a posteriori (*p < 0,05; **p < 0,01). Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento

Os efeitos genotóxicos induzidos pelo piriproxifeno resultam de um efeito indireto do inseticida no DNA das células, representando um risco para os organismos devido ao seu potencial para provocar danos cromossômicos. Segundo MOHAMMED et al. (2015) ^[76], a indução de alterações cromossômicas também pode ser devido à presença de metil (CH₃) no piriproxifeno gerando radicais livres. Vale ressaltar também que a genotoxicidade dos pesticidas é demonstrada em sistemas de plantas em que relatórios mostram que muitos dos produtos químicos utilizados no controle de pragas afetam a divisão celular, além de induzirem alterações cromossômicas e causarem uma diminuição na divisão celular ^[126].

Os diferentes tipos de alterações cromossômicas (AC) induzidas pelo pesticida no presente estudo foram as C-metáfase, perdas cromossômicas, quebras cromossômicas, micronúcleos e pontes cromossômicas. Apenas os micronúcleos (MN) foram significativos nas concentrações (0,1, 100 e 1000 ppm). O somatório de alterações cromossômicas podem ter contribuído para a mutagenicidade observada no estudo. Uma vez que as alterações ocorridas na molécula de DNA, quando não reparadas podem levar a mutações. A capacidade de reparo do DNA diminui com o passar do tempo e a taxa de mutação de cada divisão celular é aumentada com a idade do indivíduo ^[130].

Além disso, de acordo com HAQ et al. (2017) ^[73], essa indução de AC em células de *A. cepas* podem estar associadas ao efeito cumulativo de vários poluentes, tais como fenóis, metais pesados e outros poluentes orgânicos. Por outro lado, segundo CHRYSOULI et al. (2018) ^[131], o aparecimento de MN é devido ao dano aneugênico (cromossomo inteiro) e/ ou clastogênico (ruptura cromossômica). Essa formação de MN também pode estar relacionada a alguns fatores, tais como as pontes cromossômicas, em que estas podem originar MN em células filhas quando se quebram fragmentos no final da telófase ^[127]; a formação de fragmentos cromossômicos acêntricos, resultantes de quebras isocromatídicas, cromatídicas, ou de disfunções do fuso mitótico, podendo, em cada célula, aparecer mais de uma vez ^[132]. As quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou com sequências de cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico e dessa forma, não chegam aos polos das células durante a mitose ou a meiose ^[133], além de perdas de cromossomos inteiros ^[134].

Segundo a OMS, o inseticida piriproxifeno não tem ações carcinogênicas e genotóxicos na concentração de 0,01 ppm, dose esta recomendada para o tratamento de água potável ^[99]. O que se encontra em conformidade com o presente estudo, uma vez que, este não apresentou efeito genotóxico e mutagênico na dose já citada. Vale ressaltar, que no estudo em

questão esta dose (0,01 ppm) obteve um efeito citotóxico, porém, não há relatos bibliográficos do piriproxifeno que analisam a relação desta dose com esse efeito. Entretanto, esta citotoxicidade pode ser originado do piridallil, outro inseticida determinado na mistura, no qual possui efeitos de alta citotoxicidade.

3.4 *Saccharomyces cerevisiae*

As inibições de crescimento de *S. cerevisiae* usados no teste estão apresentados na Figura 17. Em todas as linhagens testadas, o larvicida comercial induziu danos oxidativo significativos em relação a solução salina (CN).

No tratamento de SODWT (linhagem selvagem), o piriproxifeno apresentou danos oxidativo ($p \leq 0,05$) apenas nas duas maiores concentrações (100 e 1000 ppm). Entretanto, no gene *Sod 1* (linhagem superóxido dismutase citoplasmática), o produto provocou danos oxidativos para a maioria das concentrações testadas, exceto na menor concentração (0,0001 ppm). Em relação a linhagem *Sod 2* (linhagem mitocondrial), os produtos em todas as concentrações testadas induziram danos oxidativo em relação a solução salina (CN). De forma similar, *Sod 1 Sod 2* (duplo mutante citoplasmático e mitocondrial), causou danos oxidativo para todas as concentrações testadas. Para *Cat* (enzima catalase), apenas nas duas menores concentrações (0,0001 e 0,001 ppm), não foram observados danos oxidativo. Já para a linhagem duplo mutante *Sod 1 Cat 1*, o produto gerou danos oxidativos em todas as concentrações testadas.

No estudo foi observado que o larvicida comercial (piriproxifeno) para a maioria das doses analisadas em todas as linhagens apresentaram um potencial efeito oxidativo. O resultado pode indicar um efeito tóxico, citotóxico e genotóxico do inseticida frente as células da levedura *S. cerevisiae*, O que seria possível correlacionar pelo teste de *A. salina*, no qual o inseticida apresentou uma toxicidade expressiva em 48 h. Além disso, o efeito citotóxico e genotóxico pode ser justificado pelo teste de *A. cepa*, em que a mistura de piriproxifeno e piridallil produziram uma citogenotoxicidade para a maioria das doses no estudo.

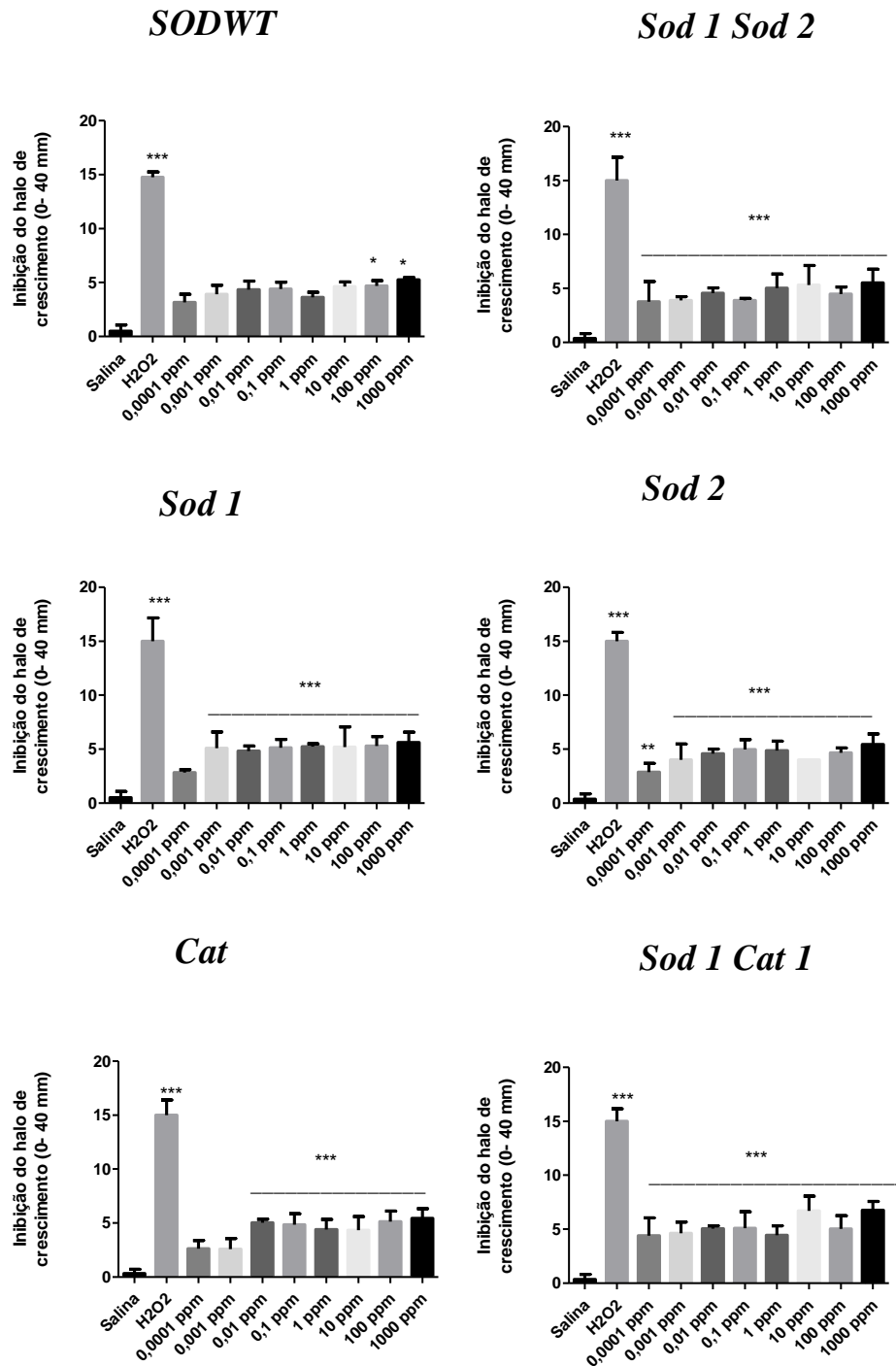


Figura 17. Potencial oxidativo das doses do larvicida comercial em linhagens de *S. cerevisiae*. Os gráficos representam os halos de inibição mensurados em mm nas linhagens SODWT, *Sod1*, *Sod2*, *Sod1Sod2*, *Cat1* e *Sod1Cat1*. Valores em média \pm desvio padrão dos halos de inibição (0-40 mm). ANOVA, pós-teste de *Bonferroni*. Valores de significância para ***($P < 0,001$), **($P < 0,01$) e *($P < 0,05$), quando comparados ao CN (solução salina)

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, tal fato pode ser explicado pela levedura *S. cerevisiae* possuir mecanismos que respondem ao estresse oxidativo, além disso o inseticida piriproxifeno apresentou capacidade de causar lesão por estresse oxidativo, devido a formação de radicais livres. Segundo BOONSTRA e POST (2004) ^[135], os pesticidas também podem induzir citotoxicidade por meio do aumento da produção de EROs através de concentrações mais elevadas dos pesticidas, estando em conformidade com este estudo que obteve danos oxidativos em todas as linhagens nas elevadas doses (100 e 1000 ppm).

Segundo FARRUGIA e BALZAN (2012) ^[95], as leveduras respondem aos estresses oxidativos usando diferentes estratégias, tais como a detoxificação de EROs, autofagia, degradação e apoptose. Ressalta-se ainda, que os danos no DNA causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese ^[136].

Neste estudo, os inseticidas piriproxifeno e piridilil presentes na mistura do larvicida comercial, foram caracterizados pelo seu potencial tóxico, por induzirem estresse oxidativo e causarem danos ao DNA, quando analisado *in vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos em pesquisa utilizando plantas de ervilha cultivada em solos tratados com piriproxifeno, nas doses de (1300, 2600 e 3900 $\mu\text{g. kg}^{-1}$), o qual apresentou elevada toxicidade para todas as concentrações ^[137]. Já no estudo de BAYOUMI et al. (2003) ^[138], com linhagens de células CHO-K1 em mamíferos *in vitro*, em diferentes condições de cultura celular após 72 h de exposição, apresentou efeitos citotóxicos que aumentam com a exposição no tempo.

Em relação as enzimas antioxidantes Cat e Sod estas foram proficiente. DOĞU et al. (2015) ^[139] afirmaram haver efeito tóxico, uma vez que o desequilíbrio entre a defesa antioxidante e a produção de EROs acarreta em estresse oxidativo, resultando em um efeito prejudicial no DNA. Vale ressaltar que essas enzimas, Cat e Sod atuam impedindo o aumento de EROs em células normais, induzindo assim a diminuição de estresse oxidativo ^[81].

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A relevância desta pesquisa está na possibilidade de contribuir para uma melhor compreensão acerca do uso de inseticidas no controle de vetores, para uma proteção do ecossistema e saúde humana, visando a necessidade de compreender o comportamento químico, biológico e farmacêutico do larvicida comercial.

No larvicida comercial, através de CLAE-DAD, CG-EM e CCD foi constatado uma mistura dos inseticidas piriproxifeno e piridallil, sendo o piriproxifeno produto majoritário da mistura.

Em *A. salina*, verificou-se uma toxicidade significativa para a maioria das concentrações do piriproxifeno, o que pode ser justificado pela presença do piridallil na mistura.

Embora tenha sido obtidos efeitos citotóxicos em todas as concentrações submetidas ao *A. cepa*, efeitos genotóxicos e mutagênicos não foram significativos em todas as doses. A citogenotoxicidade encontrada provém de danos produzidos no DNA.

Em *S. cerevisiae* mostrou-se capacidade oxidativa em todas as linhagens nas doses mais elevadas, tendo em vista a seu efeito citotóxico verificado em *A. cepa*, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio relacionada sua a toxicidade.

Portanto, esses resultados são relevantes para uma monitorização adequada, quanto ao uso de inseticidas, em detrimento a seus efeitos relacionados a saúde e ao ecossistema.

REFERÊNCIAS

- [1] ZARA, A. L. S. A.; SANTOS, S. M. D.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R.; G. COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.
- [2] DING, F.; FU, J.; JIANG, D.; HAO, M.; LIN, G. Mapping the spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Acta Tropica**, v. 178, p. 155-162, 2018.
- [3] DE BORBA BORBA, D. G.; DE LIMA, E. N.; DA SILVA, H. R.; DE BORBA, I. R.; DA SILVA, S. M.; CARDOSO, A. P. G.; ROCHA, C. A.; DE LIMA FILHO, G. F. Campanha sobre a biologia do *Aedes aegypti* e doenças associadas: Dengue, Chikungunya, Zika e Febre Amarela. Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG (CEPE)(ISSN 2447-8687), 2017.
- [4] PARRA, M. C. P.; FAVARO, E. A.; DIBO, M. R.; MONDINI, A.; EIRAS, A. E.; KROON, E. G.; TEIXEIRA, M. M.; NOGUEIRA, M. L.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F. sing adult *Aedes aegypti* females to predict areas at risk for dengue transmission: A spatial case-control study. **Acta Tropica**, v. 182, p. 43-53, 2018.
- [5] SIMOY, M. I.; SIMOY, M. V.; CANZIANI, G. A. The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. **Ecological Modelling**, v. 314, p. 100-110, 2015.
- [6] DOS REIS, C. A.; FLORENTINO, H. D. O.; CÓLON, D.; ROSA, S. R. F.; CANTANE, D. R. An approach of the exact linearization techniques to analysis of population dynamics of the mosquito *Aedes aegypti*. **Mathematical Biosciences**, v. 299, p. 51-57, 2018.
- [7] DE SOUZA MESQUITA, F. O.; PARENTE, A. S.; COELHO, G. M. P. Agentes Comunitários de Saúde e Sgentes de Combate a Endemias: Desafios para controle do *Aedes aegypti*. **Id on Line REVISTA DE PSICOLOGIA**, v. 11, p. 64-77, 2017.
- [8] WERMELINGER, E. D.; CARVALHO, R. W. D. Métodos e procedimentos usados no controle do *Aedes aegypti* na bem-sucedida campanha de profilaxia da febre amarela de 1928 e 1929 no Rio de Janeiro. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 837-844, 2016.
- [9] WANG, Y. H.; CHANG, M. M.; WANG, X. L.; ZHENG, A. H.; ZOU, Z. The immune strategies of mosquito *Aedes aegypti* against microbial infection. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 83, p. 12-21, 2018.
- [10] ALKENANI, N. A. Influence of the mixtures composed of slow-release insecticide formulations against *Aedes aegypti* mosquito larvae reared in pond water. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, p. 1181-1185, 2017.
- [11] ZHAO, M. A.; FENG, Y. N.; ZHU, Y. Z. KIM, J. H. Multi-residue Method for Determination of 238 Pesticides in Chinese Cabbage and Cucumber by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Comparison of Different Purification Procedures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 11449-11456, 2014.

- [12] ZHAO, L.; WANG, C.; GU, H.; YUE, C. Market incentive, government regulation and the behavior of pesticide application of vegetable farmers in China. **Food Control**, v. 85, p. 308-317, 2018.
- [13] COUTINHO, C. F.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A. GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M. DO AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.
- [14] PEREIRA, L. M. Análise de riscos ambientais na aplicação de defensivos agrícolas em propriedade rural. **Monografia do Curso de Pós-Graduação Lato Sensu em Engenharia de Segurança do Trabalho**, p. 01-97, 2014.
- [15] NASCIMENTO, L.; MELNYK, A. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde. **Revista Mangaio Acadêmico**, v. 1, p. 54-61, 2016.
- [16] SANCHES, S. M.; DE CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53-58, 2003.
- [17] ZHU, J.; WANG, J.; DING, Y.; LIU, B.; XIAO, W. A systems-level approach for investigating organophosphorus pesticide toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, p. 26-35, 2018.
- [18] CAPUTO, B.; IENCO, A.; CIANCI, D.; POMBI, M.; PETRARCA, V.; BASEGGIO, A.; DEVINE, G. J.; DELLA TORRE, A. The “auto-dissemination” approach: a novel concept to fight *Aedes albopictus* in urban areas. **PLOS neglected tropical diseases**, v. 6, p. 1793, 2012.
- [19] GAUGLER, R.; SUMAN, D.; WANG, Y. An autodissemination station for the transfer of an insect growth regulator to mosquito oviposition sites. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, p. 37-45, 2012.
- [20] ABAD-FRANCH, F.; ZAMORA-PEREA, E.; FERRAZ, G.; PADILLA-TORRES, S. D.; LUZ, S. L. Mosquito-disseminated pyriproxyfen yields high breeding-site coverage and boosts juvenile mosquito mortality at the neighborhood scale. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. 01-17, 2015.
- [21] SUMAN, D. S.; FARAJOLLAHI, A.; HEALY, S.; WILLIAMS, G. M.; WANG, Y.; SCHOELER, G.; GAUGLER, R. Point-source and area-wide field studies of pyriproxyfen autodissemination against urban container-inhabiting mosquitoes. **Acta tropica**, v. 135, p. 96-103, 2014.
- [22] GURARSLAN, A.; SHEN, J.; CAYDAMLI, Y.; TONELLI, A. E. Pyriproxyfen cyclodextrin inclusion compounds. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 82, p. 489-496, 2015.

- [23] CHEN, Y. W.; WU, P. S.; YANG, E. C.; NAI, Y. S.; HUANG, Z. Y. The impact of pyriproxyfen on the development of honey bee (*Apis mellifera L.*) colony in field. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, p. 589-594, 2016.
- [24] MAHARAJAN, K.; MUTHULAKSHMI, S.; NATARAJ, B.; RAMESH, M.; KADIRVELU, K. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 132-145, 2018.
- [25] DZIECIOŁOWSKA, S.; LARROQUE, A. L.; KRANJEC, E. A.; DRAPEAU, P.; SAMARUT, E. The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in zebrafish embryos. **Scientific reports**, v. 7, p. 01-11, 2017.
- [26] JAFFER, A.; PROTOPOPOFF, N.; MOSHA, F. W.; MALONE, D.; ROWLAND, M. W.; OXBOROUGH, R. M. Evaluating the sterilizing effect of pyriproxyfen treated mosquito nets against *Anopheles gambiae* at different blood-feeding intervals, **Acta tropica**, v. 150, p. 131- 135, 2015.
- [27] LIU, H.; WANG, P.; ZHOU, Z.; LIU, D. Enantioselective dissipation of pyriproxyfen in soils and sand. **Chirality**, v. 29, p. 358-368. 2017.
- [28] SINGH, S.; KUMAR, K. Effects of juvenoid pyriproxyfen on reproduction and F1 progeny in myiasis causing flesh fly *Sarcophaga ruficornis L.* (Sarcophagidae: Diptera). **Parasitology Research**, v. 114, p. 2325-2331, 2015.
- [29] SUMITOMO CHEMICAL UK PLC. **SumiLarv Informação Técnica. Hammersmith London, United Kingdom, 2012. Disponível em: <http://sumivector.com/sites/default/files/site-content/pdf/Sumilarv-informacao-2012.pdf>**
- [30] OO, S. Z. M.; THAUNG, S.; MAUNG, Y. N. M.; AYE, K. M.; AUNG, Z. Z.; THU, H. M.; THANT, K. Z.; MINAKAWA, N. Effectiveness of a novel long-lasting pyriproxyfen larvicide (SumiLarv(R)2MR) against *Aedes* mosquitoes in schools in Yangon, Myanmar. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 16, 2018.
- [31] SULLIVAN, J. J.; GOH, K. S. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. **Journal of Pesticide Science**, v. 33, p. 339-350, 2008.
- [32] SHAH, R. M.; SHAD, S. A.; ABBAS, N. Mechanism, stability and fitness cost of resistance to pyriproxyfen in the house fly, *Musca domestica L.* (Diptera: Muscidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 119, p. 67-73, 2015.
- [33] BOUHSIRA, E.; LIÉNARD, E.; LYAZRHI, F.; JACQUIET, P.; VARLOUD, M.; DEFLANDRE, A. FRANC, M. Repellent and insecticidal efficacy of a combination of dinotefuran, pyriproxyfen and permethrin (Vectra® 3D) against *Culex pipiens* in dogs. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 1, p. 233-238, 2016.
- [34] POWELL, G. F.; WARD, D. A.; PRESCOTT, M. C.; SPILLER, D. G.; WHITE, M. R.; TURNER, P. C.; EARLEY, F. G.; PHILLIPS, J.; REES, H. H. The molecular action of the

novel insecticide, Pyridalyl. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p. 459-69, 2011.

[35] NAGAHORI, H.; TOMIGAHARA, Y.; ISOBE, N.; KANEKO, H.; Metabolism of pyridalyl in rats: excretion, distribution, and biotransformation of dichloropropenyl-labeled pyridalyl. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, p. 10845-10851, 2009.

[36] ISAYAMA, S.; SAITO, S.; KURODA, K.; UMEDA, K.; KASAMATSU, K. Pyridalyl, a novel insecticide: potency and insecticidal selectivity. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 58, p. 226-33, 2005.

[37] SAKAMOTO, N.; SAITO, S.; HIROSE, T.; SUZUKI, M.; MATSUO, S.; IZUMI, K.; NAGATOMI, T.; IKEGAMI, H.; UMEDA, K.; TSUSHIMA, K. Discovery of pyridalyl: A novel compound for lepidopterous pest control. In: (Ed.): ACS Publications, p. 256-266, 2005.

[38] SAITO, S.; ISAYAMA, S.; SAKAMOTO, N.; UMEDA, K. Insecticidal activity of pyridalyl: acute and sub-acute symptoms in *Spodoptera litura* larvae. **Journal of Pesticide Science**, v. 29, p. 372-375, 2004.

[39] SAKAMOTO, N.; HIROSE, T.; SAITO, S.; UMEDA, K. Discovery and development of pyridalyl. **Journal of Pesticide Science**, v. 37, p. 265-266, 2012.

[40] SAINI, P.; GOPAL, M.; KUMAR, R.; SRIVASTAVA, C. Development of pyridalyl nanocapsule suspension for efficient management of tomato fruit and shoot borer (*Helicoverpa armigera*). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 49, p. 344-351, 2014.

[41] DAHI, H. F.; AIDA, S.; NEHAD, M.; ABD-EL A.; MONA F. Pyridalyl effectiveness on some biological and physiological parameters of cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of American Science**, v. 7, p. 855-863, 2011.

[42] ABDEL-HAFEZ, H. F.; OSMAN, H. H. Effects of pyridalyl and emamectin benzoate on some biological and biochemical parameters of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Albino rat*, Egypt. Acad. **Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 59-68, 2013.

[43] LYNCH, K. B.; CHEN, A.; LIU, S. Miniaturized high-performance liquid chromatography instrumentation. **Talanta**, v. 177, p. 94-103, 2018.

[44] DIVYA, T. N. High Performance Liquid Chromatography in analysis. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 73-75, 2014.

[45] THAMMANA, M. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, p. 22-28, 2016.

[46] BLUM, F. High performance liquid chromatography. **British Journal of Hospital Medicine (2005)**, v. 75, p. 18-21, 2014.

- [47] SILVA, C. G. A. D.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, p. 665-676, 2011.
- [48] MOTONO, T.; KITAGAWA, S.; OHTANI, H. High Performance Liquid Chromatography at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 6852-6858, 2016.
- [49] KOLOMNIKOV, I. G.; EFREMOV, AL. M.; TIKHOMIROVA, T. I.; SOROKINA, N. M.; ZOLOTOV, Y. A. DĄBROWSKI, L. Multidetector systems in gas chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 185-193, 2018.
- [50] DĄBROWSKI, L. Multidetector systems in gas chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 185-193, 2018.
- [51] JOHNSEN, L. G.; SKOU, P. B.; KHAKIMOV, B. BRO, R. Gas chromatography – mass spectrometry data processing made easy. **Journal of Chromatography A**, v. 1503, p. 57-64, 2017.
- [52] STACHNIUK, A.; FORMAL, E. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 1654-1665, 2016.
- [53] GALLO, M.; FERRANTI, P. The evolution of analytical chemistry methods in foodomics. **Journal Chromatography A**, v. 1428, p. 03-15, 2016.
- [54] DE MESQUITA CUNHA, M.; RODRIGUES, C. R.; FERREIRA, V. S.; RODRIGUES, A. R.; ALVES, S. R.; CHAVES, D. A.; DE MESQUITA, M. M.; DE ARAÚJO, L. A. DA SILVA JÚNIOR, N. J.; DE MELO-REIS, P. R. Eficiência do método de espectrometria de massas em drogas de abuso. **Estudos**, v. 42, p. 409-423, 2015.
- [55] MANDAL, K.; KAUR, R.; SINGH, B. Development of thin layer chromatographic technique for qualitative and quantitative analysis of fipronil in different formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 37, p. 2746-2755, 2014.
- [56] CIURA, K.; DZIOMBA, S.; NOWAKOWSKA, J.; MARKUSZEWSKI, M. J. Thin layer chromatography in drug discovery process. **Journal of Chromatography A**, v. 1520, p. 9-22, 2017.
- [57] KAGAN, I. A.; FLYTHE, M. D. Thin-layer chromatographic (TLC) separations and bioassays of plant extracts to identify antimicrobial compounds. **Journal of Visualized Experiments**, v. 85, p. 01-08, 2014.
- [58] BERNARD-SAVARY, P.; POOLE, C. F. Instrument platforms for thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1421, p. 184-202, 2015.
- [59] The Editors of Encyclopaedia Britannica. Paper chromatography. **Encyclopædia Britannica, inc**, 2018. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/paper-chromatography>

- [60] SHERMA, J. Review of thin-layer chromatography in pesticide analysis: 2014–2016. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 40, p. 226-238, 2017.
- [61] LO NOSTRO, P.; NINHAM, B. W.; CARRETTI, E.; DEI, L.; BAGLIONI, P. Specific anion effects in *Artemia salina*. **Chemosphere**, v. 135, p. 335-40, 2015.
- [62] MUTHUKRISHNAN, S.; SENTHIL KUMAR, T.; RAO, M. V. Anticancer activity of biogenic nanosilver and its toxicity assessment on *Artemia salina*- evaluation of mortality, accumulation and elimination: An experimental report. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, p. 1685-1695, 2017.
- [63] DUMITRASCU, M. *Artemia salina*. **Balneo-Research Journal**, v. 2, p. 119-122, 2011.
- [64] EL FELS, L.; HAFIDI, M.; OUHDOUCH, Y. *Artemia salina* as a new index for assessment of acute cytotoxicity during co-composting of sewage sludge and lignocellulose waste. **Waste Management**, v. 50, p. 194-200, 2016.
- [65] SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii*-Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. 1998.
- [66] ZHU, S.; LUO, F.; CHEN, W.; ZHU, B.; WANG, G. Toxicity evaluation of graphene oxide on cysts and three larval stages of *Artemia salina*. **Science of the Total Environment**, v. 595, p. 101-109, 2017.
- [67] CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Quimica Nova**, v.23, p.20-22, 2000.
- [68] VENTURA-CAMARGO, B. C.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. **Chemosphere**, v. 161, p. 325-332, 2016.
- [69] KWAK, J. H.; SEO, J. M.; KIM, N. H.; ARASU, M. V.; KIM, S.; YOON, M. K.; KIM, S. J. Variation of quercetin glycoside derivatives in three onion (*Allium cepa* L.) varieties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, p. 1387-1391, 2017.
- [70] BOETTCHER, C.; KRAHMER, A.; STÜRTZ, M.; WIDDER, S.; SCHULZ, H. Effect of Cultivar and Cultivation Year on the Metabolite Profile of Onion Bulbs (*Allium cepa* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, p. 3229-3238, 2018.
- [71] MALAKAHMAD, A.; MANAN, T. S. B. A.; SIVAPALAN, S.; KHAN, T. Genotoxicity assessment of raw and treated water samples using *Allium cepa* assay: evidence from Perak River, Malaysia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 5421-5436, 2018.
- [72] VAZHANGAT, P.; THOPPIL, J. E. Apoptotic induction via membrane/DNA damage and metabolic inactivation by synthetic food colorants in *Allium cepa* root meristem. **Turkish Journal of Biology**, v. 40, p. 922- 9334, 2016.

- [73] HAQ, I.; KUMAR, S.; RAJ, A.; LOHANI, M.; SATYANARAYANA, G. N. V. Genotoxicity assessment of pulp and paper mill effluent before and after bacterial degradation using *Allium cepa* test. **Chemosphere**, v. 169, p. 642-650, 2017.
- [74] BECARO, A. A.; SIQUEIRA, M. C.; PUTI, F. C.; DE MOURA, M. R.; CORREA, D. S.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C.; FERREIRA, M. D. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticle/carboxymethyl cellulose on *Allium cepa*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, p. 352, 2017.
- [75] HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, A. Cytogenotoxicity screening of source water, wastewater and treated water of drinking water treatment plants using two in vivo test systems: *Allium cepa* root based and Nile tilapia erythrocyte based tests. **Water Research**, v. 108, p. 320-329, 2017.
- [76] MOHAMMED, K. P.; AAREY, A.; TAMKEEN, S.; JAHAN, P. Forskolin: genotoxicity assessment in *Allium cepa*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 777, p. 29-32, 2015.
- [77] BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal Environmental Sciences (China)**, v. 36, p. 102-11, 2015.
- [78] VIDAKOVIC, Z; PAES, D; TOMIC, M. Toxicity of ware drilling fluids in modified *Allium* test. **Water, Air and Soil Pollution**, Berlin, v. 69, p. 413-423, 1993.
- [79] GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, p. 175-185, 1994.
- [80] KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504, p. 137-148, 2002.
- [81] SHEELA, A.; THOPPIL, J. E. Evaluation of cytotoxicity of the aqueous leaf extract of *Pogostemon heyneanus* Benth (*Java patchouli*). **BIOTROPIA-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology**, v. 24, p. 28-34, 2017.
- [82] ANACLETO, L. R.; ROBERTO, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 173, p. 31-42, 2017.
- [83] FISKESJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium cepa*. **Atlas**, v. 21, p.139-149, 1993.
- [84] VENTURA, B. D. C. Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida Atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste, 2004.
- [85] SUDHAKAR, R.; NINGE-GOWDA, K. N.; VENU, G. Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*. **Cytologia**, v.66, p. 235-239, 2001.

- [86] DA SILVA OLIVEIRA, G. L. Capacidade antioxidante celular da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, p. 461-466, 2016.
- [87] TONGUL, B.; TARHAN, L. Oxidant and antioxidant status in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to antifungal ketoconazole. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1984-1991, 2016.
- [88] SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 95-100, 2005.
- [89] OLIVEIRA, M. B.; PRADO, A. H.; BERNEGOSI, J.; SATO, C. S.; BRUNETTI, I. L.; SCARPA, M. A. Topical Application of Retinyl Palmitate-Loaded Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for the Treatment of Skin Aging. **BioMed Research International**, p. 01-08, 2014.
- [90] HOSTETTER, A. A.; OSBORN, M. F.; DEROSE, V. J. RNA-Pt adducts following cisplatin treatment of *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS chemical biology**, v. 7, p. 218-225, 2011.
- [91] BRACONI, D.; BERNARDINI, G.; SANTUCCI, A. *Saccharomyces cerevisiae* as a model in ecotoxicological studies: A post-genomics perspective. **Journal of Proteomics**, v. 137, p. 19-34, 2016.
- [92] DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. **Free Radical Research**, v. 46, p. 382-419, 2012.
- [93] SASTRE-SERRA, J.; VALLE, A.; COMPANY, M. M.; GARAU, I.; OLIVER, J.; ROCA, P. Estrogen down-regulates uncoupling proteins and increases oxidative stress in breast cancer. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, p. 506-512, 2010.
- [94] GONENC, A.; HACISEVKI, A.; TAVIL, Y.; CENGEL, A.; TORUN, M. Oxidative stress in patients with essential hypertension: a comparison of dippers and non-dippers. **European Journal of Internal Medicine**, v. 24, p. 139-44, 2013.
- [95] FARRUGIA, G.; BALZAN, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. **Frontiers in oncology**, v. 2, p. 01-21, 2012.
- [96] EL-HUSSEINY, W. M.; EL-SAYED, M. A-A.; ABDEL-AZIZ, N. I.; EL-AZAB, A. S. AHMED, E. R. ABDEL-AZIZ, A. A. M. Synthesis, antitumour and antioxidant activities of novel α , β -unsaturated ketones and related heterocyclic analogues: EGFR inhibition and molecular modelling study. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 33, p. 507-518, 2018.
- [97] GONZÁLEZ, M. J.; ROSARIO-PÉREZ, G.; GUZMÁN, A. M.; MIRANDA MASSARI, J. R.; DUCONGE, J.; LAVERGNE, J.; FERNANDEZ, N.; ORTIZ, N. QUINTERO, ANA MIKIROVA, N. Mitochondria, energy and cancer: the relationship with ascorbic acid. **Journal of orthomolecular medicine: official journal of the Academy of Orthomolecular Medicine**, v. 25, p. 29, 2010.

- [98] VIDAL, L. S.; ALVES, A. M.; KUSTER, R. M.; LAGE, C.; LEITÃO, A. C. Genotoxicity and mutagenicity of *Echinodorus macrophyllus* (chapéu-de-couro) extracts. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 549-557, 2010.
- [99] WHO [World Health Organization]. Dengue. Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control—New edition. Geneva, Switzerland, 2009.
- [100] FAROUK, M.; HUSSEIN, L. A.; EL AZAB, N. F. New HPLC and fluorometric methods for the determination of pyriproxyfen and pyridalyl insecticide residues in tomatoes. **Journal of AOAC International**, v. 97, p. 188-196, 2014.
- [101] SHIMADZU. GC-MS/MS. Analysis of Pesticides in Drinking Water. **EDX Series (LAAN- J-MS-E068)**, n. 68, p. 1-2, 2012.
- [102] MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.
- [103] 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.
- [104] ROSA, R. M.; MELECCHI, M. I.; DA COSTA HALMENSCHLAGER, R.; ABAD, F. C.; SIMONI, C. R.; CARAMÃO, E. B.; HENRIQUES, J. A.; SAFFI, J.; DE PAULA RAMOS, A. L. Antioxidant and antimutagenic properties of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, p. 7324-7330, 2006.
- [105] PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 4^o ed, p. 394-395, 2012.
- [106] ABDU, U.; BARKI, A.; KARPLUS, I.; BAREL, S.; TAKAC, P.; YEHEZKEL, G.; LAUFER, H.; SAGI, A. Physiological effects of methyl farnesoate and pyriproxyfen on wintering female crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Aquaculture**, v. 202, p. 163-175, 2001.
- [107] COSKUN, O., Separation techniques: Chromatography. **Journal Northern Clinics of İstanbul**, v. 3, p. 156–160, 2016.
- [108] RISTIVOJEVIĆ, P.; MORLOCK, G. E. High-performance thin-layer chromatography combined with pattern recognition techniques as tool to distinguish thickening agents. **Food Hydrocolloids**, v. 64, p. 78-84, 2017.
- [109] LINI, R. S.; TOMOIKE, C.; FROEMMING, E. O.; BANDO, E.; MELO, G. A. N.; MOSSINI, S. A. G.; NISHIYAMA, P. Drugs Characterization by Thin Layer Chromatography. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 95, p. 486-498, 2014.
- [110] DE ABREU GADELHA, J.; VASONCELOS, A. S.; SANTIAGO, V. R.; DE HOLANDA JUNIOR, W. P.; MOREIRA, B. A. A.; DE SÁ SOARES, J. E.; CARVALHO, T. M. J. P. Desenvolvimento de métodos cromatográficos qualitativos para identificação de benzodiazepínicos. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, p. 25-49, 2015.



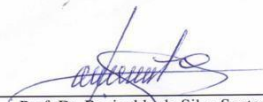

- [111] SPANGENBERG, B.; POOLE, C. F.; WEINS, C. Quantitative thin-layer chromatography: a practical survey. **Springer Science & Business Media**, p. 155– 200, 2011.
- [112] GAMBARDELLA, C.; NICHINO, D.; IACOMETTI, C.; FERRANDO, S.; FALUGI, C.; FAIMALI, M. Long term exposure to low dose neurotoxic pesticides affects hatching, viability and cholinesterase activity of *Artemia sp.* **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 79-89, 2018.
- [113] RAND, G. M. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. 2nd ed., **Taylor & Francis**: Washington, cap. 1, 1995.
- [114] FONSECA, AL. A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubi silvestris* (Crustacea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Piscis, Poeciledae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluente industriais. **Dissertação de Mestrado em Hidráulica e Saneamento**. USP São Carlos, 1991.
- [115] CRUZEIRO, C.; AMARAL, S.; ROCHA, E.; ROCHA, M. J. Determination of 54 pesticides in waters of the Iberian Douro River estuary and risk assessment of environmentally relevant mixtures using theoretical approaches and *Artemia salina* and *Daphnia magna* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 145, p. 126-134, 2017.
- [116] SHAH, R. M.; ALAM, M.; AHMAD, D.; WAQAS, M.; ALI, Q.; BINYAMIN, M.; SHAD, S. A. Toxicity of 25 synthetic insecticides to the field population of *Culex quinquefasciatus* Say. **Parasitology Research**, v. 115, p. 4345-4351, 2016.
- [117] TRUONG, L.; GONNERMAN, G.; SIMONICH, M. T.; TANGUAY, R. L. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 1089-1093, 2016.
- [118] LIMA, J. M.; SILVA, C. A.; ROSA, M. B.; SANTOS, J. B.; OLIVEIRA, T. G.; SILVA, M. B. Phytochemical prospecting of *Sonchus oleraceus* and its toxicity to *Artemia salina*. **Planta Daninha**, v. 27, p. 07-11, 2009.
- [119] VIEIRA, S.; CAIXETA, V. S.; SIQUEIRA, E.; JÚNIOR, C.; PEREIRA, E. O.; BARBOSA, B. Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of *Aedes aegypti* on nontarget organisms: Redefining the use of pyriproxyfen. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 80, p. 155-160, 2017.
- [120] FISKEJÖ G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99–112, 1985.
- [121] SUMITHA, K. V.; THOPPIL, J. E. Genotoxicity assessment of two common curing weeds: *Hyptis suaveolens* (L.) Poir. and *Leucas indica* (L.) R. Br. **Cytotechnology**, v. 68, p. 1513-1527, 2016.
- [122] YUZBASIOGLU, D.; UNAL, F.; SANCAK, C. Genotoxic effects of herbicide Illoxan (Diclofop-Methyl) on *Allium cepa* L. **Turkish Journal of Biology**, v. 33, p. 283-290, 2009.

- [123] DE SOUZA, C. P.; GUEDES, T. A.; FONTANETTI, C. S. Evaluation of herbicides action on plant bioindicators by genetic biomarkers: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, p. 01-12, 2016.
- [124] KARAISMAILOĞLU, M. C. Evaluation of the Genotoxic and Cytotoxic Effects of Pyriproxyfen Insecticide on *Allium cepa* Somatic Chromosomes with Mitotic Activity, Chromosome Abnormality and Micronucleus Frequency, **Turkish Journal of Life Sciences**, p. 65-69, 2016.
- [125] LIMAN, R.; CIĞERCI, İ. H.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by *Allium* and *Comet tests*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 61-64, 2011.
- [126] KUCHY, A. H.; WANI, A. A.; KAMILI, A. N. Cytogenetic effects of three commercially formulated pesticides on somatic and germ cells of *Allium cepa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 6895-6906, 2016.
- [127] BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p. 475-483, 2016.
- [128] JIA, Z.; MISRA, H. P. Reactive oxygen species in in vitro pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: Role of NFκB and caspase-3. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, p. 288-298, 2007.
- [129] FENG, B.; GUO, Y. W.; HUANG, C. G.; LI, L.; CHEN, R. H.; JIAO, B. H. 2'-epi-2'-O-Acetylthevetin B extracted from seeds of *Cerbera manghas L.* induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Chemico-biological interactions**, v. 183, p. 142-153, 2010.
- [130] GRISOLIA, C. K. Agrotóxicos: mutações, reprodução & câncer; riscos ao homem e ao meio ambiente, pela avaliação de genotoxicidade, carcinogenicidade e efeitos sobre a reprodução. Ed. UnB, p. 392, 2005.
- [131] CHRYSOULI, M. P.; BANTI, C. N.; KOURKOUMELIS, N.; PANAYIOTOU, N.; MARKOPOULOS, G. S.; TASIOPOULOS, A. J.; HADJIKAKOU, S. K. Chloro (triphenylphosphine) gold (I) a forefront reagent in gold chemistry as apoptotic agent for cancer cells. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 179, p. 107-120, 2018.
- [132] RIBEIRO, M. L. G; SILVA, J. H. V; DANTAS, M. O. Exigências nutricionais de lisina para codornas durante a fase de postura, em função do nível de proteína da ração. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p. 156-161, 2003.
- [133] MILLER, R. C. The Micronucleus Test as an in Vivo Cytogenetic Method. **Environmental Health Perspectives**, v. 6, p. 167-170.1973.
- [134] FENECH, M. PROTOCOL: Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1084-1104, 2007.

- [135] BOONSTRA, J.; POST, J. A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, v. 337, p. 1-13, 2004.
- [136] ABDOLLAHI, M.; SHETAB-BOUSHEHRI, S. V. Is it right to look for anti-cancer drugs amongst compounds having antioxidant effect? **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 126-135, 2012.
- [137] AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Comparative toxicity of selected insecticides to pea plants and growth promotion in response to insecticide-tolerant and plant growth promoting *Rhizobium leguminosarum*. **Crop Protection**, v. 29, p. 325-329, 2010.
- [138] BAYOUMI, A. E.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; ZIDAN, H. Z.; BALANA-FOUCE, R.; ORDONEZ, C.; ORDONEZ, D. Cytotoxic effects of two antimolting insecticides in mammalian CHO- K1 cells. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 55, p. 19-23, 2003.
- [139] DOĞU, Z.; ŞAHİNÖZ, E.; ARAL, F.; ÇELİK, H.; KOYUNCU, İ.; TAŞKIN, A.; AKSOY, N. Pesticide-Contaminated Feeds in Rainbow Trout (*Onchorhyncus mykiss* W. 1792) Aquaculture: Oxidative Stress and DNA Damage. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 47, p. 815-821, 2015.

Anexo A*

ANEXO A – Documento de solicitação para Secretária de Saúde Municipal de Água Branca – Piauí em prol das amostras de larvicida comercial.

	
GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ – UESPI CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA – CCN COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ	
<hr/>	
OFÍCIO-PPGQ Nº 01/2016	Teresina, 24 de Agosto de 2016.
 Do: Coordenador do Mestrado Acadêmico em Química Prof. Dr. Reginaldo da Silva Santos	
 Para: Secretaria de Saúde Municipal de Água Branca Sr. (a) Leila Cristiane Viana Vieira	
 Ao tempo que cumprimento V. Sa., venho por meio deste, solicitar 08 (oito) pacotes de 100g de <i>Sumilarv 0,5 G (Pyriproxifen)</i> com a finalidade de realizar pesquisas acadêmicas referentes à Dissertação de Mestrado da discente Patrícia e Silva Alves , Mestranda em Química, desse programa de pós-graduação. Em anexo, segue um resumo do trabalho de pesquisa realizado pela referida discente.	
Ciente de que, na medida do possível, essa solicitação lhes será favorável, desde já agradecemos a atenção dispensada ao fato, subscrevemo-nos e coloco-me à disposição para maiores esclarecimentos.	
Atenciosamente,	
 Prof. Dr. Reginaldo da Silva Santos Coordenador do PPGQ-UESPI Matrícula: 268401-2	
	
<hr/>	
<small>Núcleo de Pós-Graduação - Rua João Cabral, 2231 – Bairro Pirajá – CEP: 64.002-150 – Teresina – Piauí – Brasil Telefones (central) : 086 3213-7524/7524 (Ramais: 370 ou 378) E-mail: ppgq.uespi@gmail.com e www.uespi/quimica/ppgq</small>	