



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**WEDJA KELLY DE MELO VASCONCELOS**

**EFEITO GENOTÓXICO DA IVERMECTINA E DO IMIDACLOPRID EM  
IMATUROS DA ESPÉCIE DE IMPORTÂNCIA FORENSE *CHRYSOMYA*  
*ALBICEPS* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE), AVALIADO PELO ENSAIO  
COMETA**

**Recife**

**2023**

WEDJA KELLY DE MELO VASCONCELOS

**EFEITO GENOTÓXICO DA IVERMECTINA E DO IMIDACLOPRID EM  
IMATUROS DA ESPÉCIE DE IMPORTÂNCIA FORENSE *CHRYSOMYA ALBICEPS*  
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE), AVALIADO PELO ENSAIO COMETA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Animal.

Orientador: Dr. Simão Dias de Vasconcelos Filho

Coorientadora: Dra. Claudia Rohde

Recife

2023

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Vasconcelos, Wedja Kelly de Melo.

Efeito genotóxico da ivermectina e do imidacloprid em imaturos da espécie de importância forense *Chrysomya albiceps* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE), avaliado pelo ensaio cometa. / Wedja Kelly de Melo Vasconcelos. – 2023.

34 f. : il., fig.

Orientador: Simão Dias de Vasconcelos Filho.

Coorientadora: Cláudia Rohde.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia animal, 2023.

Inclui referências.

1. Genotoxicidade ambiental. 2. Neoticotinoides. 3. Avermectinas. 4. Calliphoridae. I. Vasconcelos Filho, Simão Dias de. (Orient.). II. Rohde, Claudia. (Coorient.). III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-225

WEDJA KELLY DE MELO VASCONCELOS

**EFEITO GENOTÓXICO DA IVERMECTINA E DO IMIDACLOPRID EM  
IMATUROS DA ESPÉCIE DE IMPORTÂNCIA FORENSE *CHRYSOMYA ALBICEPS*  
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE), AVALIADO PELO ENSAIO COMETA**

Dissertação defendida em 17/07/2023

Orientador: Dr. Simão Dias de Vasconcelos Filho

Coorientadora: Dra. Claudia Rohde

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Dr. Artur Campos Dalia Maia (Titular) – UFPE

---

Dr. Emerson Peter Falcão (Titular) – UFPE

---

Dr. André Severino da Silva (Titular) – CRCN

---

Dr. Wendel Teles Pontes (Suplente) – UFPE

---

Dr. Taciano de Moura Barbosa (Suplente) - UFPE

## **DEDICATÓRIA**

A minha filha Luísa, que tem sido minha maior  
motivação.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças em meus piores dias e ter sido meu refúgio, meu conforto e meu ouvinte até aqui.

Aos meus pais, Ivalda Florentino e José Bezerra a quem devo toda gratidão do mundo, por não terem medido esforços dentro das suas condições para me oferecerem acesso à educação e acreditarem em mim, a cada sonho que almejo para minha vida.

A minha filha Luísa, que despertou a melhor parte de mim. Por você eu consegui quebrar barreiras, você é minha motivação diária.

A Luis Henrique, meu companheiro ao longo desses anos que sempre me apoiou e acreditou que eu seria capaz de chegar até aqui. Foi rede de apoio nos cuidados com a nossa filha, peça fundamental para que eu conseguisse manter a rotina de idas ao laboratório.

Aos meus irmãos Roberto Bezerra, Thiago Roberto e Tércia Florentino por toda torcida nessa caminhada da pós-graduação.

Ao meu orientador, Prof. Simão Vasconcelos, por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse trabalhar com algo que sempre sonhei, ter me orientado ao longo do mestrado, por ser paciente comigo e pelas correções e puxões de orelha nas horas necessárias.

A minha coorientadora Profa. Claudia Rohde que abriu as portas da carreira científica para mim desde a graduação com a Iniciação Científica, e que sempre me incentivou a me manter na área me ajudando, me orientando e compreendendo minhas limitações.

Aos meus colegas do Laboratório de Insetos de Importância Forense, em especial a pessoa de Henrique, pelo companheirismo e parceria ao longo desse tempo no mestrado, com vocês os dias se tornaram mais leves e as dificuldades do curso mais fáceis de serem contornadas.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética, que me receberam sem nenhuma objeção para realizar os experimentos, em especial a Dra. Érima Amorim, que compartilhou seu conhecimento comigo.

A Antônio, meu terapeuta, que me ajudou a lidar com meus conflitos internos para conseguir concluir a dissertação.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal que sempre que solicitada buscou me tratar com empatia, buscando soluções para que eu pudesse concluir o curso.

A todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal pelo conhecimento transmitido durante as aulas do curso.

À CAPES e à FACEPE, por financiarem meu mestrado com apoio financeiro que foi fundamental no período de curso.

Por fim, a minha capacidade de ser resiliente e aprender com os obstáculos e a nunca desistir dos meus sonhos. Chegar até aqui me mostra que eu posso almejar qualquer coisa para o futuro.

## RESUMO

O ensaio cometa é uma técnica de biologia molecular utilizada para avaliar danos a nível celular. Diversos grupos de insetos são utilizados como modelos para avaliar sua eficácia e estudar a ação de compostos químicos e radiação sobre as células animais. O presente estudo investigou o efeito tóxico-genético de concentrações de Ivermectina (IVM) e de Imidacloprid (IMI) em *Chrysomya albiceps*, uma espécie de mosca abundante na região nordeste do Brasil e de grande importância forense. Os compostos foram diluídos em água destilada e misturados à carne de fígado liofilizado, nas concentrações de IVM 0,0498 e 0,0936 mM; e IMI  $11,6 \times 10^{-17}$  e  $23,2 \times 10^{-17}$  mM. Cerca de 100 imaturos de *C. albiceps* se alimentaram por 24 h em cada meio de tratamento. Após a exposição aos compostos e execução do Ensaio cometa, foram observados o aumento significativo dos diferentes tipos de danos, em todos os tratamentos. Os resultados demonstram que tanto a IVM quanto o IMI causaram danos genotóxicos em *C. albiceps*, com claro efeito dose-dependente da IVM, mesmo em concentrações muito baixas, como as usadas neste estudo. Todos os tipos de danos foram registrados para ambos compostos, sendo mais predominante o dano do tipo 0 para IVM e dano do tipo 4 para IMI. A presença de diferentes tipos de danos indica a sensibilidade do Ensaio cometa para esse organismo modelo. Além disso, aponta os riscos do uso indiscriminado dos compostos testados, do efeito negativo sobre o genoma de espécies não alvo, e do potencial risco de geração de mutações em células germinativas dos organismos, com consequente efeito negativo na sobrevivência de seus descendentes.

**Palavras-chaves:** Genotoxicidade ambiental; Neoticotinoides; Avermectinas; Calliphoridae.

## ABSTRACT

The comet assay is a molecular biology technique used to assess damage at the cellular level. Several groups of insects are used as models to evaluate their effectiveness and to study the action of chemical compounds and radiation on animal cells. The present study investigated the toxic-genetic effect of Ivermectin (IVM) and Imidacloprid (IMI) concentrations on *Chrysomya albiceps*, an abundant fly species in northeastern Brazil and of great forensic importance. The compounds were diluted in distilled water and mixed with freeze-dried liver meat, at concentrations of IVM 0.0498 and 0.0936 mM; and IMI  $11.6 \times 10^{-17}$  and  $23,2 \times 10^{-17}$  mM. About 100 immatures *C. albiceps* were fed for 24 h in each treatment medium. After exposure to the compounds and execution of the Comet assay, a significant increase in different types of damage was observed in all treatments. The results demonstrate that both IVM and IMI caused genotoxic damage in *C. albiceps*, with a clear dose-dependent effect of IVM, even at very low concentrations, as used in this study. All types of damage were recorded for both compounds, with type 0 damage being more predominant for IVM and type 4 damage for IMI. The presence of different types of damage indicates the sensitivity of the test for this type of model organism. In addition, it points out the risks of indiscriminate use of the tested compounds, the negative effect on the genome of non-target species, and the potential risk of generating mutations in germ cells of organisms, with a consequent negative effect on the survival of their descendants.

**Keywords:** Environmental genotoxicity; Neotocotinoids; Avermectins; Calliphoridae.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Estrutura dos compostos genotóxicos (a) Ivermectina e (b) Imidacloprid. 14
- Figura 2 – Processos utilizados para a obtenção dos resultados do Ensaio cometa, utilizando células de larvas de *Chrysomya albiceps* expostas a concentrações de Ivermectina e Imidacloprid. 19
- Figura 3 – Imagens do Ensaio cometa (representando nucleoides) corados com GelRed (Biotium) e gerados em hemócitos de larvas de *Chrysomya albiceps*. A classe zero (0) representa a ausência de dano genético e as classes 1 a 4 indicam danos crescentes no DNA (aumento da cauda do cometa e diminuição de sua cabeça). 21
- Figura 4 – Índice de Dano e Frequência de Dano ( $\bar{x} \pm Dp$ ) após exposição de *C. albiceps* ao grupo controle negativo (água destilada), controle positivo (Ciclofosfamida 3,83 mM) e concentrações de ivermectina (baixa concentração =  $11,6 \times 10^{-17}$  mM alta concentração =  $23,2 \times 10^{-17}$  mM). Abreviações: controle negativo (Cont. N), controle positivo (Cont. P). 24
- Figura 5 – Índice de dano e Frequência de dano ( $\bar{x} \pm Dp$ ) após exposição de *C. albiceps* ao grupo controle negativo (água destilada), controle positivo (Ciclofosfamida 3,83 mM) e concentrações de Imidacloprid (baixa concentração = 0,0468 mM, alta concentração = 0,0936 mM). Abreviações: controle negativo (Cont. N), controle positivo (Cont. P). 24
- Figura 6 – Tipo de dano predominante nas diferentes concentrações testadas de Ivermectina e Imidacloprid em células de *Chrysomya albiceps* avaliadas por meio da moda (Mo) após Ensaio cometa. 26

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Média dos danos genéticos e desvio padrão (Dp) observados em células hemolinfáticas de larvas de *Chrysomya albiceps* submetidas ao tratamento com água destilada (controle negativo); Ciclofosfamida 3,83 mM (Controle positivo) e concentrações de Imidacloprida (IMI) e Ivermectina (IVM). Nível de dano: zero (0) representa ausência de dano genético e 1 a 4 são os níveis crescentes de dano genético. Dp (Desvio padrão). 23
- Tabela 2 – Comparações par a par no post-hoc de Bonferroni entre os valores médios de Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) observados em tratamentos de *Chrysomya albiceps* com compostos de Ivermectina (IVM) (a) e Imidacloprid (IMI) (b). 25

## SUMÁRIO

1.	<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
	1.1 IMPORTÂNCIA DE CALLIPHORIDAE (DIPTERA) NA ENTOMOTOXICOLOGIA	12
	1.2 IVERMECTINA E IMIDACLOPRID, SUBSTÂNCIAS DE RISCO PARA ORGANISMOS NÃO-ALVO	13
	1.3 O ENSAIO COMETA PARA DETECÇÃO DE DANOS GENOTÓXICOS EM INSETOS	14
2.	<b>2. OBJETIVOS</b>	17
3.	<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	18
	3.1 MANUTENÇÃO DE <i>CHRYSOMYA ALBICEPS</i> E EXPOSIÇÃO AOS AGENTES GENOTÓXICOS	18
	3.2 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO COMETA EM <i>C. ALBICEPS</i>	18
	3.3 ANÁLISES DE DADOS.	20
4.	<b>4. RESULTADOS</b>	21
	4.1 VALIDAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA DETECÇÃO DE DANOS GENOTÓXICOS	21
	4.2 ENSAIO COMETA EM <i>CHRYSOMYA ALBICEPS</i>	22
5.	<b>5. DISCUSSÃO</b>	27
6.	<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	29
7.	<b>7. REFERÊNCIAS</b>	30

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 IMPORTÂNCIA DE CALLIPHORIDAE (DIPTERA) NA ENTOMOTOXICOLOGIA

Moscas da família Calliphoridae (Insecta, Diptera) são componentes fundamentais do necrobioma, determinando o ritmo, a intensidade e a disponibilidade de recursos resultantes do processo de decomposição (BENBOW et al., 2018). Esta íntima associação com carcaças e cadáveres faz com que os califorídeos sejam os primeiros insetos a colonizar carcaças e cadáveres, sendo indicadores primários para a estimativa do intervalo pós-morte mínimo (IPMmin) (VASCONCELOS et al., 2013; BYRD & CASTNER, 2019).

Um dos principais objetivos da entomologia forense é elaborar uma estimativa de IPMmin para auxiliar em investigações criminais. Entretanto, algumas substâncias presentes na fonte de alimento dos insetos necrófagos podem influenciar seu desenvolvimento, retardando ou acelerando seu ciclo de vida, o que pode resultar em uma estimativa errônea do IPMmin que utiliza os dados do tempo de desenvolvimento do inseto para a estimativa (THYSSEN & GRELLA, 2011).

Diversos compostos interferem na taxa de desenvolvimento dos imaturos, o que pode levar a erros na estimativa do IPMmin por métodos entomológicos (ESTRADA et al., 2009). Diante disso surgiu a entomotoxicologia, ramo da entomologia forense que avalia a presença de drogas por meio dos insetos necrófagos, e os possíveis efeitos destas substâncias no seu desenvolvimento (INTRONA et al., 2001). Como os insetos se alimentam de tecidos de cadáveres, eles podem absorver as substâncias consumidas pelo animal ou ser humano quando ainda vivo. Uma extraordinária diversidade de substâncias químicas psicoativas, barbitúricas, tóxicas, estimulantes ou mesmo os venenos, podem ser identificados nos corpos dos insetos encontrados nos cadáveres, por meio de técnicas de laboratório, como a cromatografia. Fenobarbital, alprazolam, fluoxetina, clonazepan, diazepam, cocaína, morfina, opiáceos e anfetaminas são algumas das substâncias detectadas em tecidos de Calliphoridae (GOSSELIN et al., 2011).

Uma das espécies de maior relevância forense no mundo é *Chrysomya albiceps*, espécie nativa do continente africano e que, atualmente, possui distribuição cosmopolita, assumindo o status de espécie invasora. Em Pernambuco, estado do Nordeste do Brasil, por exemplo, a espécie tem sido a dominante em diversas paisagens (VASCONCELOS et al., 2015) e efetivamente coloniza cadáveres humanos (OLIVEIRA & VASCONCELOS, 2010).

*Chrysomya albiceps* tem sido utilizada na entomotoxicologia por armazenar em seus tecidos uma diversidade de substâncias tóxicas, permitindo a detecção, identificação e quantificação química de compostos. Um dos exemplos é o inseticida Fosfeto de Alumínio (AIP), que quando presente em carcaças de coelhos, leva à contaminação química das larvas e atraso no seu desenvolvimento (EL-ASHRAM et al., 2022). A presença dos inseticidas malathion e parathion também já foi detectada em tecidos de larvas de *C. albiceps* (GOSSELIN et al., 2011).

## 1.2 IVERMECTINA E IMIDACLOPRID, SUBSTÂNCIAS DE RISCO PARA ORGANISMOS NÃO-ALVO

No âmbito veterinário, os compostos antiparasitários que contêm como princípio ativo a Ivermectina (IVM) ( $C_{48}H_{74}O_{14}$ ) (**Figura 1a**), um derivado semissintético da abamectina, estão entre os mais utilizados para controlar ecto e endoparasitas do gado e animais domésticos, com amplo espectro e interferindo com os canais de cloreto controlados por glutamato encontrados em invertebrados, mas não em espécies de vertebrados (KOSITZ et al., 2022). A IVM também é usada no controle de larvas de Calliphoridae causadoras de miíase humana (RIBEIRO et al., 2001).

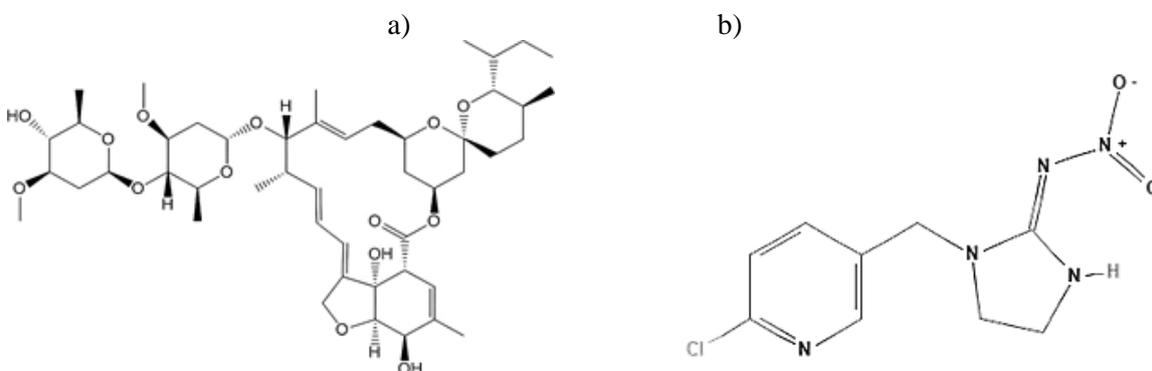
Quando administrado ao gado, estima-se que entre 80 e 98% do fármaco deixe o organismo sem ser metabolizado nas fezes, atingindo o solo, razão pela qual há uma crescente preocupação com a contaminação ambiental e os efeitos em organismos não alvo, como insetos terrestres (SOUZA & GUIMARÃES, 2022). Besouros rola-bosta têm sido os insetos mais frequentemente usados como modelo para testar o efeito residual de ivermectina, enquanto outros organismos diretamente afetados pelo composto, como larvas de Diptera, têm sido negligenciados em pesquisas experimentais.

Devido ao seu acesso fácil à população, a IVM pode ser utilizada de forma indiscriminada em pessoas e animais domésticos, o que merece um estudo mais aprofundado de seus possíveis efeitos ao nível do genoma de espécies colonizadoras de carcaças.

Na agricultura, por outro lado, o Imidacloprid (IMI) ( $C_9H_{10}ClN_5O_2$ ) (**Figura 1b**) é um inseticida aprovado pela ANVISA – Brasil e muito utilizado para controle de pragas nas culturas de algodão, banana, cebola, feijão. Segundo Jeschke et al. (2011), o IMI corresponde a cerca de 40% do comércio de neonicotinóides do mundo, sendo o composto mais vendido. É

considerado um inseticida potente que interage como nicotina, epibatidina e os análogos da toxina nereis com o receptor nicotínico pós-sináptico de acetilcolina. Em condições típicas de aplicação em campo, apenas uma pequena parte chega ao seu destino final, ou seja, o alvo biológico. A maior parte é liberada no ecossistema, podendo permanecer suspenso em partículas no ar, até ser degradado biologicamente ou abioticamente para evitar acúmulo ou contaminação (WAMHOFF et al., 1999).

Figura 1. Estrutura dos compostos genotóxicos (a) Ivermectina e (b) Imidacloprid.



### 1.3 O ENSAIO COMETA PARA DETECÇÃO DE DANOS GENOTÓXICOS EM INSETOS

Vários procedimentos analíticos de detecção/quantificação de drogas têm sido usados para a análise de tecidos de insetos, e a escolha da técnica depende das propriedades físico-químicas do composto e da seletividade. No entanto, as técnicas usadas em entomotoxicologia nem sempre são sensíveis o suficiente e, na maioria das vezes, requerem *pools* de espécimes para detectar qualquer droga presente (GOSSELIN et al., 2011).

A presença de drogas não significa, necessariamente, a morte dos organismos não-alvo. Efeitos subletais são igualmente importantes para entender a dinâmica de compostos tóxicos em seres vivos. Uma abordagem diferente para avaliar o efeito de substâncias tóxicas em organismos não-alvo inclui a detecção de danos no material genético.

Assim como agrotóxicos e compostos aniparasitários, outros elementos químicos estressores, como os provenientes da radioatividade natural, da poluição e da liberação de

medicamentos no meio ambiente podem ter graves consequências aos organismos (PHILLIPS & ARLT, 2009), incluindo danos genotóxicos.

No contexto dos testes de curta duração, um agente genotóxico é aquele que induz mutações pontuais, deleções, inserções, ampliações de genes, rearranjos cromossômicos ou alterações cromossômicas numéricas (aneuploidia) (PHILLIPS & ARLT, 2009). Como o DNA é a fonte da informação genética, sua integridade e estabilidade são essenciais para a sobrevivência dos organismos e espécies, a longo prazo. Isso porque os danos constantes ao DNA gerados pelo contato com vários agentes químicos cada vez mais lançados no meio ambiente, resultam em danos não reparados, levando a mutações e alterações dos processos normais das células (GAJSKI et al., 2019). O termo dano ao DNA representa qualquer alteração química em sua estrutura, na forma de uma quebra de suas fitas, a perda ou troca de suas bases nitrogenadas, entre outros (CHATTERJEE & WALKER, 2017).

O Ensaio do cometa, também conhecido como Eletroforese em Gel de Célula Única (SCGE), foi desenvolvido pela primeira vez por Ostling e Johansson em 1984, e tem se popularizado como um ensaio muito acessível para detectar danos ao DNA. No nível molecular, a formação de “cometas” no DNA das células após dano genotóxico pode ser visualizada através do método de eletroforese em gel e indica quebras na cadeia de DNA, pois essa molécula danificada migra em uma taxa diferente do DNA não danificado durante a eletroforese (LANGIE et al., 2015).

No Ensaio cometa, quando uma suspensão de célula única contendo DNA danificado embebida em agarose de baixo ponto de fusão é submetida à eletroforese, o DNA danificado migra para longe do corpo nucleico contendo DNA não danificado, assemelhando-se à estrutura de um cometa. A parte intacta do nucleico do DNA é chamada de “cabeça” e a sequência de DNA danificada é chamada de “cauda”. A porcentagem de DNA na cauda é diretamente proporcional à porcentagem de dano ao DNA que ocorreu em uma determinada célula. Assim, contando uma amostra representativa de ~ 100-300 células por tecido, é possível chegar à porcentagem média de dano ao DNA acumulado em um determinado tecido devido ao estresse genotóxico (BEEDANAGARI, 2017).

Dentre os insetos dípteros, *Chrysomya albiceps* é uma espécie de importância forense presente em área urbana da região neotropical, porém não há estudos sobre os efeitos genotóxicos de compostos ambientais nesta espécie. A formulação de ensaios toxicogenéticos é amplamente utilizada em *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (VERÇOSA et al., 2017; SANTANA et al., 2018; AMORIM et al., 2020) e têm motivado

estudos com outras espécies de Diptera de relevante importância para a saúde animal e humana. O Ensaio cometa tem sido utilizado como metodologia para avaliar danos no DNA em vários tipos de modelos animais em todo o mundo, por ser um método confiável e sensível para estudos *in vivo* e *in vitro* em pesquisas fundamentais com invertebrados (revisão em GAJSKI et al., 2019)

Diante da importância da espécie *C. albiceps* na entomotoxicologia forense, como agente causal de míases e na polinização de culturas agrícolas anuais e perenes, o presente trabalho teve como ponto de partida a necessidade de avaliar compostos capazes de gerar danos genotóxicos à espécie.

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Testar a validação da metodologia do Ensaio cometa como técnica de estudo de efeitos genotóxicos em imaturos de dípteros necrófagos.

### **Objetivos específicos**

1. Avaliar os efeitos genotóxicos em células da hemolinfa de imaturos expostos a diferentes doses de Ivermectina;
2. Avaliar os efeitos genotóxicos em células da hemolinfa de imaturos expostos a diferentes doses de Imidacloprid;
3. Integrar os resultados ao conhecimento atual sobre entomotoxicologia forense e toxicologia ambiental.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MANUTENÇÃO DE *CHRYSOMYA ALBICEPS* E EXPOSIÇÃO AOS AGENTES GENOTÓXICOS

Exemplares de *Chrysomya albiceps* foram coletados em um fragmento de Mata Atlântica na Mata do Curado, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil, em armadilhas confeccionadas com garrafas PET iscadas com carne bovina em decomposição. Os insetos foram triados e identificados no Laboratório de Insetos de Importância Forense da UFPE, Recife, utilizando chaves taxonômicas. A criação de *C. albiceps* foi feita em gaiolas confeccionadas de garrafa PET de 5 L, recobertas com tecido voil. Os adultos foram alimentados com solução açucarada e para estimulação de oviposição foi oferecida carne em estágio de decomposição, acondicionada em uma placa de petri, no interior das gaiolas.

As larvas eclodidas foram mantidas em recipientes plásticos de 150 mL cobertos com voil, em condições semelhantes às condições naturais, com temperatura de  $24 \pm 2$  °C, umidade relativa aproximada de 70% e fotoperíodo de 12:12 (Claro: Escuro). As larvas foram alimentadas com carne bovina moída, e ofereceu-se vermiculita como substrato para pupariação. Os indivíduos emergidos foram mantidos em gaiolas confeccionadas com garrafas PET sendo alimentados com solução de água e açúcar.

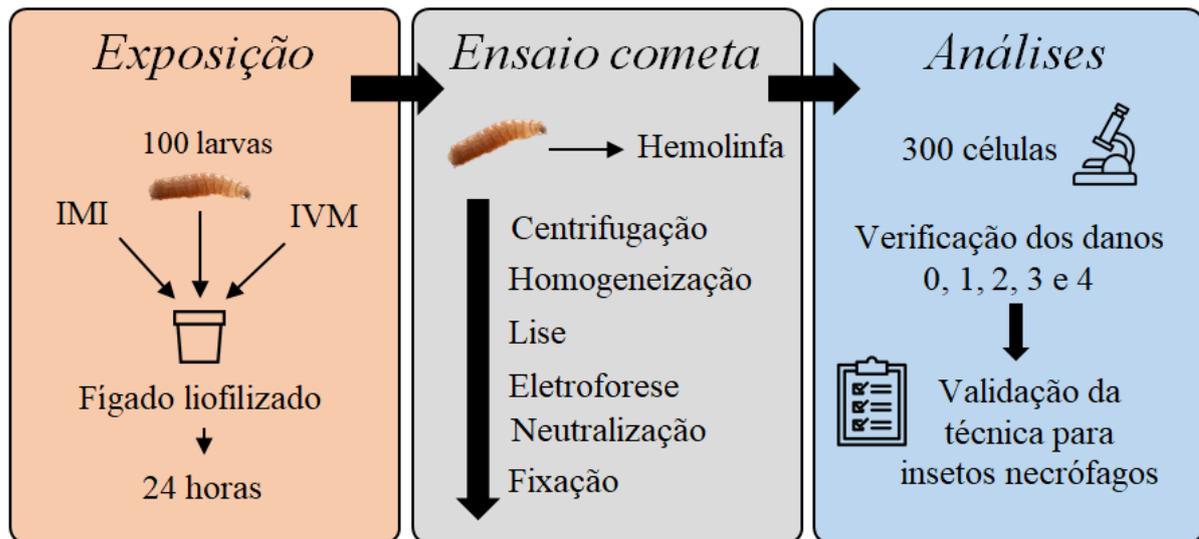
#### 3.2 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO COMETA EM *C. ALBICEPS*

Previamente aos experimentos, a metodologia do Ensaio cometa foi padronizada em células de hemolinfa extraídas de imaturos de *C. albiceps*, para seleção de nucleoides em bom estado e em quantidade suficiente.

Para os testes de genotoxicidade (sumarizado na **Figura 2**), foram selecionadas 100 larvas de terceiro ínstar cultivadas por 24 h no substrato de fígado liofilizado (BAUER et al., 2020), reidratado com cada um dos três tratamentos. O primeiro tratamento consistiu de fígado hidratado com solução de Ivermectina (Biofarma Indústria Química e Farmacêutica SA), diluída em água destilada. O segundo tratamento consistiu de fígado hidratado com o inseticida neonicotinóide Imidacloprid (1-(6-cloro-3-piridil)metil-2-nitroiminoimidazolidina) (Bayer Evidence® 700 WG - 700 g/kg - 70% m/m), diluído em água destilada. O terceiro tratamento

consistiu do controle negativo, em que apenas água destilada foi incorporada ao fígado liofilizado, e controle positivo (com Ciclofosfamida a 3,83 mM), a fim de obter resultados positivos de danos, para validação do Ensaio.

Figura 2. Processos utilizados para a obtenção dos resultados do Ensaio cometa, utilizando células de larvas de *Chrysomya albiceps* expostas a concentrações de Ivermectina e Imidacloprid.



Após a exposição das larvas aos tratamentos (substrato controle ou contaminado com substâncias tóxicas) por 24 h, foram extraídas células da hemolinfa (hemócitos) de um grupo de 60 larvas de cada réplica. As larvas foram resfriadas a 4 °C / 30 s para diminuir a taxa metabólica e facilitar a manipulação. Passado este tempo, cada larva foi transferida para um poço de uma placa escavada, contendo 150 µL de solução de EDTA para impedir a coagulação da hemolinfa. Após rompimento da cutícula de um grupo de 35 larvas por réplica, a hemolinfa (cerca de 60 µL) foi coletada em microtubos e homogeneizada com uma solução de 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão (agarose LM) a 37 °C, na ausência de luz.

O material homogeneizado (60 µL) foi aplicado sobre lâminas histológicas previamente preparadas (lixadas na face superior; lavadas com água e detergente e álcool a 70%; banhadas em agarose padrão 1,5%), e cobertas com lamínulas (24 mm x 60 mm) (VERÇOSA et al. 2017). As lâminas foram mantidas a 4°C durante 10 min (para solidificação da agarose) e em seguida, imersas em solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 1 M NaOH; 1% Tris pH 10; 1% Triton X-100 e 10% DMSO) por 48 h, a 4°C. Após esse período, as lâminas foram removidas da solução de lise e alinhadas em uma cuba de 40 cm, que foi preenchida com o tampão de eletroforese (1 M NaOH; 200 mM EDTA pH 13) para

estabilização do material por 20 min a 4°C. Na sequência, as lâminas foram submetidas a uma corrida eletroforética de 40 cm, a 40 V e 300 mA, por 20 min.

Posteriormente, foram colocadas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min, fixadas em etanol absoluto por 5 min, secas ao ar e armazenadas a 4°C até o momento da análise. Os nucleoides foram avaliados em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager. M2), equipado com o filtro Alexa-Fluor 546 com aumento de 400 x. O material genético foi corado com 50 µL de GelRed (Biotium), diluído em água purificada (1:500).

### 3.3 ANÁLISES DE DADOS

Os danos genotóxicos nas células expostas a cada um dos tratamentos foram representados pelo formato do cometa. Os cometas observados ao microscópio foram classificados de acordo com a integridade da cabeça e comprimento da cauda, atribuindo-se valores de 0 (ausência de dano) até 4 (dano máximo). Foram observadas 100 células (50 em cada uma de duas lâminas analisadas) para cada réplica, totalizando 300 nucleoides avaliados por tratamento. A moda (Mo) para cada concentração foi obtido mediante a contagem de ocorrência de cada tipo de dano na amostragem avaliada. A partir dos níveis de dano observados foram calculados os valores do Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD%), de acordo com as fórmulas a seguir:

Fórmula 1:

$$ID = 0 \times (\text{N}^\circ \text{ de cometas classe } 0) + 1 \times (\text{N}^\circ \text{ de cometas classe } 1) + 2 \times (\text{N}^\circ \text{ de cometas classe } 2) + 3 \times (\text{N}^\circ \text{ de cometas classe } 3) + 4 \times (\text{N}^\circ \text{ de cometas classe } 4)$$

Fórmula 2:

$$FD\% = \frac{[(\text{N}^\circ \text{ total de cometas} - \text{N}^\circ \text{ cometas classe } 0) \times 100]}{\text{N}^\circ \text{ total de cometas}}$$

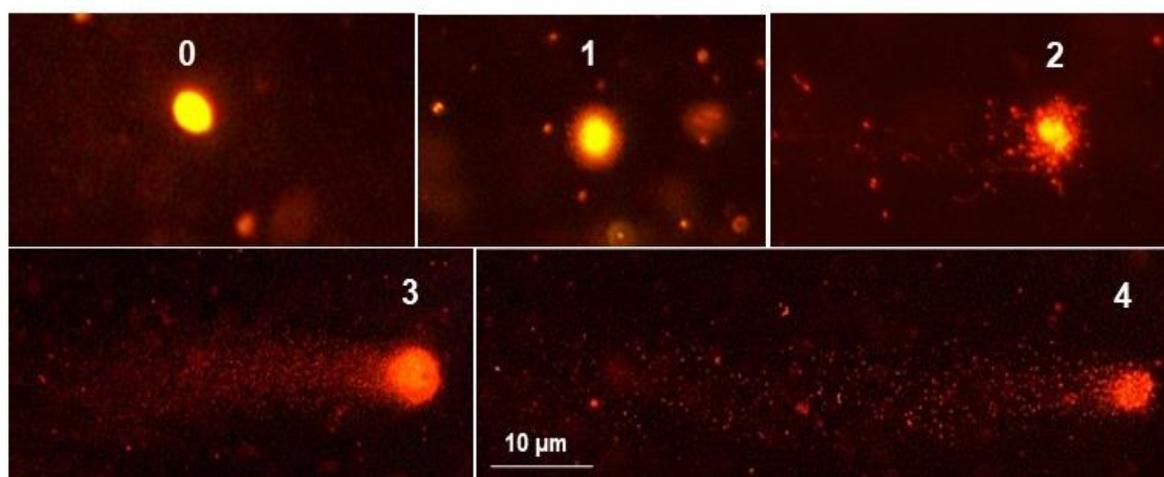
A análise estatística dos valores médios de ID e FD% foi realizada pelo teste de Análise da Variância (ANOVA) entre todos os tratamentos, e pelo pós-teste de Bonferroni, par a par, no programa Stata 14.2. O nível de significância foi de 5%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 VALIDAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA DETECÇÃO DE DANOS GENOTÓXICOS

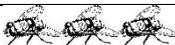
Os cometas observados ao microscópio foram classificados de acordo com a integridade da cabeça e comprimento da cauda, atribuindo-se valores de 0 (ausência de dano) até 4 (dano máximo). Seguindo as recomendações Møller et al. (2020) para avaliação do Ensaio cometa em novas espécies, foi elaborado o padrão de classificação visual dos danos de nível 0 até 4 de *C. albiceps*, conforme imagens **Figura 3**, obtidas do grupo controle positivo. Foram observadas 100 células (50 em cada uma de duas lâminas analisadas) para cada réplica, totalizando 300 nucleoides avaliados por tratamento.

Figura 3. Imagens do Ensaio cometa (representando nucleoides) corados com GelRed (Biotium) e gerados em hemócitos de larvas de *Chrysomya albiceps*. A classe zero (0) representa a ausência de dano genético e as classes 1 a 4 indicam danos crescentes no DNA (aumento da cauda do cometa e diminuição de sua cabeça).



Propusemos critérios metodológicos para avaliar a validade do Ensaio cometa como ferramenta para detecção de danos genotóxicos em *C. albiceps* e observamos que esta técnica pode ser considerada satisfatória (Quadro 1).

Quadro 1. Avaliação dos critérios para validação da técnica do ensaio cometa para detecção de danos genotóxicos em células de *Chrysomya albiceps*.

Critério	
Sensibilidade para detectar o dano genotóxico	
Necessidade de baixo número de indivíduos	
Necessidade de pequeno volume de material biológico (hemolinfa)	
Padronização da evidência visual do dano	
Facilidade de correlação dose-dependente	
Necessidade de equipamentos adicionais	
Confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados	
Possibilidade de testar vários compostos	
Facilidade de construção das curvas de calibração	
Fidedignidade de comparação com os controles negativo e positivo	

 = precisa de grandes modificações no protocolo (reagentes, testes piloto elaborados)

 = precisa de pequenas modificações no protocolo

 = totalmente adequado ao modelo proposto

#### 4.2 ENSAIO COMETA EM *CHRYSOMYA ALBICEPS*

Os resultados de genotoxicidade obtidos neste estudo estão apresentados na Tabela 1. Conforme indicado na tabela, os efeitos genotóxicos de ID e FD% médios de todas as concentrações testadas de IVM e IMI foram significativamente diferentes do grupo controle negativo. Também foram positivos os resultados de genotoxicidade do grupo controle positivo, com Ciclofosfamida (3,83 mM), com ocorrência de danos de todos os níveis (incluindo dano 3 e 4), que resultaram em medidas altas de ID =  $277,33 \pm 20,98$  e FD% =  $90,00 \pm 1,73$ . Conforme esperado, esses valores diferiram estatisticamente dos obtidos no grupo controle negativo (ID =  $26,00 \pm 9,54$  e FD% =  $10,33 \pm 2,08$ ).

Tabela 1. Média dos danos genéticos e desvio padrão (Dp) observados em células hemolinfáticas de larvas de *Chrysomya albiceps* submetidas ao tratamento com água destilada (controle negativo); Ciclofosfamida 3,83 mM (Controle positivo) e concentrações de Imidacloprida (IMI) e Ivermectina (IVM). Nível de dano: zero (0) representa ausência de dano genético e 1 a 4 são os níveis crescentes de dano genético. Dp (Desvio padrão).

Tratamentos	Nível de dano (média ± Dp)					Índice de dano ± Dp	Frequência de dano ± Dp	*
	0	1	2	3	4			
Controle Negativo	89,67 ± 2,08	3,67 ± 2,31	0	4,33 ± 4,51	2,33 ± 0,58	26,00 ± 9,54	10,33 ± 2,08	I n d i c a d i f
Controle Positivo	10,00 ± 1,73	14,33 ± 2,89	11,00 ± 5,29	17,67 ± 4,04	47,00 ± 6,08	277,33* ± 20,98	90,00* ± 1,73	
IVM 11,6 x 10 <sup>-17</sup> mM	73,67 ± 0,58	20,00 ± 3,61	5,00 ± 2,00	1,33 ± 2,31	0	34,00 ± 7,00	26,33* ± 0,58	
IVM 23,2 x 10 <sup>-17</sup> mM	58,33 ± 5,51	22,67 ± 4,16	12,33 ± 1,53	5,00 ± 2,00	1,67 ± 0,58	69,00* ± 10,00	41,67* ± 5,51	
IMI 0,0468 mM	13,67 ± 3,06	10,33 ± 2,52	8,33 ± 3,06	25,67 ± 7,51	42,00 ± 2,00	272,00* ± 16,37	86,33* ± 3,06	
IMI 0,0936 mM	21,33 ± 2,89	16,33 ± 5,51	11,00 ± 2,65	20,00 ± 2,65	31,33 ± 4,93	223,67* ± 17,50	78,67* ± 2,89	

erências estatisticamente significantes na análise *post hoc* de Bonferroni ( $P \leq 0,05$ ) em relação ao grupo controle negativo.

As **Figuras 4 e 5** apresentam os resultados comparativos entre os grupos controle e o tratamento com IVM e IMI, separadamente, demonstrando o elevado efeito genotóxico dos compostos para imaturos de *C. albiceps*. Os resultados da análise estatística está apresentado na **Tabela 2**.

Figura 4. Índice de Dano e Frequência de Dano ( $\bar{x} \pm Dp$ ) após exposição de *C. albiceps* ao grupo controle negativo (água destilada), controle positivo (Ciclofosfamida 3,83 mM) e concentrações de ivermectina (baixa concentração =  $11,6 \times 10^{-17}$  mM alta concentração =  $23,2 \times 10^{-17}$  mM). Abreviações: controle negativo (Cont. N), controle positivo (Cont. P).

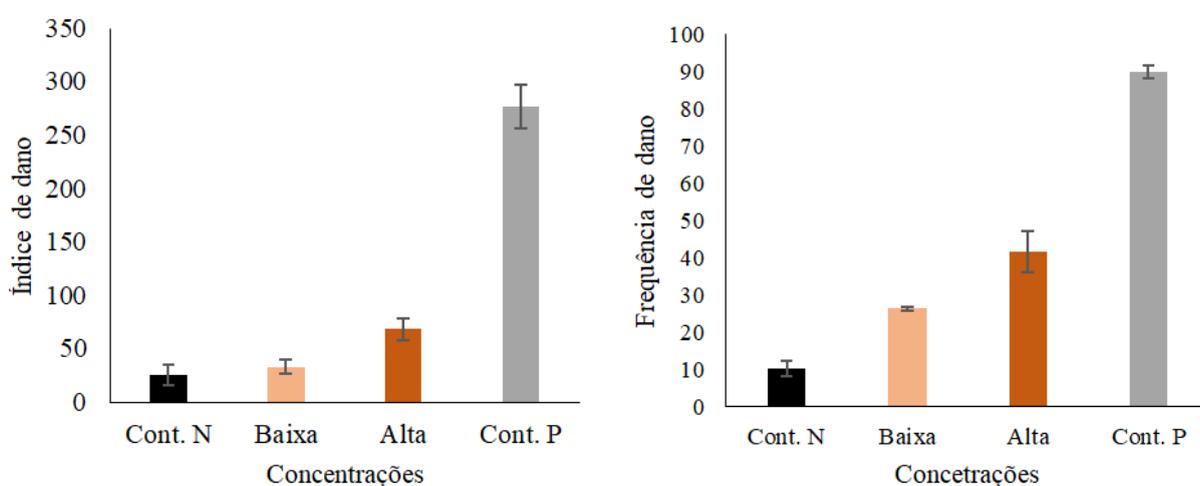


Figura 5. Índice de dano e Frequência de dano ( $\bar{x} \pm Dp$ ) após exposição de *C. albiceps* ao grupo controle negativo (água destilada), controle positivo (Ciclofosfamida 3,83 mM) e concentrações de Imidacloprid (baixa concentração = 0,0468 mM, alta concentração = 0,0936 mM). Abreviações: controle negativo (Cont. N), controle positivo (Cont. P).

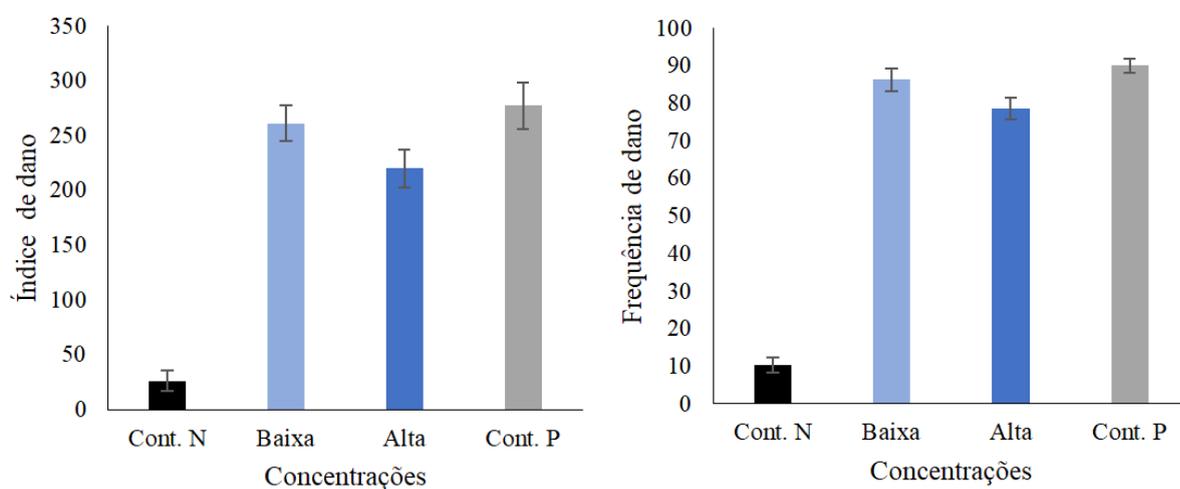


Tabela 2. Comparações par a par no post-hoc de Bonferroni entre os valores médios de Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) observados em tratamentos de *Chrysomya albiceps* com compostos de Ivermectina (IVM) (a) e Imidacloprid (IMI) (b).

<b>Tratamentos</b>	Controle negativo	Controle positivo	IVM 11,6 x 10 <sup>-17</sup> mM	IVM 23,2 x 10 <sup>-17</sup> mM
Controle negativo		0,0001*	0,0010*	0,0001*
Controle positivo	0,0001*		0,0001*	0,0001*
IVM 11,6 x 10 <sup>-17</sup> mM	1,0000	0,0001*		0,0020*
IVM 23,2 x 10 <sup>-17</sup> mM	0,0220*	0,0001*	0,066	

(a)

\* Significant difference ( $P < 0.05$ ).

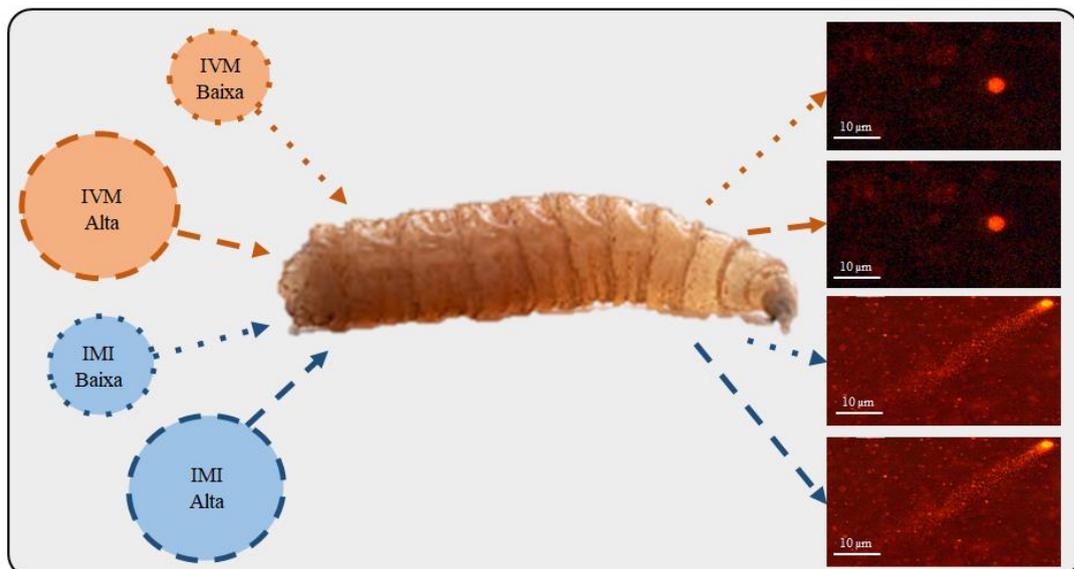
<b>Tratamentos</b>	Controle negativo	Controle positivo	IMI 0,0468 mM	IMI 0,0936 mM
Controle negativo		0,0001*	0,0001*	0,0001*
Controle positivo	0,0001*		0,6610	0,0030*
IMI 0,0468 mM	0,0001*	1,000		0,0330*
IMI 0,0936 ng/mL	0,0001*	0,0250*	0,044*	

(b)

\* Significant difference ( $P < 0.05$ ).

Para ambos os compostos testados (IVM e IMI) foram observados todos os tipos de danos (de 0 a 4), porém, houve maior ocorrência de um determinado tipo de dano em cada composto. Para as duas concentrações testadas de Ivermectina, o dano predominante foi o dano do tipo 0 (Mo = 396). Por outro lado, para o composto Imidacloprid a maior ocorrência de dano nas células foi no nível 4 (Mo = 220), para ambas concentrações (ilustração na **Figura 6**).

Figura 6. Tipo de dano predominante nas diferentes concentrações testadas de Ivermectina e Imidacloprid em células de *Chrysomya albiceps* avaliadas por meio da moda (Mo) após Ensaio cometa.





## 5. DISCUSSÃO

Estudos sobre os efeitos genotóxicos e mutagênicos feitos por Sousa et al. (2019) com baixas concentrações de Ivermectina foram aos primeiros a indicar que baixas concentrações desse composto são genotóxicos e mutagênicos para a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*. No presente estudo, a IVM foi geradora de genotoxicidade nas mesmas diluições aplicadas Sousa et al. (2019), de  $11,6 \times 10^{-17}$  e  $23,2 \times 10^{-17}$  mM, com significativo efeito dose-dependente entre as duas concentrações testadas em *C. albiceps*.

Nossos resultados corroboram também análises prévias de Ensaio cometa feitos com as duas concentrações de IVM, em larvas de *D. melanogaster* (CIPRIANO, 2023) que obteve valores altos de danos (ID = 138,0 e FD% = 52,3 e ID = 182,0 e FD% = 62,3) na menor e na maior concentração, respectivamente. Assim, é forte o argumento de que a IVM tem grande poder de causar alterações relevantes ao DNA de espécies de Dipteros, confirmando outros efeitos dose-dependentes da IVM, em outros dipteros como *Scathophaga stercoraria* e *Musca autumnalis* (RÖMBKE et al., 2009, 2010).

Danos genotóxicos significativos também foram observados em *C. albiceps* após tratamento com Imidacloprid. Nas condições testadas, entretanto, não foi possível observar um efeito dose-dependente, visto que as duas concentrações não diferiram entre si (0,0468 e 0,0936 mM). Esses resultados demonstram que em doses mais altas de IMI, como as escolhidas para este estudo, o composto oferece risco potencial. Esses resultados estão de acordo com testes feitos com a mosca polinizadora *Eristalis tenax* (Diptera: Syrphidae) (NAGLOO et al., 2023).

De acordo com Nagloo et al. (2023) o IMI persiste no ambiente por muito tempo após a aplicação inicial, resultando em exposição crônica a insetos não-alvo. Para um estudo mais aprofundado, os autores desenvolveram um bioensaio de alimentação natural para medir com precisão a dose de ingestão de IMI e os efeitos de toxicidade em *E. tenax*. Entre as doses testadas, apenas aquelas superiores a 12,1 ng/mg de IMI (ou 0,0468 mM) geraram um início de comprometimento locomotor grave nas moscas, que as impediu de completar a tarefa de alimentação. Nossos resultados corroboram esses resultados, ao indicarem para há chances de ocorrência de danos ao DNA nos casos de exposição de moscas a doses elevadas de IMI no campo, tal como 0,0468 mM e superior.

Estudos de Ensaio cometa aplicados a outros insetos, como abelhas *Apis* spp. coletadas em diferentes ambientes no Paquistão, mostraram que as provenientes de zonas agrícolas expostas a pesticidas apresentam mais fragmentação de DNA do que aquelas

coletadas em zonas livres de pesticidas (HAYAT et al., 2018). Os resultados desta pesquisa assumem especial importância uma vez que moscas da família Calliphoridae, incluindo *C. albiceps*, estão entre as principais polinizadoras de culturas agrícolas em pólos produtores, como o semi-árido nordestino do Brasil, e ocorrem tanto em cultivo orgânico quanto em plantações que sofrem aplicação de pesticidas (CARMO et al., 2021).

No nosso estudo observamos que, para IVM, apesar da predominância do dano 0 houve uma distribuição de danos de todos os níveis, mostrando que mesmo em doses muito baixas esse composto causa dano no material genético de *C. albiceps*. A ivermectina utilizada na agricultura e na pecuária gera preocupação devido às grandes quantidades lançadas no meio ambiente. Estima-se que 98% da dose administrada é liberada pelas fezes sem sofrer nenhum processo metabólico (SOUZA & GUIMARÃES, 2022). E como as doses administradas às larvas no nosso estudo foram baixas podemos inferir a possibilidade de que espécies não alvo possam ser prejudicadas com as quantidades de compostos liberadas no solo, devido ao possível consumo indireto.

Para os invertebrados a ação da Ivermectina está relacionada à entrada de mais íons cloreto nas células, causando hiperpolarização e culminando na paralisia dos sistemas neuromusculares e que resultam na perda da função celular e impulsos nervosos. Isso inibe os movimentos, fazendo com que a alimentação e reprodução sejam interrompidos (SOUZA & GUIMARÃES, 2022)

Foi possível avaliar no ensaio cometa realizado no presente estudo diferentes níveis de dano para uma mesma concentração nos dois compostos testados. Esse teste é capaz de distinguir pequenas diferenças de danos ao DNA em diferentes amostras de células (MØLLER & LOFT, 2014) utilizamos o padrão visual de (VERÇOSA et al., 2017) para identificar os danos observados nesse trabalho, mas outras abordagens são utilizadas como, por exemplo, a adoção de softwares que são capazes de detectar e classificar os níveis de danos nas células (GYORI et al., 2014).

O acúmulo de evidência dos efeitos negativos do uso de compostos como a IVM em animais, que por sua vez se transmitem a moscas colonizadoras de cadáveres, ou dos efeitos negativos de compostos como o IMI, que continuam ativos no ambiente após seu uso na agricultura, podem ser ainda melhor compreendidos com a aplicação concomitante do Ensaio cometa nos experimentos com diferentes espécies de Diptera. Sendo assim, nosso estudo abre perspectivas ao implementar a metodologia em *C. albiceps* e demonstrar um efeito genotóxico relevante em imaturos submetidos as doses dos dois compostos.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A pesquisa realizada consolida a técnica do Ensaio cometa para a detecção de efeitos genotóxicos em moscas de importância forense (primeiro estudo quantitativo na região Neotropical). Podemos concluir que:

- Valida-se aqui a relevância da espécie *C. albiceps* como modelo *in vivo* para o estudo de efeitos genotóxicos de compostos químicos biocidas, devido à abundância, dominância e ubiquidade da espécie como principal colonizadora de recursos animais efêmeros (carcaças e cadáveres)
- O Ensaio cometa é uma técnica eficiente para detectar danos genotóxicos em células de dípteros da Família Calliphoridae causados pelo composto **Ivermectina**
- O Ensaio cometa é uma técnica eficiente para detectar danos genotóxicos em células de dípteros da Família Calliphoridae causados pelo composto **Imidacloprid**
- Há uma correlação positiva entre a concentração de Ivermectina e o nível de dano genotóxico causado em *C. albiceps*
- Nas concentrações testadas do Imidacloprid, não foi possível estabelecer uma correlação positiva entre a dose/concentração e o nível de dano genotóxico causado em *C. albiceps*
- Propõe-se aqui um arcabouço inicial para a testagem de outros compostos químicos biocidas, como inseticidas, acaricidas, herbicidas, entre outros, tendo como modelos moscas necrófagas, fortalecendo a entomotoxicologia forense.

Alguns questionamentos surgem a partir da nossa pesquisa, e merecem ser investigados em estudos futuros:

- Há correlação entre os danos genotóxicos e os efeitos subletais nas populações de moscas necrófagas?
- Como a técnica do Ensaio cometa pode ser aprofundada para estudos de toxicologia ambiental de longa duração?
- Como construir inferências confiáveis entre danos genotóxicos observados nas células de um inseto necrófago e a exposição do substrato (animal, ser humano) a uma substância tóxica, bioativa, medicamentosa, entre outras?
- Como as pistas sobre danos genotóxicos podem auxiliar o entomologista forense?

## 7. REFERÊNCIAS

- AMORIM, E.M.; SANTANA, S.L.; SILVA, A.S. et al. Genotoxic assessment of the dry decoction of *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) leaves in somatic cells of *Drosophila melanogaster* by the Comet and SMART assays. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 61 (3): 329-237, 2020.
- BAUER, A.; BAUER, A.M.; TOMBERLIN, J.K. Impact of diet moisture on the development of the forensically important blow fly *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). **Forensic Science International** 312, 110333, p.1-10, 2020.
- BENBOW, M. E.; BARTON, P.S.; ULYSHEN, M. D. et al. Necrobiome framework for bridging decomposition ecology of autotrophically and heterotrophically derived organic matter. **Ecological Monographs** 89 (1), e01331, 2018.
- BEEDANAGARI, S. Genetic Toxicology. Volume 4. In: Samuel Chackalamannil, David Rotella and Simon E. Ward (Eds), **Comprehensive Medicinal Chemistry III**, Alkermes Inc., Waltham, MA, United States, p. 195–203, 2017.
- BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. The utility of arthropods in legal investigations. Jason H. Byrd, Jeffery K. Tomberlin (Eds). **Forensic Entomology**. 3rd edition, Boca Raton, CRC Press, 2019.
- CARMO, R.F.R.; BARBOSA, T.M.; TORRIS, A.F.; BEZERRA, M-A.S.; VASCONCELOS, S.D. Diversity of sarcosaprophagous Diptera (Calliphoridae, Sarcophagidae) in organic and conventional mango plantations in the Brazilian semi-arid region. **Revista Brasileira de Entomologia** 65 (1), e20200108, 2021.
- CHATTERJEE, N.; WALKER, G.C. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 58 (5): 235-263, 2017.
- CIPRIANO, T. H. A. S. **Avaliação do efeito genotóxico da Ivermectina e antígenotóxico das combinações com Vitamina D3 e Curcumina no modelo experimental *Drosophila melanogaster***. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada) - Universidade de Pernambuco, Recife, 2023.
- EL-ASHRAM, S.; TOTO, N.A.; EL WAKIL, A.; AUGUSTYNIAK, M.; EL-SAMAD, L.M. Reduced body length and morphological disorders in *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) larvae reared on aluminum phosphide-treated rabbits. **Scientific Reports** 12: 8358, 2022.
- ESTRADA, D.A.; GRELLA, M.D.; THYSSEN, P.J.; LINHARES, A.X. *Chrysomya albiceps* Wiedemann (Diptera: Calliphoridae) developmental rate on artificial diet with animal tissues for forensic purpose. **Neotropical Entomology** 38: 203-207, 2009.

GAJSKIA, G.; ŽEGURAB, B.; LADEIRA, C. et al. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 1 Invertebrates). **Mutation Research-Reviews in Mutation Research** 779: 82–113, 2019.

GOSSELIN, M.; WILLE, S. M. R.; FERNANDEZ, M. M. R. et al. Entomotoxicology, experimental set-up and interpretation for forensic toxicologists. **Forensic Science International** 208 (1-3): 1-9, 2011.

GYORI, B. M.; VENKATACHALAM, G.; THIAGARAJANE, P. S. et al. OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. **Redox Biology** 2: 457-465, 2014.

HAYAT, K.; AFZAL, M.; AQUEEL, M.A.; KHAN, Q.M. Determination of insecticide residues in fruits, vegetables, pollen, nectar and ground water of Punjab (Pakistan). **Journal of Agricultural Research** 56 (2): 95-105, 2018.

INTRONA, F.; CAMPOBASSO, C.P.; GOFF, M.L. Entomotoxicology. **Forensic Science International** 120 (1-2): 42-47, 2001.

JESCHKE, P.; NAUEN, R.; SCHINDLER, M.; ELBERT, A. Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 59 (7): 2897-2908, 2011.

KOSITZ, C.; BRADLEY, J.; HUTCHINS, H.; LASTA, A.; D’ALESSANDRO, H.; MARKS, M. Broadening the range of use cases for ivermectin – a review of the evidence. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 116: 201-212, 2022.

LANGIE, S. A. S.; AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The comet assay: past, present, and future. **Frontiers in Genetics** 6, 266, 2015.

MØLLER, P.; AZQUETA, A.; BOUTET-ROBINET, E. et al. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. **Nature Protocols** 15 (12): 3817-3826, 2020.

MØLLER, P.; LOFT, S. Statistical analysis of comet assay results. **Frontiers in Genetics** 5, 292, 2014.

NAGLOO, N.; RIGOSI, E.; O’CARROLL, D.C. Acute and chronic toxicity of imidacloprid in the pollinator fly, *Eristalis tenax* L., assessed using a novel oral bioassay. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 251: 114505, 2023.

OLIVEIRA, D.L.; VASCONCELOS, S.D. Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil and its implications for forensic entomology. **Forensic Science International** 198 (1- 3): 97-102, 2010.

PHILLIPS, D. H.; ARLT, V. M. **Genotoxicity: damage to DNA and its consequences**. In A. Luch (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. v. 1, pp. 87-110. 2009.

RIBEIRO, F. A. Q; PEREIRA, C. S. B; ALVES, A.; MARCON, M. A. Tratamento da miíase cavitária com ivermectina oral. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia** 67 (6): 755-761, 2001.

RÖMBKE, J.; BARRETT, K.; BLANCKENHORN, W.U.; HARGREAVES, T.; KADIRI, N.; et al. Results of an international ring test with the dung fly *Musca autumnalis* in support of a new OECD test guideline. **Science of the Total Environment** 408: 4102-4106, 2010.

RÖMBKE, J.; FLOATE, K.D.; JOCHMANN, R.; SCHÄFER, M.A.; PUNIAMOORTHY, N.; et al. Lethal and sublethal toxic effects of a test chemical (ivermectin) on the Yellow Dung Fly *Scathophaga stercoraria* based on a standardized international ring test. **Environmental Toxicology and Chemistry** 28: 2117–2124, 2009.

SANTANA S.L., VERÇOSA C.J., CASTRO I.F.A., et al. *Drosophila melanogaster* as model organism for monitoring and analyzing genotoxicity associated with city air pollution. **Environmental Science and Pollution Research** 25: 32409-32417, 2018.

SOUSA, F.A.; MORAIS, C.R.; VIEIRA, J.S.; MARANHO, L.S.; MACHADO, F.L.; PEREIRA, S., et al. Genotoxicity and carcinogenicity of ivermectin and amoxicillin *in vivo* systems. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 70: 103196, 2019.

SOUZA, R. B.; GUIMARÃES, J. R. Effects of Avermectins on the environment based on its toxicity to plants and soil invertebrates - a review. **Water, Air, & Soil Pollution** 233 (7): 259, 2022.

THYSSEN, P. J.; GRELLA, M. D. Efeito da escopolamina sobre o desenvolvimento de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) e sua importância para a estimativa do intervalo pós-morte. **Revista Brasileira de Criminalística** 1 (1): 39-42, 2011.

VASCONCELOS, S.D.; CRUZ, T.M.; SALGADO, R.L.; THYSSEN, P.J. Dipterans associated with a decomposing animal carcass in a rainforest fragment in Brazil: Notes on the early arrival and colonization by necrophagous species. **Journal of Insect Science** 13: 145, 2013.

VASCONCELOS, S. D.; BARBOSA, T. M.; OLIVEIRA, T. P. B. Diversity of forensically-important dipteran species in different environments in northeastern Brazil, with notes on the attractiveness of animal baits. **Florida Entomologist** 98 (2): 770-775, 2015.

VERÇOSA, C.J.; Moraes Filho, A. V.; Castro, I. F. A. et al. Validation of Comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 141: 148-153, 2017.

WAMHOFF, H.; SCHNEIDER, V. Photodegradation of imidacloprid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 47 (4): 1730-1734, 1999.