

DETECÇÃO DE INSETICIDAS POR BIOENSAIO COM *DROSOPHILA MELANOGASTER*R. Hirata¹, S.S. Dias², A.R. Rosa³¹Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental, Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

A sensibilidade da mosca *Drosophila melanogaster* para inseticidas foi avaliada para os organofosforados dimetoato e ometoato, carbamatos carbofuran e carbaril e os piretróides permctrina, deltametrina e alfa-cipermetrina. A finalidade do trabalho foi a de determinar sua eficiência como método de triagem na detecção de resíduos de inseticida. Como parâmetro de toxicidade utilizou-se a concentração letal mediana, CL_{50} , calculada pela percentagem de mortalidade das drosófilas expostas à diferentes concentrações inseticida por 24 horas. Os valores da CL_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) encontrados: carbofuran 9,70; carbaril > 5.000; dimetoato 19,9; ometoato 67,8; permctrina 581; deltametrina 1,28; alfa-cipermetrina 2,16 mostram que o bioensaio utilizando *Drosophila melanogaster* é útil como método de triagem na detecção de inseticidas, apesar de sua insensibilidade ao carbaril.

PALAVRAS-CHAVE: *Drosophila melanogaster*, inseticida, concentração letal mediana, relação estrutura-atividade.

ABSTRACT

DETECTION OF INSECTICIDES BY BIOASSAY WITH *DROSOPHILA MELANOGASTER*. The sensitivity of *Drosophila melanogaster* to insecticides has been evaluated for the organophosphorus dimethoate and omethoate, the carbamates carbofuran and carbaryl, and the pyrethroids permctrine, deltametrine and alpha-cypermethrine. This work was aimed at determining the fly's efficiency as a trial method for the detection of insecticide residues. Median lethal concentration, LC_{50} , calculated by percent mortality of the drosophilas exposed for 24 hours to several insecticide concentrations was used as the toxicity parameter. The LC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) values found: carbofuran 9.70; carbaryl > 5,000; dimethoate 19.9; omethoate 67.8; permctrine 581; deltametrine 1.28; alpha-cypermethrine 2.16, indicate that bioassay utilizing *Drosophila melanogaster* is useful as a trial method for the detection of insecticides, despite its insensitivity for carbaryl.

KEY WORDS: *Drosophila melanogaster*, insecticide, median lethal concentration, structure-activity relationships.

INTRODUÇÃO

Atualmente, grande número de agrotóxicos é utilizado na agropecuária para o combate dos mais variados tipos de pragas e doenças. Seu uso constante tem causado, paralelamente, problemas de intoxicação (FERRER & CABRAL, 1991) e de contaminação ambiental (ELFVENDAHL, 2000; MARGARIDO, 2001), devido a seus resíduos tóxicos que podem permanecer por um certo tempo após a aplicação.

Assim, as técnicas de investigação que visam o controle dos agroquímicos, como poluentes ambientais e contaminantes de alimentos, constituem um campo de grande relevância no programa de avaliações

toxicológicas e têm recebido constante atenção das autoridades governamentais e sanitárias em todo mundo (ESPIGARES *et al.*, 1998; McLEAY & HALL, 1999; WERNER *et al.*, 2000; AMARANENI & PILLALA, 2001).

Os ensaios biológicos, usados como método de triagem, constituem-se em um dos recursos mais adequados para detectar a presença de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos e dos componentes abióticos, em regiões onde o alto custo e as elevadas despesas operacionais dificultam o uso de aparelhos de alta precisão, para a análise de um número significativo de amostras. O bioensaio com mosca *Drosophila melanogaster* é um dos métodos de triagem descrito e utilizado na determinação de resi-

²Bolsita PIBIC-CNPq/IB³Bolsista CNPq

duos de inseticidas (JOSEPH JR. & KNOBEL, 1980; BAGDONAS *et al.*, 1988; PAULINO *et al.*, 1992; ALMEIDA & REYES, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2001).

Sabe-se, ainda, que a toxicidade de um pesticida está intimamente ligada a sua estrutura molecular: modificações entre classes de agrotóxicos e mesmo entre membros de uma mesma classe podem alterar acentuadamente suas atividades biológicas (ETO, 1974; HIRATA, 1995).

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a sensibilidade da mosca *D. melanogaster* a inseticidas selecionados e de correlacionar os dados obtidos com suas estruturas moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Inseticidas

Para os ensaios toxicológicos foram utilizados os organofosforados dimetoato-95,0% (Nortox) e ometoato-95,0% (Bayer); os carbamatos carbaril-85,0% (Rhodia Agro) e carbofuran-85,0% (FMC) e os piretróides (AgrEvo): permetrina-98,0%, deltametrina-98,5% e alfa-cipermetrina-96,5%.

Manutenção das moscas

Em estufa a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e $90 \pm 3\%$ de umidade, cerca de 300 moscas foram mantidas em frascos de vidro (250 mL), contendo meio nutritivo preparado com 1.000 mL de água desionizada, 30 g de ágar (Difco), 100 g de levedura em pó, 60 g de açúcar e 15 mL de solução fungicida (80 mL de ácido ortofosfórico, 800 mL de ácido propiônico e 1.120 mL de água desionizada). Os repiques foram realizados a cada 5 dias, transferindo-se as moscas para outros frascos contendo meio nutritivo. Após um período de 2 dias as drosófilas foram retiradas, permanecendo nos frascos apenas os ovos depositados. As moscas foram utilizadas 3 dias após a transformação das pupas em adultos.

Determinação da concentração letal mediana (CL_{50})*

Nas determinações da CL_{50} foram preparadas soluções acetônicas de cada inseticida nas faixas de concentração (mg.mL^{-1}): dimetoato (10–30); ometoato (20–80); carbofuran (7,0–15); carbaril (100–5000); permetrina (100–650); deltametrina (0,25–5,0) e alfa-cipermetrina (0,25–5,0). Para cada concentração, alíquotas de 1 mL destas soluções foram distribuídas em papel-filtro Whatman n° 1, com área aproximada de 25 cm^2 , colocado sobre a superfície interna de frascos de vidro de 5 cm de altura por 1,6 cm de

diâmetro interno. A cada teste realizado foi preparado um frasco controle contendo 1 mL do solvente acetona. Os conteúdos dos frascos foram evaporados até a secura, acrescentando-se, a seguir, a cada um deles 0,1 g de meio nutritivo. As moscas, anestesiadas com éter etílico, foram distribuídas nos frascos em número de 50 (sexo 1:1) e, em seguida mantidas em estufa a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e $90 \pm 3\%$ de umidade. As percentagens de mortalidade foram determinadas após 24 horas de exposição e, para se estabelecer os valores da CL_{50} a partir dos dados de mortalidade, utilizou-se o método dos probitos como descrito por BROWN (1980) e CASSARETH & DOULL (1991). Para cada inseticida foram realizados testes preliminares a fim de conhecer-se a concentração que causava uma mortalidade de drosófilas próxima a 50%. Em seguida, foram conduzidos ensaios, com cinco repetições, para concentrações inseticida acima e abaixo do valor da CL_{50} provisória, inclusive, para se calcular o valor final desse parâmetro de toxicidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação do método do probito aos dados da Tabela 1, forneceu para o carbofuran um valor de $9,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a concentração letal mediana, como mostra a Figura 1.

O mesmo tratamento de cálculo para os outros inseticidas levou aos resultados constantes da Tabela 2. Uma análise desses valores mostra que inseticidas do mesmo grupo, como os carbamatos carbofuran e carbaril, podem exibir comportamentos inseticida bem diferentes. Assim, enquanto o carbofuran apresenta alta toxicidade para *D. melanogaster* (baixo valor da CL_{50}), este inseto é praticamente insensível ao análogo carbaril, não ocorrendo nenhuma mortalidade mesmo para concentrações tão altas como $5.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Como verificado por SUN (1985), para mosca doméstica, a lenta velocidade de penetração do carbaril após sua aplicação tópica, pode ser o caso para o presente experimento, pois a absorção do inseticida pela drosófila verifica-se pelo contato de suas patas com a superfície do papel-filtro contendo o inseticida, um meio de penetração menos eficiente que a tópica. A baixa velocidade de absorção forneceria, então, tempo suficiente para a ocorrência de processos de degradação do carbaril antes que uma dose tóxica se acumulasse no sítio de ação do inseto. Assim, como sugerido por KUHR (1971) para insetos pouco susceptíveis ao carbaril, a resistência das

*Concentração letal mediana é uma estimativa estatística da concentração de um agente tóxico no meio ambiente, necessária para causar a morte de 50% dos animais em experimentação, sob certo tempo de exposição e condições específicas (HAYES, 1975).

drosófilas à ação deste inseticida pode resultar, também, de processos oxidativos de degradação, com sua subsequente transformação para metabólitos não-tóxicos, solúveis em água e passíveis de eliminação.

Essa diferença de toxicidade foi, também, verificada por METCALF *et al.* (1967) na determinação da DL₅₀ tóxica para mosca doméstica, sendo encontrado os valores 7 e maior que 5.000 µg.g⁻¹ de inseto para o carbofuran e o carbaril, respectivamente, o que vem corroborar os dados da CL₅₀ 9,7 e maior que 5.000 µg.mL⁻¹ auferidos no presente trabalho. Segundo KUHR (1976), a presença de dois radicais metila (-CH₃) na posição 2 da subunidade ciclofurânica no carbofuran (Fig. 2), acentua a afinidade desta molécula inseticida pelos sítios aniônicos e esteéricos da acetilcolinesterase, aumentando a complementaridade inseticida-enzima e, conseqüentemente, a velocidade de sua carbamilação. Estas interações, características da ação biológica dos inseticidas carbamatos e de elevada intensidade para o carbofuran, são responsáveis pela sua alta toxicidade verificada para mosca doméstica e, certamente, também, para o presente caso da *D.melanogaster*.

Essa grande diferença de atividade biológica entre esses dois inseticidas carbamatos já não é verificada para os organofosforados dimetoato e ometoato, em relação à *D. melanogaster*, como mostra os valores de suas CL₅₀ (Tabela 2). Segundo UCHIDA *et al.* (1965), em insetos, a toxicidade do dimetoato depende da sua velocidade de degradação e de outros fatores como: velocidade de penetração, velocidade de ativação e sensibilidade da acetilcolinesterase ao homólogo oxigenado ometoato. Estes autores verificaram que, para mosca doméstica, esses três fatores eram bem acentuados: o dimetoato apresentou uma alta toxicidade para este inseto.

Já, experimentos *in vitro* conduzidos por ZECH *et al.* (1966) mostraram que o dimetoato não é um inibidor da enzima acetilcolinesterase, comportamento esse diferente do ometoato que, nas mesmas condições, é um inibidor direto desta enzima, inibição que se constitui no princípio de ação dos inseticidas

organofosforados. Entretanto, *in vivo* como é o caso do presente trabalho, a Tabela 2 mostra que o dimetoato apresentou uma atividade maior (CL₅₀ menor) que a do ometoato. Para as drosófilas, como foi para a mosca doméstica, a atividade do dimetoato pode estar associada a sua passagem para dimetoxon (ometoato) por uma dessulfuração oxidativa, predominante nos insetos em relação à hidrólise, e que transformaria a ligação P=S para a mais reativa P=O, única diferença estrutural entre as moléculas do dimetoato e ometoato (Fig. 2). O ometoato por não apresentar a alternativa da dessulfuração oxidativa estaria, portanto, mais sujeito a processos de degradação, por exemplo, a hidrolítica: o ometoato é muito mais sensível à água (50% de degradação em 2,5 dias a pH 7) que o dimetoato, com a mesma percentagem de degradação em 12 dias a pH 9 (WORTING & WALKER, 1987). A menor solubilidade em água para o dimetoato (25 g.L⁻¹) em relação ao ometoato (miscível) pode ter sido, também, um fator determinante na atividade biológica desses inseticidas para *D. melanogaster*, pois o dimetoato sendo mais lipossolúvel seria absorvido mais rapidamente. O menor poder de penetração do ometoato pelas patas do inseto reduziria em parte sua atividade biológica, pois deixaria este inseticida mais tempo sujeito a processos de degradação química, como a hidrólise, antes dele atingir o sítio ativo (sinapses) da drosófila.

Em relação aos piretróides, o alto potencial tóxico (baixo valor da CL₅₀) para *D. melanogaster* apresentado pela deltametrina e alfa-cipermetrina (Tabela 2) pode ser devido, como sugerido por ELLIOTT & JANES (1979); FARNHAM & KHAMBAY (1995), a ocorrência de uma forte ligação de complementaridade a um receptor quiral no inseto, em razão da presença de grupos apropriadamente orientados na molécula piretróide que possui um grupo α-CN na configuração *S*, a mesma apresentada pela deltametrina e a forma isomérica mais ativa da alfa-cipermetrina (Fig.2). Esta interação é reduzida quando a configuração do α-CN

Tabela 1 - Mortalidade de *Drosophila melanogaster* expostas ao inseticida carbofuran.

Concentração (µg.mL ⁻¹)	Mortalidade (%)*	Desvio padrão
7	20,0	2,0
9	46,8	2,3
11	50,2	2,3
13	77,6	3,8
15	92,2	1,8

*Média de cinco valores

Tabela 2 - Concentração letal mediana de inseticidas para *Drosophila melanogaster*.

Inseticida	CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
carbofuran	9,7±1,6
carbaril	> 5.000
dimetoato	19,8±4,1
ometoato	68±16
deltametrina	1,28±0,80
alfa-cipermetrina	2,16±0,76
permetrina	580±250

A incerteza expandida da CL₅₀ foi calculada de acordo com EURACHEM/CITAC Guide (2000); HARRIS, D.C. (2001), considerando apenas a incerteza padrão tipo A e aplicando o fator de abrangência k igual a 2

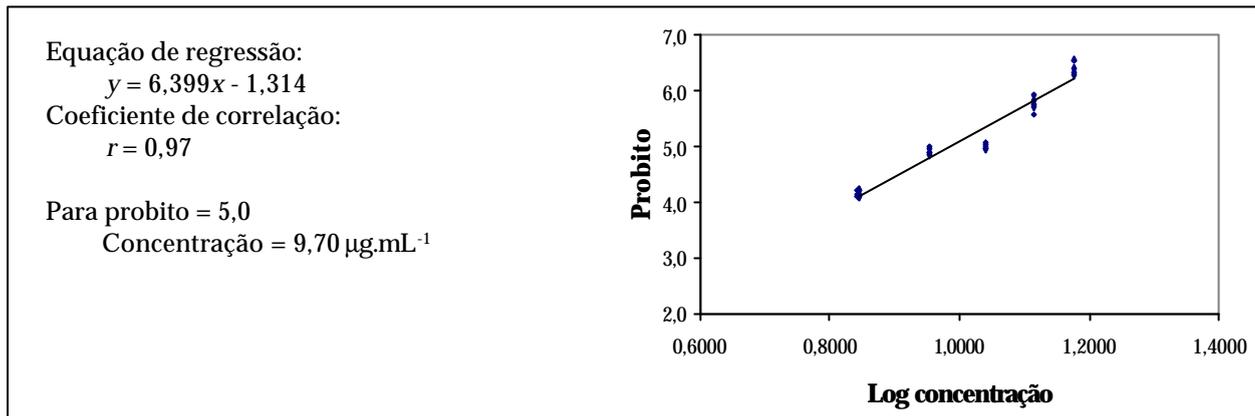


Figura 1 - Gráfico probito x logaritmo da concentração inseticida para cálculo da CL_{50} do carbofuran, para *Drosophila melanogaster*.

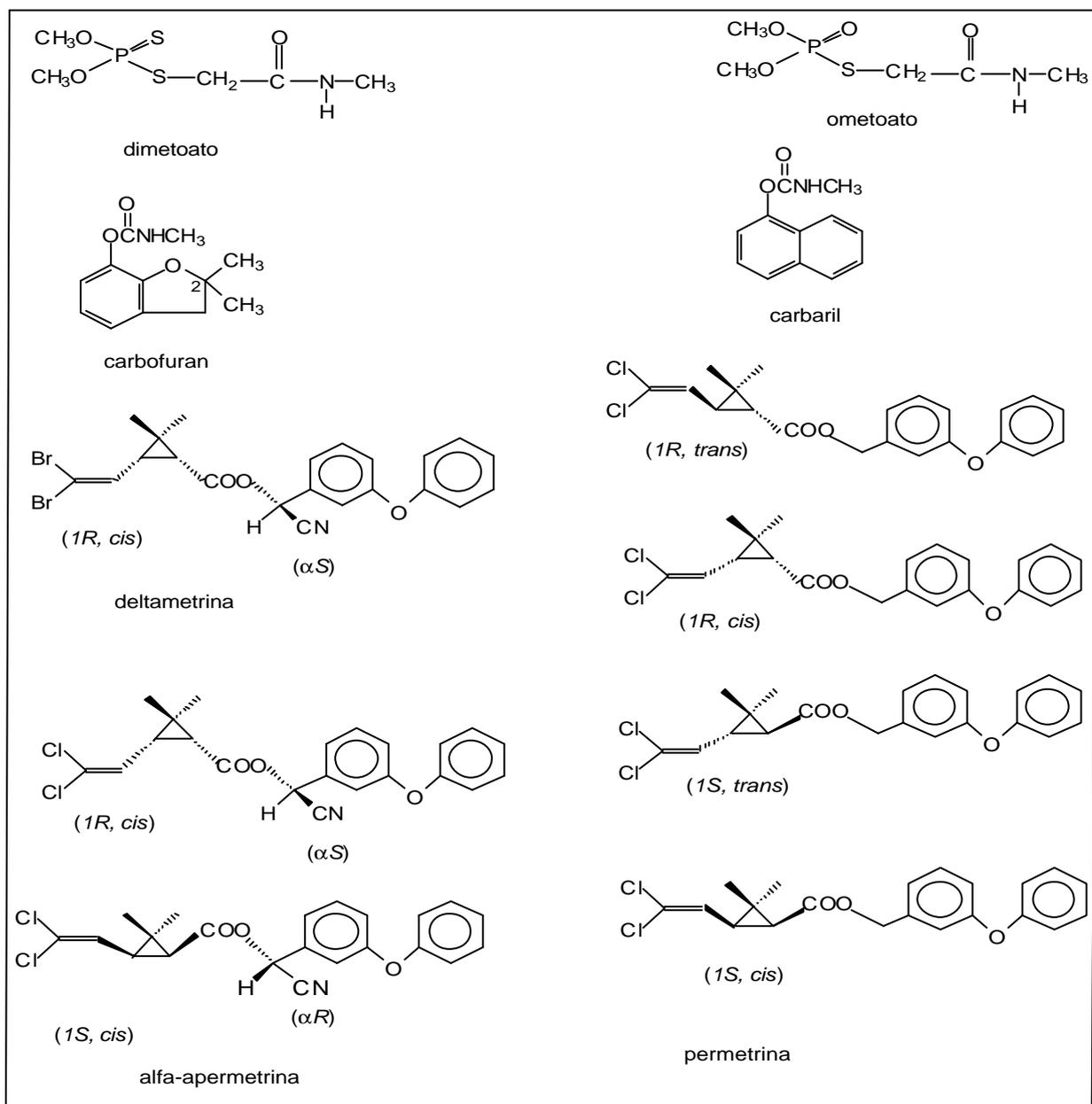


Fig. 2 - Estrutura das moléculas inseticidas referidas na Tabela 2.

é R, o que evidencia a importância da disposição espacial dos grupos quiral* para a toxicidade dessa classe de inseticida. A baixa toxicidade (alto valor da CL₅₀) apresentada no bioensaio pela permetrina (Tabela 2), comparada a da deltametrina e alfacipermetrina, pode estar ligada a ausência do grupo α-CN em suas moléculas (Fig. 2) e, ainda, a ocorrência de metabolismo oxidativo que, segundo MACDONALD *et al.* (1985), também, contribuiria para reduzir a interação de complementaridade das moléculas desse inseticida com os sítios ativos (neurônios) na *D. melanogaster*. Pode-se dizer, então, que a sensibilidade da *Drosophila melanogaster* aos piretróides está estreitamente relacionada ao tipo e a estereoquímica da molécula inseticida. Realmente, para os piretróides a atividade inseticida depende fundamentalmente da forma estrutural de suas moléculas, sendo a reatividade química de importância secundária (ELLIOTT, 1979). Já, nos organosforados ometoato e dimetoato e nos carbamatos carbaril e carbofuran, diferentemente dos piretróides, a relação estrutura-atividade biológica está ligada a habilidade do composto ou seu metabólito tóxico, de atacar a enzima acetilcolinesterase: a reatividade química é, portanto, o fator controlador da toxicidade inseticida.

CONCLUSÃO

O presente bioensaio mostrou ser a *D. melanogaster* um bom bioindicador para a detecção de inseticidas, embora apresente limitações como foi o caso para o carbaril. Os dados auferidos no presente trabalho, como já observado por autores citados, fortalecem o fato de que diferenças nas estruturas químicas de inseticidas são importantes para a sua toxicidade e podem contribuir para diferenças na seletividade: a *Drosophila melanogaster* foi insensível ao carbaril.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Helena Rossi, do Laboratório de Produtos Naturais, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal, Instituto Biológico, pela confecção das fórmulas químicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCASTRO, R.B. & WIRCKER, L.F. Nomenclatura dos compostos orgânicos – parte II – estereoquímica fundamental. *Quím. Nova*, v.7, n.3, p.150-167, 1984.

ALMEIDA, G.R. & REYES, F.G.R. *Drosophila melanogaster* Meigen: 1. Sensibilidade ao endossulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.58, n.2, p.15-24, 1999.

ALMEIDA, G.R.; REYES, F.G.R.; RATH, S. *Drosophila melanogaster* Meigen: 3. Sensibilidade ao carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Quím. Nova*, v.24, n.6, p.768-772, 2001.

AMARANENI, S.R. & PILLALA, R.R. Concentrations of pesticide residues in tissues of fish from Kolleru lake in India. *Environ. Toxicol.*, v.16, n.6, p.550-556, 2001.

BAGDONAS, M.; MELLO, M.H.S. DE; UNGARO, M.T.S.; GUINDANI, C.M.A.; FERREIRA, M.S.; GAETA, R. Ensaio biológico como testes preliminares na detecção de resíduos de inseticidas em frutas e hortaliças. *Rev. Bras. Toxicol.*, v.1, n.1, p.3-5, 1988.

BROWN, V.K. *Acute toxicity in theory and practice*. New York: John Wiley, 1980. p.20-21

CASSARETT, L.J. & DOULL, J. *Toxicology: The basic science of poisons*. New York: Pergamon Press, 1991. p.21-22

ELFVENDAHL, S. Detection of pesticide residues in water, sediment and fish in Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira, State of São Paulo, Brazil. Uppsala: 2000. 42p. [Master's thesis – Department of Environmental Assessment, SLU].

ELLIOTT, M. Progress in the design of insecticides. *Chem. Ind.*, v.17, p.757-768, 1979.

ELLIOTT, M. & JANES, N.F. Recente structure-activity correlations in synthetic pyrethroids. In: H.Geissbuch (Ed.) *Advances in pesticides science*. New York: Pergamon Press, v.2, p.166-173, 1979.

ETO, M. *Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry*. Cleveland: CRC Press, 1974. p.144-152.

ESPIGARES, M.; CROVETO, G.; GÁLVEZ, R. *In vitro* evaluation of the toxicity of several dithiocarbamates using an *Escherichia coli* growth inhibition bioassay and the acetylcholinesterase inhibition test. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, v.13, n.2, p.165-174, 1998.

EURACHEM/CITAC Guide. Appendix A. Examples. In: *Quantifying uncertainty in analytical measurement*. 2. ed., May 2000, p.31-94

FARNHAM, A.W. & KHAMBAY B.P.S. The pyrethrins and related compounds. Part XXXIX – Structure-activity relationships of pyrethroidal esters with cyclic side chains in the alcohol component against resistant strains of housefly (*Musca domestica*). *Pestic. Sci.*, v.44, p.269-275, 1995.

FERRER, A. & CABRAL, R. Toxic epidemics caused by alimentary exposure to pesticides: a review. *Food Add. Contam.*, v.8, p.755-776, 1991.

HARRIS, D.C. Propagação da incerteza. In: *Análise Química Quantitativa*. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC editora, 2001. p.52-57.

HAYES Jr., W.J. *Toxicology of pesticides*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1975. p.53.

HIRATA, R. Piretróides: estrutura química-atividade biológica. *Quím. Nova*, v.18, n.4, p.368-374, 1995.

*Quando dois centros não são imagens especular um do outro, como no presente caso, sugere-se o uso do termo quiral no singular (ALENCASTRO & WIRCKER, 1984)

- JOSEPH JR., H. & KNOBEL, M.G. Estudo preliminar da sensibilidade da mosca *Drosophila melanogaster* a diversos pesticidas organoclorados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.40, n.1, p.43-47, 1980.
- KUHR, R.J. Comparative metabolism of carbaryl by resistant and susceptible strains of the cabbage looper. *J. Econ. Entomol.*, v.64, p.1373-1378, 1971.
- KUHR, R.J. *Carbamate insecticides: Organic and biological chemistry*. Cleveland: CRC Press, 1976. p.88-89.
- MACDONALD, R.S.; SOLOMON, K.R.; SURGEONER, G.A.; HARRIS, C.R. Laboratory studies on the mechanisms of resistance to permethrin in a field-selected strain of house flies. *Pestic. Sci.*, v.16, p.10-16, 1985.
- MARGARIDO, A.P. Caso Shell. *Folha de São Paulo*, São Paulo, 24 ago. 2001. Cotidiano, p.C5.
- MCLEAY, M.J. & HALL, K.J. Monitoring agricultural drainage ditches and the receiving water (Nicomekl River, Surrey, BC) for toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and probable cause due to organophosphate contamination. *Water Qual. Res. J. Canada*, v.34, n.3, p.423-453, 1999.
- METCALF, R.L.; ORMAN, M.F.; FUKUTO, J.R. Metabolism of C¹⁴-labeled carbamate insecticides to C¹⁴O₂ in the housefly. *J. Econ. Entomol.*, v.60, n.2, p.445-450, 1967.
- PAULINO, C.A.; MAZANTI, M.T.; GAETA, R. Método de triagem para detecção de intoxicações pelo carbofuran usando moscas *Drosophila melanogaster*. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.27, n.1, p.209-212, 1992.
- SUN, Y.P. Evaluation of the intrinsic toxicity of new chemical structures. A potential application of the dynamics of insect toxicology. *Res. Rev.*, v.94, p.101-117, 1985.
- UCHIDA, T.; RAHMATI, H.S.; O'BRIEN, R.D. The penetration and metabolism of dimethoate in insects. *J. Econ. Entomol.*, v.58, p.831-835, 1965.
- WERNER, I.; DEANOVIC, L.A.; CONNOR, V.; VLAMING, V. DE; BAILEY, H.C.; HILTON, D.E. Insecticide-caused toxicity to *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera) in the Sacramento-San Joaquin River Delta, California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.19, n.1, p.215-227, 2000.
- WORTHING, C.R. & WALKER, S.B. *The pesticide manual: a world compendium*. 8 th ed. Great Britain: British Crop Protection Council, 1987. p.298, 614.
- ZECH, R.; ENGELHARD, H.; ERDMANN, W-D. Reaktionen von pyridinium oximen mit dem alkylphosphat dimethoat und seinen derivaten. Wirkung auf cholinesterasen. *Biochim. Biophys. Acta*, v.128, p.363-371, 1966.

Recebido em 5/4/02

Aceito em 26/8/02