



1150035891

T/UNICAMP
AL64b
BCCL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

BIOMONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE INSETICIDAS EM VEGETAIS UTILIZANDO
Drosophila melanogaster (Meig.)

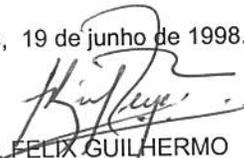
Garcia Rodrigues de Almeida

Biólogo

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Garcia Rodrigues de Almeida aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de junho de 1998.

Campinas, 19 de junho de 1998.


Prof. Dr. FELIX GUILLERMO
REYES REYES
Presidente da Banca

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos,
da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Doutor em Ciência de Alimentos.

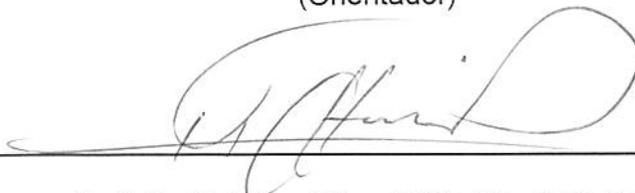
Campinas, 1998

3822193

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Felix Guilherme Reyes Reyes
(Orientador)



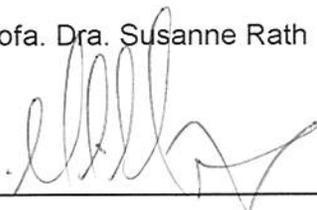
Prof. Dr. Mohamed Ezz El Din Moustafa Habib



Profa. Dra. Heloisa M. Cecchi



Profa. Dra. Susanne Rath



Prof. Dr. Miguel A. Áreas

Prof. Dr. Angelo Z. Trappé

Profa. Dra. Glauca M. Pastore

Campinas, 19 de Junho de 1998

AGRADECIMENTOS

Pai Eterno

Tu me examinas e me conheces. Sabes tudo o que eu faço; de longe conheces todos os meus pensamentos. Tu me vês quando estou trabalhando ou quando estou descansando; tu conheces minhas ações. Antes mesmo que eu fale, tu já sabes o que eu vou dizer. Estás em volta de mim, por todos os lados, e me proteges com teu poder. Eu não consigo entender como tu me conheces tão bem; o teu conhecimento é tão profundo, que não posso entendê-lo. Aonde posso ir a fim de escapar do teu Espírito? Para onde posso fugir da tua presença? Se eu subir ao céu, tu lá estás; se eu descer ao mundo dos mortos, lá estás também. Se eu voar para o Oriente ou for para os lugares mais distantes do Ocidente, ainda ali a tua mão me guia. Eu posso pedir que a escuridão me esconda e que em volta de mim a luz vire noite; mas isso não adianta nada porque para ti a escuridão não é escura e a noite é tão clara como o dia. Tu não fazes diferença entre a luz e a escuridão. Tu criaste cada parte do meu corpo; tu me formaste no ventre da minha mãe. Eu te louvo porque deves ser temido. Tudo o que fazes é maravilhoso, e eu sei isso com todo coração. Tu viste quando os meus ossos estavam sendo feitos, quando eu estava sendo formado no ventre de minha mãe, crescendo ali em segredo. Tu me viste antes de eu ter nascido. Os dias que tinham sido criados para mim foram todos escritos no teu livro quando ainda nenhum deles existia. Ó DEUS como é difícil entender os teus pensamentos! E são tantos! Se eu os contasse, seriam mais do que os grãos de areia; contaria, contaria e nunca chegaria ao fim¹.

Senhor, tua sabedoria é infinita e para o teu amor não há limite. Concedeste-me o privilégio de pertencer a tua família, ser teu filho e chegar até aqui. Nada tenho para te oferecer a não ser meu reconhecimento e gratidão por tudo. Obrigado Senhor.

Minha Família

À minha esposa, Neusa Freitas de Almeida e aos meus filhos Garcia Rodrigues de Almeida Jr e Gilson Rodrigues de Almeida, meu reconhecimento pelo apoio durante a realização deste trabalho, o qual é dedicado a vocês.

Prof. Dr. Felix G. R. Reyes

Dr. Felix, as palavras são insuficientes para expressar os meus agradecimentos por tudo que você fez por mim antes e durante a realização do meu doutorado aqui na FEA. Sempre que precisei de sua orientação, prontamente fui atendido. As dificuldades que surgiram, no transcorrer do curso, você sabiamente me ajudou a encontrar solução. Sempre fui recebido com um sorriso, um aperto de mão e um abraço. Você foi, não apenas um orientador, mas um grande "AMIGO". Obrigado por tudo.

Instituto Adventista de Ensino

Campus São Paulo

Aos diretores e administradores do Instituto e também os professores José Iran Miguel, Francinete de Lima Oliveira, Elizabete Regina Araújo de Oliveira, Euler Pereira Bahia, Flávio Reti, Rosa Gerolim e Luciano Senti da Costa, a todos vocês, meu apreço e gratidão pelo apoio recebido, tornando nosso trabalho uma realidade.

Instituto Adventista São Paulo

Hortolândia

Aos administradores do Instituto e o Tadeu Buenos da Silva, por terem permitido a utilização do campo experimental da instituição para a realização dos ensaios de campo e, aos senhores Luiz Paixeco e Pedro Batista Godói, pela aplicação dos inseticidas e os cuidados pós aplicação. A todos vocês, meus agradecimentos

Laboratório de Toxicologia

FEA - Unicamp

Profª. Dra. Maria Cecília de Figueredo Toledo, por seu dinamismo, do qual muito aprendemos;

Silvia Helena, pelo apoio analítico

Maria José, por seu apoio no preparo dos materiais usados durante o desenvolvimento da parte experimental;

Aos demais, pelo companheirismo, pelas trocas de idéias e sugestões, o que sem dúvida, contribuiu muito para nosso crescimento cultural.

A todos vocês muito obrigado

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Aos professores e funcionários meus sinceros agradecimentos por tudo que pudemos aprender com vocês.

ITAL

Laboratório de análise de resíduos de pesticidas

Ao Jorge José do Vale Oliveira, meus sinceros agradecimentos pelo uso do Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas do ITAL e também pelas excelentes informações técnicas.

Instituto Biológico

São Paulo

Meus sinceros agradecimentos à Dra. Marilene Silva Ferreira, do Laboratório de Análise de Resíduos de Inseticidas e ao Dr. Flávio Puga, Laboratório de Toxicologia Animal, pela oportunidade do estágio em seus laboratórios.

CONTEÚDO

CONTEÚDO

Resumo	1
Summary	2
Introdução	3
Objetivos	4

CAPÍTULO 1

UTILIZAÇÃO DE BIOENSAIOS NO MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE INSETICIDAS EM ALIMENTOS: UMA REVISÃO	6
Resumo	6
Abstract	6
Introdução	7
Métodos de realização do bioensaio	7
Técnica do filme seco	7
Técnica de imersão ou de suspensão aquosa	7
Aplicação tópica	8
Método de ingestão de alimento	8
Bioensaio por inibição da acetilcolinesterase	9
Organismos utilizados nos bioensaios	9
Bioensaio com <i>Musca domestica</i>	9
Bioensaio com <i>Drosophila melanogaster</i>	10
Bioensaio com abelhas	12
Bioensaios com larvas de mosquitos	15
Bioensaios com microcrustáceos e crustáceos	16
Bioensaios com organismos diversos	17
Considerações finais	18
Agradecimentos	18
Referências bibliográficas	18

CAPÍTULO 2

BIOENSAIO COM <i>Drosophila melanogaster</i> (Meig.) 1. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E TOXICIDADE DO ENDOSULFAN E BIOMONITORAMENTO DE SEUS RESÍDUOS EM COUVE MANTEIGA	23
Resumo	23
Introdução	24
Material e métodos	25
Aparelhos	25
Solventes e reagentes	25
Bioensaio com <i>Drosophila melanogaster</i>	26
Moscas <i>D. melanogaster</i>	26
Meio de cultura para criação das moscas	26
Criação das moscas	26
Bioensaio: Sensibilidade das moscas ao endosulfan	26
Cálculo da DL ₅₀	27
Avaliação da estabilidade do endosulfan nas condições do bioensaio	27
Ensaio de campo	27
Validação do bioensaio	28
Determinação, por cromatografia gasosa, dos resíduos do endosulfan em couve	28
Recuperação e sensibilidade	29
Análise estatística	29
Resultados e discussão	30
Conclusões	35
Agradecimentos	36
Abstract	36
Referências bibliográficas	37

CAPÍTULO 3

BIOENSAIO COM <i>Drosophila melanogaster</i> (Meig.): 2. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E TOXICIDADE DO PARATION METÁLICO E BIOMONITORAMENTO DE SEUS RESÍDUOS EM COUVE MANTEIGA	42
Resumo	42
Introdução	43

Material e métodos	44
Aparelhos	44
Solventes e reagentes	44
Bioensaio com <i>Drosophila melanogaster</i>	45
Moscas <i>D. melanogaster</i>	45
Meio de cultura para criação das moscas	45
Criação das moscas	45
Bioensaio	45
Calculo da DL ₅₀	46
Avaliação da estabilidade do paration metílico nas condições do bioensaio	46
Ensaio de campo	46
Validação do bioensaio	47
Determinação, por cromatografia gasosa, dos resíduos de paration metílico em couve	47
Recuperação e sensibilidade	48
Análise estatística	48
Resultados e discussão	49
Conclusões	54
Abstract	54
Referências bibliográficas	55

CAPÍTULO 4

BIOENSAIO COM <i>Drosophila melanogaster</i> (Meig.): 3. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E TOXICIDADE DO CARBOFURAN E BIOMONITORAMENTO DE SEUS RESÍDUOS EM REPOLHO	60
Resumo	60
Introdução	60
Material e métodos	62
Equipamentos	62
Solventes e reagentes	62
Bioensaio com as moscas <i>D. melanogaster</i>	62
Moscas <i>D. melanogaster</i>	62

Meio de cultura para criação das moscas	63
Criação das moscas	63
Bioensaio	63
Cálculo da DL ₅₀	63
Avaliação da estabilidade do carbofuran nas condições do bioensaio	63
Ensaio de campo	64
Determinação dos resíduos do carbofuran no repolho	64
Recuperação e sensibilidade	65
Validação do bioensaio	65
Análise estatística	66
Resultados e discussão	66
Conclusões	71
Agradecimentos	71
Abstract	72
Referências bibliográficas	72

CAPÍTULO 5

BIOENSAIO COM <i>Drosophila melanogaster</i> (Meig.): 4. ESTUDOS DA DEGRADAÇÃO E TOXICIDADE DA DELTAMETRINA E BIOMONITORAMENTO DE SEUS RESÍDUOS EM COUVE MANTEIGA	77
Resumo	77
Abstract	77
Introdução	78
Material e métodos	79
Aparelhos	79
Solventes e reagentes	79
Bioensaio com <i>D. melanogaster</i>	80
Moscas <i>D. melanogaster</i>	80
Meio de cultura para criação das moscas	80
Criação das moscas	80
Bioensaio	80
Cálculo da DL ₅₀	80
Avaliação da estabilidade da deltametrina nas condições do bioensaio	81

Ensaio de campo	81
Validação do bioensaio	81
Extração dos resíduos da deltametrina em couve	82
Recuperação e sensibilidade	82
Análise estatística	82
Resultados e discussão	82
Conclusões	87
Agradecimentos	87
Bibliografia	88

CONCLUSÕES GERAIS

Conclusões gerais	93
-------------------	----

ANEXO 1

<i>Drosophila melanogaster</i> . 1. Estudo da sua sensibilidade ao endosulfan	95
---	----

ANEXO 2

<i>Drosophila melanogaster</i> . 2. Estudo da sua sensibilidade ao paration metílico	99
--	----

ANEXO 3

<i>Drosophila melanogaster</i> . 3. Estudo da sua sensibilidade ao carbofuran	103
---	-----

ANEXO 4

<i>Drosophila melanogaster</i> . 4. Estudo da sua sensibilidade a deltametrina	107
--	-----

ANEXO 5

Biomonitoramento com <i>Drosophila melanogaster</i> (Meig.) para detecção de resíduos do endosulfan em couve	111
--	-----

ANEXO 6

Biomonitoramento com <i>Drosophila melanogaster</i> (Meig.) para detecção de resíduos da deltametrina em couve	114
--	-----

ANEXO 7

Estruturas do alfa- e beta-endosulfan, endosulfan sulfato, paration metílico, carbofuran e deltametrina	116
---	-----

ANEXO 8

Cromatogramas	118
---------------	-----

RESUMO

A sensibilidade das *Drosophila melanogaster* (Meig.) a diferentes inseticidas (endossulfan, paration metílico, carbofuran e deltametrina) e o uso desse organismo no biomonitoramento de resíduos de inseticidas em vegetais foi avaliada. Para tanto, inicialmente avaliou-se a estabilidade dos inseticidas nas condições do bioensaio, assim como a sensibilidade da *Drosophila* aos inseticidas, em função da temperatura e do tempo de exposição. Posteriormente, os inseticidas foram aplicados em plantação de couve manteiga (*Brassica oleracea*, var. *acephala*) ou repolho (*Brassica oleracea*, var. *capitata*), e os seus resíduos determinados por bioensaio e por métodos cromatográficos [cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)]. O bioensaio foi realizado pelo método do filme seco, em placas de Petri (50 x 20 mm), em temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C, durante 24 h. Nessas condições os inseticidas se degradaram de modo proporcional ao tempo de exposição e a variação da temperatura, sendo que a deltametrina e o carbofuran apresentaram maior estabilidade do que o endossulfan e o paration metílico. O isômero alfa-endossulfan degradou-se mais rapidamente do que o isômero beta, em todas as temperaturas estudadas. Os bioensaios realizados com *D. melanogaster*, indicaram que, em geral, a toxicidade dos inseticidas aumenta com o aumento da temperatura (20 a 35 °C), sendo que para o endossulfan as fêmeas apresentam maior susceptibilidade do que os machos. Os valores de DL₅₀ (expressos em mg/kg pc e considerando machos e fêmeas) variaram de 10,1 a 2,8 para o endossulfan, 10,5 a 3,0 para o paration metílico, 10,5 a 2,9 para o carbofuran e 0,96 a 0,34 para a deltametrina, para as temperaturas de 20 e 35 °C, respectivamente. Thiodan[®] 350 CE (endossulfan), Folidol[®] 600 CE (paration metílico) e Decis[®] 25 CE (deltametrina) foram aplicados em couve manteiga e os seus resíduos determinados pelo método de bioensaio e validados por CG. Furadan[®] G50 (carbofuran) foi aplicado em repolho e os seus resíduos, determinados por bioensaio, foram validados por CLAE. Em geral, os resultados obtidos pelo bioensaio não diferiram (P<0,05) daqueles obtidos pelos métodos cromatográficos. O limite de determinação pelo bioensaio foi menor do que 0,1 mg/kg, tendo o método apresentado boa reprodutibilidade, com coeficiente de variação menor que 20 %. Os resultados obtidos confirmam a viabilidade do bioensaio com *D. melanogaster* para o biomonitoramento de resíduos de inseticidas em vegetais, sendo que, em comparação a determinação por métodos cromatográficos, o bioensaio apresenta baixo custo e simplicidade de execução sem comprometer o padrão de acuidade necessário para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

SUMMARY

The sensitivity of *Drosophila melanogaster* (Meig.) to different insecticides (endosulfan, methyl parathion, carbofuran and deltamethrin) and the use of this organism in the biomonitoring of residues of insecticides on vegetables was evaluated. Initially, the stability of the insecticides was evaluated under the conditions of the bioassay, as well as the sensitivity of the *D. melanogaster* to the insecticides, as a function of the temperature and the extent of exposure. Then, the insecticides were applied on plantation of kale (*Brassica oleracea*, var. *acephala*) or cabbage (*Brassica oleracea*, var. *capitata*) and their residues evaluated by bioassay and chromatographic methods [gas chromatography (GC) or high performance liquid chromatography (HPLC)]. The bioassay was conducted up using dry film technique in Petri plates (50 x 20 mm) under temperatures of 20, 25, 30, and 35°C for 24 h. Under these conditions the insecticides degraded proportionally to the extent of exposure and to the variation of temperature. Deltamethrin and carbofuran displayed higher stability than endosulfan and methyl parathion. The alpha-isomer of endosulfan degraded more rapidly than the beta-isomer in all the observed temperatures. Bioassays made with *D. melanogaster* generally showed that the toxicity of the insecticides increases with the increasing of temperature (20 to 35 °C) and females present higher susceptibility to the endosulfan than males. The value of DL₅₀, expressed in mg/kg body weight and considering males and females, varied from 10,1 to 2,8 for endosulfan; from 10,5 to 3.0 for methyl parathion; from 10,5 to 2,9 for carbofuran and from 1,0 to 0,3 for deltamethrin under the temperature of 20 to 35 °C, respectively. Thiodan® 350 CE (endosulfan), Folidol® 600 CE (methyl parathion) and Decis® 25 CE (deltamethrin) were applied to kale and their residues determined by bioassay method and validated by GC. Furadan® G 50 was applied to cabbage (*Brassica oleracea*, var. *capitata*) and its residues determined by bioassay and validated by HPLC. Generally, the results obtained by the bioassay were not different (P<0,05) of those obtained by chromatographic methods. The determination limit of the bioassay was lower than 0,1 mg/kg, presenting a good reproducibility with a variation coefficient less than 20%. The results obtained confirm the viability of the bioassay with *D. melanogaster* for the biomonitoring of residues of insecticides on vegetables. Compared to the determination by chromatographic methods the bioassay shows low cost and simplicity of execution without compromising the standard of needed acuity for the monitoring of pesticide residues in food.

INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos tem trazido numerosos benefícios a humanidade entre os quais se incluem o aumento da produção e da qualidade de alimentos. Entretanto, como são substâncias tóxicas, se usados indevidamente, além de elevar o nível dos resíduos nos alimentos podem contaminar o ambiente, com repercussões negativas sobre o ecossistema.

Para proteger a saúde dos consumidores, tem sido criadas leis que restringem não somente o uso dos agrotóxicos, mas também determinam os limites máximos dos seus resíduos (LMRs) nos alimentos. Consumir alimentos com resíduos acima dos LMRs estabelecidos ou com resíduos não permitidos pela legislação constitui-se um perigo à saúde humana. Por esses motivos, a presença de resíduos dos agrotóxicos em alimentos tem preocupado as entidades governamentais, e a população em geral, com respeito a ingestão de alimentos contaminados com essas substâncias.

Para garantia da qualidade dos alimentos oferecidos à população é necessário monitorar os resíduos dos agrotóxicos, principalmente em frutas e hortaliças, cuja maioria são consumidas "*in natura*". O monitoramento constitui também um meio eficaz para o controle adequado do uso dos agrotóxicos, podendo desta forma serem evitados níveis de resíduos em quantidades superiores aos permitidos.

Vários procedimentos podem ser utilizados para monitorar resíduos. Entre os mais usados estão os métodos cromatográficos [cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)]. Esses métodos analíticos apresentam grande sensibilidade e especificidade, contudo são procedimentos analíticos de alto custo devido ao preço elevado dos equipamentos e dos solventes e reagentes utilizados nos processos de extração e limpeza dos resíduos.

Torna-se, portanto, evidente que para os países em desenvolvimento é muito difícil realizar, pela metodologia citada, um monitoramento satisfatório de resíduos dos agrotóxicos nos alimentos. Ainda, é nesses países que os inseticidas, assim como outros agrotóxicos, freqüentemente são empregados de modo excessivo e indiscriminado, bem como são utilizados em culturas não permitidas. Justifica-se, portanto, a necessidade de serem pesquisados e avaliados métodos alternativos de triagem que sejam ao mesmo tempo satisfatórios, práticos e que reduzam significativamente os custos de controle da qualidade dos produtos alimentícios, especialmente os hortifrutigranjeiros, quanto a presença de agrotóxicos em geral e de inseticidas em particular.

Como o objetivo básico do monitoramento de resíduos de agrotóxicos é detectar níveis acima dos LMRs estabelecidos ou a presença dos mesmos em culturas não permitidas ou que possam apresentar risco à manutenção do equilíbrio ecológico de ecossistemas, é de grande interesse desenvolver e difundir metodologias simples, mas que permitam detectar resíduos de inseticidas em quantidades que realmente causem perigo para a saúde humana ou para a cadeia trófica. Neste sentido, os métodos biológicos representam uma linha de pesquisa de grande interesse, tendo os bioensaios demonstrado serem eficientes para detectar pequenas quantidades de agentes tóxicos.

Cabe destacar que para se obter resultados que se enquadrem dentro da sensibilidade exigida pela legislação (LMRs), assim como pelos métodos químicos de análise de resíduos, os organismos utilizados nos bioensaios devem ser sensíveis para detectar níveis residuais menores do que 1 mg/kg e, ainda, fornecer resultados reprodutíveis. Bioensaios realizados com *D. melanogaster*, no início da década de 50, indicaram que esses insetos poderiam ser utilizados para detecção de resíduos de inseticidas em alimentos. Ainda, são insetos de fácil manipulação e criação nas condições de laboratório, sendo que grande número de moscas podem ser criadas em pequeno espaço, num curto intervalo de tempo, pois são insetos de ciclo reprodutivo curto (9 a 10 dias da ovoposição até emergência das moscas), assim como os meios de cultura utilizado para o seu desenvolvimento são de preparo simples.

OBJETIVOS:

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a utilização da *D. melanogaster* para o biomonitoramento de resíduos de inseticidas em vegetais.

Dentre os objetivos específicos destacam-se:

1. Estabelecer um procedimento analítico para o bioensaio de inseticidas, utilizando moscas *D. melanogaster*.
2. Avaliar a sensibilidade das *D. melanogaster* aos inseticidas clorados (endosulfan), fosforados (paration metílico), carbamatos (carbofuran) e piretróides (deltametrina), mediante a determinação da dose letal 50 (DL₅₀), em diferentes temperaturas (20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C).
3. Avaliar a estabilidade dos inseticidas nas mesmas condições do bioensaio.
4. Aplicar os inseticidas em vegetais folhosos (couve ou repolho) e utilizar o bioensaio para avaliar a presença dos seus resíduos e confirmar os resultados utilizando métodos químicos (CG ou CLAE), afim de garantir a segurança do procedimento biológico para avaliar a presença de resíduos de inseticidas em vegetais.

CAPÍTULO 1

UTILIZAÇÃO DE BIOENSAIO NO MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE INSETICIDAS EM ALIMENTOS: UMA REVISÃO

**TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA
BRASILEIRA DE TOXICOLOGIA EM OUTUBRO DE 1997**

Utilização de bioensaios no monitoramento de resíduos de inseticidas em alimentos: Uma revisão

Resumo

Os bioensaios, amplamente utilizados para avaliar a presença de substâncias tóxicas, podem ser utilizados no monitoramento de resíduos de inseticidas em alimentos, dado a sua sensibilidade, rapidez e baixo custo. Os organismos escolhidos devem ser altamente sensíveis e fornecerem resultados reprodutíveis. A sensibilidade do bioensaio é dependente do organismo utilizado, da idade e sensibilidade ao agente tóxico, podendo ser modificada pela quantidade da amostra, isolamento do agrotóxico, aumento do tempo e temperatura de exposição, e uso de organismos jovens.

Unitermos: Bioensaio, *Drosophila melanogaster*, resíduos de inseticidas, métodos de bioensaios, toxicidade.

Abstract

Bioassays, largely used to evaluate the presence of toxic substances, can also be used in monitoring insecticide residue in foods, due to their sensibility, fastness and low cost. The chosen organism must be highly sensitive and give reproducible results. The sensibility of the bioassay is dependent on the organism used, on the age and sensibility of the toxic agent, and can be modified by the quantity of the sample used, isolation to the pesticide, increasing of time and temperature of exposure and the use of young organisms.

Keywords: Bioassay, *Drosophila melanogaster*, residue of insecticide, methods of bioassays, toxicity.

Introdução

O ensaio biológico (bioensaio) é uma técnica usada para avaliar o nível de uma substância farmacologicamente ativa em uma preparação farmacêutica ou a presença de um resíduo tóxico em uma amostra de solo, água, ar ou alimento. A resposta geralmente é medida pela taxa de mortalidade, crescimento ou outra resposta fisiológica do animal, da planta ou do microorganismo utilizado^{1,2}.

Diferentes técnicas para realização do bioensaio tem sido relatadas na literatura, como a do filme seco³, imersão ou suspensão aquosa², aplicação tópica direta^{4,5}, ingestão de alimento^{6,7} ou inibição da acetilcolinesterase (AChE)^{2,8}.

Os bioensaios são eficientes para detectar a presença de inseticidas em alimentos, entretanto a sensibilidade desses ensaios depende da toxicidade do agrotóxico para o organismo sob as condições teste. Aumento da quantidade da amostra, isolamento do agrotóxico, aumento da quantidade do extrato usado por teste, aumento do tempo de contato entre a amostra e o organismo teste ou uso de organismos jovens podem contribuir para melhorar a sensibilidade do teste. Para obter resultados que se enquadrem dentro da sensibilidade exigida pelos métodos químicos de análise de resíduos, os or-

ganismos escolhidos devem ser altamente sensíveis e fornecerem resultados reprodutíveis^{9,10,11}.

Constitui objeto básico desta revisão avaliar as diferentes técnicas de realização do bioensaio, os diferentes organismos utilizados e a sensibilidade destes para detecção de resíduos de inseticidas em alimentos.

Métodos de realização do bioensaio

Técnica do filme seco

LAUG³, um dos pioneiros no campo dos bioensaios de resíduos de inseticidas, desenvolveu uma metodologia para o bioensaio do DDT e BHC em tecidos de animais, denominada técnica do filme seco. O procedimento consiste na deposição da substância tóxica pela evaporação do solvente, levando a formação de um filme seco na superfície depositada. O organismo em teste é colocado em contato, por um período de tempo, com o filme seco contendo a substância tóxica. Esta técnica tem sido usada, especialmente por pesquisadores que utilizam a *Musca domestica* ou a *Drosophila melanogaster* para bioensaio.

Técnica de imersão ou de suspensão aquosa

Imersão ou suspensão aquosa é outra

Revista Brasileira de Toxicologia.

metodologia empregada para realização do bioensaio. O método consiste em um procedimento de extração, evaporação do solvente e ressuspensão do resíduo em água. Alta sensibilidade tem sido obtida pela exposição de larvas de mosquito, microcrustáceos ou peixes ao meio aquoso contendo o agente tóxico. A sensibilidade desta técnica tem sido atribuída ao fato de todas as vias de absorção estarem expostas ao agente tóxico. A absorção da substância tóxica através do movimento das gnelras ou órgãos equivalentes também contribui com a sensibilidade do método².

Aplicação tópica

Aplicação tópica direta é um procedimento de bioensaio que pode ser usado quando o extrato pode ser reduzido a um volume pequeno. Microquantidades podem ser aplicadas topicamente sobre larvas de Lepidopteros ou em moscas e baratas. Esta é uma técnica simples, mas requer manipulação cuidadosa e a quantificação dos resultados depende do controle da manipulação, alimentação do organismo e condições ambientais do teste⁴.

Método de ingestão de alimento

O método proposto por FRAWLEY e col.⁶ para o bioensaio por ingestão de alimento consiste na extração dos resíduos do inseti-

cida da amostra, evaporação completa do solvente sobre açúcar e dissolução em meio aquoso. *M. domestica* são alimentadas *ad libitum* com esta solução por 24 h. Procedimento semelhante foi reportado por SUN & SUN⁷ para a determinação de dieldrin no leite, por alimentação direta das moscas com leite homogeneizado. Os resultados eram obtidos por comparação da mortalidade das moscas na amostra contaminada com a mortalidade em amostras tratadas, as quais eram preparadas pela adição de quantias conhecidas do mesmo agente tóxico em leite não tratado.

Posteriormente SUN & SUN⁷ estenderam a metodologia de alimentação direta, pela exposição de moscas de frutas, *D. melanogaster* (Meig.), a tecidos macerados e a resíduos secos. Pela exposição das moscas *D. melanogaster* aos tecidos macerados 0,1 mg/kg de aldrin ou dieldrin foram detectados em muitas frutas e vegetais, enquanto que pela exposição das moscas ao resíduo seco foi possível detectar 0,05 mg/kg. Para determinar o nível de resíduo do inseticida na planta previamente tratada, a mortalidade resultante da exposição a esse material é comparada com a mortalidade resultante da exposição a amostras preparadas com o mesmo material de plantas não tratadas, adicionadas de quantias conhecidas do mesmo inseticida².

Bioensaio por inibição da acetilcolinesterase

Os inseticidas organofosforados e os carbamatos são inibidores da enzima AChE (EC 3. 1. 1. 7). O princípio do método enzimático por inibição da AChE para detecção de microquantidades de inseticidas pode ser ilustrado como segue:

AChE + Inibidor → AChE inibida + AChE não inibida → AChE não inibida + Acetilcolina → Colina + Ácido acético.

A mudança de pH ou da quantidade de acetilcolina não hidrolisada pode ser usada para cálculo do nível de inibidor. Cabe destacar que a regeneração espontânea da enzima carbamilada (carbamatos) tende a ocorrer mais rapidamente que a regeneração espontânea da enzima fosforilada (organofosforados), o que favorece a identificação do grupo de inseticidas inibidores da enzima^{2, 8}.

Organismos utilizados nos bioensaios

Teoricamente, qualquer ser vivo poderia ser usado para bioensaio da substância para a qual ele é alvo. No entanto, muitas vezes, por razões de sensibilidade, dificuldade de criação ou de manipulação do organismo durante os ensaios rotineiros, poucas espécies tem sido efetivamente usadas^{2, 12}. Dados da literatura relatam diversos organismos como sendo utilizados na realização dos bioen-

saio de inseticidas, entre os quais destacam-se a *M. domestica* e a *D. melanogaster*.

Bioensaio com *Musca domestica*

Bioensaios utilizando a *M. domestica* como organismo teste foram usados por LAUG³ em 1946 e, desde então, elas tem sido amplamente usadas para determinar resíduos de inseticidas. DAHM & PANKASKIE¹³ utilizaram o bioensaio com *M. domestica* L., pelo método do filme seco, para determinar resíduos do aldrin em extratos de alfafa e em amostras de origem animal como músculo, rim, fígado, cérebro, urina, fezes, bile, gordura e leite. Os valores das dose letal 50 (DL₅₀)^a, nas referidas amostras, variaram entre 1,1 - 1,7 mg/kg de pc. para 48 h de observação.

Vários princípios básicos para a realização do bioensaio com *M. domestica*, com referência especial ao aldrin e dieldrin, foram relatados por SUN & SUN⁷. Entre eles os cuidados necessários para a obtenção e preparo das amostras, método da DL₅₀ para o cálculo dos níveis de resíduo, método de interpolação para cálculo dos níveis de resíduo do inseticida e avaliação da sensibilidade do bioensaio.

Procedimentos diversos de realização de bioensaios, como aplicação tópica, depósitos

^a Dose letal 50 indica a quantidade da substância capaz de matar 50 % da população teste

Revista Brasileira de Toxicologia.

sobre madeira e papel, teste aerosol ou em ambiente pulverizado, foram utilizados por TAYLOR¹⁴ para avaliar a resistência da *M. domestica* a organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Bioensaios, com moscas susceptíveis e resistentes, foram feitos para avaliar o mecanismo de toxicidade de inseticidas piretróides, tais como permetrina¹⁵ e deltametrina¹⁶.

Bioensaio com Drosophila melanogaster

SUN & PANKASKIE¹⁷, pioneiros na realização de bioensaios com *D. melanogaster*, verificaram, por exposição direta das moscas a tecidos macerados, que até 0,1 mg/kg de aldrin e dieldrin podiam ser detectados na batata, no espinafre e na pera ou 0,05 mg/kg, pelo método do filme seco, em extratos de tecidos animais como cérebro, fígado, rim, músculo e gordura. Os autores concluíram que as moscas de frutas *D. melanogaster* eram mais sensíveis que as *M. domestica* e de sensibilidade aproximadamente igual as larvas de mosquito para os bioensaios de resíduos de inseticidas.

DEWEY¹⁸ avaliou a utilidade do bioensaio na determinação de resíduos de inseticidas em alimentos, tendo apresentado algumas razões básicas para o uso das *D. melanogaster* em bioensaios, tais como facilidade de criação, de manipulação, produção em grande quantidade, menor espaço de cria-

ção, ciclo de vida menor que o das *M. domestica* e dos mosquitos, como o *Aedes aegypti*.

Bioensaio com *D. melanogaster* para a determinação de resíduos de inseticidas em tecidos vegetais, com referência especial ao aldrin e dieldrin, pelo método de alimentação direta a tecidos macerados, foi avaliado por EARLE e col.¹⁹. Os autores detectaram níveis residuais de aldrin e dieldrin da ordem de 0,1 mg/kg em vários tipos de frutas e vegetais. Observaram ainda que diminuindo o tamanho do frasco teste a sensibilidade do bioensaio aumentava.

A avaliação de resíduos de inseticidas em alimentos, através do método de monitoramento paralelo, proposto por PHILLIPS e col.²⁰ proveu bases para detecção, caracterização e avaliação de resíduos de inseticidas que sejam inibidores da AChE ou que conttenham cloro. O procedimento de monitoramento paralelo consiste da análise do cloro orgânico, teste da inibição da AChE e bioensaio com *D. melanogaster*, utilizando o mesmo extrato.

CHIANG e col.²¹ utilizaram o bioensaio com *D. melanogaster* para avaliar a atividade da enzima fosfotriesterase (PTE) na degradação de inseticidas organofosforados. O bioensaio está baseado no princípio de que a enzima PTE cliva a ligação fosfotriéster, podendo degradar ou detoxificar alguns in-

seticidas organofosforados. Os extratos das amostras eram tratados com a enzima PTE antes da realização do bioensaio com *D. melanogaster*, conforme o fluxograma apresentado na figura 1.

A substância teste deve ser ativa para *D. melanogaster*. A tabela 1. mostra alguns organofosforados que são degradados pela enzima PTE, sendo que os do grupo I tem degradação igual ou maior que 50 %, os do grupo II degradação menor que 50 % e os do grupo III não são degradados pela enzima.

O abamectin B1A (Avermectin ou vertimex), composto isolado a partir de produtos da fermentação de organismos do solo, *Streptomyces avermitilis* (Burg), são lactonas macrocíclicas, originalmente consideradas como antihelmínticos e, recentemente, como inseticidas e acaricida^{22, 23, 24}. Os efeitos do abamectin B1A sobre ovoposição e desenvolvimento de moscas *D. melanogaster* foi avaliado por bioensaio e sua toxicidade comparada com a da cipermetrina. A concentração do abamectin B1A para se obter uma redução de 95 % das moscas adultas foi de 0,25 ng/cm² enquanto que para igual redução, a concentração da cipermetrina foi 60 ng/cm²²².

Testando a sensibilidade das *D. melanogaster* a diversos inseticidas organoclorados, JOSEPH & KNOBEL²⁵ verificaram que as

moscas *D. melanogaster* machos foram mais sensíveis que as fêmeas para os inseticidas testados. Os bioensaios por eles realizados com as *D. melanogaster* foram feitos em placas de Petri, contendo um disco de papel de filtro colocado no interior da placa, sobre o qual era depositado o inseticida, formando o filme seco, onde as moscas eram colocadas. Níveis de até 0,2 µg/mL foram detectados para aldrin, dieldrin, endrin, heptacloro e lindano. Os autores sugeriram que as moscas *D. melanogaster* machos podem ser usadas no monitoramento da contaminação de alimentos por inseticidas, principalmente pela rapidez e baixo custo do teste, podendo mesmo ser executado em laboratórios desprovidos de aparelhagem e equipamentos sofisticados.

A indicação da presença de resíduos de inseticidas organofosforados e organoclorados em amostras de frutas e hortaliças foram avaliados por bioensaio com *D. melanogaster* e comparados por cromatografia gasosa¹⁰. Dessa maneira foi possível comparar se os resultados observados no método de bioanálise coincidiam ou não com os obtidos pelo método de cromatografia gasosa. Os autores constataram que, em 65 % das 233 amostras analisadas, os resultados foram coincidentes nos dois métodos e concluíram que apesar das limitações, os bioensaios, quando utilizados como método preliminar de triagem, podem prestar grande auxílio na

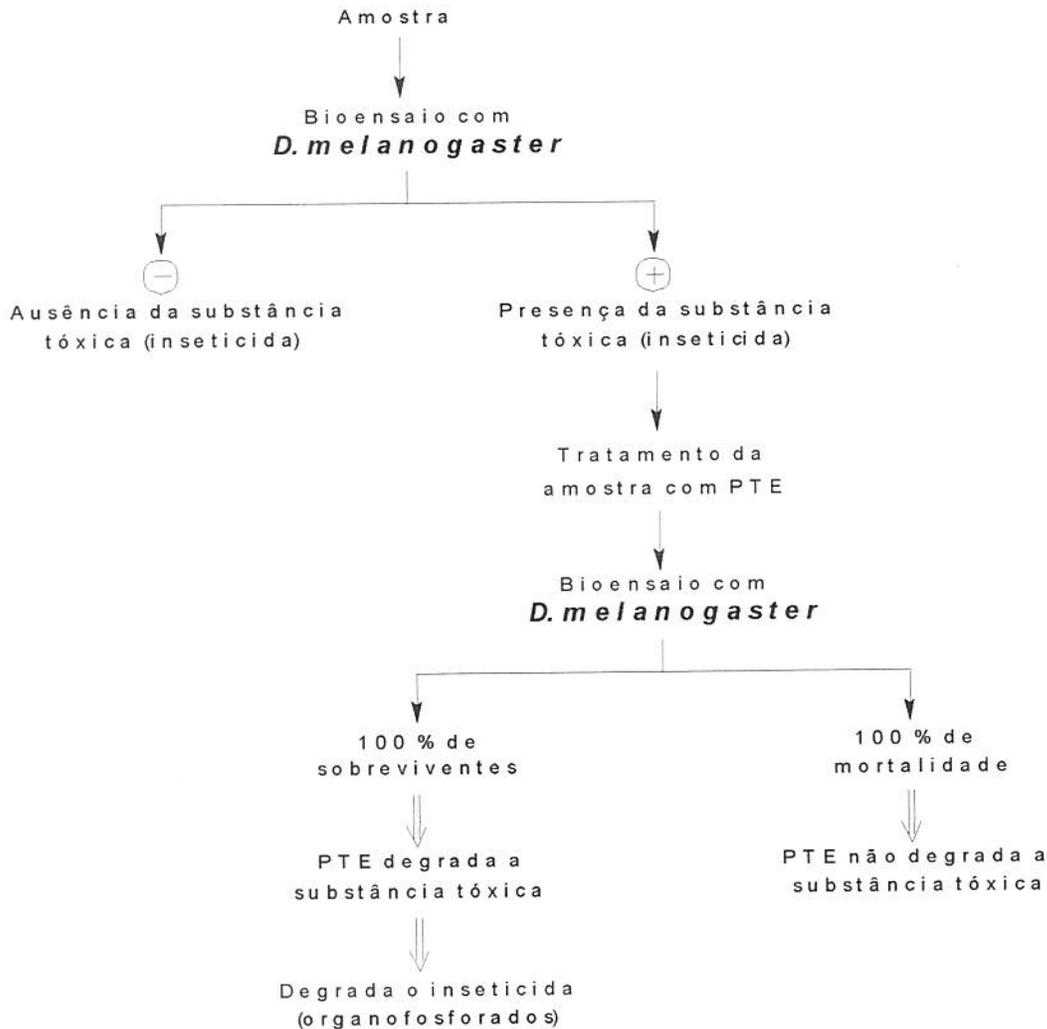


Figura 1. Fluxograma para tratamento de amostra contaminada, usando a enzima fosfotriesterase e o bioensaio com *Drosophila melanogaster* para identificação de inseticida organofosforado.

pesquisa de resíduos tóxicos em alimentos.

Bioensaio com abelhas

Abelhas (*Apis mellifera*) também tem sido usadas como bioindicadores da presença de resíduos de inseticidas em vegetais. MURRAY²⁶ usou abelhas operárias para

avaliar a toxicidade do dimetoato e da α - cipermetrina, isômeros cis (R) e (S). As DL₅₀ tópica e oral determinadas foram, respectivamente, 0,16 e 0,13 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ para o dimetoato de grau técnico, 0,03 e 0,06 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ para a α - cipermetrina de grau técnico e 0,11 e 0,13 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ para a

Tabela 1. Percentagem de degradação de inseticidas organofosforados pela enzima fosfotriesterase²¹.

Inseticida	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
	Degradação (%)	Inseticida	Degradação (%)	Inseticida	Degradação (%)	Inseticida
Coumafos	100,0	Clorpirifos	37,2	Clorpirifos metílico	0,0	
Fensulfotion	100,0	Diclofention	32,6	Etoprop	0,0	
Leptofos (O ₂ análogo)	100,0	Paration metílico	31,3	Etrimifos	0,0	
Paraoxon	100,0	EPN	29,3	Famfur	0,0	
Quinalfos	99,3	Tricloronate	19,8	Fention	0,0	
Paration	98,4	Pirimifos metílico	17,1	Isofenfos	0,0	
Pirimifos etílico	94,3	Malation	16,4	Jodfenfos	0,0	
Pirazofos	89,1	Clorotiofos	11,4	Ronel	0,0	
Diazinon	72,1	Fenitrotion	7,9	Sulfopros	0,0	
Bromofos etílico	53,2	Clorfenvinfos	7,4	Sulfotep	0,0	

α -cipermetrina como produto formulado, para 24 h de observação em temperatura de 25 °C. A toxicidade residual foi avaliada por exposição de flores da *Phacelia*, pulverizadas com os inseticidas e colocadas dentro das gaiolas das abelhas. Após 48 h de exposição foi registrado mortalidade de 15 % das abelhas que estavam em contato com as flores pulverizadas com a α -cipermetrina e 97 % das com flores pulverizadas com dimetoato.

A suscetibilidade das abelhas para muitos inseticidas comumente usados na agricultura, segundo MANSOUR¹², sugere que elas possam ser usadas como bioindicadores para determinação de alguns resíduos de inseticida em plantas, bem como para detectar o perigo da toxicidade de algum inseticida comumente usado na prática agrícola. O autor usou abelhas como inseto teste para avaliar resíduos de vários inseticidas pulverizados em flores de trevo (*Trifolium alexandrinum*) e concluiu que o método de bioensaio pode ser usado para detecção de resíduos de inseticidas em vegetais, podendo também ser usado como bioindicadores para detectar a presença de resíduos de inseticidas perigosos para abelhas que tenham sido aplicados no campo.

A suscetibilidade de abelhas européias e africanas a inseticidas organofosforados, organoclorados e piretróides foi avaliada pelo

método de aplicação tópica⁵. Para as africanas, os valores calculados da concentração letal 50 (CL₅₀)^b (μ g/abelha) variou entre 0,028 - 0,324 μ g, na seguinte ordem de toxicidade: permetrina > carbaril > azinfos metílico > paration metílico; entre as européias variou de 0,015 - 0,165 μ g com a seguinte ordem de toxicidade: permetrina > azinfos metílico > carbaril > paration metílico.

WILSON e col.⁸ reportaram que durante o verão de 1985 ocorreram, na Califórnia, EUA, mais de 1200 casos de intoxicações, os quais foram atribuídos ao consumo de melancia. Alguns dos pacientes apresentavam claramente sintomas colinérgicos. Intoxicações semelhantes foram associadas, no estado de Oregon, EUA, com a presença de aldicarb sulfóxido no melão. Face ao ocorrido e prevendo possíveis ocorrências futuras, os autores sugeriram, como auxiliar dos métodos analíticos convencionais, a implementação de métodos biológicos de monitoramento para avaliar a presença de carbamatos e/ou ésteres de organofosforados em melancia.

Estudos da inibição da AChE e bioensaio com abelhas foram feitos para testar a presença do aldicarb, aldicarb sulfóxido, aldicarb sulfona, acefato e metamidofos no suco, suco concentrado e na polpa de melancia. Em amostras contaminadas com

^b Concentração letal 50 indica a quantidade da substância capaz de matar 50 % da população em teste

0,91 mg/kg dos inseticidas, foram verificados, respectivamente no suco, suco concentrado e na polpa da melancia, a inibição de 91 %, 90 % e 90 % da AChE pelo aldicarb, 97 %, 100 % e 96 % pelo aldicarb sulfóxido, 50 %, 77 % e 38 % pelo aldicarb sulfona, 19 %, 30 % e 5 % pelo metamidofos e 7 %, 18 % e 15 % nas amostras tratadas com acefato. Nos bioensaios com abelhas, em amostras contaminadas com 5 mg/kg, a taxa de mortalidade foi de 48 % para aldicarb, 25 % para aldicarb sulfóxido, 21 % para o aldicarb sulfona, 25 % para o metamidofos e 63 % para o acefato. Embora o ensaio enzimático tenha sido mais sensível que o bioensaio com abelhas, ambos são adequados para monitorar a contaminação de melancias. A metodologia desenvolvida é vantajosa pois dispensa o uso de sistemas de solventes orgânicos no preparo de extrato das amostras⁸.

Bioensaios com larvas de mosquitos

Dados da literatura mostram que as larvas de mosquito (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*) são extremamente sensíveis aos inseticidas e, portanto, podem ser usadas para bioensaio de microquantidades dos seus resíduos. No entanto, apresentam as desvantagens de também serem bastante sensíveis a outras substâncias presentes nos extratos, terem ciclos de vida longos e não serem manipula-

dos com facilidade como as moscas *D. melanogaster*^{2, 18}.

Utilizando larvas do mosquito *Aedes aegypti* (L. 1762) (Diptera: CULICIDAE), no 4º instar, OLIVEIRA & BATISTA²⁷ avaliaram a toxicidade de vários organofosforados mediante a determinação da CL₅₀, cujos valores, expressos em mg/L, foram: paration metílico 0,0054; paration etílico 0,0137; fenotato 0,0186; diclorvos 0,076; mevinfos 0,099; malation 0,185 e diazinon 0,227. Objetivando o estabelecimento de períodos de carência, esses mesmos inseticidas foram aplicados em couve (*Brassica oleracea*, var. *acephala* L.) e os seus resíduos avaliados por bioanálise com larvas do *Aedes aegypti*. Os resultados indicaram que a bioanálise com larvas de *A. aegypti* permite a determinação dos intervalos de segurança para o paration metílico, paration etílico e malation em plantas de couve.

STRICKMAN²⁸ avaliando a toxicidade de inseticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, em larvas do mosquito *Wyeomyia smithii* (Diptera: CULICIDAE) verificou que os valores de CL₅₀ nas larvas eram comparáveis aqueles calculados para peixes, como a truta arco-íris (*Salmo gairdneri*), truta de lago (*Salvelinus namaycush*), truta de riacho (*Salvelinus fontinalis*), lampréia (*Ictalurus punctatus*) e o bagre preto (*Ictalurus melas*). Observou, ainda,

que dentre os sinais comportamentais resultantes da intoxicação incluíam-se movimentos desordenados e espasmódicos, dificuldade de inflexão, inatividade e contração tônica dos músculos longitudinais, resultando em encurtamento e engrossamento da larva. Embora esses sinais fossem comuns a todos os inseticidas testados, alguns sinais de intoxicação apresentavam-se diferentes nos diferentes grupos de inseticidas. O heptacloro epóxido causava paralisia tremula na larva, mas não contração tônica dos músculos longitudinais. Os piretróides provocavam incapacidade para inflexão mais pronunciada do que os outros grupos de inseticidas. Os organofosforados causavam contração tônica dos músculos longitudinais mais uniformemente que os demais inseticidas. O autor concluiu que o bioensaio com as larvas do mosquito *Wyeomyia smithii* pode ser aplicado para avaliar a presença de inseticidas na água e que através de uma avaliação sistemática dos sinais de intoxicação da larva é possível a identificação preliminar do grupo químico responsável pela intoxicação.

Bioensaios com microcrustáceos e crustáceos

A toxicidade aguda do aldicarb, aldicarb sulfóxido e aldicarb sulfona foi avaliada em *Daphnia laevis*²⁹. Os bioensaios foram realizados em animais jovens e adultos, com du-

ração de 48 h. Os valores determinados das CL₅₀ para as *Daphnia laevis* jovens e adultos foram, respectivamente, 70 e 209 µg/L para o aldicarb, 84 e 103 µg/L para o aldicarb sulfóxido e 910 e 1124 µg/L para aldicarb sulfona. Embora os valores da CL₅₀ para os animais jovens tenham sido, em geral, menores do que para os adultos, essa diferença foi significativa ($p < 0,05$) apenas para o aldicarb.

Os microcrustáceos de água doce *Diaptomus sp.*, *Encyclops sp.*, *Alonella sp.* e *Cypria sp.* foram utilizados por NAQVI & HAWKINS³⁰ para determinar a CL₅₀ dos inseticidas endosulfan e malation. Os quatro gêneros de microcrustáceos apresentaram suscetibilidade semelhante para cada agrotóxico e a CL₅₀, expressa em µg/L, variou entre 0,1 a 0,9 para o endosulfan, 1,0 a 2,0 para o malation. Considerando que os valores da CL₅₀ (µg/L) para o endosulfan variou entre 0,1 a 0,9 e os do malation entre 1,0 e 2,0 e que a solubilidade destes compostos em água é, respectivamente 150 µg/L e 145 µg/L, os autores concluíram que o malation, embora sendo menos tóxico que o endosulfan, pode ser potencialmente mais perigoso que o endosulfan para microcrustáceos e seu uso próximo de rios e lagos deve ser evitado.

Larvas de lagostim, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) e de camarão, *Penaeus*

stylirostris (Stimpson) foram utilizados por JUAREZ & SANCHEZ³¹ para avaliar a toxicidade do inseticida organofosforado metamidofos. Os bioensaios foram realizados em temperatura de 28 °C. O metamidofos apresentou toxicidade elevada tanto para o estágio larvário naupliae do lagostim (CL₅₀ de 0,60 ng/L para 36 h de teste) quanto para o estágio larvário zoea IV do camarão (CL₅₀ de 0,22 ng/L para 96 h de teste). Devido aos baixos valores de CL₅₀ encontrados para os estágios larvários desses crustáceos, assim como ao fato de que a concentração de 0,10 ng/L era suficiente para reduzir a sobrevivência e aumentar o tempo de metamorfose, os autores concluíram que pequenas quantidades desse inseticida podem afetar adversamente a população dos crustáceos no curso das águas.

Bioensaios com organismos diversos

SALIBIÁN³² estudou os efeitos da deltametrina no estágio larvário do sapo (*Bufo arenarum*). Os girinos foram expostos a diferentes concentrações da deltametrina e a CL₅₀, calculada para 96 h de exposição, foi 4,4 µg/L, para animais com idade variando entre 26 a 30 dias. Devido a alta sensibilidade aos piretróides, baixo custo, facilidade de observação simultânea de grande número de animais, o autor considerou o girino do *B. arenarum* um organismo adequado para bioensaio aquático de piretróides.

Bioensaio com os acaricidas zolone (fosfalona), folimat (ometoato) e com os inseticidas gusathion (azinfos etílico), diazinon, malation e vapon (diclorvós) sobre os diferentes estágios de vida do ácaro vermelho (*Tetranychus bioculatus* (Wood - Mason)) mostrou que os estágios de ninfas são mais susceptíveis aos agrotóxicos do que os adultos. O folimat, vapon e zolone foram os que apresentaram maior toxicidade para as ninfas com DL₅₀ variando de 302 - 327 mg/kg³³.

Culturas de células nervosas de embrião de galinha foram utilizadas na detecção de resíduos de organofosforados no solo. Os valores da concentração de inibição 50 (CI₅₀)^c, nos extratos de amostras de solos, foram 3,5 x 10⁻⁹ moles/L para o sarin e 1,2 x 10⁻³ moles/L para o diisopropil metilfosfonato³⁴.

Algas verdes, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus*, foram avaliadas para uso na detecção de inseticidas. Para tanto, placas de Petri contendo um meio basal mais ágar a 1,5 % foram inoculadas com culturas de algas (2 x 10⁵ células/mL). Discos de papel de filtro, impregnados com diferentes concentrações dos inseticidas, foram colocados sobre a superfície das placas inoculadas e mantidas a temperatura de 26 ± 3 °C. As zonas de inibição estavam diretamente

^c Quantidade do inseticida necessário para inibir 50 % da atividade da enzima AChE

relacionada com a concentração do inseticida aplicado no papel de filtro. Os limites de detecção do bioensaio, pelas diferentes algas foram de 2 - 4 µg/disco para o quinalfos, carbaril, carbofuran, cipermetrina e fenvalerato e 20 µg/disco para o metamidofos¹¹. Os autores sugeriram que o bioensaio com algas verdes é eficiente para detectar a presença de inseticidas.

Considerações finais

Segundo MEGHARAJ e col.¹¹, os bioensaios são eficientes para detectar a presença de inseticidas, especialmente quando não se dispõe de equipamentos para cromatografia gasosa ou líquida de alta eficiência. PUGA & RUBANO⁹ e BAGDONAS e col.¹⁰ reportam que a sensibilidade do bioensaio é dependente da toxicidade do agrotóxico para o organismo sob as condições de teste, e essa sensibilidade pode ser modificada por alguns fatores, tais como: aumento da quantidade de amostra, isolamento do agrotóxico, aumento da quantidade do extrato usado por teste, aumento do tempo de contato entre a amostra e o organismo teste, assim como pelo uso de organismos jovens. Para se obter resultados que se enquadrem dentro da sensibilidade exigida pelos métodos químicos de análise de resíduos, devem ser escolhidos organismos que sejam suficientemente sensíveis para detectar níveis residu-

ais na faixa de 0,1 a 1,0 mg/kg e ainda que forneçam resultados reprodutíveis.

Agradecimentos

G. R. de Almeida agradece a CAPES pela bolsa de estudos e ao Instituto Adventista de Ensino, Campus São Paulo, pelo apoio recebido.

Referências bibliográficas

1. BOWMAN, W. C.; RAND, M. J. - *Textbook of Pharmacology*, Second edition. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1980.
2. SUN, Y. P. - Bioassay of pesticide residues. In: METCALF, R. L. *Advances in pest control research*. New York: Inter-Science, 1957. v. 1, p. 449 - 497.
3. LAUG, E. P. - A biological assay method for determining 2,2 bis (p-chlorophenyl)-1,1,1, trichloroethane (DDT). *J. Pharm. Exptl. Therap.* 86: p. 324 - 331, 1946.
4. KOHN, G. K. - Bioassay as a monitoring tool. *Residue Reviews*, v. 76, p. 99 - 129, 1980.
5. DANKA, R. G.; RINDERER, T. E.; HELLMICH II, R. L.; COLLINS, A. M. - Comparative toxicities of four topically

- applied insecticides to Africanized and European honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, v. 79, n. 1, p. 18 - 21, 1986.
6. FRAWLEY, J. P.; LAUG, E. P.; FITZHUGH, O. G. - A procedure for the biological assay of insecticides by oral administration to flies. *J. Assoc. Agric. Chem.*, v. 35, n. 3, p. 741 - 745, 1952.
 7. SUN, Y. P.; SUN, J. Y. T. - Microbioassay of insecticides with special reference to aldrin and dieldrin. *J. Econ. Entomol.*, v. 45, n. 1, 26 - 37, 1952.
 8. WILSON, B. W.; SEIBER, J. N.; STELLJES, M. E.; HENDERSON, J. D.; ARCHER, T. E.; POLLOCK, G. A.; KNAACK, J. B. - Bioassay for detection of aldicarb in watermelon. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 42, n. 2, p. 159 - 166, 1989.
 9. PUGA, F. R.; RUBANO, S. - Determinação de resíduos de inseticidas através de bioensaio com *Drosophila melanogaster*. In: ALMEIDA, W. F. (ed.) *Métodos prácticos para detección de residuos de plaguicidas*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, Mexico: 1987. p. 37 - 43.
 10. BAGDONAS, M.; MELLO, M. H. S. H.; UNGARO, M. T. S.; GUINDANI, C. M. A.; FERREIRA, M. S.; GAETA, R. - Ensaio biológicos como testes preliminares na detecção de resíduos de inseticidas em frutas e hortaliças. *Rev. Soc. Bras. Toxicol.*, v.1, n.1, p. 3 - 5, Jan. 1988 e Jul. 1988.
 11. MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; RAO, A. S. - The use of unicellular soil green algae for insecticide bioassay. *J. Microb. Methods*, v. 10, n. 2, p. 119 - 122, 1989.
 12. MANSOUR, S. A. - Is it possible to use the honey bee adult as a bioindicator for the detection of pesticide residue in plants? *Acta Biologica Hungarica*, v. 38, n. 1, p. 69 - 76, 1987.
 13. DAHM, P. A.; PANKASKIE, J. E. - A biological assay method for determining Aldrin. *J. Econ. Entomol.*, v. 42, n. 6, p. 987 - 988, 1949.
 14. TAYLOR, R. N. - Insecticide resistance in houseflies from the Middle east and North Africa with notes on the use of various bioassay techniques. *Pestic. Sci.*, v. 13, n. 4, p. 415 - 425, 1982.
 15. MACDONALD, R. S.; SOLOMON, K. R.; SURGEONER, G. A.; HARRIS, C. R. - Laboratory studies on the mecha-

- nisms of resistance to permethrin in a field-selected strain of house flies. *Pestic. Sci.*, v. 16, n. 1, p. 10 - 16, 1985.
16. BLOOMQUIST, J. R.; MILLER, T. A. - A simple bioassay for detecting and characterising insecticide resistance. *Pestic. Sci.*, v. 16, n. 6, p. 611 - 614, 1985.
17. SUN, Y. P.; PANKASKIE, J. E. - *Drosophila*, a sensitive insect for the microbioassay of insecticide residues. *J. Econ. Entomol.*, v. 47, n. 1, p. 180 - 181, 1954.
18. DEWEY, J. E. - Utility of bioassay in the determination of pesticide residues. *J. Agric. Food Chem.*, v. 6, n. 4, p. 274 - 281, 1958.
19. EARLE, N. W.; PANKASKIE, J. E.; SUN, Y. P. - Microbioassay of insecticide residues in plant tissues without extraction, with special reference to aldrin and dieldrin. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, v. 42, n. 3, p. 586 - 592, 1959.
20. PHILLIPS, W. F.; BOWMAN, M. C.; SCHULTHEISZ, R. J. - Estimation of insecticide residues in foods through parallel screening methods. *J. Agric. Food Chem.*, v. 10, n. 6, p. 486 - 490, 1962.
21. CHIANG, T.; DEAN, M. C.; McDANIEL, C. S. - A fruit fly bioassay with phosphotriesterase for detection of certain organophosphorous insecticide residues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 34, n. 6, p. 809 - 814, 1985.
22. ISHAAYA, I.; YABLONSKI, S.; GUREVITZ, E.; RENNEH, S. - Toxicity of avermectin B₁ to *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) and *Lobesia botrana* (Lepdoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.*, v. 79, n. 6, p. 1621 - 1623, 1986.
23. MATSUMURA, F. - *Toxicology of insecticides*. Second edition. New York: Plenum Press, 1985.
24. BRASIL. Ministério da Saúde - *Relação de substâncias para uso fitossanitário e domissanitário: portarias do Ministério da Saúde*. ILSI Brasil, São Paulo, 1995. 716p.
25. JOSEPH Jr, H.; KNOBEL, M. G. - Estudo preliminar da sensibilidade de moscas *Drosophila melanogaster* a diversos pesticidas organoclorados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 40, n. 1, p. 43 - 47, 1980.

26. MURRAY, A. - Acute and residual toxicity of a new pyrethroid insecticide, WL 85871, to honey-bees. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 34, n. 4, p. 560 - 564, 1985.
27. OLIVEIRA, J. V.; BATISTA G. C. - Avaliação quantitativa de resíduos de inseticidas organofosforados em couve (*Brassica oleracea* Var. *acephala* L.) pela bioanálise com larvas de *Aedes aegypti* (L., 1.762) (Diptera: Culicidae). *Ecossistema*, v. 1, p. 45 - 53, 1976.
28. STRICKMAN, D. - Aquatic bioassay of 11 pesticides using larvae of the mosquito, *Wyeomyia smithii* (Diptera: Culicidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 35, n. 1, p. 133 - 142, 1985.
29. FORAN, J. A.; GERMUSKA, P. J.; DELFINO, J. J. - Acute toxicity of aldicarb, aldicarb sulfoxide, and aldicarb sulfone to *Daphnia laevis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 35, n. 4, p. 546 - 550, 1985.
30. NAQVI, S. M.; HAWKINS, R. H. - Responses and LC₅₀ values for selected microcrustaceans exposed to Spartan[®], malathion, Sonar[®], Weedtrine-D[®] and Oust[®] pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 43, n. 3, p. 386 - 393, 1989.
31. JUAREZ, L. M.; SANCHEZ, J. - Toxicity of the organophosphorous insecticide metamindophos(O,S-dimethyl phosphoramidothioate) to larvae of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) and blue shrimp *Penaeus stylirostris* Stimpson. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 43, n. 2, p. 302 - 309, 1989.
32. SALIBIÁN, A. - Effects of Deltamethrin on the South American toad, *Bufo anae-run*, tadpoles. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 48, n. 4, p. 616 - 621, 1992.
33. SARDAR, M. A.; SARKER, K. R. - Bioassay of pesticides on the life stages of red mite, *Tetranychus bioculatus* (WOOD-MASON) (Prostigmata: Tetranychidae). *Acarologia*, v. 29, n. 3, p. 279 - 284, 1988.
34. SAWYER, T. W.; WEISS, M. T.; D'AGOSTINO, P. A.; PROVOST, L. R.; HANCOCK, J. R. - Bioassay of organophosphate nerve agents in soil using neuronal tissue cultures. *J. Appl. Toxicol.*, v. 12, n. 1, p. 1 - 6, 1992.

CAPÍTULO 2

BIOENSAIO COM *Drosophila melanogaster* (Meig.):

**1. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E TOXICIDADE DO
ENDOSULFAN E BIOMONITORAMENTO DE SEUS
RESÍDUOS EM COUVE-MANTEIGA**

**TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ EM OUTUBRO DE 1997**

BIOENSAIO COM *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E TOXICIDADE DO ENDOSULFAN E BIOMONITORAMENTO DE SEUS RESÍDUOS EM COUVE-MANTEIGA

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endosulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. Rev. Inst. Adolfo Lutz

RESUMO: O endosulfan é um inseticida e acaricida fitossanitário com amplo espectro de atividade, formado pelos isômeros alfa e beta em proporção aproximada de 70 e 30 %, respectivamente. A sensibilidade das *Drosophila melanogaster* ao endosulfan e ao uso desse organismo no biomonitoramento dos resíduos do inseticida em couve foi avaliada. Nas condições do bioensaio, método do filme seco em placa de Petri, o endosulfan se degrada em função da temperatura, sendo que o isômero alfa se degrada mais rapidamente do que o beta. Os bioensaios realizados com *D. melanogaster*, indicaram que a toxicidade do inseticida aumenta com o aumento da temperatura (25 a 35 °C), sendo que as fêmeas apresentam maior susceptibilidade ao inseticida. Os valores de DL₅₀ calculados, em função da temperatura, variaram entre 4,2 e 11,7 mg/kg pc para machos e entre 2,8 e 8,1 mg/kg pc para fêmeas. Thiodan[®] 350 CE, foi aplicado em couve-manteiga (*Brassica oleracea*, var. *acephala*), e os resíduos de endosulfan foram determinados pelo método de bioensaio e validados por cromatografia gasosa. O limite de determinação pelo bioensaio é da ordem de 0,1 mg/kg, tendo o método apresentado boa reprodutibilidade, com coeficiente de variação de 10 %. Os resultados obtidos confirmam a viabilidade do bioensaio com *D. melanogaster* no monitoramento de resíduos de endosulfan em couve.

DESCRITORES: Bioensaio com *Drosophila melanogaster*, degradação do endosulfan, toxicidade e resíduos em couve.

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endossulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

INTRODUÇÃO

O endossulfan (Sulfito de 1,2,3,4,7,7-hexa-cloro-biciclo (2,2,1)-2-hepteno,-5,6-bis oximetileno) é um inseticida e acaricida fitossanitário com espectro amplo de atividade, formado pelos isômeros alfa (α) e beta (β) em proporção aproximada de 70 e 30 %, respectivamente. Pertence ao grupo éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico clorado^{10, 19, 40}.

Os produtos de degradação do endossulfan são: endossulfan sulfato, diol, éter, OH-éter e lactona^{9, 10, 26}, os quais são formados através de reações de oxidação e hidrólise^{9, 12, 26}, fotólise^{2, 32} e biodegradação^{12, 25, 26}.

No solo e em vegetais como feijão (*Phaseolus vulgaris*), beterraba (*Beta vulgaris* L.)⁷, feijão guandu (*Cajanus cajan* L. Millsp)²⁷, beringela (*Solanum melongena* L.), mostarda (*Brassica campestris* L.) e grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.)^{11, 28} o isômero beta e o endossulfan sulfato têm-se mostrado mais estável do que o isômero alfa³⁵, o que parece estar relacionado com as condições de umidade do solo e com a quantidade de inseticida aplicado³¹.

No Brasil, o endossulfan tem uso permitido apenas em culturas de algodão, cacau, café, soja e cana-de-açúcar. Porém, com a finalidade de registro para extensão de uso, estudos dos seus resíduos, assim como do seu principal metabólito, o endossulfan sul-

fato, foram realizados em culturas de batata, tomate, laranja, mamão, maçã, maracujá e morangos¹⁹. Por outro lado, a presença dos seus resíduos, devido a uso indevido, tem sido reportada em culturas como: batata¹⁹, cenoura³⁹, couve³⁹, couve-flor³³, pepino³⁹, tomate^{5, 19} e morango²⁹, o que justifica o desenvolvimento de metodologia simples para monitoramento do endossulfan em culturas onde não tenha, necessariamente, seu uso permitido.

Bioensaio com a mosca *Drosophila melanogaster* (Meig.) tem sido usado por alguns pesquisadores como indicador da presença de substâncias químicas ambientais com potencial mutagênico⁴¹, de resíduos de agrotóxicos em alimentos^{3, 30}, para auxiliar e esclarecer a natureza da substância tóxica em casos de envenenamento envolvendo inibidores da acetilcolinesterase (AChE), como os organofosforados e os carbamatos⁸.

Cabe destacar que as moscas *D. melanogaster*, além da sua elevada sensibilidade para detectar a presença de substâncias de natureza tóxica, são insetos de fácil manipulação, criação e manutenção nas condições de laboratório, o que facilita amplamente a realização do bioensaio^{6, 38}.

Com o propósito de detectar resíduos de inseticidas em quantidades que possam apresentar perigo à saúde humana, torna-se

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endossulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

necessário pesquisar e avaliar métodos alternativos de triagem que sejam satisfatórios, práticos e que reduzam significativamente os custos para o controle de qualidade de produtos alimentícios, especialmente os hortifrutigranjeiros, quanto à presença de agrotóxicos em geral e de inseticidas em particular¹.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a sensibilidade das moscas *D. melanogaster* ao efeito inseticida do endossulfan, assim como a viabilidade do biomonitoramento, com *Drosophila*, dos resíduos de endossulfan em hortigranjeiros. Para tanto, inicialmente foi avaliada a estabilidade do endossulfan nas condições do bioensaio, assim como a sensibilidade da *Drosophila*, ao inseticida, em função da temperatura e do tempo de exposição. Posteriormente, o endossulfan foi aplicado em plantação de couve-manteiga (*Brassica oleracea*, var. *acephala*) e os seus resíduos avaliados pelos métodos de bioensaio e por cromatografia gasosa (CG).

MATERIAL E MÉTODOS

APARELHOS

Cromatógrafo a gás Varian, modelo 3400, com detector de captura de elétrons (⁶³Ni), equipado com coluna megabore DB1 (30 m de comprimento x 0,54 mm de diâme-

tro interno), acoplado a um integrador processador CG, modelo 300.

Evaporador rotatório Tecnal, modelo 120.

Homogeneizador de tecidos Tecnal, modelo 102.

Pulverizador costal, marca Jato com capacidade de 20 L.

SOLVENTES E REAGENTES

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau para resíduos da Merck, os quais foram previamente destilados. O cloreto de sódio foi lavado com acetona e o sulfato de sódio anidro e o florisil aquecidos a 400 °C, durante 8 horas. Antes do uso, o florisil foi ativado em estufa a 120 °C.

Como padrão analítico foi utilizado endossulfan (isômeros α , β e endossulfan sulfato), com grau de pureza de 99,0 %, o qual foi cedido pelo Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada / Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticida do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Para avaliação da estabilidade do endossulfan nas condições do bioensaio, da sensibilidade do bioensaio e nos ensaios de campo, foi utilizado o produto comercial Thiodan[®] 350 CE, cedido pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI).

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endossulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

BIOENSAIO COM *Drosophila melanogaster*

Moscas *D. melanogaster*

As moscas *D. melanogaster*, usadas para a realização dos bioensaios, foram criadas no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), em ambiente com temperatura de 25 ± 2 °C, a partir de cepas cedidas pelo Laboratório de Toxicologia Animal, Instituto Biológico de São Paulo.

Meio de cultura para criação das moscas

O meio de cultura para criação das moscas foi preparado conforme JOSEPH e KNOBEL¹⁷, com modificação do procedimento do aquecimento do meio que, ao invés de ser feito em autoclave, foi realizado em forno de microondas. Após o preparo, cerca de 50 mL do meio foram colocados em frasco de vidro transparente, de boca larga e capacidade aproximada de 500 mL. Os frascos contendo o meio de cultura, foram conservados em geladeira até o momento do uso.

Criação das moscas

Moscas machos (15) e fêmeas (15) foram transferidas para os frascos contendo o meio de cultura e mantidas a temperatura de 25 ± 2 °C. Ao oitavo dia, as moscas foram

removidas dos frascos, remanescendo as larvas. Após 48 h do início da emergência, as moscas foram transferidas para um novo frasco de cultura, procedimento este que foi repetido a cada 48 horas, para obtenção de novos lotes de moscas. O bioensaio foi realizado utilizando moscas com idade de 3 a 5 dias.

BIOENSAIO: SENSIBILIDADE DAS MOSCAS AO ENDOSULFAN

O bioensaio com as moscas *D. melanogaster* foi realizado conforme o método do filme seco¹⁸ em placa de Petri (50 x 20 mm). Para a formação do filme foram colocados, na base de cada placa, 100 µL de soluções contendo 100, 120, 144, 173 e 207 ng de endossulfan / placa para os testes realizados a 20 °C; 83, 100, 120, 144 e 173 ng/placa para os testes a 25 e 30 °C e 35, 42, 50, 60 e 73 ng/placa para os testes realizados a 35 °C. Na lateral da base de cada placa foram colocados 0,5 cm³ do meio de cultura, para a alimentação das moscas durante o teste. Placas controles foram preparadas com 100 µL do solvente (acetona) utilizado na diluição do inseticida.

Moscas com idade de 3 a 5 dias, foram transferidas para um frasco de vidro e imobilizadas por resfriamento a, aproximadamente, - 10 °C, durante ± 5 min.⁶. Após a imobilização, as moscas foram transferidas

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endosulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

para um vidro de relógio revestido com papel de filtro, mantido a uma temperatura de, aproximadamente, 5 °C. Nessa temperatura, as moscas eram separadas por sexo, o que é realizado pela observação do tamanho e das características do abdômen^{30, 36}, contadas e transferidas para as placas testes. As placas contendo 20 moscas, machos ou fêmeas, foram colocadas em recipiente de vidro, com tampa, em estufa durante 12 h a 35 °C ou 24 h para as temperaturas de 20 °C, 25 °C e 30 °C. A umidade do ambiente foi mantida colocando uma placa de Petri com água no fundo do recipiente.

CÁLCULO DA DL₅₀

Para efeito de cálculo da DL₅₀, levou-se em consideração as moscas mortas, assim como as moribundas observadas no momento da contagem⁶. Os cálculos dos valores de DL₅₀ foram efetuados por análise de probito, usando o programa "Análise de probito com determinação da dose letal mediana - Programa probito" (HOFFMANN - ESALQ / USP - Maio de 1990).

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO ENDOSULFAN NAS CONDIÇÕES DO BIOENSAIO

A avaliação da estabilidade do endosulfan foi realizada conforme o método do filme seco. Para tanto, foram aplicados, na

base de placas de Petri (50 x 20 mm), 100 µL de solução contendo 120 ng de endosulfan. Evaporado o solvente, as placas foram fechadas, colocadas em recipiente de vidro e mantidas a 20, 25, 30 e 35 °C. Os níveis de degradação do endosulfan, colocado nas placas, foram avaliados após 6, 12 e 24 h da aplicação. Para tanto, o endosulfan foi extraído das placas com n-hexano, transferido para tubo concentrador, e levado para volume final de 1,0 mL. O endosulfan foi determinado por CG, nas seguintes condições: temperatura da coluna 200 °C, do injetor 220 °C e do detector 300 °C; gás de arraste nitrogênio; fluxo de 20 mL/min.

ENSAIO DE CAMPO

Couve-manteiga (*Brassica oleracea*, var. *acephala*) foi cultivada, segundo as boas práticas agrícolas, na horta do Instituto Adventista São Paulo, em Hortolândia, São Paulo.

As mudas foram plantadas em canteiro com espaçamento de 1,0 x 0,5 m em área de aproximadamente 100 m², no mês de Outubro de 1992 e pulverizada com Thiodan[®] 350 CE, no mês de Novembro do mesmo ano. Para tanto, o inseticida foi diluído em água (1 : 2000) e aplicado, com pulverizador costal, na proporção de 440 g do ingrediente ativo por hectare, na área cultivada. Amostras testemunhas foram colhidas

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endosulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

da mesma plantação, antes da aplicação do inseticida.

Amostras de couve foram colhidas e analisadas após 3, 10 e 17 dias após terem sido pulverizadas. O procedimento de colheita foi aleatório, colhendo-se apenas uma folha de cada planta, em diferentes pontos da área cultivada, no período compreendido entre 9:00 e 10:00 h (sempre depois da perda da umidade superficial das folhas). As amostras foram transportadas para o laboratório, imediatamente após a colheita e analisadas.

VALIDAÇÃO DO BIOENSAIO

Para avaliação do método de bioensaio, os extratos de couve tratada com Thiodan 350 CE foram analisados conforme apresentado na figura 1.

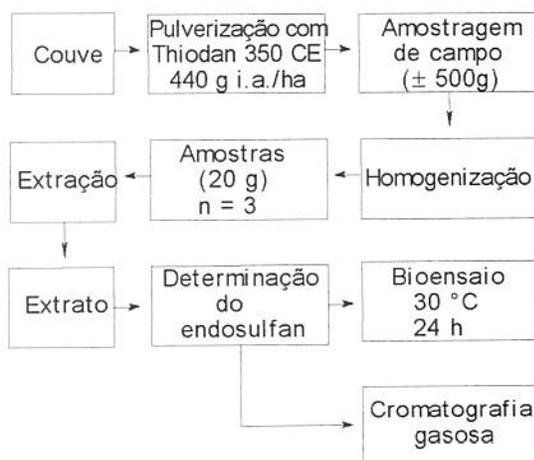


Figura 1 - Esquema de pulverização, extração e determinação dos resíduos do endosulfan aplicado em couve

Extratos de couve cultivada sem tratamento com o agrotóxico também foram avaliados pelo bioensaio. Para realização do bioensaio foram preparadas placas com diferentes alíquotas do extrato, de maneira que pudesse ser estimado o volume necessário para matar 50 % da população teste. As placas foram mantidas a 30 °C, durante 24 h.

DETERMINAÇÃO, POR CROMATOGRAFIA GASOSA, DOS RESÍDUOS DO ENDOSULFAN EM COUVE

Os resíduos de endosulfan na couve foram determinados conforme a metodologia proposta por LUKE et alii²⁴, com as seguintes modificações: de uma amostra de couve homogeneizada, foram transferidos 20 g para um erlenmeyer de 250 mL. Após a adição de 150 mL da mistura acetona + água bidestilada (2:1 v/v), a amostra foi triturada em homogeneizador de tecido e filtrada a vácuo em funil de Büchner, com papel de filtro Whatman n° 1. O filtrado foi transferido para um funil de separação de 500 mL, acrescentado 100 mL da mistura de diclorometano + hexano (1 : 1 v/v), agitado vigorosamente durante 2 minutos. Após a separação das fases, a fase aquosa foi transferida para outro funil de separação de 250 mL contendo 5,0 g de NaCl, lavado previamente com acetona. A mistura foi agitada vigorosamente até a completa dissolução do NaCl e a seguir adicionado 50 mL de diclorometano.

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endossulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

no. Após agitar durante 2 minutos, a fase orgânica foi separada e transferida para o funil de separação de 500 mL contendo a fase orgânica obtida inicialmente. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. A fase orgânica total foi colocada em um balão de fundo redondo (500 mL), concentrada em rotavapor à temperatura de 40 °C até cerca de 1 mL e ressuspensa em 10 mL de hexano.

A limpeza do extrato foi realizada em uma coluna cromatográfica de 10 x 200 mm contendo 8 cm³ de florisil e, no topo, cerca de 1 cm³ de Na₂SO₄, previamente condicionada com 10 mL de hexano. Após a adição de 5,0 mL do extrato, a coluna foi lavada com 20 mL de hexano e o resíduo eluído com 40 mL da mistura diclorometano + hexano (1:1 v/v) e mais 60 mL da mistura acetonitrila + diclorometano + hexano (0,5 : 50 : 49,5 v/v/v). O eluato recolhido foi concentrado em rotavapor à temperatura de 40 °C até quase à secura e transferido com 10 mL de hexano para um tubo concentrador graduado. O extrato foi seco com nitrogênio, sendo o tubo lavado com hexano e seco novamente com nitrogênio e diluído a 1 mL com hexano e injetado no cromatógrafo a gás, conforme os parâmetros do aparelho descritos anteriormente.

RECUPERAÇÃO E SENSIBILIDADE

Para avaliação da metodologia modificada de LUKE *et alii*²⁴ determinou-se a percentagem de recuperação do endossulfan. Para tanto, amostras de couve (20 g), livre do inseticida, foram adicionadas de 1 mL dos padrões nas concentrações de 0,5 µg/mL e 1 µg/mL de α e de β-endossulfan, caracterizando fortificação de 0,025 mg/kg e 0,05 mg/kg de amostra, respectivamente. Em seguida, as amostras fortificadas foram analisadas conforme o procedimento descrito anteriormente. A faixa de linearidade (curva padrão) de resposta do detector do cromatógrafo foi determinada usando diluições de 0,005 a 0,20 µg/mL para o α e β-endossulfan e de 0,01 a 1,0 µg/mL para o endossulfan sulfato. De cada uma dessas soluções foram injetados, no cromatógrafo, 2 µL.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no bioensaio foram avaliados por análise de variância (ANOVA). O teste de TUKEY foi utilizado para verificar se havia diferença entre os resultados obtidos para as moscas machos e fêmeas, como também entre as temperaturas utilizadas no bioensaio. Os cálculos foram feitos utilizando-se o software estatístico S.A.S., disponível no LABEST (Laboratório de Estatística / UNICAMP).

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endosulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado a sensibilidade das *D. melanogaster* ao endosulfan e o uso desse organismo no biomonitoramento dos resíduos do inseticida em couve.

O estudo da degradação do endosulfan em função do tempo de exposição e da variação de temperatura foi conduzido para avaliar a quantidade do inseticida que estaria disponível, como isômero alfa e beta, durante o período em que os bioensaios foram realizados, já que estes, juntamente com o endosulfan sulfato, são mais tóxicos para insetos do que os demais produtos de sua degradação^{4, 23}.

A percentagem residual do endosulfan alfa e beta, remanescente em placa de Petri,

determinada por CG, após 6, 12 e 24 h nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C, está apresentada nas figuras 2 a 5. Os resultados indicam que a degradação é diretamente proporcional tanto ao tempo de exposição como a variação da temperatura, sendo que o endosulfan alfa se degrada mais rapidamente do que o beta. Após 24 h, o isômero alfa atinge concentrações 2 a 3 vezes menores do que o isômero beta. Resultados semelhantes foram relatados por BEARD & WARE⁷.

Os valores de DL₅₀ para as moscas *D. melanogaster* machos e fêmeas, calculadas em função da variação da temperatura, estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Valores médios da dose letal mediana (DL₅₀, expressa em mg/kg pc) do endosulfan para *D. melanogaster*, machos e fêmeas, em diferentes temperaturas.

Temp. ⁽¹⁾ (°C)	MACHOS		FÊMEAS	
	DL ₅₀ ± s ⁽²⁾	Taxa de DL ₅₀ ⁽³⁾	DL ₅₀ ± s ⁽²⁾	Taxa de DL ₅₀ ⁽³⁾
20	10,1 ± 0,7 (A, a) ⁽⁴⁾	-1,2	6,3 ± 0,5 (B, a)	-1,3
25	11,7 ± 1,0 (A, b)	1,0	8,1 ± 0,6 (B, b)	1,0
30	8,7 ± 0,3 (A, c)	1,3	5,9 ± 0,1 (B, a)	1,4
35	4,2 ± 0,1 (A, d)	2,8	2,8 ± 0,2 (B, c)	2,9

(1) Nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C o tempo de exposição foi de 24 h, a 35 °C foi de 12 h.

(2) s = desvio padrão absoluto (n = 5)

(3) Relação temperatura-toxicidade em relação à 25 °C³⁴

(4) Comparação entre médias. As letras "A e B" indicam comparação de médias entre machos e fêmeas para uma mesma temperatura e as letras "a, b, c, d" indicam comparação de médias entre temperaturas para o mesmo sexo. Médias com mesma letra não são diferentemente significativas (P < 0,05).

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endosulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. Rev. Inst. Adolfo Lutz

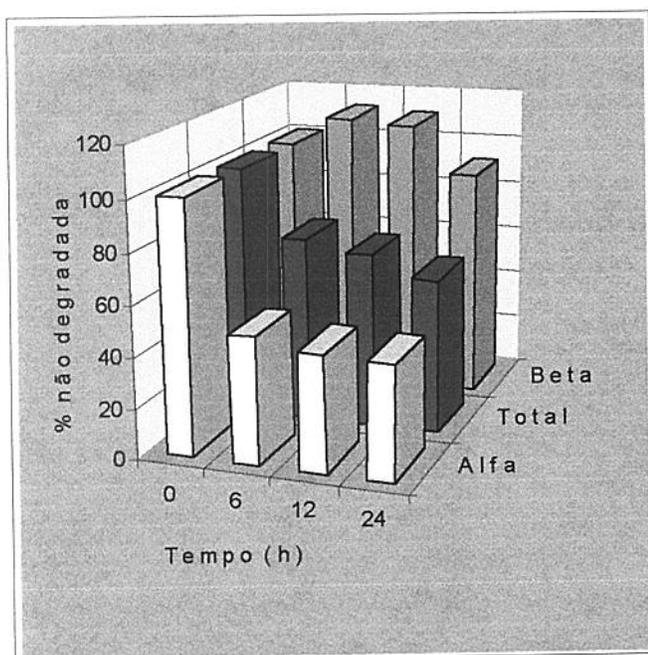


Figura 2. Percentagem residual do endosulfanalfa, beta e total, degradado em placa de Petri (50 x 20 mm), concentração de 120 ng/placa, em temperatura de 20 °C durante 6, 12 e 24 horas de exposição

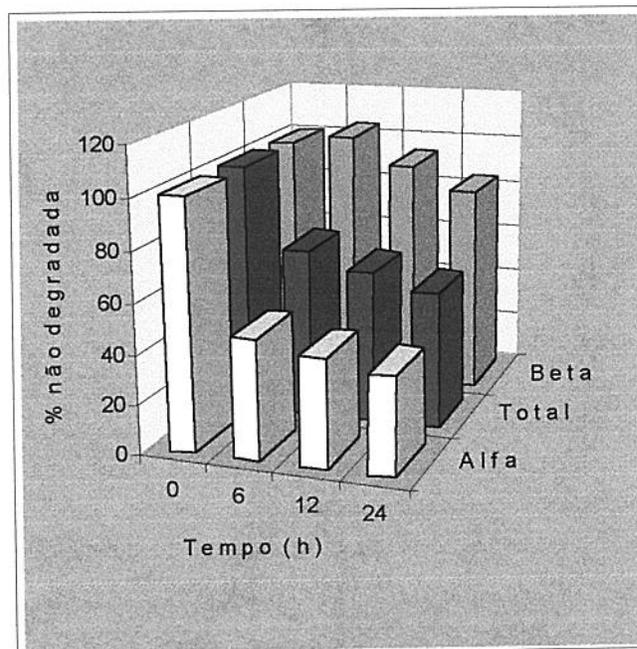


Figura 3. Percentagem residual do endosulfan alfa, beta e total, degradado em placa de Petri (50 x 20 mm), concentração de 120 ng/placa, em temperatura de 25 °C durante 6, 12 e 24 horas de exposição

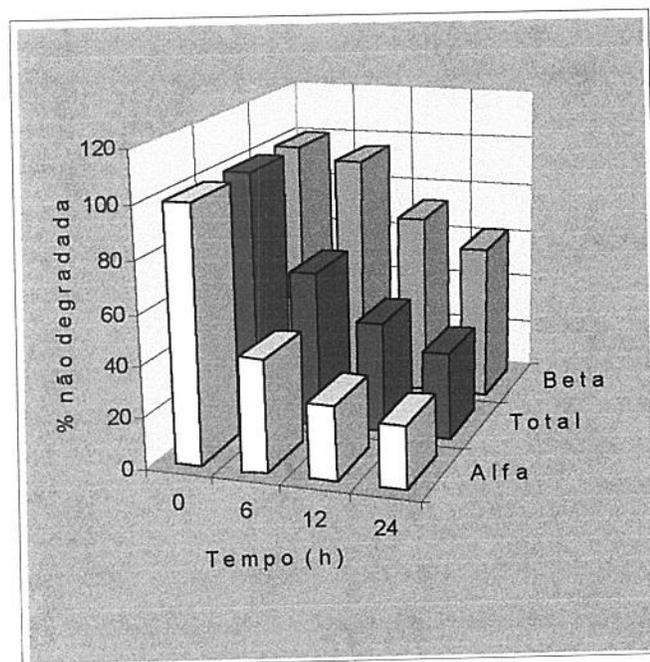


Figura 4. Percentagem residual do endosulfan alfa, beta e total, degradado em placa de Petri (50 x 20 mm), concentração de 120 ng/placa, em temperatura de 30 °C durante 6, 12 e 24 horas de exposição

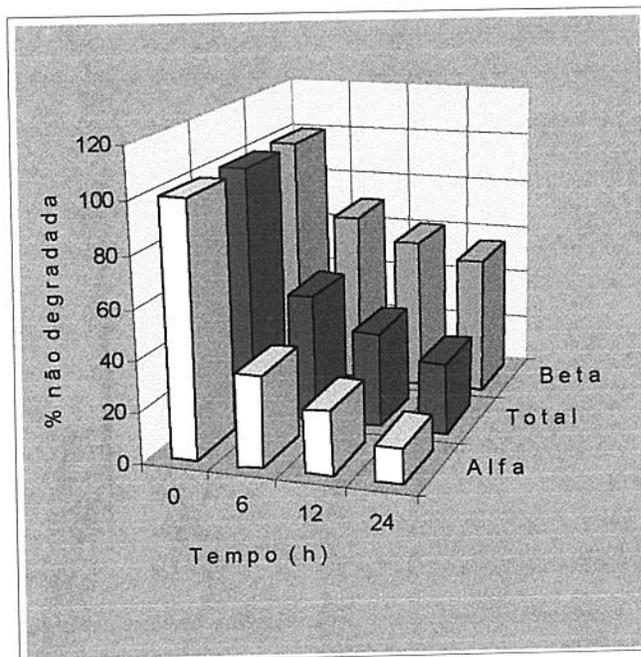


Figura 5. Percentagem residual do endosulfan alfa, beta e total, degradado em placa de Petri (50 x 20 mm), concentração de 120 ng/placa, em temperatura de 35 °C durante 6, 12 e 24 horas de exposição

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endosulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

Maior suscetibilidade ao inseticida foi observada no grupo das fêmeas, sendo que o valor de DL₅₀ diferiu significativamente (P<0,05) entre machos e fêmeas para a mesma temperatura, assim como entre as diferentes temperaturas estudadas para um mesmo sexo. Os valores de DL₅₀ encontrados no presente estudo estão na mesma ordem de magnitude daqueles relatados para *M. domestica*, os quais encontram-se na faixa de 5,5 - 6,2, 8,5 - 9,0 e 9,5 mg/kg pc para o endosulfan alfa, beta e sulfato, respectivamente, na temperatura de 26 °C^{4,23}.

Sabe-se que a temperatura influencia a toxicidade dos inseticidas e que o efeito da mesma depende, entre outros, da espécie do inseto, estágio de desenvolvimento, método de administração, concentração e formulação¹⁴. No presente estudo, tanto para machos como para fêmeas a toxicidade aguda do endosulfan a 35 °C foi, aproximadamente, 3 vezes maior do que a 25 °C (tabela 1), o que pode ser devido a uma maior absorção dérmica do inseticida em função do aumento da temperatura. Comportamento semelhante tem sido relatado por outros pesquisadores, utilizando diferentes inseticidas e sistemas biológicos^{13, 14, 15}. Essa diferença na resposta foi sugerida como dispositivo para aumentar a sensibilidade do bioensaio³⁷.

Por outro lado, tanto para machos como para fêmeas, o endosulfan apresentou uma toxicidade ligeiramente superior a 20 °C (menor valor de DL₅₀), em relação aquela apresentada a 25 °C. Este resultado poderá ser devido a um maior tempo de residência das *Drosophilas* no filme de endosulfan aplicado nas placas Petri, como consequência da menor mobilidade das moscas na temperatura mais baixa. Comportamento semelhante foi observado para *M. domestica* quando exposta ao DDT na faixa de temperatura de 18 a 36 °C³⁷ e nas larvas de grilo (*Acheta pennsylvanicus*, Burmeister) quando expostas ao DDT na faixa de 21 a 33 °C¹⁴.

Os valores de recuperação do inseticida para as amostras de couve contaminadas com 0,025 mg/kg e 0,05 mg/kg foram, respectivamente, 104% e 90 % para o endosulfan- α e 85% e 96 % para o endosulfan- β (média de três determinações; coeficiente de variação entre 4 e 11%). Esses valores de recuperação encontram-se dentro da faixa aceita internacionalmente (80 a 120%), o que indica que as modificações introduzidas no método de Luke *et alii*²⁴, não afetaram a sua confiabilidade.

A quantidade mínima detectável, considerando relação sinal-ruído da linha base igual a 3:1, foi de 20 pg para endosulfan alfa e beta e 100 pg para endosulfan sulfato, a

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endossulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

qual para o volume injetado de 2 μ L, corresponde a 10 e 50 ng/mL, respectivamente.

Para avaliar a presença, na couve, de substâncias naturalmente presentes com ação inseticida, tais como o 2-fenil-etil-isotiocianato que ocorre naturalmente no nabo (*Brassica campestris*, var. *rapa*)²², repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), brócoli (*B. oleracea* var. *italica*) e couve (*B. oleracea* var. *acephala*)²¹ ou o 5-alil-1-metóxi-2,3-metilenodioxibenzeno (miristicin) identificado na cheirivia (*Pastinaca sativa* L.)²⁰, amostras dos extratos, isentos de agrotóxicos, obtidos pelo método de LUKE *et alii*²⁴, foram avaliados pelo método de bioensaio com as moscas *D. melanogaster*. Todas as moscas sobreviveram ao período do teste, cuja duração foi de 24 h, o que indicou ausência de substâncias tóxicas para a *D. melanogaster*.

Embora os métodos cromatográficos sejam procedimentos analíticos de grande sensibilidade, do ponto de vista econômico, a sua utilização torna-se limitada para o monitoramento de resíduos de inseticidas em alimentos, especialmente nos países em desenvolvimento, devido aos custos elevados de equipamentos e reagentes. Por outro lado, nos países em desenvolvimento, os inseticidas e outros praguicidas, freqüentemente são usados de modo excessivo e indiscriminado.

Os bioensaios com *D. melanogaster* para detecção dos resíduos do endossulfan foram feitos em temperatura de 30 °C, durante 24 h de exposição. Os níveis de endossulfan aplicados nas placas de Petri e que correspondem aos valores de DL₅₀ das *Drosophilas* estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Quantidades de endossulfan nas placas de Petri (ng/placa) que correspondem aos valores de DL₅₀ das moscas *D. melanogaster*, machos e fêmeas, em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Machos	Fêmeas
20	139	136
25	161	174
30	120	126
35	59	59

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endosulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

Esses valores foram utilizados para determinar, pelo método de bioensaio, os níveis de resíduo do endosulfan aplicados na couve. Assim, diferentes volumes do extrato obtido após a limpeza em coluna de florisil, foram usados para determinar o volume necessário para provocar a morte de 50 % da população teste, o qual foi comparado com o valor da DL_{50} do inseticida, calculada para a mesma temperatura (tabelas 1 e 2). Utilizando-se esses dados, foi estimado o nível de resíduo de endosulfan na couve.

A sensibilidade dos métodos químicos de análise de resíduos, assim como os limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos pela legislação de agrotóxicos, exigem que os organismos usados nos bioensaios sejam suficientemente sensíveis para detectar níveis residuais menores do que 1,0 mg/kg^{3, 30}. No presente estudo, a sensibilidade do método de bioensaio é uma função do volume de extrato necessário para provocar a morte de 50 % da população teste. Considerando-se um extrato purificado de 2 mL obtido de uma amostra inicial de 20 g de couve, do qual um volume de 100 µL tenha provocado a morte de 50 % da população teste, o limite de determinação encontra-se na ordem de 0,1 mg de endosulfan/kg de amostra, tanto para as moscas machos como para fêmeas (Tabelas 1 e 2).

Esses resultados confirmam a elevada sensibilidade das moscas *D. melanogaster* para detecção de resíduos de endosulfan em couve-manteiga tratada com o inseticida. Ainda, três repetições na análise de uma mesma amostra de couve mostraram para o método de bioensaio um coeficiente de variação de 10 %. Coeficientes de variação de até 20 % são considerados aceitáveis na determinação de contaminantes traço¹⁶.

No intuito de validar o método de bioensaio, os mesmos extratos utilizados nos bioensaios foram analisados, quanto ao teor de endosulfan, por cromatografia gasosa. Na tabela 3 estão apresentados os níveis de resíduo de endosulfan alfa, beta e sulfato determinados em couve após diversos períodos (3, 10 e 17 dias) da aplicação do inseticida e na figura 6 comparam-se o endosulfan total determinado pelo método cromatográfico com os valores obtidos pelo método de bioensaio. Verificou-se que não existe diferença significativa entre os métodos, a um nível de confiança de 0,05. Os resultados obtidos mostram que as moscas *D. melanogaster* são insetos sensíveis para detecção dos resíduos do endosulfan na couve-manteiga (*Brassica oleracea*, var. *acephala*) e comprovam a possibilidade de utilização desses insetos para o monitoramento de resíduos do endosulfan nessa matriz.

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endosulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

Tabela 3: Resíduos de endosulfan alfa, beta e sulfato determinados em couve, por cromatografia gasosa, após diferentes períodos de aplicação de Thiodan® 350 CE (440 g/ha)

Período após aplicação (dias)	Endosulfan (mg/kg)		
	Alfa	Beta	Sulfato
3	0,474	0,513	0,276
10	0,034	0,030	0,390
17	0,011	0,011	0,196

Cabe ressaltar, conforme pode ser verificado pela figura 6, que mesmo após 17 dias da aplicação, resíduos de endosulfan foram detectados na couve em níveis de 0,2 mg/kg, o que sugere lenta degradação do inseticida e corrobora à necessidade de seu monitoramento em couve, visto seu uso indevido nesse vegetal³⁹

CONCLUSÕES

A degradação do endosulfan aplicado em placa Petri, assim como a toxicidade aguda do inseticida para as moscas *D. melanogaster*, aumenta com o aumento da temperatura. Os bioensaios com *D. melanogaster*, mostraram a elevada sensibilidade desses insetos para detecção de resíduos de endosulfan em couve, ficando evidente a possibilidade de utilização desses organismos para os bioensaios destinados ao monitoramento

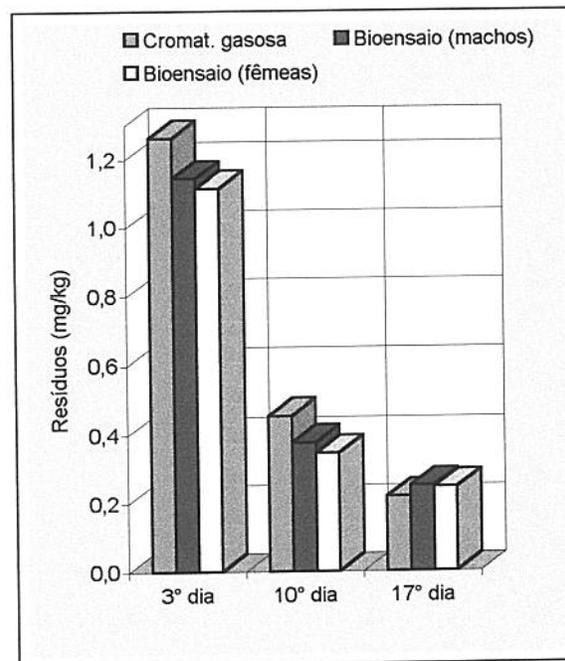


Figura 6 - Resíduos de endosulfan aplicado em couve, analisado por bioensaio com *D. melanogaster* e por cromatografia gasosa, para o 3º, 10º e 17º dia após a aplicação do inseticida.

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endossulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

dos resíduos do endossulfan nesta ou em outras matrizes. Em comparação ao método de determinação por cromatografia gasosa, o método de bioensaio apresenta baixo custo e simplicidade de execução sem comprometer o padrão de acuidade necessário para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Flavio Puga, Instituto Biológico de São Paulo, pela doação das cepas de *D. melanogaster* e ao Serviço de Análise e Diagnósticos / Laboratório de Agrotóxicos da CATI, pela doação do produto técnico. G. R. de Almeida agradece a CAPES pela bolsa de estudos e ao Instituto Adventista de Ensino, Campus São Paulo, pelo apoio recebido.

ALMEIDA, G. R.; REYES, F. G. R. - Bioassay with *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Studies on degradation and toxicity of endosulfan and biomonitoring of its residues in kale. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

ABSTRACT: Endosulfan is an insecticide and a phytosanitary acaricide which has a relatively wide range of activity. It is formed by alpha and beta isomers in the proportion of 70% and 30%, respectively. The sensitivity of flies *Drosophila melanogaster* to endosulfan and the use of this organism in biomonitoring of residue of the insecticide was evaluated in kale. In the conditions of bioassays, dry film method on Petri plate, endosulfan degraded depending on the temperature, and alpha isomers degrades faster than beta isomers. Bioassays conducted with *D. melanogaster* flies showed that the toxicity of the insecticide increases with the increasing temperatures (25 to 35 °C) and the females presented a higher susceptibility to the insecticide. Values of LD₅₀ calculated according to temperature, varied between 4.2 and 11.7 mg/kg body weight (bw) for the males and between 2.8 and 8.1 mg/kg bw for the females. Thiodan® 350 CE was applied on kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the residues of endosulfan were determined by bioassay and evaluated by gas chromatography. The determination limit of the bioassay is on the order of 0.1 mg/kg and the method presented a good reproducibility with a variation coefficient of 10%. The results confirm the viability of the bioassay with *D. melanogaster* in monitoring the residues of endosulfan in kale.

DESCRIPTORS: Bioassay with *Drosophila melanogaster*, degradation of the endosulfan, toxicity and residues in kale

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endossulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, W. F. *Métodos prácticos para detección de residuos de plaguicidas*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, México: 1987. 54p.
2. ARCHER, T. E. Endosulfan residues on alfafa hay exposed to drying by sunlight, ultraviolet light and air. *Pestic. Sci.* **4**: 59 - 68, 1973.
3. BAGDONAS, M.; MELLO, M. H. S. H.; UNGARO, M. T. S.; GUINDANI, C. M. A.; FERREIRA, M. S. & GAETA, R. Ensaio biológicos como testes preliminares na detecção de resíduos de inseticidas em frutas e hortaliças. *Rev. Soc. Bras. Toxicol.* **1**: 3 - 5, Jan. 1988 e Jul. 1988.
4. BARNES W. W. & WARE G. W. The absorption and metabolism of C¹⁴-labeled endosulfan in house fly. *J. Econ. Entomol.* **58**: 286 - 291, 1965.
5. BARRETO, H. H. C.; INOMATA, O. N. K.; LEMES, V. R. R. KUSSUMI, T. A.; SCORSAFAVA, M. A. & ROCHA, S. O. Monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos comercializados no estado de São Paulo em 1994. *Pesticidas R. Téc. Cient.*, **6**: 1 - 12, 1996.
6. BARTLETT, B. R. A new method for rearing *Drosophila* and a technique for testing inseticides with this insect. *J. Econ. Entomol.* **44**: 621, 1951.
7. BEARD, J. E. & WARE, G. W. Fate and endosulfan ou plants and glass. *J. Agric. Food Chem.* **17**: 216 - 220, 1969.
8. CHIANG, T.; DEAN, M. C. & McDANIEL, C. S. A fruit fly bioassay with phosphotriesterase for detection of certain organophosphorous insecticide residues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **34**: 809 - 814, 1985.
9. CHOPRA, N. M. & MAHFOUZ, A. M. Metabolism of endosulfan I, endosulfan II, and endosulfan sulfate in tobacco leaf. *J. Agric. Food Chem.* **25**: 32 - 36, 1977.
10. GOEBEL, H. Chemical and physical properties of endosulfan and its degradation products. *Residue Reviews*, **83**: 6 - 12, 1982.
11. GOPAL, M. & MUKHERJEE, I. Determination of residues of endosulfan and endosulfan sulfate on eggplant, mustard and chickpea. *Pestic. Sci.* **37**: 67 - 72, 1993.
12. GREVE, P. A. & WIT, S. L. Endosulfan in the Rhine river. *J. Water Pollution Control Fed.* **43**: 2338 - 2348, 1971.

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endosulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

13. GUTHRIE, F. E. Effect of temperature on the toxicity of certain organic insecticides. *J. Econ. Entomol.* **43**: 559 - 560, 1950.
14. HARRIS, C. R. - Influence of temperature on the biological activity of insecticides in soil. *J. Econ. Entomol.* **64**: 1044 - 1049, 1971.
15. HARRIS, C. R. & KINOSHITA, G. B. Influence of posttreatment temperature on the toxicity of pyrethroid insecticides. *J. Econ. Entomol.* **70**: 215 - 218, 1977.
16. HORWITZ, W.; KAMPS, L. R. & BOYER, K. W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**: 1344 - 1354, 1980
17. JOSEPH Jr, H. & KNOBEL, M. G. Estudo preliminar da sensibilidade de moscas *Drosophila melanogaster* a diversos pesticidas organoclorados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **40**: 43 - 47, 1980.
18. LAUG, E. P. A biological assay method for determining 2,2 bis (p- chlorophenyl)-1,1,1, trichloroethane (DDT). *J. Pharm. Exptl. Terap.* **86**: 324 - 331, 1946.
19. LEMES, V. R. R.; INOMATA, O. N. K. & BARRETTO, H. H. C. Resíduos de endosulfan em tubérculos e frutos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* **53**: 49 - 54, 1993.
20. LICHTENSTEIN, E. P. & CASIDA, J. E. Myristicin, an inseticide and synergist occurring naturally in the edible parts of parsnips. *J. Agric. Food Chem.* **11**: 410 - 415, 1963.
21. LICHTENSTEIN, E. P., MORGAN, D. G. & MUELLER, C. H. Naturally occurring insecticides in cruciferous crops. *J. Agric. Food Chem.* **12**: 158 - 161, 1964.
22. LICHTENSTEIN, E. P.; STRONG, F. M. & MORGAN, D. G. Identification of 2-Phenylethylisothiocyanate as an insecticide occurring naturally in the edible part of turnips. *J. Agric. Food Chem.* **10**: 30 - 33, 1962.
23. LINDQUIST, D. A. & DAHM, P. A. - Some chemical and biological experimental with thiodan. *J. Econ. Entomol.* **50**: 483 - 486, 1957.
24. LUKE, M. A.; FROBERG, J. E. & MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **58**: 1020 - 1026, 1975.

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endossulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

25. MARTENS, R. Degradation of [8,9-¹⁴C]endossulfan by soil microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 853 - 858, 1976.
26. MILES, J. R. W. & MOY, P. Degradation of endossulfan and its metabolites by a mixed culture of soil microorganisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **23**: 13 - 19, 1979.
27. MUKHERJEE, I. GOPAL, M. & YADURAJU, N. T. HCH, endossulfan, and fluralinate residue behavior in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **48**: 163 - 170, 1992.
28. MUKHERJEE, I. M. & GOPAL, M. Interconversion of stereoisomers of endossulfan on chickpea crop under field conditions. *Pestic. Sci.* **40**: 103 - 106, 1994.
29. OLIVEIRA, J. J. V. & TOLEDO, M. C. F. Resíduos de agrotóxicos em morangos. *Pesticidas R. Téc. Cient.* **5**: 95 - 110, 1995.
30. PUGA, F. R.; RUBANO, S. - Determinação de resíduos de inseticidas através de bioensaio com *Drosophila melanogaster*. In: ALMEIDA, W. F. (ed.) Métodos prácticos para detección de residuos de plaguicidas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, Mexico: 1987, p. 37 - 43.
31. RAO, D. M. R. & MURTY, A. S. Persistence of endossulfan in soils. *J. Agric. Food Chem.* **28**: 1099 - 1101, 1980.
32. SINGH, N. C.; DASGUPTA, T. P. ROBERTS, E. V. & MANSINGH, A. Dynamics of pesticides in tropical conditions. 1. Kinetic studies of volatilization, hydrolysis, and photolysis of dieldrin and α - and β -endossulfan. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 575 - 579, 1991.
33. SOARES, I. A. A.; GOULART, M. C. B.; QUEIROZ, R. L.; MELLO, S. M. M.; AZEVEDO, S. F. & ÁVILA, J. T. Levantamento de resíduos de inseticidas organoclorados e de malation e paration em frutas e hortaliças na CEASA/MG - 1983 - 1986. In: *XI encontro nacional de analistas de resíduos de pesticidas*. São Paulo, Junho, 03 a 05, 1987: Relatório. São Paulo: Inst. Adolfo Lutz, São Paulo. 1987. p. 75 - 84.
34. SPARKS, T. C.; SHOUR, M. H & WELLEMAYER, E. G. Temperature-toxicity relationships of pyrethroids on three lepidopterans. *J. Econ. Entomol.* **75**: 643 - 646, 1982.

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endossulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

35. STEWART, D. K. R. & CAIRNS, K. G. Endossulfan persistence in soil and uptake by potato tubers. *J. Agric. Food Chem.* **22**: 984 - 986, 1974.
36. STORER, I. T.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. *Zoologia Geral*. Trad. de Ericka Schlenz e Francisco A. A. Sampaio. 6. Ed. São Paulo: Editora Nacional, 1991. 816p.
37. SUN, Y. P.; JOHNSON, E. R. PANKASKIE, J. E. EARLE, N. W. & SUN, J. T. - Factors affecting residues-film bioassay of insecticide residues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **46**: 530 - 542, 1963.
38. SUN, Y. P. & PANKASKIE, J. E. *Drosophila*, a sensitive insect, for the microbioassay of insecticide residues. *J. Econ. Entomol.* **47**: 180 - 181, 1954.
38. UNGARO, M. T. S.; GUINDANI, C. M. A.; FERREIRA, M. S. & BAGDONAS, M. Resíduos de inseticidas clorados e fosforados em frutas e hortaliças (III). *Biológico, São Paulo* **53(7/12)**: 51 - 56, 1987.
40. World Health Organization (WHO/IPCS): Endossulfan. *Environmental Health Criteria 40*. Geneva, 1984. 62p.
41. ZIMMERING, S. - Utility of *Drosophila* for detection of potential environmental chemical mutagens. *Ann. New York Acad. Sci.* **269**: 26 - 33, 1975.

CAPÍTULO 3

**BIOENSAIO COM *Drosophila melanogaster* (Meig.):
2. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E TOXICIDADE DO
PARATION METÁLICO E BIOMONITORAMENTO DE
SEUS RESÍDUOS EM COUVE MANTEIGA**

**TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA
"PESTICIDAS REVISTA TÉCNICO CIENTÍFICA"**

BIOENSAIO COM *Drosophila melanogaster* (Meig.): 2. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E TOXICIDADE DO PARATION METÍLICO E BIOMONITORAMENTO DE SEUS RESÍDUOS EM COUVE-MANTEIGA

Paration metílico é um inseticida e acaricida fitossanitário, de curta persistência no ambiente, não sofre bioacumulação nem é transferido pela cadeia alimentar. Nas condições do bioensaio, método do filme seco em placa de Petri, o paration metílico se degrada em função da temperatura e do tempo de exposição. Os bioensaios com *D. melanogaster*, indicaram que a toxicidade do inseticida aumenta ($p < 0,05$) com o aumento da temperatura de exposição, com susceptibilidade semelhante para ambos os sexos. Os valores de DL_{50} , em função da temperatura, variaram de 3,0 a 10,5 mg/kg p.c. para os machos e 3,0 a 9,5 mg/kg p.c. para as fêmeas. O produto comercial Folidol[®] 600 CE foi aplicado em plantação de couve (*Brassica oleracea*, var. *acephala*), na proporção de 0,36 kg do i. a./ha, e os resíduos do paration metílico foram determinados pelo método do bioensaio e por cromatografia gasosa. O limite de determinação do bioensaio é da ordem de 0,1 mg/kg de amostra, tendo o método apresentado boa reprodutibilidade (coeficiente de variação inferior a 20 %). Os resultados obtidos confirmam a viabilidade do bioensaio com *D. melanogaster* para o monitoramento de resíduos do paration metílico em couve.

1 INTRODUÇÃO

Paration metílico (*O,O*-dimetil-*O-p*-nitrofenil-fosforotioato) é um inseticida e acaricida fitossanitário organofosforado, sintetizada por SCHARADER em 1944 (1, 2). Puro, apresenta-se como cristais brancos e, em grau técnico, como líquido castanho claro com odor de alho. A meia vida é de 175 dias a 20 °C (meio aquoso e pH de 1,0 a 5,0) e de 11 horas a 70 °C. Pouco solúvel em meio aquoso (55 mg/L a 20 °C), éter de petróleo e óleos minerais e facilmente solúvel na maioria dos solventes orgânicos (2, 3)

A taxa da degradação do paration metílico é dependente da temperatura, da natureza do solo (4) e do pH do meio, aumentando com o aumento da alcalinidade (5, 6). Degrada-se nos vegetais e no solo por ação bacteriana dando origem ao *p*-nitrofenol, amino-paration metílico e ao 4-nitrofenol (7, 8, 9, 10), por fotólise forma o *O,O,S*-trimetil fosforotioato e trimetil fosfato (11), e a sua biotransformação, em camundongos, dá origem aos ácidos fosfórico, metil e dimetil fosfórico, desmetil fosfato e desmetil fosforotioato (12).

Efeitos fitotóxicos tem sido reportados, para o paration metílico, tais como redução do tamanho e densidade da cabeça de alface (9, 13), interferência nos processos de fotossíntese no trigo com redução do comprimento do gomo da cana e da raiz da planta, bem como da quantidade de clorofila e de carotenóides (14) e, dependendo do número de aplicações, afeta a fotossíntese, o crescimento e a frutificação do algodoeiro (15).

O paration metílico tem ampla ação inseticida e acaricida e pulverização foliar é o método recomendado para sua aplicação em frutas e hortaliças (16). No Brasil, a tolerância do paration metílico em bulbos, cereais, frutos, leguminosas, hortaliças folhosas e não folhosas e na batata é de 0,5 ppm (17). Todavia, a presença dos seus resíduos tem sido reportada em culturas onde não tem seu uso permitido como na mandioquinha (18) e na cenoura (19, 20), o que justifica o desenvolvimento de metodologia simples para monitoramento dos resíduos desse inseticida em vegetais.

Os bioensaios com a mosca *D. melanogaster* (Meig.) têm sido usados como indicadores da presença de substâncias químicas ambientais com potencial mutagênico (21), de resíduos de agrotóxicos em alimentos (22, 23) ou para auxiliar e esclarecer a natureza da substância tóxica em casos de envenenamento envolvendo inibidores da colinesterase, como os organofosforados e os carbamatos (24). Cabe destacar que as *Drosophilas*, além da sua sensibilidade para detectar pequenas quantidades de

substâncias de natureza tóxica, são insetos de fácil manipulação, criação e manutenção nas condições de laboratório, o que facilita amplamente a realização do bioensaio (25, 26).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a sensibilidade das *D. melanogaster* ao paration metílico assim como a viabilidade do biomonitoramento dos resíduos de paration metílico em hortigranjeiros. Para tanto, inicialmente foi avaliada a estabilidade do paration metílico nas condições do bioensaio, assim como a sensibilidade da *Drosophila*, ao inseticida, em função da temperatura e do tempo de exposição. Posteriormente, o paration metílico foi aplicado em plantação de couve-manteiga (*Brassica oleracea*, var. *acephala*) e os seus resíduos determinados pelos métodos de bioensaio e por cromatografia gasosa (CG).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 APARELHOS

Cromatógrafo a gás Varian, modelo 3700, detector TSD, pérola 6,4 e coluna 10 % SE-30 em Chromosorb 100 - 120 mesh.

Evaporador rotatório Tecnal, modelo 120.

Homogeneizador de tecidos Tecnal, modelo 102.

Pulverizador costal, marca Jato com capacidade para 20 L.

2.2 SOLVENTES E REAGENTES

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau para resíduos da Merck, os quais foram previamente destilados, e o sulfato de sódio anidro aquecido a 400 °C, durante 8 horas.

Como padrão analítico foi utilizado paration metílico, com grau de pureza de 95,86 %, o qual foi cedido pelo Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada / Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Para avaliação da estabilidade do paration metílico nas condições do bioensaio, e nos ensaios de campo, foi utilizado o produto comercial Folidol[®] 600 CE, cedido pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI).

2. 3 BIOENSAIO COM A *Drosophila melanogaster*

2. 3. 1 Moscas *D. melanogaster*

As moscas *D. melanogaster*, usadas para a realização dos bioensaios, foram criadas no laboratório de Toxicologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP), em ambiente com temperatura de 25 ± 2 °C, a partir de cepas cedidas pelo Laboratório de Toxicologia Animal do Instituto Biológico de São Paulo.

2. 3. 2 Meio de cultura para criação das moscas

O meio de cultura para criação das moscas foi preparado conforme JOSEPH & KNOBEL (27), segundo as modificações sugeridas por ALMEIDA & REYES (28). Após o preparo, cerca de 50 mL do meio foram colocados em frasco de vidro transparente, de boca larga e capacidade aproximada de 500 mL, os quais foram conservados em geladeira até o momento do uso.

2. 3. 3 Criação das moscas

Moscas machos (15) e fêmeas (15) foram transferidas para os frascos contendo o meio de cultura, preparado conforme descrito anteriormente, e mantidos a temperatura de 25 ± 2 °C. Ao oitavo dia, as moscas foram removidas dos frascos, remanescendo as larvas. Após 48 h do início da emergência, as moscas foram transferidas para um novo frasco de cultura, procedimento este que foi repetido a cada 48 horas, para obtenção de novos lotes de moscas. O bioensaio foi realizado utilizando moscas com idade de 3 a 5 dias.

2. 3. 4 Bioensaio

O bioensaio com as *D. melanogaster* foi realizado pelo método do filme seco (29), em placa de Petri (50 x 20 mm). Para a formação do filme foram colocados, na base de cada placa, cinco níveis diferentes do inseticida / placa, na faixa de 37 a 297 ng/placa. O procedimento do bioensaio foi feito conforme descrito por ALMEIDA & REYES (28).

2. 3. 5 Cálculo da DL₅₀

Para efeito de cálculo da DL₅₀, levou-se em consideração as moscas mortas, assim como as moribundas observadas no momento da contagem (25). Os cálculos dos valores de DL₅₀ foram feitos por análise de probito, usando o programa "Análise de probito com determinação da dose letal mediana - Programa probito" (HOFFMANN - ESALQ / USP - Maio de 1990).

2. 4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PARATION METÍLICO NAS CONDIÇÕES DO BIOENSAIO

A estabilidade do paration metílico, nas condições do bioensaio, foi avaliada segundo o procedimento descrito por ALMEIDA & REYES (28). Para tanto, foram aplicados, na base de placas de Petri (50 x 20 mm), 100 µl de solução contendo 1 µg do inseticida. O paration metílico residual foi determinado por cromatografia gasosa, conforme os seguintes parâmetros analíticos: temperatura da coluna 200 °C, do injetor 220 °C e do detector 290 °C; ar 120 mL/min., hidrogênio 5 mL/min. e nitrogênio 40 mL/min.

2. 5 ENSAIO DE CAMPO

Couve-manteiga (*Brassica oleracea*, var. *acephala*) foi cultivada, segundo as boas práticas agrícolas, na horta do Instituto Adventista São Paulo, em Hortolândia, São Paulo.

As mudas foram plantadas em sistema de linha com espaçamento de 1,0 x 0,5 m em área de aproximadamente 100 m², no mês de outubro de 1996 e pulverizadas com Folidol[®] 600 CE, no mês de janeiro de 1997. Para tanto, o inseticida foi diluído em água (100 mL : 100 L) e aplicado, com pulverizador costal, na proporção aproximada de 0,36 kg do ingrediente ativo/ha. Amostras testemunhas foram colhidas da mesma plantação, antes da aplicação do inseticida.

Amostras de couve foram colhidas e analisadas para 0, 3 e 7 dias após terem sido pulverizadas. O procedimento de colheita foi aleatório, tendo-se o cuidado de não colher mais que uma folha de cada planta, em diferentes pontos da área cultivada, no período compreendido entre 9:00 e 10:00 h, sempre depois da perda da umidade superficial das

folhas, e transportadas imediatamente após a colheita, para o laboratório e estocadas a -18 °C até o momento da análise.

2.6 VALIDAÇÃO DO BIOENSAIO

Para avaliação do método de bioensaio, os extratos de couve tratada com Folidol® 600 CE foram analisados conforme apresentado na figura 1. Extratos de couve cultivada sem tratamento com o agrotóxico também foram avaliados pelo bioensaio. Para realização do bioensaio foram preparadas placas com diferentes alíquotas do extrato, de maneira que pudesse ser estimado o volume necessário para matar 50 % da população teste. As placas foram mantidas a 30 °C, durante 24 h.

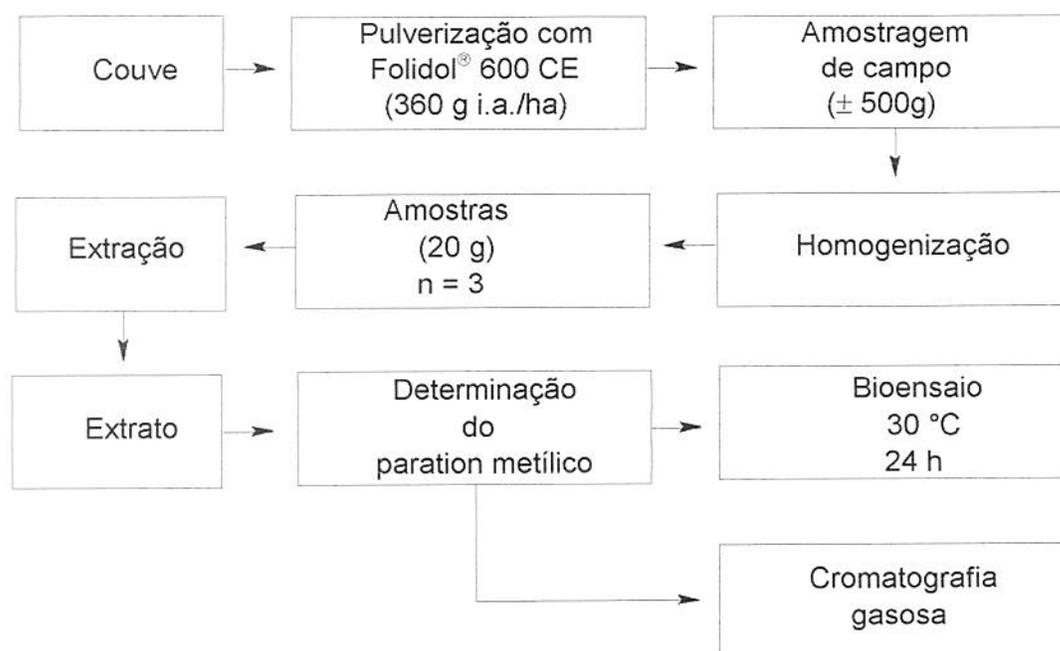


FIGURA 1 - ESQUEMA DE PULVERIZAÇÃO, EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS RESÍDUOS DO PARATION METÍLICO APLICADO EM COUVE

2.7 DETERMINAÇÃO, POR CROMATOGRAFIA GASOSA, DOS RESÍDUOS DE PARATION METÍLICO EM COUVE

Os resíduos de paration metílico na couve foram extraídos conforme a metodologia proposta por LUKE *et alii* (30), com as seguintes modificações: de uma amostra (500 g) homogeneizada de couve foram retirados 20 g, triturados em

homogeneizador de tecido, adicionados de 100 mL de acetona, filtrados em funil de Büchner, com papel de filtro Whatman nº 1, sendo o resíduo lavado com 50 mL de acetona. Os filtrados foram transferido para um funil de separação de 500 mL, adicionados de 150 mL de água e 100 mL de n-hexano, sendo o funil agitado por cerca de 2 minutos e posteriormente mantido em repouso até a separação das fases. A fase aquosa foi drenada para outro funil de separação e reextraída com igual volume de n-hexano. As fases hexânicas obtidas na primeira e segunda extração, foram reunidas, filtradas em Na_2SO_4 anidro e concentradas em rotavapor a 40 °C até cerca de 1 mL. O extrato foi transferido para um tubo concentrador, secado com nitrogênio, ressuspensionado em 10 mL de acetona, sendo injetados 4 μL no cromatógrafo gasoso, conforme os parâmetros cromatográficos descritos anteriormente.

2. 8 RECUPERAÇÃO E SENSIBILIDADE

Para avaliação da metodologia modificada de LUKE *et alii* (30), determinou-se a percentagem de recuperação. Para tanto, em amostras de couve (20 g), livre de agrotóxicos, foram adicionados 2 mL de solução do paration metílico em concentrações de 1,02 e 10,2 $\mu\text{g/mL}$, caracterizando fortificações de 0,102 e 1,02 mg/kg de amostra, respectivamente. A seguir, executou-se as mesmas etapas de extração, limpeza e concentração empregadas para as amostras. A faixa de linearidade (curva padrão) de resposta do detector do cromatógrafo foi determinada usando diluições de 0,102 e 1,02 $\mu\text{g/mL}$. De cada uma dessas soluções foram injetados 4 μL no cromatógrafo gasoso, com os mesmos parâmetros analíticos descrito anteriormente.

2. 9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no bioensaio foram avaliados por análise de variância (ANOVA). O teste de TUKEY foi utilizado para verificar se havia diferença entre os resultados obtidos para as moscas machos e fêmeas, como também entre as temperaturas utilizadas no bioensaio. Os cálculos foram feitos utilizando-se o software estatístico S.A.S., disponível no LABEST (Laboratório de Estatística / UNICAMP).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso indevido ou abusivo dos agrotóxicos para produção de alimentos constitui grande risco para a saúde humana. Por outro lado, é difícil monitorar os resíduos dos inseticidas nos alimentos, tendo em vista que as metodologias empregadas para análise de resíduos e os equipamentos utilizados serem de custos elevados. Isso inviabiliza os países em desenvolvimento monitorarem os resíduos dos agrotóxicos nos alimentos, aumentando assim o perigo a saúde dos consumidores.

Como o objetivo básico do monitoramento de resíduos de inseticidas em alimentos é detectar uma quantidade do agrotóxico que esteja acima do limite máximo permitido e possa, portanto, apresentar um efeito agudo para a saúde humana, é de grande importância avaliar e difundir metodologias simples e de baixo custo que permitam detectar esses níveis de resíduos (31). Fundamentado nessa idéia, foi avaliado o bioensaio com *D. melanogaster*, em diversas condições de temperatura, visando a utilização desse organismo para detecção de resíduos de paration metílico em alimentos.

Inicialmente, estudou-se a degradação do paration metílico em placas de Petri (50 x 20 mm), para avaliar a quantidade do inseticida que estaria disponível nas placas, durante a realização do bioensaio pelo método do filme seco (29). A percentagem residual de paration metílico, remanescente nas placa de Petri, após 6, 12 e 24 h nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C, está apresentada na figura 2. Os resultados indicam que o paration metílico degradou-se de forma diretamente proporcional tanto ao tempo de exposição como a variação da temperatura.

Os valores de DL₅₀ para as moscas *D. melanogaster*, machos e fêmeas, calculados em função da variação da temperatura, são apresentados na tabela 1. A toxicidade do paration metílico foi semelhante entre os sexos para a mesma temperatura. Entretanto, a toxicidade aumentou ($p < 0,05$) com o aumento da temperatura para ambos os sexos, exceto entre os machos para as temperaturas de 25 e 30 °C, onde o aumento da toxicidade não foi significativo ao nível de 0,05.

Sabe-se que a temperatura influencia a toxicidade dos inseticidas e que o efeito da mesma depende, entre outros, da espécie do inseto, estágio de desenvolvimento, método de administração, concentração e formulação (33). No presente estudo, tanto

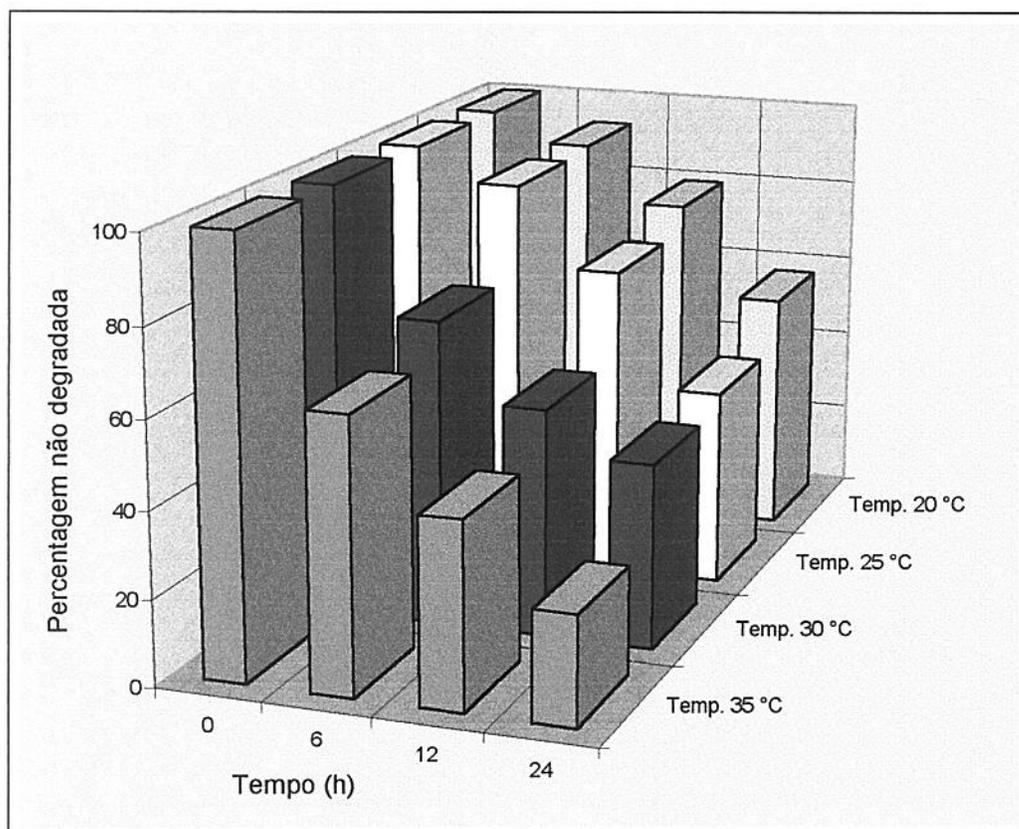


FIGURA 2: PERCENTAGEM NÃO DEGRADADA DE PARATION METÍLICO EM PLACAS DE PETRI APÓS 6, 12 E 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO NAS TEMPERATURAS DE 20, 25, 30 E 35 °C. QUANTIDADE DE INSETICIDA APLICADO: 1 µg /placa.

para machos como para fêmeas a toxicidade aguda do paration metílico a 35 °C foi, aproximadamente, 3 vezes maior do que a 20 °C (tabela 1), o que pode ser devido a uma maior absorção dérmica do inseticida em função do aumento da temperatura. Comportamento semelhante tem sido relatado por outros pesquisadores, utilizando diferentes inseticidas e sistemas biológicos (33, 34, 35). Essa diferença na resposta foi sugerida como dispositivo para aumentar a sensibilidade do bioensaio (36).

Os valores de recuperação do paration metílico em amostras de couve contaminadas com 0,102 mg/kg e 1,02 mg/kg foram, respectivamente, 70 % e 84 %, valores estes que encontram-se muito próximo ou dentro da faixa aceita internacionalmente (80 a 120%), o que indica que as modificações introduzidas no método de LUKE

TABELA 1: VALORES MÉDIOS DA DOSE LETAL MEDIANA (DL₅₀, EXPRESSA EM mg/kg pc) DO PARATION METÍLICO PARA *D. melanogaster*, MACHOS E FÊMEAS, EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

Temp. ⁽¹⁾ (°C)	MACHOS		FÊMEAS	
	DL ₅₀ ± s ⁽²⁾	Taxa de DL ₅₀ ⁽³⁾	DL ₅₀ ± s ⁽²⁾	Taxa de DL ₅₀ ⁽³⁾
20	10,5 ± 1,2 (A, a) ⁽³⁾	1,00	9,5 ± 0,6 (A, a)	1,00
25	6,5 ± 0,9 (A, b, c)	1,62	6,3 ± 0,8 (A, b)	1,51
30	5,8 ± 0,7 (A, c)	1,81	5,2 ± 0,4 (A, c)	1,83
35	3,0 ± 0,1 (A, d)	3,50	3,0 ± 0,3 (A, d)	3,17

⁽¹⁾ Nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C o tempo de exposição foi de 24 h, a 35 °C foi de 12 h.

⁽²⁾ s = desvio padrão absoluto (n = 5)

⁽³⁾ Relação temperatura-toxicidade em relação à 20 °C (32).

⁽⁴⁾ Comparação entre médias. A letra "A" indica comparação de médias entre machos e fêmeas para uma mesma temperatura e as letras "a, b, c, d" indicam comparação de médias entre temperaturas para o mesmo sexo. Médias com mesma letra não são diferentemente significativas (P<0,05).

et alii (30), não afetaram a sua confiabilidade

A literatura reporta que na família das Brassicaceae Cruciferae são encontrados, em maior quantidade na raiz, substâncias naturalmente presentes com ação inseticida. Dentre elas, o 2-fenil-etil-isotiocianato é encontrado na couve (*B. oleracea* var. *acephala*) (37). Para avaliar a presença dessas substâncias na couve, extratos de amostras não tratadas com paration metílico foram avaliados pelo método do bioensaio. Todas as moscas sobreviveram ao período do teste, cuja duração foi de 24 h a 30 °C, o que indicou ausência de substâncias tóxicas para a *D. melanogaster* nos extratos utilizados.

Os bioensaios para detecção dos resíduos do paration metílico nos extratos de couve foram feitos em temperatura de 30 °C, durante 24 h de exposição. Os níveis de paration metílico aplicados nas placas de Petri e que correspondem aos valores de DL₅₀ das *Drosophilas* estão apresentados na tabela 2. Esses valores foram utilizados para determinar, pelo método de bioensaio, os níveis de resíduo do inseticida aplicado na couve. Assim, diferentes volumes do extrato obtido pela metodologia modificada de LUKE *et alii* (30), foram usados para determinar o volume necessário para provocar a

TABELA 2: QUANTIDADES DO PARATION METÍLICO NAS PLACAS DE PETRI (ng/placa) QUE CORRESPONDEM AOS VALORES DE DL₅₀ DAS MOSCAS *D. melanogaster*, MACHOS E FÊMEAS, EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA.

Temperatura (°C)	Machos	Fêmeas
20	145	204
25	89	135
30	80	112
35	41	64

morte de 50 % da população teste, o qual foi comparado com o valor da DL₅₀ do inseticida, calculada para a mesma temperatura (tabelas 1 e 2). Utilizando-se esses dados, foi estimado o nível de resíduo do paration metílico na couve.

A sensibilidade dos métodos químicos de análise de resíduos, assim como os limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos pela legislação de agrotóxicos, exigem que os organismos usados nos bioensaios sejam suficientemente sensíveis para detectar níveis residuais menores do que 1,0 mg/kg (22, 23). No presente estudo, a sensibilidade do método de bioensaio é uma função do volume de extrato necessário para provocar a morte de 50 % da população teste.

Considerando-se um extrato purificado igual a 2 mL obtido de uma amostra inicial de 20 g de couve, do qual um volume de 100 µL tenha provocado a morte de 50 % da população teste, o limite de determinação encontra-se na ordem de 0,1 mg do paration metílico / kg de amostra (Tabelas 1 e 2). Esses resultados confirmam a elevada sensibilidade das moscas *D. melanogaster* para detecção de resíduos do paration metílico na couve tratada com o mesmo inseticida.

Para validação do método, os mesmos extratos utilizados nos bioensaios foram analisados, quanto ao teor do paration metílico, por cromatografia gasosa. Na figura 3 estão apresentados os níveis de resíduo de paration metílico determinados na couve após 0, 3, e 7 dias da aplicação do inseticida. Verificou-se que não existe diferença significativa entre os métodos, a um nível de confiança de 0,05. Os resultados obtidos

mostram que as moscas *D. melanogaster* são insetos sensíveis para detecção dos resíduos do paration metílico na couve e comprovam a possibilidade de utilização desses insetos para o monitoramento de resíduos do paration metílico nessa matriz.

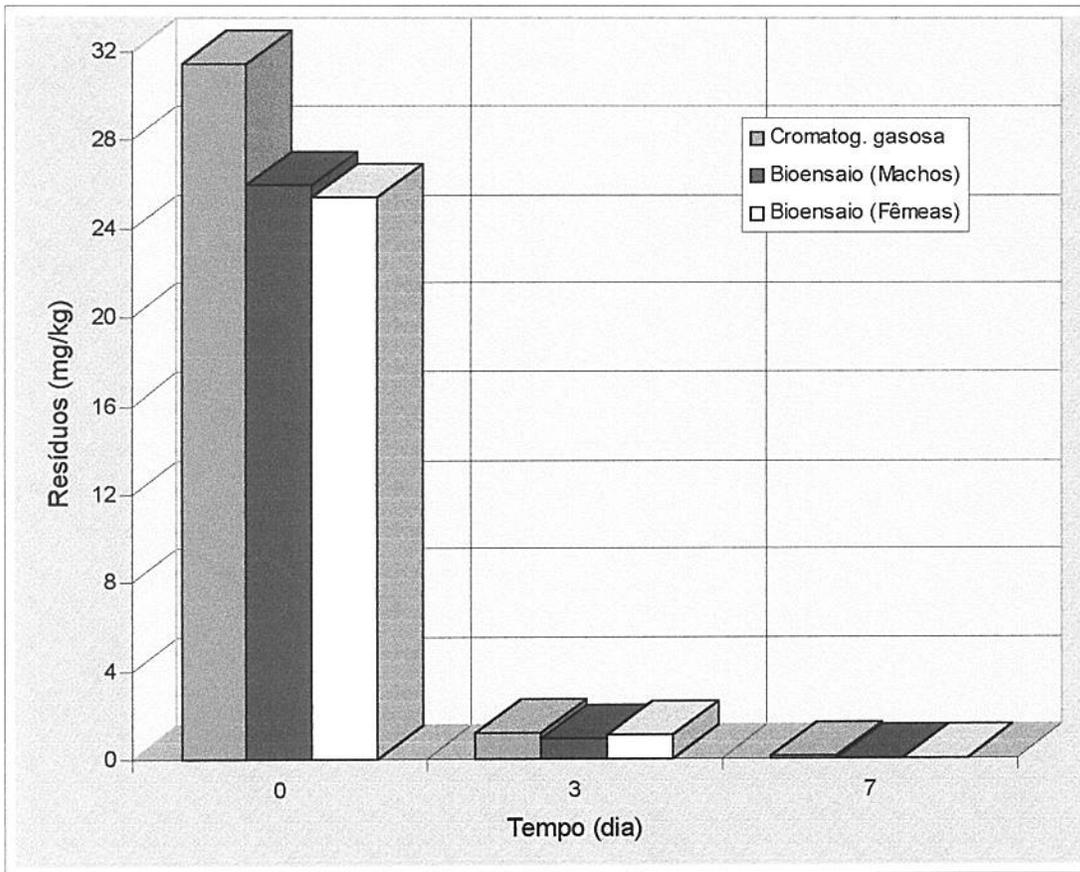


FIGURA 3. RESÍDUOS DE PARATION METÍLICO APLICADO EM COUVE E DETERMINADOS POR CROMATOGRÁFIA GASOSA E POR BIOENSAIO COM *D. melanogaster*, APÓS 0, 3 E 7 DIAS DA APLICAÇÃO DO INSETICIDA.

4 CONCLUSÕES

A degradação do paration metílico aplicado em placa Petri, assim como a toxicidade aguda do inseticida para as moscas *D. melanogaster*, aumenta com o aumento da temperatura,

Os bioensaios com *D. melanogaster*, mostraram a elevada sensibilidade desses insetos para detecção de resíduos do paration metílico em couve, ficando evidente a possibilidade de utilização desses organismos para o monitoramento dos resíduos do paration metílico nesta ou em outras matrizes. Em comparação ao método de determinação por cromatografia gasosa, o método de bioensaio apresenta baixo custo e simplicidade de execução sem comprometer o padrão de acuidade necessário para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Abstract

Methyl parathion is an phytosanitary insecticide and acaricide of short duration in the environment. It does not suffer bioaccumulation and it is not taken on in the food chain. Under the conditions of the bioassay, dry film method in the Petri plate, the methyl parathion degrades depending on temperature and on the time of exposure. Bioassays with *D. melanogaster* showed that the toxicity of the insecticide increases ($P < 0.05$) according to the increases in temperature and time of exposure. The susceptibility was similar to both sexes. The LD₅₀ values, depending on temperature, varied from 3.0 to 10.5 mg/kg body weight (bw) for the males and from 3.0 to 9.5 mg/kg bw for the females. Folidol® 600 CE was applied on plantation of kale (*Brassica oleracea*, var. *acephala*) in the proportion of 0.36 kg of the a.i./ha and the residues of methyl parathion were determined by bioassay and gas chromatographic methods. The determination limits of the bioassay was about 0.1 mg/kg of sample. The method showed good reproducibility (variation coefficient less than 20%). The results confirm the viability of the bioassay with *D. melanogaster* in the monitoring of residues of methyl parathion in kale.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. F. Puga, Instituto Biológico de São Paulo, pela doação das cepas de *D. melanogaster*, ao Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada / Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas do ITAL, pela doação do padrão analítico e ao Serviço de Análise e Diagnósticos / Laboratório de Agrotóxicos da CATI, pela doação do produto técnico. G. R. de Almeida agradece a CAPES pela bolsa de estudos e ao Instituto Adventista de Ensino - Campus São Paulo, pelo apoio recebido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 FEST, C. & SCHMIDT, K. J. **The chemistry of organophosphorus pesticides: Reactivity, Synthesis, Mode of Action, Toxicology.** Berlin: Springer - Verlag, 1973. 339p.
- 2 WHO Methyl Parathion. **Environmental Health Criteria 145**, World Health Organization, Geneva, 1993, 225p.
- 3 MELNIKOV, N. N. **Chemistry of pesticides.** Transl. Ruth L. Busbey. New York: Springer - Verlag, 1971. 480 p.
- 4 SHARMILA, M.; RAMANAND, K. & SETHUNATHAN, N. Hydrolysis of methyl parathion in a flooded soil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 43, n. 1, p. 45 - 51, 1989a.
- 5 SHARMILA, M.; RAMANAND, K. & SETHUNATHAN, N. Effect of yeast extract on the degradation of organophosphorus insecticides by soil enrichment and bacterial cultures. **Canadian J. Microbiol.**, v. 35, n. 12, p. 1105 - 1110, 1989b.
- 6 JAGLAN, P. S. & GUNTHER, F. A. Comparison of hydrolysis rates of methyl parathion and methyl paraoxon by gas liquid chromatography and spectrometry. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 8, n. 8, p. 483 - 485, 1970.
- 7 ADHYA, T. K.; SUDHAKAR-BARIK & SETHUNATHAN, N. Stability of commercial formulation of fenitrothion, methyl parathion, and parathion in anaerobic soils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 29, n. 1, p. 90 - 93, 1981a.
- 8 ADHYA, T. K.; SUDHAKAR-BARIK & SETHUNATHAN, N. Hydrolysis of selected organophosphorus insecticides by two bacteria isolated from flooded soil. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 50, n. 1, p. 167 - 172, 1981b.
- 9 YOUNGMAN, R. R.; TOSCANO, N. C. & GASTON, L. K. Degradation of methyl parathion to *p*-nitrophenol on cotton and lettuce leaves and its effects on plant growth. **J. Econ. Entomol.**, v. 82, n. 5, p. 1317 - 1322, 1989.
- 10 OU, L. T. & SHARMA, A. Degradation of methyl parathion by a mixed bacterial culture and a *Bacillus sp.* isolated from different soils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 37, n. 6, p. 1514 - 1518, 1989.

- 11 CHUKWUDEBE, A.; MARCH, R. B.; OTHMAN, M. & FUKUTO, T. R. Formation of trialkyl phosphorothioate esteres from organophosphorus insecticides after exposure to either ultraviolet light or sunlight. **J. Agric. Food Chem.**, v. 37, n. 2, p. 539 - 545, 1989.
- 12 HOLLINGWORTH, R. M.; METCALF, R. L. & FUKUTO, T. R. The selectivity of sumithion compared with methyl parathion. Metabolism in the white mouse. **J. Agric. Food Chem.**, v. 15, n. 2, p. 242 - 249, 1967.
- 13 JOHNSON, M. W.; WELTTER, S. C.; TOSCANO, N. C.; IWATA, Y. & TING, I. P. Lettuce yield reductions correlated with methyl parathion use. **J. Econ. Entomol.**, v. 76, n. 6, p. 1390 - 1394, 1983.
- 14 MOORTHY, P.; GOPINANDHAN, T. N.; SANTHANAM, R.; BALAKUMAR, T. & ANBUDURAI, P. R. Phytotoxicity of methyl parathion with special reference to photosynthesis in wheat seedlings. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 48, n. 1, p. 138 - 143, 1992.
- 15 YOUNGMAN, R. R.; LEIGH, T. F.; KERBY, T. A.; TOSCANO, N. C. & JACKSON, C. E. Pesticides and cotton: Effect on photosynthesis growth, and fruiting. **J. Econ. Entomol.**, v. 83, n. 4, p. 1549 - 1557, 1990.
- 16 BAYER. **Catálogo de Defensivos Agrícolas Bayer**. São Paulo: Grifo Editorial, 1989. 112p.
- 17 ILSI Brasil. **Relação de substâncias para uso fitossanitário e domissanitário**: Portarias do Ministério da Saúde. International Life Sciences Institute do Brasil, São Paulo, 1995. 716p.
- 18 SOARES, I. A. A.; GOULART, M. C. B.; QUEIROZ, R. L.; MELLO, S. M. M.; AZEVEDO, S. F. & ÁVILA, J. T. Levantamento de resíduos de inseticidas organoclorados e de malation e paration em frutas e hortaliças na CEASA/MG - 1983 - 1986. In: **XI Encontro Nacional de Analistas de Resíduos de Pesticidas**. São Paulo, Junho, 03 a 05, 1987: relatório. São paulo: Inst. Adolfo Lutz, São Paulo. 1987. p. 75 - 84.

- 19 UNGARO, M. T. S.; GUINDANI, C. M. A.; FERREIRA, M. S. & BAGDONAS, M. Resíduos de inseticidas clorados e fosforados em frutas e hortaliças (III). **Biológico**, São Paulo, v. 53, n. 7/12, p. 51 - 56, 1987.
- 20 BARRETO, H. H. C.; INOMATA, O. N. K.; LEMES, V. R. R. KUSSUMI, T. A.; SCORSAFAVA, M. A. & ROCHA, S. O. Monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos comercializados no estado de São Paulo em 1994. **Pesticidas R. Téc. Cient.**, v. 6, p. 1 - 12, 1996.
- 21 ZIMMERING, S. Utility of *Drosophila* for detection of potential environmental chemical mutagens. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 269, p. 26 - 33, 1975.
- 22 PUGA, F. R. & RUBANO, S. Determinação de resíduos de inseticidas através de bioensaio com *Drosophila melanogaster*. In: ALMEIDA, V. F. ed. **Métodos prácticos para detección de resíduos de plaguicidas**. Centro Panamericano de Ecologia Humana y Salud, OPS/OMS, Mexico: 1987. p. 37 - 43.
- 23 BAGDONAS, M.; MELLO, M. H. S. H.; 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. Soc. Brasil. Toxicol.**, v. 1, n. 1, p. 3 - 5, 1988.
- 24 CHIANG, T.; DEAN, M. C. & McDANIEL, C. S. A fruit fly bioassay with phosphotriesterase for detection of certain organophosphorous insecticide residues. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 34, n. 6, p. 809 - 814, 1985.
- 25 BARTLETT, B. R. A new method for rearing *Drosophila* and a technique for testing insecticides with this insect. **J. Econ. Entomol.**, v. 44, n. 4, p. 621, 1951.
- 26 SUN, Y. P. & PANKASKIE, J. E. *Drosophila*, a sensitive insect, for the microbioassay of insecticide residues. **J. Econ. Entomol.**, v. 47, n. 1, p. 180 - 181, 1954.
- 27 JOSEPH Jr, H. & KNOBEL, M. G. Estudo preliminar da sensibilidade de moscas *Drosophila melanogaster* a diversos pesticidas organoclorados. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 40, n. 1, p. 43 - 47, 1980.
- 28 ALMEIDA, G. R. & REYES, F. G. R. Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endosulfan e biomonitoramento

- de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. (submetido para publicação em 10/1997).
- 29 LAUG, E. P. A biological assay method for determining 2,2 bis (p- chlorophenyl)-1,1,1, trichloroethane (DDT). *Jour. Pharm. Exptl. Terap.*, v. 86, p. 324 - 31, 1946.
- 30 LUKE, M. A.; FROBERG, J. E. & MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 58, n. 5, p. 1020 - 1026, 1975.
- 31 ALMEIDA, W. F. **Métodos prácticos para detección de resíduos de plaguicidas.** Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, México, 1987. 54p.
- 32 SPARKS, T. C.; SHOUR, M. H.; WELLEMEYER, E. G. Temperature-toxicity relationships of pyrethroids on three lepdopterans. *J. Econ. Entomol.*, v. 75, n. 4, p. 643 - 6, 1982.
- 33 HARRIS, C. R. - Influence of temperature on the biological activity of insecticides in soil. *J. Econ. Entomol.*, v. 64, p. 1044 - 1049, 1971.
- 34 HARRIS, C. R. & KINOSHITA, G. B. Influence of posttreatment temperature on the toxicity of pyrethroid insecticides. *J. Econ. Entomol.*, v. 70, n. 2, p. 215 - 218, 1977.
- 35 GUTHRIE, F. E. Effect of temperature on the toxicity of certain organic insecticides. *J. Econ. Entomol.* v. 43, n. 4, p. 559 - 560, 1950.
- 36 SUN, Y. P.; JOHNSON, E. R. PANKASKIE, J. E. EARLE, N. W. & SUN, J. T. - Factors affecting residues-film bioassay of insecticide residues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 46, n. 3, p 530 - 542, 1.963.
- 37 LICHTENSTEIN, E. P., MORGAN, D. G. & MUELLER, C. H. Naturally occurring insecticides in cruciferous crops. *J. Agric. Food Chem.*, v. 12, n. 2, p. 138 - 161, 1.964.

CAPÍTULO 4

**BIOENSAIO COM *Drosophila melanogaster* (Meig.):
3. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E TOXICIDADE DO
CARBOFURAN E BIOMONITORAMENTO DE SEUS
RESÍDUOS EM REPOLHO**

**TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA
REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

BIOENSAIO COM *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E TOXICIDADE DO CARBOFURAN E BIOMONITORAMENTO DE SEUS RESÍDUOS EM REPOLHO

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

RESUMO: Carbofuran é um inseticida e nematicida do grupo dos carbamatos, de curta persistência no ambiente e pequeno deslocamento para regiões adjacentes. A sensibilidade das *Drosophila melanogaster* ao carbofuran e o uso desse organismo no biomonitoramento dos resíduos do inseticida em repolho foi avaliado. Nas condições do bioensaio, método do filme seco em placa de Petri, o carbofuran se degrada em função da temperatura. Os bioensaios realizados com *D. melanogaster*, indicaram que a toxicidade do inseticida aumenta com o aumento da temperatura. Os valores de DL₅₀ calculados, em função da temperatura, variaram entre 3,6 e 10,5 mg/kg pc para machos e entre 2,9 e 8,7 mg/kg pc para fêmeas. Furadan[®] 50 G, foi aplicado em repolho (*Brassica oleracea*, var. *capitata*), e seus resíduos determinados pelo método de bioensaio e validados por cromatografia líquida de alta eficiência. O limite de determinação pelo bioensaio é da ordem de 0,1 mg/kg e os resultados obtidos confirmam a viabilidade desta metodologia no monitoramento de resíduos do carbofuran em repolho.

DESCRITORES: Carbofuran, Bioensaio, *Drosophila melanogaster*, Repolho.

INTRODUÇÃO

Carbofuran (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-N-metil carbamato) é um inseticida e nematicida do grupo dos carbamatos, sendo efetivo por contato, ingestão e por ação sistêmica. Apresenta curta persistên-

cia no ambiente e pequeno deslocamento para regiões adjacente^{14, 17}.

O inseticida é aplicado no solo em culturas de algodão, amendoim, arroz, milho, trigo, feijão, banana, batata, café, cana-de-açúcar, cenoura, repolho, tomate, assim como utilizado no tratamento de sementes

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

de algodão, arroz, trigo, milho e feijão, na época do plantio¹⁴.

O carbofuran é biotransformado por reações de hidrólise, hidroxilação e/ou oxidação produzindo, nos animais e plantas, o 3-hidróxi-carbofuran como metabólito principal¹⁷. Este, por sua vez, se oxida a 3-ceto carbofuran, o qual por hidrólise produz o 3-ceto carbofuran fenol^{23,31}. Os metabólitos 3-hidróxi carbofuran e 3-ceto carbofuran tem curta persistência no solo^{9, 32}, são formados lentamente e apresentam baixa toxicidade aguda para insetos^{23,31}.

No ambiente, a biodegradação do carbofuran é dependente da temperatura, da umidade, do pH do solo, da biomassa disponível, assim como da atividade degradativa da mesma²⁵. Aplicações periódicas de carbofuran, no mesmo solo, aumenta a atividade degradativa do mesmo^{9, 10}, o que é devido ao maior crescimento de microrganismos capazes de utilizá-lo como fonte de carbono e nitrogênio⁶. Solos tratados anualmente com carbofuran degradaram, em uma semana, 90 % do inseticida aplicado enquanto que em solos não tratados a degradação, para igual período, foi de 14 %³¹.

O valor da DL₅₀ do carbofuran, reportado para mosca doméstica (*Musca domesti-*

ca) é de 4,6 - 6,7 mg/kg pc (exposição tópic) e de 2,0 mg/kg pc para camundongos (exposição oral)^{23, 24, 33}. O JMPR¹⁵ relatou valores de DL₅₀ (mg/kg pc), oral, de 14,4 para camundongos e de 6,0 -18,0 para ratos.

O carbofuran é absorvido rapidamente, independente da via de administração e distribui-se nos órgãos, tecidos moles e esqueleto, sendo excretado como carbofuran nas fezes e seus metabólitos, pelas vias urinária e pulmonar^{1, 8, 23, 27}. Os processos de detoxificação ocorrem por hidrólise, N-dealquilação, S-dealquilação, O-dealquilação e hidroxilação do anel fenólico²⁴.

Os bioensaios com a mosca *Drosophila melanogaster* (Meig.) têm sido usados como indicadores da presença de substâncias químicas ambientais com potencial mutagênico³⁴, de resíduos de inseticidas em alimentos^{2, 4, 26} ou para auxiliar e esclarecer a natureza da substância tóxica em casos de envenenamento envolvendo inibidores da colinesterase, como os inseticidas organofosforados e carbamatos⁷.

Cabe destacar que as *Drosophilas*, além da sua sensibilidade para detectar pequenas quantidades de substâncias de natureza tóxica, são insetos de fácil manipulação, criação e manutenção nas condições de

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

laboratório, o que facilita amplamente a realização do bioensaio^{5, 29}.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a sensibilidade das moscas *D. melanogaster* para detecção do inseticida carbofuran. Foram também avaliados, nas condições do bioensaio, o efeito da temperatura e do tempo de exposição na degradação do inseticida Furadan[®] 50 G foi aplicado em lavoura de repolho (*Brassica oleracea*, var. *capitata*), e os resíduos de carbofuran determinados por bioensaio com *D. melanogaster* e por cromatografia líquida de alta eficiência.

MATERIAL E MÉTODOS

Equipamentos

Cromatógrafo líquido WATERS, modelo 486, com detector UV/VIS e sistema acoplado a um integrador CHROMJET. Como fase estacionária foi utilizada coluna C₁₈ Lichrocart.

Evaporador rotatório Tecnal, modelo 120.

Homogeneizador de tecidos Tecnal, modelo 102.

Solventes e reagentes

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau para resíduos, Merck, os quais foram previamente destilados. O sulfato de sódio anidro e o florisil foram aquecidos a 400 °C, durante 8 horas. Antes do uso, o florisil foi desativado com 2 % de água.

Como padrão analítico foi utilizado carbofuran, com grau de pureza de 99,5 %, o qual foi cedido pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Para avaliação da estabilidade do carbofuran nas condições do bioensaio, da sensibilidade do bioensaio e nos ensaios de campo, foi utilizado o produto comercial Furadan[®] 50 G, cedido pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), Campinas, SP.

Bioensaio com as moscas *D. melanogaster*

Moscas D. melanogaster

As moscas *D. melanogaster*, utilizadas nos bioensaios, foram criadas no Laboratório de Toxicologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/UNICAMP), em ambiente com temperatura de 25 ± 2 °C, a partir de cepas cedidas pelo Laboratório de Toxicologia Animal do Instituto Biológico de São Paulo.

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

Meio de cultura para criação das moscas

O meio de cultura para criação das moscas *D. melanogaster* foi preparado conforme JOSEPH e KNOBEL¹⁶, com as modificações relatadas por ALMEIDA & REYES². Após o preparo, cerca de 50 mL do meio foram colocados em frasco de vidro transparente, de boca larga e capacidade aproximada de 500 mL, os quais foram conservados em geladeira até o momento do uso.

Criação das moscas

Moscas machos (15) e fêmeas (15) foram transferidas para os frascos contendo o meio de cultura e mantidas a temperatura de 25 ± 2 °C. Ao oitavo dia, as moscas foram removidas dos frascos, remanescendo as larvas.

Após 48 h do início da emergência, as moscas foram transferidas para um novo frasco de cultura, procedimento este que foi repetido a cada 48 horas, para obtenção de novos lotes de moscas. O bioensaio foi realizado utilizando moscas com idade de 3 a 5 dias.

Bioensaio

O bioensaio com as moscas *D. melanogaster* foi realizado pelo método do filme seco¹⁸, em placa de Petri (50 x 20 mm). Para a formação do filme foram colocados, na base de cada placa, cinco níveis diferentes do inseticida/placa, na faixa de 30 a 250 ng/placa. O procedimento do bioensaio foi realizado conforme descrito por ALMEIDA & REYES².

Cálculo da DL₅₀

Para efeito de cálculo da DL₅₀, levou-se em consideração as moscas mortas, assim como as moribundas observadas no momento da contagem⁵. Os cálculos dos valores de DL₅₀ foram feitos por análise de probito, usando o programa "Análise de probito com determinação da dose letal mediana - Programa probito" (HOFFMANN - ESALQ / USP - Maio de 1990).

Avaliação da estabilidade do carbofuran nas condições do bioensaio

A avaliação da estabilidade do carbofuran nas condições do bioensaio, a 20, 25, 30 e 35 °C, foi realizado pelo método do filme seco, conforme procedimento descrito por ALMEIDA & REYES². Para tanto, foram aplicados, na base de placas de Petri

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

(50 x 20 mm), 5,0 µg de carbofuran. Após 6, 12 e 24 h o carbofuran foi extraído das placas com acetona e transferido para um tubo concentrador, evaporado o solvente até secar, o resíduo ressuspendido em 1 mL de metanol e injetados 10 µL no cromatógrafo líquido. Os parâmetros analíticos do cromatógrafo foram: fase móvel metanol:água (1:1 v/v), fluxo 0,5 mL/min e detecção a 220 nm.

Ensaio de campo

Repolho (*Brassica oleracea*, var. *capitata*) foi cultivado, segundo as boas práticas agrícolas, na horta do Instituto Adventista São Paulo, Hortolândia, SP.

As mudas foram plantadas em sistema de linha, com espaçamento aproximado de 60 x 80 cm, em área aproximada de 200 m², no mês de junho de 1996. A área cultivada foi dividida em dois lotes iguais e, em um deles foi aplicado, por ocasião do repique das mudas, o produto formulado "Furadan[®] 50 G", na proporção de 4,0 - 5,0 g/cova, equivalente a 0,2 - 0,25 g do ingrediente ativo/cova. A área não tratada serviu como controle.

Amostras de repolho foram colhidas e analisadas após 30 dias do plantio. O procedimento de colheita foi aleatório e as

amostras foram embaladas em sacos de plástico, transportadas imediatamente para o laboratório e congeladas a - 20 °C, no máximo 30 min após a colheita.

Determinação dos resíduos de carbofuran no repolho

Os resíduos de carbofuran no repolho foram determinados pelo método descrito por LAWRENCE & LEDUC¹⁹, com modificações. Para tanto, de uma amostra homogeneizada de, aproximadamente, 1 kg de repolho, foram retirados 20 g sendo adicionados de 100 mL de acetona. Após agitação durante 5 minutos, a mistura foi filtrada em funil de Büchner e o resíduo lavado com 50 mL de acetona. O filtrado foi transferido para um funil de separação de 500 mL contendo 200 mL de diclorometano:hexano (1:1 v/v), agitado por 2 minutos e deixado em repouso para separação das fases. A fase aquosa foi drenada para um funil de separação de 250 mL contendo 15 mL de solução aquosa saturada de NaCl e reextraída com duas porções de 20 mL de diclorometano. As fases orgânicas foram combinadas, adicionadas de 5 g de Na₂SO₄ anidro, agitadas e deixadas em repouso durante 10 min. A seguir, foram percoladas por uma coluna de Na₂SO₄ anidro, sendo a coluna lavada com 10 mL de diclo-

rometano. O eluato foi evaporado em rotavapor a 30 °C até, aproximadamente, 1 mL. O resíduo foi transferido para um tubo concentrador, levando-se o volume até 10 mL com metanol. Uma alíquota de 5 mL foi aplicada a uma coluna cromatográfica de vidro (200 x 15 mm) contendo 5 g de florisil desativado com 2 % de água e, no topo, 1 g de Na₂SO₄ anidro. A coluna foi previamente lavada com 50 mL de n-hexano. O carbofuran foi eluído da coluna com 100 mL de n-hexano, concentrado em rotavapor a 30 °C e transferido para tubo concentrador. O solvente foi evaporado sob fluxo de N₂ e o resíduo ressuscitado em 2 mL de metanol. Desta solução foram injetados 10 µL no cromatógrafo líquido, conforme os parâmetros analíticos descritos anteriormente.

Recuperação e sensibilidade

Para avaliação da metodologia de LAWRENCE & LEDUC¹⁹, determinou-se a percentagem de recuperação. Para tanto, em amostras de repolho (20 g), livres de agrotóxicos, foram adicionados 3 mL de solução do carbofuran em concentrações de 10,0 e 1,0 µg/mL, caracterizando fortificações de 1,0 e 0,1 mg/kg de amostra, respectivamente. Em seguida as amostras

foram analisadas conforme descrito anteriormente.

A faixa de linearidade (curva padrão) de resposta do detector do cromatógrafo foi determinada usando-se soluções contendo 0,5, 1,0 e 10,0 µg de carbofuran/mL. De cada uma dessas soluções foram injetados 10 µL no cromatógrafo líquido, com os mesmos parâmetros analíticos descritos anteriormente.

Validação do bioensaio

Para validação do método de bioensaio, os extratos do repolho tratados com Furadan[®] 50 G foram analisados conforme esquematizado na figura 1.

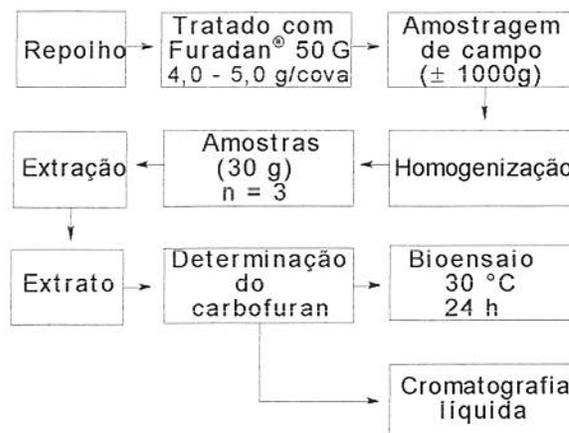


Figura 1 - Esquema de pulverização, extração e determinação dos resíduos do carbofuran aplicado em couve

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

Para realização do bioensaio foram preparadas placas com diferentes alíquotas do extrato, de maneira que pudesse ser estimado o volume necessário para matar 50 % da população teste. As placas foram mantidas a 30 °C, durante 24 h. Extratos de repolho cultivado sem tratamento com carbofuran também foram avaliados pelo bioensaio.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no bioensaio foram avaliados por análise de variância (ANOVA). O teste de TUKEY foi utilizado para verificar se havia diferença entre os resultados obtidos para as moscas machos e fêmeas, como também entre as temperaturas utilizadas no bioensaio. Os cálculos foram feitos utilizando-se o software estatístico S.A.S., disponível no LABEST (Laboratório de Estatística / UNICAMP).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos cromatográficos são procedimentos analíticos de grande sensibilidade. Entretanto, a sua utilização ainda é limitada para o monitoramento de resíduos de inseticidas em alimentos, devido aos

custos elevados de equipamentos e reagentes, especialmente nos países em desenvolvimento. Por outro lado, nesses países os inseticidas e outros agrotóxicos, freqüentemente, são utilizados de modo excessivo e indiscriminado. Como o objetivo básico do monitoramento é detectar uma quantidade de agrotóxico que possa apresentar um efeito agudo para a saúde humana humana, é de grande interesse avaliar e difundir metodologias simples que permitam detectar esses níveis de resíduos³

O estudo da degradação do carbofuran, nas condições do bioensaio, foi conduzido para avaliar a quantidade do inseticida que estaria disponível nas placas durante a realização do ensaio. A percentagem residual do carbofuran, remanescente nas placa de Petri, após 6, 12 e 24 h, nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C, está apresentada na figura 2. Os resultados indicam que, nas condições do bioensaio, a degradação do inseticida foi de, no máximo, 18 %, sendo que a degradação observada foi diretamente proporcional tanto ao tempo de exposição como a variação da temperatura. Resultados semelhantes foram relatados por PARKIN & SHELTON²⁵.

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

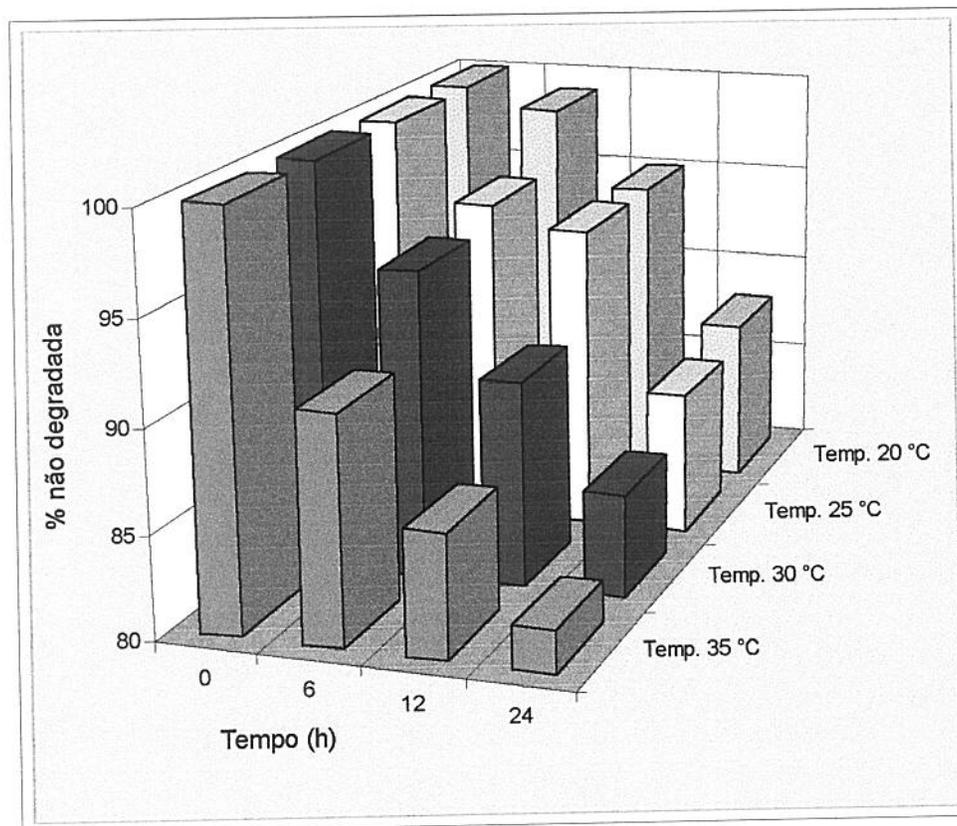


Figura 2. Percentagem residual, após 6, 12 e 24 h da exposição de 5 µg do carbofuran / placa de Petri (50 x 20 mm), nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C.

Os valores de DL₅₀ para as moscas *D. melanogaster*, machos e fêmeas, calculados em função da variação da temperatura, estão apresentados na tabela 1.

Em geral, machos e fêmeas apresentaram susceptibilidade semelhante ao carbofuran, sendo que as fêmeas mostram-se significativamente ($p < 0,05$) mais susceptíveis a ação do inseticida nos bioensaios realizados a 20 e 35 °C. Em relação à temperatura, a toxicidade do inseticida aumentou si-

gnificativamente ($p < 0,05$) com o aumento da mesma, para ambos os sexos, exceto entre os machos, para as temperaturas de 25 e 30 °C, onde o aumento da toxicidade não foi significativo ($p < 0,05$). Cabe mencionar que os valores de DL₅₀ calculados no presente estudo encontram-se na mesma ordem de magnitude daqueles relatados para *M. domestica* (4,6 - 6,7 mg/kg pc), para ensaios realizados à temperatura ambiente^{23, 24, 33}.

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

Tabela 1: Valores médios da dose letal mediana (DL₅₀, expressa em mg/kg pc) do carbofuran para *D. melanogaster*, machos e fêmeas, em diferentes temperaturas.

Temp. ⁽¹⁾ (°C)	MACHOS		FÊMEAS	
	DL ₅₀ ± s ⁽²⁾	Taxa de DL ₅₀ ⁽³⁾	DL ₅₀ ± s ⁽²⁾	Taxa de DL ₅₀ ⁽³⁾
20	10,5 ± 0,8 (A, a) ⁽⁴⁾	1,00	8,7 ± 0,4 (B, a)	1,00
25	5,3 ± 0,7 (A, b)	1,98	4,9 ± 0,8 (A, b)	1,78
30	4,8 ± 0,9 (A, b, c)	2,19	3,9 ± 0,3 (A, c)	2,23
35	3,6 ± 0,3 (A, d)	2,92	2,9 ± 0,5 (B, d)	3,00

(1) Nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C o tempo de exposição foi de 24 h, a 35 °C foi de 12 h.

(2) s = desvio padrão absoluto (n = 5)

(3) Relação temperatura-toxicidade²⁸.

(4) Comparação entre médias. As letras "A e B" indicam comparação de médias entre machos e fêmeas para uma mesma temperatura e as letras "a, b, c, d" indicam comparação de médias entre temperaturas para o mesmo sexo. Médias com mesma letra não são diferentemente significativas (p < 0,05).

Sabe-se que a temperatura influencia a toxicidade dos inseticidas e que o efeito da mesma depende, entre outros, da espécie do inseto, estágio de desenvolvimento do mesmo, via de exposição, concentração e formulação¹². No presente estudo, tanto para machos como para fêmeas, a toxicidade aguda do carbofuran, a 35 °C, foi 3 vezes maior do que a 20 °C (tabela 1), o que pode ser devido a uma maior absorção dérmica do inseticida em função do aumento da temperatura. Comportamento semelhante tem sido relatado por outros pesquisadores, utilizando diferentes inseticidas e sistemas biológicos^{11, 12, 13}. Essa diferença na resposta foi sugerida como

dispositivo para aumentar a sensibilidade do bioensaio³⁰.

Dados da literatura indicam que na família das *Brassicaceae Cruciferae* são encontradas, em maior quantidade na raiz, substâncias com ação inseticida, tais como o 2-fenil-etil-isotiocianato presente no nabo (*Brassica campestris*, var. *rapa*)²², repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), brócolis (*B. oleracea* var. *italica*) e couve (*B. oleracea* var. *acephala*)²¹ ou o 5-alil-1-metóxi-2,3-metileno-dioxibenzeno (miristicin) identificado na chervia (*Pastinaca sativa* L.)²⁰. Extratos de repolho, isentos de agrotóxicos, obtidos pelo método de LAWRENCE & LEDUC¹⁹,

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

foram avaliados pelo método de bioensaio com as moscas *D. melanogaster*. Todas as moscas sobreviveram ao período do teste, cuja duração foi de 24 h, o que indicou ausência de substâncias tóxicas para a *D. melanogaster*.

Os bioensaios com *D. melanogaster* para detecção dos resíduos do carbofuran nos extratos de repolho foram feitos em temperatura de 30 °C, durante 24 h de exposição. Os níveis do carbofuran aplicados nas placas de Petri e que correspondem aos valores de DL₅₀ das *Drosophilas* estão apresentados na tabela 2.

Esses valores foram utilizados para determinar, pelo método de bioensaio, os níveis de resíduo do carbofuran aplicados no repolho. Assim, diferentes volumes do extrato obtido pela metodologia modificada de LAWRENCE & LEDUC¹⁹, foram usados

para determinar o volume necessário para provocar a morte de 50 % da população teste, o qual foi comparado com o valor da DL₅₀ do inseticida, calculada para a mesma temperatura (tabelas 1 e 2). Utilizando-se esses dados, foi estimado o nível de resíduo do carbofuran no repolho.

A sensibilidade dos métodos químicos de análise de resíduos, assim como os limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos pela legislação de agrotóxicos, exigem que os organismos usados nos bioensaios sejam suficientemente sensíveis para detectar níveis residuais menores do que 1,0 mg/kg^{4, 26}. No presente estudo, a sensibilidade do método de bioensaio é uma função do volume de extrato necessário para provocar a morte de 50 % da população teste.

Tabela 2: Quantidades do carbofuran nas placas de Petri (ng/placa) que correspondem aos valores de DL₅₀ das moscas *D. melanogaster*, machos e fêmeas, em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Machos	Fêmeas
20	144	185
25	74	105
30	66	85
35	50	62

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

Considerando-se um extrato purificado igual a 4 mL obtido de uma amostra inicial de 20 g de repolho, do qual um volume de 150 µL tenha provocado a morte de 50 % da população teste, o limite de determinação encontra-se na ordem de 0,1 mg de carbofuran / kg de amostra (Tabelas 1 e 2). Esses resultados confirmam a elevada sensibilidade das moscas *D. melanogaster* para detecção de resíduos do carbofuran no repolho tratado com o inseticida.

Para validação do bioensaio, os mesmos extratos utilizados nesse método foram também analisados, quanto ao teor de carbofuran, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na metodologia utilizando-se CLAE, os valores de recuperação do inseticida para as amostras de repolho contaminadas com 0,1 mg/kg e 1,0

mg/kg foram, respectivamente, 100% e 71 %. Esses valores de recuperação estão próximos, ou encontram-se na faixa, aceita internacionalmente (80 a 120 %), o que indica que as modificações introduzidas na metodologia descrita por LAWRENCE & LEDUC¹⁹, não afetaram a confiabilidade do método.

Na tabela 3 estão apresentados os níveis de resíduo de carbofuran determinados no repolho por CLAE e pelo método de bioensaio, após 30 dias da aplicação do inseticida. Verificou-se que não existe diferença significativa entre os métodos, a um nível de confiança de 0,01. Ainda, o bioensaio apresentou a sensibilidade necessária para detectar, no repolho, níveis de carbofuran abaixo do limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido para essa cultura

Tabela 3: Resíduos de carbofuran (média ± s)^a determinados em repolho por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por bioensaio, após 30 dias da aplicação do Furadan[®] 50 G (4 - 5 g / cova).

M É T O D O		
CLAE (mg/kg) ^c	BIOENSAIO (mg/kg) ^b	
	Machos	Fêmeas
0,43 ± 0,06	0,65 ± 0,05	0,66 ± 0,11

^a s = Estimativa do desvio padrão absoluto; ^b n = 6; ^c n = 3

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

(1,0 mg/kg, com intervalo de carência de 90 dias)¹⁴.

Os resultados obtidos indicam que as moscas *D. melanogaster* são insetos sensíveis para detecção de resíduos de carbofuran no repolho (*Brassica oleracea*, var. *capitata*) e comprovam a viabilidade de utilização desses insetos para o monitoramento de resíduos do carbofuran nessa matriz.

CONCLUSÕES

Nas condições do bioensaio, o carbofuran apresenta alta estabilidade, sendo que a degradação verificada, assim como a toxicidade aguda do inseticida para as moscas *D. melanogaster*, aumenta com o aumento da temperatura.

Os bioensaios com *D. melanogaster* mostraram a elevada sensibilidade desses insetos para detecção de resíduos do carbofuran em repolho, ficando evidente a possibilidade de utilização desses orga-

nismos para os bioensaios destinados ao monitoramento dos resíduos do carbofuran nesta ou em outras matrizes. Em comparação ao método de determinação por CLAE, o método de bioensaio apresenta baixo custo e simplicidade de execução sem comprometer o padrão de acuidade necessário para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. F. Puga, Instituto Biológico de São Paulo, pela doação das cepas de *D. melanogaster*, ao Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada / Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas do ITAL, pela doação do padrão analítico e ao Serviço de Análise e Diagnósticos / Laboratório de Agrotóxicos da CATI, pela doação do produto técnico. G. R. de Almeida agradece a CAPES pela bolsa de estudos e ao Instituto Adventista de Ensino - Campus São Paulo, pelo apoio recebido.

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

Bioassay with *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Studies on degradation and toxicity of carbofuran and biomonitoring of its residues in cabbage. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

ABSTRACT: Carbofuran is an insecticide and nematicide of the carbamate group, present short permanence in the environment and small dislocation to adjacent regions. The sensivity of *Drosophila melanogaster* to carbofuran and the use of this organism in the biomonitoring of residues of the insecticide in cabbage was evaluated. Under the conditions of the bioassay, dry film method on Petri plate, carbofuran degrades according to the temperature. Bioassays conducted with *D. melanogaster* showed that the toxicity of the insecticide increases with elevation of temperature. The LD₅₀ values calculated, as a function of the temperature, were between 3.6 and 10.5 mg/kg body weight (bw) for males and between 2.9 and 8.7 mg/bw for females. Furadan® 50 G was applied on cabbage (*Brassica oleracea*, var. *capitata*) and its residues determined by bioassay method and validated by high performance liquid chromatography. The determination limit of the bioassay was in the order of 0.1 mg/kg. The results obtained confirm the viability of this methodology in the monitoring of carbofuran residues in cabbage

DESCRIPTORS: Carbofuran, Bioassay, *Drosophila melanogaster*, Cabbage.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHDAYA, S. & GUTHRIE, F. E. Stomach absorption of intubated insecticides in fasted mice. *Toxicol.* **22**: 311 - 317, 1982.
2. ALMEIDA, G. R. & REYES, F. G. R. Estudos da degradação e toxicidade do inseticida endossulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga por bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 1997 (submetido para publicação).
3. ALMEIDA, W. F. *Métodos prácticos para detección de resíduos de plaguicidas*. Centro Panamericano de Ecologia Humana y Salud, OPS/OMS, México: 1987. 54p.
4. BAGDONAS, M.; MELLO, M. H. S. H.; UNGARO, M. T. S.; GUINDANI, C. M. A.; FERREIRA, M. S. & GAETA, R. Ensaio biológicos como testes preliminares na detecção de resíduos de inseticidas em frutas e hortaliças. *Rev. Soc. Brasil. Toxicol.* **1**: 3 - 5, Jan. 1988 e Jul. 1988.

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

5. BARTLETT, B. R. A new method for rearing *Drosophila* and a technique for testing insecticides with this insect. *J. Econ. Entomol.* **44**: 621, 1951.
6. CHARNAY, M. P. & FOURNIER, J. C. Study of the relation between carbofuran degradation and microbial or physicochemical characteristics of some French soils. *Pestic. Sci.* **40**: 207 - 216, 1994.
7. CHIANG, T.; DEAN, M. C. & McDANIEL, C. S. A fruit fly bioassay with phosphotriesterase for detection of certain organophosphorous insecticide residues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **34**: 809 - 814, 1985.
8. DOROUGH, H. W. - Metabolism of Furadan (NIA - 10242) in rat and houseflies. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **16**: 319 - 325, 1968.
9. FELSOT, A.; MADDOX, J. V. & BRUCE, W. Enhanced microbial degradation of carbofuran in soils with histories of Furadan[®] use *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **26**: 781 - 788, 1981.
10. FELSOT, A. S. - Enhanced biodegradation of insecticides in soil: Implications for agroecosystems. *Ann. Rev. Entomol.* **34**: 453 - 476, 1989.
11. GUTHRIE, F. E. Effect of temperature on the toxicity of certain organic insecticides. *J. Econ. Entomol.* **43**: 559 - 560, 1.950.
12. HARRIS, C. R. - Influence of temperature on the biological activity of insecticides in soil. *J. Econ. Entomol.* **64**: 1044 - 1049, 1.971.
13. HARRIS, C. R. & KINOSHITA, G. B. Influence of posttreatment temperature on the toxicity of pyrethroid insecticides. *J. Econ. Entomol.* **70**: 215 - 218, 1977.
14. ILSI BRASIL. *Relação de substâncias para uso fitossanitário e domissanitário: Portarias do Ministério da Saúde.* International Life Sciences Institute do Brasil, São Paulo, 1995, 716p.
15. JMPR - Pesticide residues in food - 1996 evaluations. Part II - Toxicology: Carbofuran 23 - 43. World Health Organization, WHO / PCS / 97.1, 1997.
16. JOSEPH Jr, H. & KNOBEL, M. G. Estudo preliminar da sensibilidade de moscas *Drosophila melanogaster* a diversos pesticidas organoclorados.

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

- Rev. Inst. Adolfo Lutz* **40**: 43 - 47, 1980.
17. KUHR, R. J. & DOROUGH, H. W. *Carbamate insecticides: Chemistry, Biochemistry and Toxicology*. CRC Press, 1976. 301p.
 18. LAUG, E. P. A biological assay method for determining 2,2 bis (p-chlorophenyl)-1,1,1, trichloroethane (DDT). *Jour. Pharm. Exptl. Terap.* **86**: 324 - 331, 1946.
 19. LAWRENCE, J. F. & LEDUC, B. High pressure liquid chromatography with ultraviolet absorbance or fluorescence detection of carbaryl in potato and corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **61**: 872 - 876, 1978.
 20. LICHTENSTEIN, E. P. & CASIDA, J. E. Myristicin, an insecticide and synergist occurring naturally in the edible parts of parsnips. *J. Agric. Food Chem.* **11**: 410 - 415, 1.963.
 21. LICHTENSTEIN, E. P., MORGAN, D. G. & MUELLER, C. H. Naturally occurring insecticides in cruciferous crops. *J. Agric. Food Chem.* **12**: 138 - 161, 1.964.
 22. LICHTENSTEIN, E. P.; STRONG, F. M. & MORGAN, D. G. Identification of 2-Phenylethylisothiocyanate as an insecticide occurring naturally in the edible part of turnips. *J. Agric. Food Chem.* **10**: 30 - 33, 1962.
 23. METCALF, R. L.; FUKUTO, T. R.; COLLINS, C.; BORCK K.; EL-AZIZ, S. A.; MUNOZ, R. & CASSIL, C. C. Metabolism of 2,2-dimethyl-2,3-dihydrobenzofuranyl-7-N-methylcarbamate (Furadan) in plants, insects, and mammals. *J. Agric. Food Chem.* **16**: 300 - 311, 1968.
 24. METCALF, R. L.; OSMAN, M. F. & FUKUTO, T. R. - Metabolism of C¹⁴-labeled carbamate insecticides to C¹⁴O₂ in the house fly. *J. Econ. Entomol.* **60**: 445 - 450, 1967.
 25. PARKIN, T. R. & SHELTON, D. R. Modeling environmental effects on enhanced carbofuran degradation. *Pestic. Sci.* **40**: 163 - 168, 1994.
 26. PUGA, F. R. & RUBANO, S. Determinação de resíduos de inseticidas através de bioensaio com *Drosophila melanogaster*. In: ALMEIDA, V. F. ed. *Métodos prácticos para detección de resíduos de plaguicidas*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, Mexico: 1987. p. 37 - 43.

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 3. Estudo da degradação e toxicidade do carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*

27. SHAH, P. V.; MONROE, R. J. & GUTHRIE, F. E. Comparative rates of dermal penetration of insecticides in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **59**: 414 - 423, 1981.
28. SPARKS, T. C.; SHOUR, M. H & WELLEMAYER, E. G. Temperature-toxicity relationships of pyrethroids on three lepdopterans. *J. Econ. Entomol.* **75**: 643 - 646, 1982.
29. SUN, Y. P. & PANKASKIE, J. E. *Drosophila*, a sensitive insect, for the microbioassay of insecticide residues. *J. Econ. Entomol.* **47**: 180 - 181, 1954.
30. SUN, Y. P.; JOHNSON, E. R. PANKASKIE, J. E. EARLE, N. W. & SUN, J. T. - Factors affecting residues-film bioassay of insecticide residues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **46**: 530 - 542, 1963.
31. TALEBI, K. & WALKER, C. H. A comparative study of carbofuran metabolism in treated and untreated soils. *Pestic. Sci.* **39**: 65 - 69, 1993.
32. WILLIAMS, I. H.; PEPIN, H. S. & BROWN, M. J. Degradation of carbofuran by soil microorganisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **15**: 244 - 249, 1976.
33. YU, C.; METCALF, R. L. & BOOTH, G. M. Inhibition of acetylcholinesterase from mammals and insects by carbofuran and its related compounds and their toxicities toward these animals. *J. Agric. Food Chem.* **20**: 923 - 925, 1972.
34. ZIMMERING, S. Utility of *Drosophila* for detection of potential environmental chemical mutagens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **269**: 26 - 33, 1975.

CAPÍTULO 5

**BIOENSAIO COM *Drosophila melanogaster* (Meig.):
4. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E TOXICIDADE DA
DELTAMETRINA E BIOMONITORAMENTO DE SEUS
RESÍDUOS EM COUVE-MANTEIGA**

**TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA
REVISTA BRASILEIRA DE TOXICOLOGIA**

Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 4. Estudos da degradação e toxicidade da deltametrina e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga

Resumo

Deltametrina é um inseticida piretróide sintético, de uso fito e domissanitário com amplo espectro de ação. A sensibilidade das *Drosophila melanogaster* a deltametrina e o uso desse organismo no biomonitoramento dos resíduos do inseticida em couve foi avaliada. Ensaio de degradação, em placa de Petri, pelo método do filme seco, mostraram que o inseticida degrada-se proporcionalmente ao tempo de exposição e ao aumento da temperatura. Os valores de DL₅₀, calculados em função da temperatura, variaram entre 0,35 e 0,72 mg/kg pc para machos e entre 0,34 e 0,96 mg/kg pc para fêmeas, sendo que a toxicidade do inseticida foi semelhante na faixa de temperatura de 20 a 30 °C, apresentando aumento de toxicidade a 35 °C. O produto formulado Decis® 25 CE, foi aplicado em couve-manteiga, (*Brassica oleracea*, var. *acephala*), em proporção aproximada de 6,0 g do ingrediente ativo/ha. A determinação dos resíduos pelo método de bioensaio comparado com o método por cromatografia gasosa não mostrou diferença (P<0,05) para amostras analisadas após 0 e 4 dias da aplicação do inseticida. O limite de determinação pelo bioensaio foi da ordem de 0,01 mg/kg, tendo o método apresentado boa reprodutibilidade, com coeficiente de variação menor que 20 %. Os resultados obtidos confirmam a viabilidade do bioensaio com *D. melanogaster* no monitoramento de resíduos de deltametrina em couve.

Unitermos: Deltametrina, toxicidade, resíduos, bioensaio, *Drosophila melanogaster*

Abstract

Deltamethrin is a synthetic piretroid insecticide for phyto and domestic sanitary use having wide spectrum of action. The sensitivity of *Drosophila melanogaster* to deltamethrin and the use of this organism in the biomonitoring of residues of the insecticide on kale was evaluated. Degradation studies, in Petri plate, by the dry film method, showed that the insecticide degrades proportionally to the time of exposure, and to the increasing of temperature. The values of LD₅₀, nevertheless, calculated as a function of the temperature in the range of 20 to 35 °C, varied from 0.35 to 0.72 mg/kg body weight (bw) for males and from 0.34 to 0.96 mg/kg bw for females. The toxicity of the insecticide was similar at the temperatures of 20 and 30 °C, showing increase of toxicity at 35 °C. Decis® 25 CE was applied on kale (*Brassica olerarea*, var. *acephala*) in the proportion of 6.0 g of the active ingredient/ha. The determination of the residues by the bioassay and gas chromatography did not present difference (P < 0,05) for samples analyzed after 0 and 4 days of application of the insecticide. The limit of determination by the bioassay was in the order of 0.01 mg/kg, the method showed good reproducibility with coefficient variation less than 20 %. The results confirm the viability of the bioassay with *Drosophila melanogaster* in the monitoring of residues of deltamethrin in kale.

Keywords: Deltamethrin; toxicity; residues; bioassay; *D. melanogaster*

Introdução

Deltametrina [D-cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de alfa ciano-N-fenoxibenzila; (S)-alfa-ciano-N-fenoxibenzila(1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato], produzida a partir da esterificação do álcool (±)-alfa-ciano-3-fenoxibenzil com o ácido (1R, cis)-2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil) ciclopropano carboxílico^{1, 2}, é um inseticida piretróide sintético, de uso fito e domissanitário com amplo espectro de ação. O produto técnico contém cerca de 98 % do ingrediente ativo sendo praticamente insolúvel em água, mas altamente solúvel em solventes orgânicos, e apresenta boa estabilidade à luz, ao calor e em meio ácido ou neutro^{3, 4}.

Os processos de degradação da deltametrina envolvem reações de isomerização, hidrólise e oxidação. No solo, parte do inseticida depositado se degrada rapidamente pela ação de agentes físicos, e a fração que fica retida tem processo mais lento de dissipação, com taxa de degradação determinada pelo pH, pela ação microbiana e pelas condições aeróbicas do solo^{5, 6, 7}.

Nos animais, a deltametrina ingerida é excretada nas fezes e na urina. A detoxificação envolve processos oxidativos (Sistema de oxidases de função mista - NADPH) e hidrolíticos, por ação de esterases de piretróides (carboxilesterase) presentes primariamente na fração microsossomal de homogeni-

zados de fígado e também no cérebro, rins e no sangue^{8, 9, 10, 11, 12, 13}.

A deltametrina interfere na abertura dos canais de sódio¹⁴, reduz a amplitude dos potenciais de ação¹⁵, estimula a liberação do íon Ca^{++} ¹⁶, afeta a atividade do sistema Ca^{++} - Calmodulina, que regula o metabolismo do AMPc¹⁷, estimula a ação da proteinoquinase C, via fosfoinositideo¹⁸ e inibe a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase¹⁹ nos axônios e no cérebro.

Em geral, a variação da temperatura modifica a toxicidade dos inseticidas. O permetrin e resmetrin apresentaram maior toxicidade para larvas de grilo, *Gryllus pennsylvanicus* Burmeister, no primeiro instar, a 15 °C do que a 32 °C²⁰. A toxicidade da deltametrina para lagarta de repolho, *Trichoplusia ni* Hübner, diminuiu com o aumento da temperatura do bioensaio, enquanto que para a lagarta do milho, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, e lagarta do tabaco, *Heliothis virescens* F., a toxicidade aumentou com o aumento da temperatura dos bioensaios²¹. A toxicidade de outros piretróides como a resmetrina, permetrina, fluralinate, fenvalerato, cipermetrina ou esfenvalerate para baratas machos, *Blattella germanica* L, por aplicação tópica, diminuiu com o aumento da temperatura²².

Bioensaios com moscas *Drosophila melanogaster* Meig. têm sido usados como indicadores da presença de substâncias

químicas ambientais com potencial mutagênico²³, de resíduos de agrotóxicos em alimentos^{24, 25} ou para auxiliar e esclarecer a natureza da substância tóxica em casos de envenenamento envolvendo inibidores da colinesterase, como os inseticidas organofosforados e os carbamatos²⁶.

Cabe destacar que as *Drosophilas*, além da sua elevada sensibilidade para detectar pequenas quantidades de substâncias de natureza tóxica, são insetos de fácil manipulação, criação e manutenção nas condições de laboratório, o que facilita amplamente a realização do bioensaio^{27, 28}.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a sensibilidade das moscas *D. melanogaster* ao efeito inseticida da deltametrina, assim como a viabilidade do biomonitoramento, com moscas *D. melanogaster*, dos resíduos de deltametrina em hortigranjeiros. Para tanto, foi avaliada a estabilidade da deltametrina nas condições do bioensaio, assim como a sensibilidade da *Drosophila*, ao inseticida, em função da temperatura e do tempo de exposição. Posteriormente, a deltametrina foi aplicada em plantação de couve-manteiga (*Brassica oleracea*, var. *acephala*) e os seus resíduos determinados pelos métodos de bioensaio e por cromatografia gasosa (CG).

Material e métodos

Aparelhos

Cromatógrafo a gás Varian, modelo 3400, com detector de captura de elétrons (⁶³Ni), equipado com coluna megabore DB1 (30 m de comprimento x 0,54 mm de diâmetro interno), acoplado a um integrador processador CG, modelo 300.

Evaporador rotatório Tecnal, modelo 120.

Homogeneizador de tecidos Tecnal, modelo 102.

Pulverizador costal, marca Jato com capacidade de 20 L.

Solventes e reagentes

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau para resíduos da Merck, os quais foram previamente destilados. O cloreto de sódio foi lavado com acetona e o sulfato de sódio anidro e o florisil aquecidos a 400 °C, durante 8 horas. Antes do uso, o florisil foi ativado em estufa a 120 °C.

Como padrão analítico foi utilizado a deltametrina, com grau de pureza de 99 %, o qual foi cedido pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Para avaliação da estabilidade da deltametrina nas condições do bioensaio, da sensibilidade do bioensaio e nos ensaios de campo, foi utilizado o produto comercial Decis[®] 25 CE, cedido pela

Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI).

Bioensaio com a *D. melanogaster*

Moscas *D. melanogaster*

As moscas *D. melanogaster*, usadas para a realização dos bioensaios, foram criadas no laboratório de Toxicologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP), em ambiente com temperatura de 25 ± 2 °C, a partir de cepas cedidas pelo laboratório de Toxicologia Animal, Instituto Biológico de São Paulo.

Meio de cultura para criação das moscas

O meio de cultura para criação das moscas *D. melanogaster* foi preparado conforme JOSEPH & KNOBEL²⁹, com as modificações sugeridas por ALMEIDA & REYES³⁰. Após o preparo, cerca de 50 mL do meio foram colocados em frasco de vidro transparente, de boca larga e capacidade aproximada de 500 mL, os quais foram conservados em geladeira até o momento do uso.

Criação das moscas

Moscas machos (15) e fêmeas (15) foram transferidas para os frascos contendo o

meio de cultura e mantidas a temperatura de 25 ± 2 °C. Ao oitavo dia, as moscas foram removidas dos frascos, remanescendo as larvas. Após 48 h do início da emergência, as moscas foram transferidas para um novo frasco de cultura, procedimento este que foi repetido a cada 48 horas, para obtenção de novos lotes de moscas. O bioensaio foi realizado utilizando moscas com idade de 3 a 5 dias.

Bioensaio

O bioensaio com as moscas *D. melanogaster* foi realizado pelo método do filme seco³¹, em placa de Petri (50 x 20 mm). Para a formação do filme foram colocados, na base de cada placa, cinco níveis diferentes do inseticida/placa, na faixa de 1 a 81 ng/placa e o procedimento do bioensaio foi realizado conforme descrito por ALMEIDA & REYES³⁰.

Cálculo da DL₅₀

Para efeito de cálculo da DL₅₀, levou-se em consideração as moscas mortas, assim como as moribundas observadas no momento da contagem²⁷. Os cálculos dos valores de DL₅₀ foram feitos por análise de probito, usando o programa "Análise de probito com determinação da dose letal mediana - Programa probito" (HOFFMANN - ESALQ / USP - Maio de 1990).

Avaliação da estabilidade da deltametrina nas condições do bioensaio

A avaliação da estabilidade da deltametrina foi realizado conforme o método do filme seco, segundo o procedimento descrito por ALMEIDA & REYES³⁰. Para tanto, foram aplicados, na base de placas de Petri (50 x 20 mm), um volume de solução contendo 81 ng de deltametrina. Após diferentes intervalos de tempo (0, 6, 12 e 24 h), nas diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35 °C), a deltametrina residual foi determinada por cromatografia gasosa, conforme os seguintes parâmetros: temperatura da coluna 240 °C, do injetor 250 °C e do detector 300 °C; gás de arraste nitrogênio; fluxo de 10 mL/min.

Ensaio de campo

Couve-manteiga (*Brassica oleracea*, var. *acephala*) foi cultivada, segundo as boas práticas agrícolas, na horta do Instituto Adventista São Paulo, em Hortolândia, São Paulo.

As mudas foram plantadas em canteiro com espaçamento de 1,0 x 0,5 m em área de aproximadamente 300 m², no mês de fevereiro de 1993 e pulverizadas com Decis® 25 CE no mês de junho do mesmo ano. Para tanto, o inseticida foi diluído em água

(50 mL : 100 L) e aplicado, com pulverizador costal, na área cultivada em proporção aproximada de 6,0 g/ha. Amostras testemunhas foram colhidas da mesma plantação, antes da aplicação do inseticida.

Amostras de couve foram colhidas e analisadas após 0, 2 e 4 dias de terem sido pulverizadas. O procedimento de colheita foi aleatório, tendo-se o cuidado de não colher mais que uma folha de cada planta, em diferentes pontos da área cultivada, no período compreendido entre 9:00 e 10:00 h, sempre depois da perda da umidade superficial das folhas, e transportadas imediatamente após a colheita, para o laboratório.

Validação do bioensaio

Para avaliação do método de bioensaio, os extratos de couve tratada com Decis® 25 CE, foram analisados conforme esquematizado na figura 1.

Extratos de couve cultivada sem tratamento com o agrotóxico também foram avaliados pelo bioensaio. Para realização do bioensaio foram preparadas placas com diferentes alíquotas do extrato, de maneira que pudesse ser estimado o volume necessário para matar 50 % da população teste. As placas foram mantidas a 30 °C, durante 24 h.

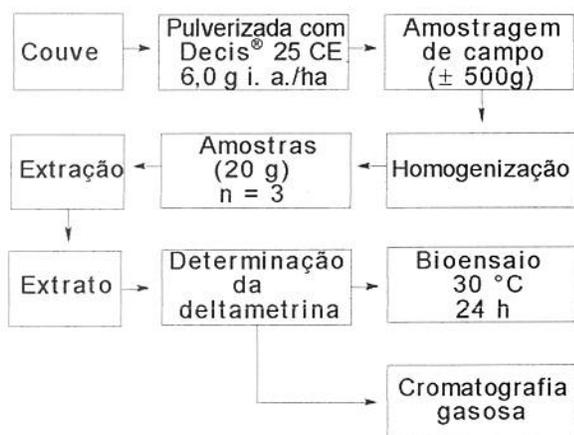


Figura 1. Esquema de pulverização, extração e determinação dos resíduos da deltametrina aplicada em couve

Extração dos resíduos da deltametrina em couve

Os resíduos da deltametrina na couve foram determinados conforme a metodologia proposta por LUKE et alii³², com as modificações sugeridas por ALMEIDA & REYES³⁰.

Recuperação e sensibilidade

Para avaliação da metodologia modificada de LUKE et alii³² determinou-se a percentagem de recuperação. Para tanto, em amostras de couve (20 g), livre de agrotóxicos, foram adicionados diferentes quantidades da deltametrina padrão, caracterizando fortificação de 0,5 e 0,05 mg/kg de amostra. Em seguida executou-se as etapas de extração limpeza e concentração empregadas para as amostras. A faixa de linearidade (curva padrão) de resposta do detector do

cromatógrafo foi determinada usando diluições de 0,1 a 1,0 µg/mL. De cada uma dessas soluções foram injetados, no cromatógrafo, 2 µL, nas condições cromatográficas descritas anteriormente.

Análise estatística

Os dados obtidos no bioensaio foram avaliados por análise de variância (ANOVA). O teste de TUKEY foi utilizado para verificar se havia diferença entre os resultados obtidos para as moscas machos e fêmeas, como também entre as temperaturas utilizadas no bioensaio. Os cálculos foram feitos utilizando-se o software estatístico S.A.S., disponível no LABEST (Laboratório de Estatística / UNICAMP).

Resultados e discussão

Considerando os riscos para a saúde humana, decorrentes do uso excessivo e indiscriminado dos agrotóxicos para produção de alimentos, especialmente nos países em desenvolvimento, os elevados custos dos procedimentos analíticos que utilizam cromatografia gasosa ou líquida de alta eficiência para o monitoramento dos resíduos dos agrotóxicos e que o objetivo básico do monitoramento de resíduos de inseticidas em alimentos é detectar uma quantidade do agrotóxico que possa apresentar um efeito agudo para a saúde humana, é de grande importância avaliar e difundir metodologias

simples e de baixo custo que permitam detectar esses níveis de resíduos³³. Desta forma, no presente estudo foi avaliada a sensibilidade das moscas *D. melanogaster* a deltametrina e o uso desse organismo no biomonitoramento dos resíduos do inseticida em couve.

O estudo da degradação da deltametrina, nas condições do bioensaio, foi conduzido para verificar a quantidade do inseticida que estaria disponível nas placas durante a realização do ensaio, pois este é mais tóxico do que os produtos de sua degradação³⁴. A percentagem residual da deltametrina, remanescente em placa de Petri, após 6, 12 e 24 h nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C,

está apresentada na figura 2. Os resultados indicam que a degradação observada foi diretamente proporcional tanto ao tempo de exposição como a variação da temperatura. Todavia, a deltametrina mostrou-se estável nas condições do bioensaio, remanescendo mais de 82 % nas condições extremas do teste (24 h; 35 °C).

Os valores de DL₅₀ para as moscas *D. melanogaster* machos e fêmeas, calculadas em função da variação da temperatura, estão apresentados na tabela 1. Os machos e as fêmeas apresentaram susceptibilidade semelhante ($p < 0,05$) à deltametrina em todas as temperaturas estudadas. Em relação

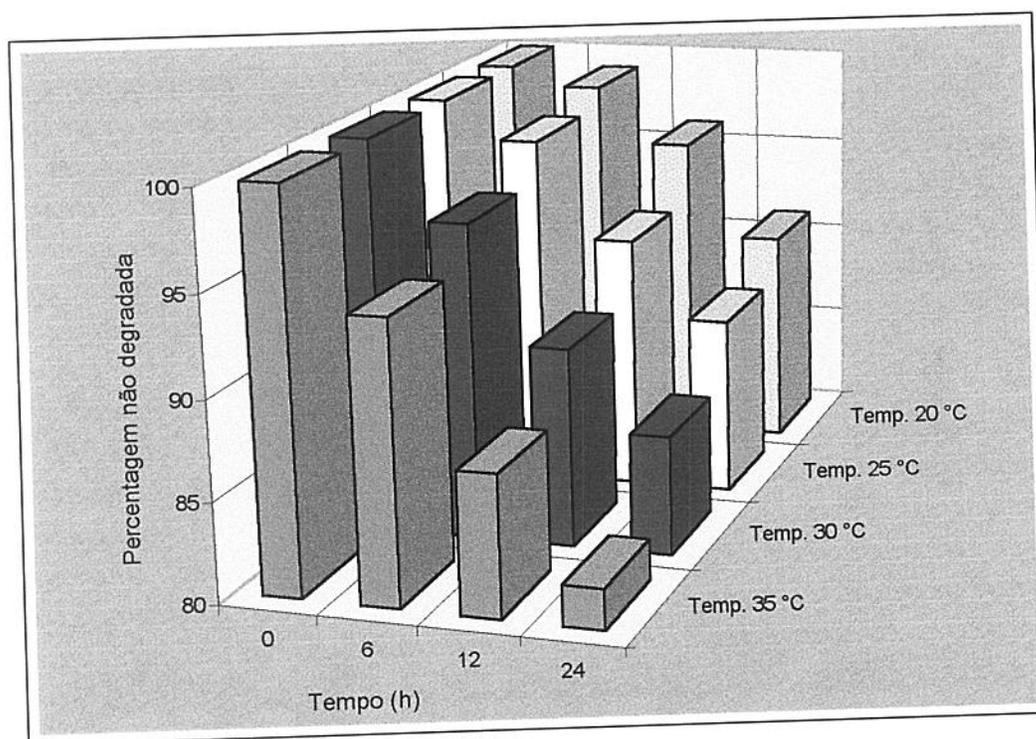


Figura 2: Percentagem residual de deltametrina em placas de Petri após 6, 12 e 24 horas de exposição nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C. Quantidade de inseticida aplicado: 81 ng/placa.

Tabela 1. Valores médios da dose letal mediana (DL₅₀, expressa em mg/kg pc) da deltametri-
na para *D. melanogaster*, machos e fêmeas, em diferentes temperaturas

Temp. ⁽¹⁾ (°C)	MACHOS		FÊMEAS	
	DL ₅₀ ± s ⁽²⁾	Taxa de DL ₅₀ ⁽³⁾	DL ₅₀ ± s ⁽²⁾	Taxa de DL ₅₀ ⁽³⁾
20	0,7 ± 0,1(A, a) ⁽⁴⁾	1,0	1,0 ± 0,2(A, a)	1,0
25	0,7 ± 0,1(A, a)	1,0	0,9 ± 0,2(A, a)	1,1
30	0,6 ± 0,1(A, a)	1,2	0,7 ± 0,1(A, a)	1,4
35	0,4 ± 0,04(A, b)	1,8	0,3 ± 0,02(A, b)	3,3

(1) Nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C o tempo de exposição foi de 24 h, a 35 °C foi de 12 h.

(2) s = desvio padrão absoluto (n = 5)

(3) Relação temperatura-toxicidade em relação à 20 °C²¹.

(4) Comparação entre médias. A letra "A" indica comparação de médias entre machos e fêmeas para uma mesma temperatura e as letras "a, b" indicam comparação de médias entre temperaturas para o mesmo sexo. Médias com mesma letra não são diferentemente significativas (P < 0,05).

à temperatura, a toxicidade do inseticida foi semelhante na faixa de 20 a 30 °C apresentando, entretanto, diferença significativa (p<0,05) a 35 °C (tabela 1).

Sabe-se que a temperatura influencia a toxicidade dos inseticidas e que o efeito da mesma depende, entre outros, da espécie do inseto, estágio de desenvolvimento, via de exposição, concentração e formulação³⁵. No presente estudo, a toxicidade aguda da deltametrina a 35 °C foi 1,8 e 3,3 vezes maior do que a 20 °C, respectivamente, para machos e fêmeas (tabela 1), o que pode ser devido a uma maior absorção dérmica do inseticida em função do aumento da temperatura. Comportamento semelhante tem sido relatado por outros pesquisadores, utilizando diferentes inseticidas e sistemas biológicos^{20, 21, 35, 36, 37}. Ainda, essa diferença na

resposta tem sido sugerida como dispositivo para aumentar a sensibilidade do bioensaio³⁸.

Dados da literatura indicam que na família das *Brassicaceae Cruciferae* são encontradas, em maior quantidade na raiz, substâncias como o 2-fenil-etil-isotiocianato presente na couve (*B. oleracea* var. *acephala*)³⁹ o qual é tóxico para a *D. melanogaster*, assim como para outros insetos, funcionando como inseticida de ocorrência natural. Por esse motivo, extratos de couve isentos de agrotóxicos foram avaliados pelo método de bioensaio. Todas as moscas sobreviveram ao período do teste (24h; 30 °C), o que indicou ausência de substâncias tóxicas para as *D. melanogaster*, nos extratos utilizados.

Os bioensaios com *D. melanogaster* para detecção dos resíduos da deltametrina nos extratos de couve foram feitos em temperatura de 30 °C, durante 24 h de exposição. Os níveis de deltametrina aplicados nas placas de Petri e que correspondem aos valores de DL₅₀ das *Drosophilas* estão apresentados na tabela 2. Esses valores foram utilizados para estimar, pelo método de bioensaio, os níveis de resíduo da deltametrina aplicados na couve. Assim, diferentes volumes do extrato obtido pela metodologia modificada de LUKE *et alii*³², foram usados para determinar o volume necessário para provocar a morte de 50 % da população teste, o qual foi comparado com o valor da DL₅₀ do inseticida, calculada para a mesma temperatura (tabelas 1 e 2). Utilizando-se esses dados, foi estimado o nível de resíduo de deltametrina na couve.

A sensibilidade dos métodos químicos de análise de resíduos, assim como os limites máximos de resíduos (LMRs) estabeleci-

dos pela legislação de agrotóxicos, exigem que os organismos usados nos bioensaios sejam suficientemente sensíveis para detectar níveis residuais menores do que 1,0 mg/kg^{24, 25}. No presente estudo, a sensibilidade do método de bioensaio é uma função do volume de extrato necessário para provocar a morte de 50 % da população teste.

Considerando-se um extrato purificado de 2 mL obtido de uma amostra inicial de 20 g de couve, do qual um volume de 100 µL tenha provocado a morte de 50 % da população teste, o limite de determinação encontra-se na ordem de 0,008 e 0,015 mg de deltametrina/kg de amostra, para as moscas machos e fêmeas, respectivamente (tabelas 1 e 2). Esses resultados confirmam a elevada sensibilidade das moscas *D. melanogaster* para detecção de resíduos de deltametrina em couve-manteiga tratada com o inseticida. Repetições na análise de uma mesma amostra de couve mostraram

Tabela 2: Quantidades de deltametrina em placas de Petri (ng/placa) que correspondem aos valores de DL₅₀ das moscas *D. melanogaster*, machos e fêmeas, em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Machos	Fêmeas
20	9,9	20,5
25	9,7	19,0
30	8,8	15,7
35	4,9	7,4

para o método de bioensaio, coeficientes de variação de, no máximo, 20 % (n = 5). Coeficientes de variação de até 20 % são considerados aceitáveis na determinação de contaminantes traço⁴⁰.

Para validar o bioensaio, os mesmos extratos utilizados nesse método foram analisados, quanto ao teor da deltametrina, por cromatografia gasosa. Nesta metodologia, os valores de recuperação do inseticida para amostras de couve contaminadas com 0,5 e 0,05 mg/kg foram de 93 e 108 %, respecti-

vamente (coeficiente de variação inferior a 10 %; n = 3). Esses valores de recuperação encontram-se dentro da faixa aceita internacionalmente (80 a 120%), o que indica que as modificações introduzidas no método de Luke *et alii*³² não afetaram a sua confiabilidade.

Na figura 3 estão apresentados os níveis de resíduo da deltametrina determinados, pelo método cromatográfico e de bioensaio, em couve após diversos períodos (0, 2 e 4 dias) da aplicação do inseticida.

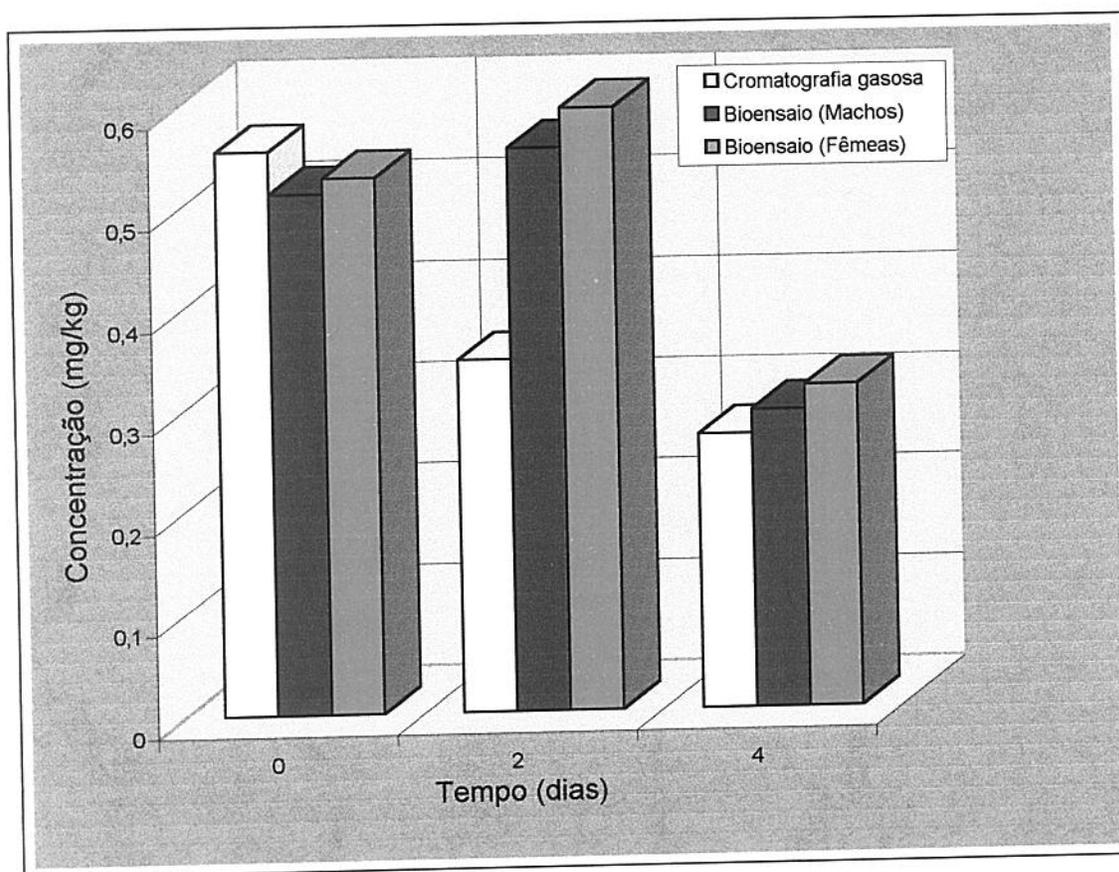


Figura 3. Quantidades de resíduos de deltametrina aplicada em couve, determinados por cromatografia gasosa e por bioensaio com *D. melanogaster*, após 0, 2 e 4 dias da aplicação do inseticida.

Verificou-se que não existe diferença significativa entre os métodos, a um nível de confiança de 0,05, exceto nas amostras analisadas para o segundo dia da aplicação, nas quais apesar dos métodos utilizados diferirem significativamente ($P < 0,05$), os níveis de resíduos determinados encontram-se na mesma ordem de magnitude (0,4 e 0,6 mg/kg para os métodos químico e biológico, respectivamente). Os resultados obtidos indicam que as moscas *D. melanogaster* são insetos sensíveis para detecção de resíduos de deltametrina em couve-manteiga (*Brassica oleracea*, var. *acephala*) e corroboram a viabilidade de utilização desses insetos para o monitoramento de resíduos da deltametrina nessa matriz.

Cabe ressaltar, conforme pode ser verificado na figura 3, que os resíduos de deltametrina na couve permaneceram acima do LMR permitido para esse cultivar (0,1 mg/kg para dois dias de intervalo de segurança)². Provavelmente, os níveis de resíduos encontrados estejam correlacionados com a aplicação máxima da quantidade recomendada para o produto comercial Decis[®] 25 CE, que é de até 6,0 g/ha segundo as boas práticas agrícolas, assim como com as baixas temperaturas observadas no período do estudo (aplicação feita no mês de junho). Esses dados corroboram a necessidade de monitorar os resíduos de inseticidas em alimentos, já que a relação nível de resí-

duo/intervalo de segurança é afetada pela quantidade aplicada, bem como com o uso indevido dos agrotóxicos⁴¹.

Conclusões

A degradação da deltametrina aplicada em placa Petri, assim como sua toxicidade aguda para as moscas *D. melanogaster*, aumenta com o aumento da temperatura,

Os bioensaios com *D. melanogaster*, mostraram a elevada sensibilidade desses insetos para detecção de resíduos da deltametrina em couve, ficando evidente a possibilidade de utilização desses organismos para os bioensaios destinados a monitorar resíduos da deltametrina nesta matriz. Comparativamente ao método de determinação por cromatografia gasosa, o método de bioensaio apresenta baixo custo e simplicidade de execução sem comprometer o padrão de acuidade necessário para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. F. Puga, Instituto Biológico de São Paulo, pela doação das cepas de *D. melanogaster*, ao Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada / Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas do ITAL, pela doação do padrão analítico e ao Serviço de Análise e Diagnósticos / Laboratório de Agrotóxicos da

CATI, pela doação do produto técnico. G. R. de Almeida agradece a CAPES pela bolsa de estudos e ao Instituto Adventista de Ensino - Campus São Paulo, pelo apoio recebido.

Bibliografia

1. ELLIOTT, M.; FARNHAM, A. W.; JANES, N. F.; NEEDHAM, P. H.; PULMAN, D. A. Synthetic insecticide with a new order of activity. *Nature*, v. 248, n. 5450, p. 710 - 711., 1974.
2. ILSI BRASIL. *Relação de substâncias para uso fitossanitário e domissanitário*: Portarias do Ministério da Saúde. International Life Sciences Institute do Brasil, São Paulo, 1995, 716p.
3. WHO. Deltamethrin. *Environmental Health Criteria 97*, World Health Organization, Geneva, 1990. 133p.
4. MESTRES, R.; MESTRES, G. Deltamethrin: Uses and environmental safety. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 124, p. 1 - 18, 1992.
5. KAUFMAN, D. D.; RUSSELL, B. A.; HELLING, C. S.; KAYSER, A. J. Movement of cypermethrin, decamethrin, permethrin, and their degradation products in soil. *J. Agric. Food Chem.*, v. 29, n. 2, p. 239 - 245, 1981.
6. ZHANG, L. Z.; KHAN, S. U.; AKHTAR, M. H.; IVARSON, K. C. Persistence, degradation, and distribution of deltamethrin in an organic soil under laboratory conditions. *J. Agric. Food Chem.*, v. 32, n. 6, p. 1207 - 1211, 1984.
7. HILL, B. D.; SCHAALJE, G. B. A two-compartment model for the dissipation of deltamethrin on soil. *J. Agric. Food Chem.*, v. 33, n. 5, p. 1001 - 1006, 1985.
8. RUZO, L. O.; ENGEL, J. L.; CASIDA, J. E. Decamethrin metabolites from oxidative, hydrolytic, and conjugative reactions in mice. *J. Agric. Food Chem.*, v. 27, n. 4, p. 725 - 731, 1979.
9. COLE, L. M.; RUZO, L. O.; WOOD, E. J.; CASIDA, J. E. Pyrethroid metabolism: Comparative fate in rats of tralomethrin, traloccythrin, deltamethrin and (1R, α S)-cis-cypermethrin. *J. Agric. Food Chem.*, v. 30, n. 4, p. 631 - 636, 1982.
10. AKHTAR, M. H. Metabolism of deltamethrin by cow and chicken liver enzyme preparations. *J. Agric. Food Chem.*, v. 32, n. 2, p. 258 - 262, 1984.
11. MATSUMURA, F. *Toxicology of insecticides*. Second edition. New York: Plenum Press, 1985. 598 p.

12. AKHTAR, M. H.; HARTIN, K. E.; TRENHOLM, H. L. Fate of [¹⁴C]Deltamethrin in lactating dairy cows. *J. Agric. Food Chem.*, v. 34, n. 4, p. 753 - 758, 1986.
13. DEMOUTE, J. P. A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. *Pestic. Sci.*, v. 27, n. 4, p. 375 - 385, 1989.
14. BROWN, L. D.; NARAHASHI, T. Modulation of nerve membrane sodium channel activation by deltamethrin. *Brain Research*, v. 584, n. 1/2, p. 71 - 76, 1992.
15. LAUFER, J. L.; PELHATE, M.; SATTELLE, D. B. Actions of pyrethroid insecticides on insect axonal sodium channels. *Pestic. Sci.*, v. 16, n. 6, p. 651 - 661., 1985.
16. ENAN, E.; MATSUMURA, F. Stimulation of protein phosphorylation in intact rat brain synaptosomes by pyrethroid insecticide, deltamethrin. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v. 39, p. 182 -185, 1991.
17. ENAN, E.; MATSUMURA, F. Action of deltamethrin on the calcium / calmodulin-dependent protein kinase from the rat brain. *Pestic. Sci.*, v. 37, n. 1, p. 21 - 30, 1993b.
18. ENAN, E.; MATSUMURA, F. Activation of phosphoinositide / protein kinase C pathway in rat brain tissue by pyrethroids. *Biochem. Pharmacol.*, v. 45, n. 3, p. 703 - 710, 1993a.
19. LENG, X. F.; XIAO, D. Q. Effect of deltamethrin on protein phosphorylation of housefly brain synaptosomes. *Pestic. Sci.*, v. 44, n. 1, p. 88 - 89, 1995.
20. HARRIS, C. R.; KINOSHITA, G. B. Influence of post treatment temperature on the toxicity of pyrethroid insecticides. *J. Econ. Entomol.*, v. 70, n. 2, p. 215 - 218, 1977.
21. SPARKS, T. C.; SHOUR, M. H.; WELLEMAYER, E. G. Temperature-toxicity relationships of pyrethroids on three lepidopteran. *J. Econ. Entomol.*, v. 75, n. 4, p. 643 - 646, 1982.
22. WADLEIGH, R. W.; KOEHLER, P. G.; PREISLER, H. K.; PATTERSON, R. S.; ROBERTSON, J. L. Effect of temperature on the toxicities of ten pyrethroids to German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.*, v. 84, n. 5, p. 1433 - 1436, 1991.
23. ZIMMERING, S. Utility of *Drosophila* for detection of potential environmental chemical mutagens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 269, p. 26 - 33, 1975.
24. PUGA, F. R.; RUBANO, S. Determinação de resíduos de inseticidas atra-

- vés de bioensaio com *Drosophila melanogaster*. In: ALMEIDA, V. F. ed. *Métodos prácticos para detección de resíduos de plaguicidas*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, México: 1987. p. 37 - 43.
25. BAGDONAS, M.; MELLO, M. H. S. H.; 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. Soc. Brasil. Toxicol.*, v. 1, n. 1, p. 3 - 5, Jan. 1988 e Jul. 1988.
 26. CHIANG, T.; DEAN, M. C.; McDANIEL, C. S. A fruit fly bioassay with phosphotriesterase for detection of certain organophosphorous insecticide residues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 34, n. 6, p. 809 - 814, 1985.
 27. BARTLETT, B. R. A new method for rearing *Drosophila* and a technique for testing insecticides with this insect. *J. Econ. Entomol.*, v. 44, n. 4, p. 621, 1951.
 28. SUN, Y. P.; PANKASKIE, J. E. *Drosophila*, a sensitive insect for the microbioassay of insecticide residues. *J. Econ. Entomol.*, v. 47, n. 1, p. 180 - 181., 1954.
 29. JOSEPH Jr, H.; KNOBEL, M. G. Estudo preliminar da sensibilidade de moscas *Drosophila melanogaster* a diversos pesticidas organoclorados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 40, n. 1, p. 43 - 47, 1980.
 30. ALMEIDA, G. R.; REYES, F. G. R. Bioensaio com *Drosophila melanogaster* (Meig.): 1. Estudo da degradação e toxicidade do endosulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. (submetido para publicação em 10/1997).
 31. LAUG, E. P. A biological assay method for determining 2,2 bis (p-chlorophenyl)-1,1,1, trichloroethane (DDT). *Jour. Pharm. Exptl. Terap.*, v. 86, p. 324 - 331, 1946.
 32. LUKE, M. A.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 58, n. 5, p. 1020 - 1026, 1975.
 33. ALMEIDA, W. F. *Métodos prácticos para detección de resíduos de plaguicidas*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, México: 1987. 54p.

34. RUZO, L. O.; HOLMSTEAD, R. L.; CASIDA, J. E. Pyrethroid photochemistry: Decamethrin. *J. Agric. Food Chem.*, v. 25, n. 6, p. 1385 - 1394, 1977.
35. HARRIS, C. R. - Influence of temperature on the biological activity of insecticides in soil. *J. Econ. Entomol.* v. 64, p. 1044 - 1049, 1.971.
36. GUTHRIE, F. E. Effect of temperature on the toxicity of certain organic insecticides. *J. Econ. Entomol.*, v. 43, n. 4, p. 559 - 560, 1.950.
37. SPARKS, T. C.; PAVLOFF, A. M.; ROSE, R. L.; CLOWER, D. F. Temperature-toxicity relationships of pyrethroids on *Heliothis virescens* (F) (Lepdoptera: Noctuidae) and *Anthonomus grandis grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.*, v. 76, n. 2, p. 243 - 246, 1983.
38. SUN, Y. P.; JOHNSON, E. R. PANKASKIE, J. E. EARLE, N. W.; SUN, J. T. - Factors affecting residues-film bioassay of insecticide residues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 46, n. 3, p. 530 - 542, 1.963.
39. LICHTENSTEIN, E. P., MORGAN, D. G.; MUELLER, C. H. Naturally occurring insecticides in cruciferous crops. *J. Agric. Food Chem.*, v. 12, n. 2, p. 138 - 161, 1.964.
40. HORWITZ, W.; KAMPS, L. R.; BOYER, K. W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 63, p. 1344 - 1354, 1980
41. UNGARO, M. T. S.; GUINDANI, C. M. A.; FERREIRA, M. S.; BAGDONAS, M. Resíduos de inseticidas clorados e fosforados em frutas e hortaliças (III). *Biológico, São Paulo*, v. 53, n. 7/12, p. 51 - 56, 1987.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

1. Os inseticidas endosulfan, paration metílico, carbofuran e deltametrina, quando aplicados em placa de Petri, pelo método de filme seco, e mantidas durante 24 h nas temperaturas de 20, 25, 30, e 35 °C, degradam-se com o aumento da temperatura, sendo que a deltametrina e o carbofuran apresentam maior estabilidade do que o endosulfan e o paration metílico.
2. A toxicidade aguda (DL_{50}) dos inseticidas endosulfan, paration metílico, carbofuran e deltametrina, para as moscas *D. melanogaster*, aumenta com o aumento da temperatura (20 a 35 °C), sendo que para o endosulfan as fêmeas apresentam maior susceptibilidade do que os machos.
3. O bioensaio, pelo método do filme seco, com *D. melanogaster*, apresenta elevada sensibilidade (limite de determinação do método menor do que 0,1 mg/kg) para detecção de resíduos de endosulfan, paration metílico e deltametrina em couve e de carbofuran no repolho, ficando evidente a possibilidade de utilização desse organismo nos bioensaios destinados ao monitoramento de resíduos de inseticidas, nesta ou em outras matrizes.
4. Comparativamente aos métodos de determinação cromatográficos (CG e CLAE), o método de bioensaio apresenta baixo custo e simplicidade de execução sem comprometer o padrão de acuidade necessário para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

ANEXO 1

***Drosophila melanogaster*: 1. ESTUDO DA SUA SENSIBILIDADE AO ENSDOSULFAN**

RESUMO APRESENTADO:

**1 - VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA / II CONGRESSO DE
TOXICOLOGIA DO CONE SUL / REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO
MUNDIAL DE ASSOCIAÇÕES DE CONTROS DE TOXICOLOGIA
18 - 23 / 09 / 1993 - CURITIBA - PR**

**2 - IV AMOSTRA INTERNA DE TRABALHOS CIENTÍFICOS DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS / UNICAMP
18 - 20 / 10 / 1993 - CAMPINAS - SP**

Título: *Drosophila melanogaster*: 1. ESTUDO DA SUA SENSIBILIDADE AO
ENSDOSULFAN

Autores: ALMEIDA, G. R.; REYES, F. G. R.

Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S. P., Brasil

Apresentador: ALMEIDA, G. R.

A sensibilidade da *Drosophila melanogaster* (Meig.) ao endosulfan (produto formulado) foi determinada calculando-se a dose letal 50 (DL₅₀), para moscas machos e fêmeas, nas temperaturas de 20, 25, 30, 35 °C. Os testes foram realizados em placa de Petri, tamanho 50 x 20 mm, preparadas pelo método do filme seco, para cinco níveis de concentração diferentes do inseticida. As placas, contendo 20 *Drosophilas*, foram colocadas em dessecador e mantidas em estufa por 12 h para 35 °C e 24 h para 20, 25 e 30 °C. Os dados obtidos (Tab. 1) indicam que a sensibilidade da *Drosophila melanogaster* ao endosulfan foi semelhante nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C, tendo aumentado a 35 °C. Em geral, as fêmeas foram ligeiramente mais sensíveis do que os machos.

Tab. 1 - Toxicidade aguda do endosulfan para *Drosophila melanogaster* em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Valores de DL ₅₀ (mg/kg) ¹	
	Machos	Fêmeas
20	10,1 ± 0,7	6,3 ± 0,5
25	11,7 ± 1,0	8,1 ± 0,6
30	8,7 ± 0,3	5,9 ± 0,1
35	4,2 ± 0,1	2,8 ± 0,2

¹ Média ± desvio padrão para 5 experimentos.

RESUMO APRESENTADO NO VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA / II
CONGRESSO DE TOXICOLOGIA DO CONE SUL / REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO
MUNDIAL DE ASSOCIAÇÕES DE CENTROS DE TOXICOLOGIA.

CURITIBA - PR, 18 - 23 / 09 / 1993



VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA
II CONGRESSO DE TOXICOLOGIA DO CONE SUL
REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO MUNDIAL DE
ASSOCIAÇÕES DE CENTROS DE TOXICOLOGIA
18 A 23 DE SETEMBRO DE 1993 - CURITIBA - PR

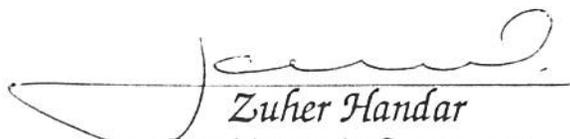
Certificado

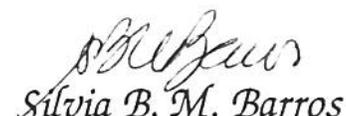
Certificamos que o trabalho DROSOPHILA MELANOGASTER: 1. ESTUDO DA
SUA SENSIBILIDADE AO ENDOSSULFAN.

de autoria de Almeida, G.R.; Reyes, F.G.R.

foi apresentado no VIII CONGRESSO BRASILEIRO
DE TOXICOLOGIA.

Curitiba, 23 de setembro de 1993


Zuhier Handar
Presidente do Congresso


Sílvia B. M. Barros
Presidente da S.B.T.

APOIO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO REGIONAL DO NORTE DO PARANÁ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA



UNICAMP

**IV MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS CIENTÍFICOS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

CERTIFICADO

Certificamos que foi apresentado na IV MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS CIENTÍFICOS, realizada nos dias 18 a 20 de outubro de 1993, o poster: "*Drosophila melanogaster: Estudo da sua sensibilidade ao endossulfan*", de autoria de: Almeida, G.; Reyes, F.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
Campinas, 14 de setembro de 1994

Antonio José de Almeida Meirelles
Coordenador do Evento

Walter Esteves
Diretor da FEA

ANEXO 2

Drosophila melanogaster: 2. ESTUDO DA SUA SENSIBILIDADE AO PARATION METÁLICO

RESUMO APRESENTADO:

1 - VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA / II CONGRESSO DE
TOXICOLOGIA DO CONE SUL / REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO
MUNDIAL DE ASSOCIAÇÕES DE CONTROS DE TOXICOLOGIA
18 - 23 / 09 / 1993 - CURITIBA - PR

2 - IV AMOSTRA INTERNA DE TRABALHOS CIENTÍFICOS DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS / UNICAMP
18 - 20 / 10 / 1993 - CAMPINAS - SP

TÍTULO: *Drosophila melanogaster*. 2. ESTUDO DA SUA SENSIBILIDADE AO PARATION METILICO.

Autores: REYES, F. G. R.; ALMEIDA, G. R.

Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S. P., Brasil

Apresentador: REYES, F. G. R.

A sensibilidade da *Drosophila melanogaster* (Meig.) ao paration metílico (produto formulado) foi determinada calculando-se a dose letal 50 (DL₅₀), para moscas machos e fêmeas, nas temperaturas de 20, 25, 30, 35 °C. Os testes foram realizados em placa de Petri, tamanho 50 x 20 mm, preparadas pelo método do filme seco, para cinco níveis de concentração diferentes do inseticida. As placas, contendo 20 *Drosophilas*, foram colocadas em dessecador e mantidas em estufa por 12 h para 35 °C e 24 h para 20, 25 e 30 °C. Os dados obtidos (Tab. 1) indicam que a sensibilidade da *Drosophila melanogaster* ao paration metílico aumentou paralelamente ao aumento da temperatura.

Tab. 1 - Toxicidade aguda do paration metílico para *Drosophila melanogaster* em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Valores de DL ₅₀ (mg/kg) ¹	
	Machos	Fêmeas
20	10.5 ± 1.2	9,5 ± 0.6
25	6.5 ± 0.9	6,3 ± 0.8
30	5.8 ± 0.7	5,2 ± 0.4
35	3.0 ± 0.1	3,0 ± 0.3

¹Média ± desvio padrão para 5 experimentos.

RESUMO APRESENTADO NO VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA / II
CONGRESSO DE TOXICOLOGIA DO CONE SUL / REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO
MUNDIAL DE ASSOCIAÇÕES DE CENTROS DE TOXICOLOGIA.

CURITIBA - PR, 18 - 23 / 09 / 1993



VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA
II CONGRESSO DE TOXICOLOGIA DO CONE SUL
REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO MUNDIAL DE
ASSOCIAÇÕES DE CENTROS DE TOXICOLOGIA
18 A 23 DE SETEMBRO DE 1993 - CURITIBA - PR

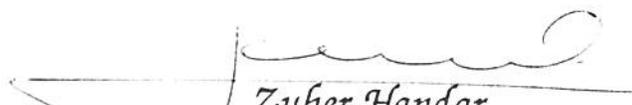
Certificado

Certificamos que o trabalho DROSOPHILA MELANOGASTER: 2. ESTUDO DA
SUA SENSIBILIDADE AO PARATHION METÁLICO.

de autoria de Reyes, F.G.R.; Almeida, G.R.

foi apresentado no VIII CONGRESSO BRASILEIRO
DE TOXICOLOGIA.

Curitiba, 23 de setembro de 1993


Zuhier Handar
Presidente do Congresso


Silvia B. M. Barros
Presidente da S.B.T.

APOIO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO REGIONAL DO NORTE DO PARANÁ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA



UNICAMP

IV MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS CIENTÍFICOS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CERTIFICADO

Certificamos que foi apresentado na IV MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS CIENTÍFICOS, realizada nos dias 18 a 20 de outubro de 1993, o poster: "*Drosophila melanogaster: Estudo da sua sensibilidade ao parathion metílico*", de autoria de: Reyes, F.; Almeida, G.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
Campinas, 14 de setembro de 1994

Antonio José de Almeida Meirelles
Coordenador do Evento

Walter Esteves
Diretor da FEA

Titulo: *Drosophila melanogaster*: 3. ESTUDO DA SUA SENSIBILIDADE AO CARBOFURAN

Autores: Almeida, G.R.; Reyes, F.G.R.

Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S.P., Brasil

Apresentador: Almeida, G.R.

A sensibilidade da *Drosophila melanogaster* (Meig.) ao carbofuran (produto formulado) foi determinada calculando-se a dose letal 50 (DL₅₀), para moscas machos e fêmeas, nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C. Os testes foram realizados em placa de Petri, tamanho 50 x 20 mm, preparadas pelo método do filme seco, para cinco níveis de concentração diferentes do inseticida. As placas, contendo 20 *Drosophilas*, foram colocadas em dessecador e mantidas em estufa por 12 h para 35 °C e 24 h para 20, 25 e 30 °C. Os dados obtidos (Tab. 1) indicam que a sensibilidade da *Drosophila melanogaster* ao carbofuran foi semelhante para fêmeas e machos e que aumentou paralelamente com o aumento da temperatura.

Tab.1 - Toxicidade aguda do carbofuran para *Drosophila melanogaster* em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Valores de DL ₅₀ (mg/kg) ⁽¹⁾	
	Machos	Fêmeas
20	10.5 ± 0.8	8.7 ± 0.4
25	5.3 ± 0.7	4.9 ± 0.8
30	4.8 ± 0.9	3,9 ± 0.3
35	3.6 ± 0.3	2,9 ± 0.5

(1) Média ± desvio padrão para 5 experimentos.

RESUMO APRESENTADO NO VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA / II
CONGRESSO DE TOXICOLOGIA DO CONE SUL / REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO
MUNDIAL DE ASSOCIAÇÕES DE CENTROS DE TOXICOLOGIA.

CURITIBA - PR, 18 - 23 / 09 / 1993



VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA
II CONGRESSO DE TOXICOLOGIA DO CONE SUL
REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO MUNDIAL DE
ASSOCIAÇÕES DE CENTROS DE TOXICOLOGIA
18 A 23 DE SETEMBRO DE 1993 - CURITIBA - PR

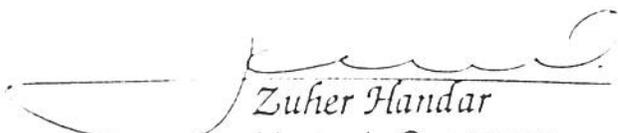
Certificado

Certificamos que o trabalho DROSOPHILA MELANOGASTER: 3. ESTUDO DA
SUA SENSIBILIDADE AO CARBOFURAN.

de autoria de Almeida, G.R.; Reyes, F.G.R.

foi apresentado no VIII CONGRESSO BRASILEIRO
DE TOXICOLOGIA.

Curitiba, 23 de setembro de 1993


Zuber Handar
Presidente do Congresso


Sílvia B. M. Barros
Presidente da S.B.T.



UNICAMP

IV MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS CIENTÍFICOS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CERTIFICADO

Certificamos que foi apresentado na IV MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS CIENTÍFICOS, realizada nos dias 18 a 20 de outubro de 1993, o poster: "*Drosophila melanogaster*: Estudo da sua sensibilidade ao carbofuran", de autoria de: Almeida, G.; Reyes, F.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
Campinas, 14 de setembro de 1994

Antonio José de Almeida Meirelles
Coordenador do Evento

Walter Esteves
Diretor da FEA

ANEXO 4

***Drosophila melanogaster*: 4. ESTUDO DA SUA SENSIBILIDADE A DELTAMETRINA**

RESUMO APRESENTADO:

**1 - VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA / II CONGRESSO DE
TOXICOLOGIA DO CONE SUL / REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO
MUNDIAL DE ASSOCIAÇÕES DE CONTROS DE TOXICOLOGIA
18 - 23 / 09 / 1993 - CURITIBA - PR**

**2 - IV AMOSTRA INTERNA DE TRABALHOS CIENTÍFICOS DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS / UNICAMP
18 - 20 / 10 / 1993 - CAMPINAS - SP**

TÍTULO: *Drosophila melanogaster*: 4. ESTUDO DA SUA SENSIBILIDADE A
DELTAMETRINA

AUTORES: REYES, F. G. R ; ALMEIDA, G. R.

Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S. P., Brasil

APRESENTADOR: REYES, F. G. R

A sensibilidade da *Drosophila melanogaster* (Meig.) a deltametrina (produto formulado) foi determinada calculando-se a dose letal 50 (DL₅₀), para moscas machos e fêmeas, nas temperaturas de 20, 25, 30, 35 °C. Os testes foram realizados em placa de Petri, tamanho 50 x 20 mm, preparadas pelo método do filme seco, para cinco níveis de concentração diferentes do inseticida. As placas, contendo 20 *Drosophilas*, foram colocadas em dessecador e mantidas em estufa por 12 h para 35 °C e 24 h para 20, 25 e 30 °C. Os dados obtidos (Tab. 1) indicam que a sensibilidade da *Drosophila melanogaster* à deltametrina foi semelhante em todas as temperaturas, entretanto aumentando a toxicidade com o aumento da temperatura.

Tab. 1 - Toxicidade aguda da deltametrina para *Drosophila melanogaster* em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Valores de DL ₅₀ (mg/kg) ¹	
	Machos	Fêmeas
20	0.72 ± 0.12	0.96 ± 0.20
25	0.71 ± 0.10	0.89 ± 0.17
30	0.64 ± 0.07	0.73 ± 0.13
35	0.36 ± 0.04	0.34 ± 0.02

¹ Média ± desvio padrão para 5 experimentos

RESUMO APRESENTADO NO VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA / II
CONGRESSO DE TOXICOLOGIA DO CONE SUL / REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO
MUNDIAL DE ASSOCIAÇÕES DE CENTROS DE TOXICOLOGIA.

CURITIBA - PR, 18 - 23 / 09 / 1993



VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA
II CONGRESSO DE TOXICOLOGIA DO CONE SUL
REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO MUNDIAL DE
ASSOCIAÇÕES DE CENTROS DE TOXICOLOGIA

18 A 23 DE SETEMBRO DE 1993 - CURITIBA - PR

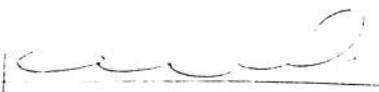
Certificado

Certificamos que o trabalho DROSOPHILA MELANOGASTER: 4. ESTUDO DA
SUA SENSIBILIDADE A DELTAMETRINA.

de autoria de Reyes, F.G.R.; Almeida, G.R.

foi apresentado no VIII CONGRESSO BRASILEIRO
DE TOXICOLOGIA.

Curitiba, 23 de setembro de 1993


Zuhier Handar
Presidente do Congresso


Silvia B. M. Barros
Presidente da S.B.T.



UNICAMP

IV MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS CIENTÍFICOS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CERTIFICADO

Certificamos que foi apresentado na IV MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS CIENTÍFICOS, realizada nos dias 18 a 20 de outubro de 1993, o poster: "*Drosophila melanogaster: Estudo da sua sensibilidade a deltametrina*", de autoria de: Reyes, F.; Almeida, G.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
Campinas, 14 de setembro de 1994

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio José de Almeida Meireilles'.

Antonio José de Almeida Meireilles
Coordenador do Evento

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Walter Esteves'.

Walter Esteves
Diretor da FEA

ANEXO 5

BIOMONITORAMENTO COM *Drosophila melanogaster* (Meig.) PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ENDOSULFAN EM COUVE

RESUMO APRESENTADO NO IX CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA

03 - 08 / 09 / 1995 - RIBEIRÃO PRETO - SP

BIOMONITORAMENTO COM *Drosophila melanogaster* (Meig.) PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ENDOSULFAN EM COUVE.

Almeida, G. R.; Reyes, F. G. R.

Fac. Adventista de Biologia / Instituto Adventista de Ensino, SP.;

Fac. de Engenharia de Alimentos / Unicamp, Campinas, SP.

Endosulfan, agrotóxico utilizado no combate aos insetos, foi aplicado em couve (*Brassica oleracea*, var. *acephala*), na proporção de 437 g do ingrediente ativo/ha. Amostras foram coletadas em intervalos diferentes de tempos e os resíduos do inseticida extraídos com acetona/água (2:1), quantificados por cromatografia gasosa (Luke e cols. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58(5): 1020 - 1026, 1.975) e submetidos a bioensaio com *Drosophila melanogaster*. O bioensaio foi realizado em placa de Petri, 50 x 20 mm, temperatura de 30 °C, pelo método do filme seco. Nessas condições, quando comparados o método químico com o bioensaio verificou-se que a sensibilidade das *Drosophilas* para detectar os resíduos de endosulfan foi, em média, 0,09 mg/kg para os machos e 0,05 mg/kg para as fêmeas. Embora o uso de endosulfan não seja permitido em couve, isto não , garantia da ausência de seus resíduos, já que o uso indevido deste agrotóxico tem sido reportado em diferentes culturas, justificando portanto o seu monitoramento. Os dados obtidos indicam que, devido a alta sensibilidade do teste com *Drosophilas* para detecção de resíduos de endosulfan, aliada sua fácil execução e baixo custo, esse bioensaio pode ser considerado uma técnica apropriada para o monitoramento de resíduos de endosulfan em alimentos.

Apoio Financeiro: CAPES

RESUMO APRESENTADO NO IX CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA

RIBEIRÃO PRETO - SP, 03 - 08 / 09 / 95

IX CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA

Certificado

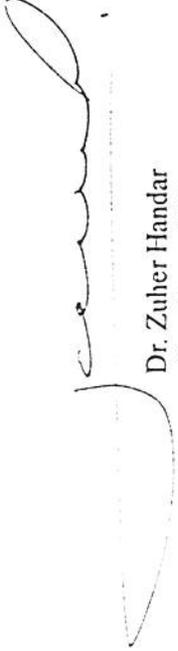
Certificamos que o trabalho subordinado ao título **BIOMONITORAMENTO COM Drosophila melanogaster (Meigen) PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ENDOSULFAN EM COUVE.**

de autoria de Almeida, G.R.; Reyes, F.G.R.

foi apresentado durante a Sessão de Temas Livres, dia 07 de setembro de 1995, por ocasião do IX CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA, realizado no período de 03 a 08 de setembro de 1995, aprovado pela Sociedade Brasileira de Toxicologia, promovido pela Associação Latinoamericana de Toxicologia e Universidade de Ribeirão Preto.

Ribeirão Preto, 08 de setembro de 1995.


Dra. Myriam Clara Salvadori
Secretária SBT


Dr. Zuher Handar
Presidente SBT


Prof. Dr. Dermeval de Carvalho
Presidente IX CBT

ANEXO 6

BIOMONITORAMENTO COM *Drosophila melanogaster* (Meig.) PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DA DELTAMETRINA EM COUVE

RESUMO APRESENTADO NO IX CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA

03 - 08 / 09 / 1995 - RIBEIRÃO PRETO – SP

BIOMONITORAMENTO COM *Drosophila melanogaster* (Meig.) PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DA DELTAMETRINA EM COUVE.

Reyes, F. G. R.; Almeida, G. R.

Faculdade de Engenharia de Alimentos / Unicamp, Campinas, SP.

Faculdade Adventista de Biologia / Instituto Adventista de Ensino, SP.

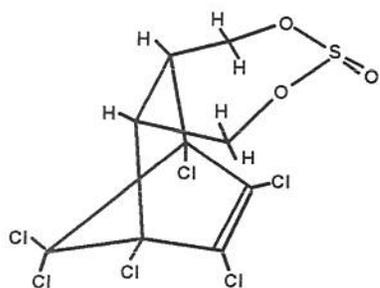
Deltametrina, agrotóxico do grupo piretróide sintético amplamente utilizado no combate aos insetos, foi aplicado em couve (*Brassica oleracea*, var. *acephala*), na proporção de 6,0 g do ingrediente ativo/ha. Amostras foram coletadas em intervalos diferentes de tempos e os resíduos do inseticida, extraídos com acetona/água (2:1), quantificados por cromatografia gasosa (Luke e cols. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58(5): 1020 - 1026, 1.975) e submetidos a bioensaio com *Drosophila melanogaster*. O bioensaio foi realizado em placa de Petri, 50 x 20 mm, temperatura de 30 °C, pelo método do filme seco. Nessas condições, quando comparados o método químico com o bioensaio, verificou-se que a sensibilidade das *Drosophilas* para detectar os resíduos de deltametrina foi, em média, 0,020 mg/kg para os machos e 0,013 mg/kg para as fêmeas. Os dados obtidos indicam que, devido a alta sensibilidade do teste com *Drosophilas* para detecção de resíduos de Deltametrina, aliada sua fácil execução e baixo custo, esse bioensaio pode ser considerado uma técnica apropriada para o monitoramento de resíduos de deltametrina em alimentos.

Apoio Financeiro: CAPES

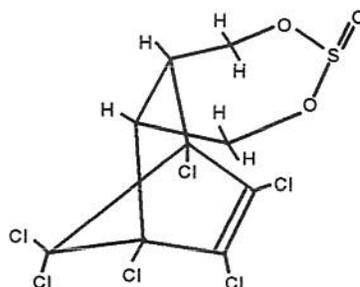
RESUMO APRESENTADO NO IX CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA
RIBEIRÃO PRETO - SP, 03 - 08 / 09 / 95

ANEXO 7

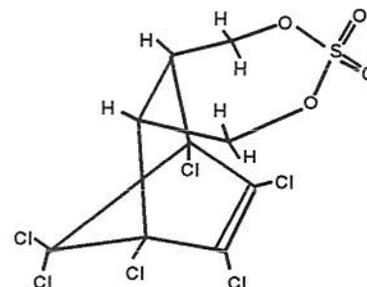
Estruturas do alfa- e beta-endosulfan, endosulfan sulfato, paration metílico, carbofuran e deltametrina



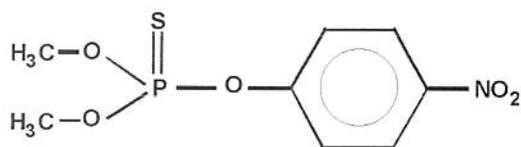
Alfa-endosulfan



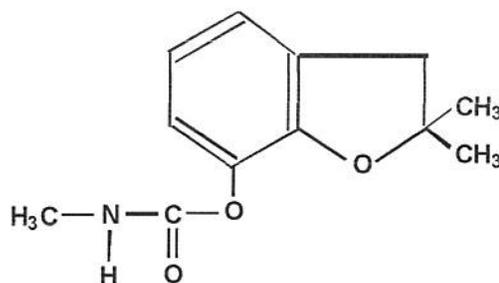
Beta-endosulfan



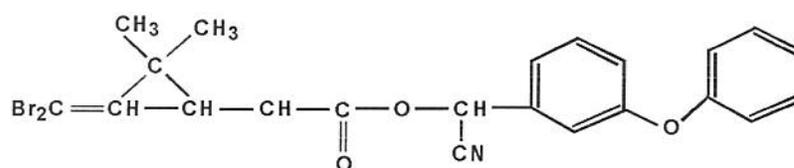
Endosulfan sulfato



Paration metílico



Carbofuran



Deltametrina

Estruturas do alfa- e beta-endosulfan, endosulfan sulfato, paration metílico, carbofuran e deltametrina

ANEXO 8

Cromatogramas

ANEXO 8

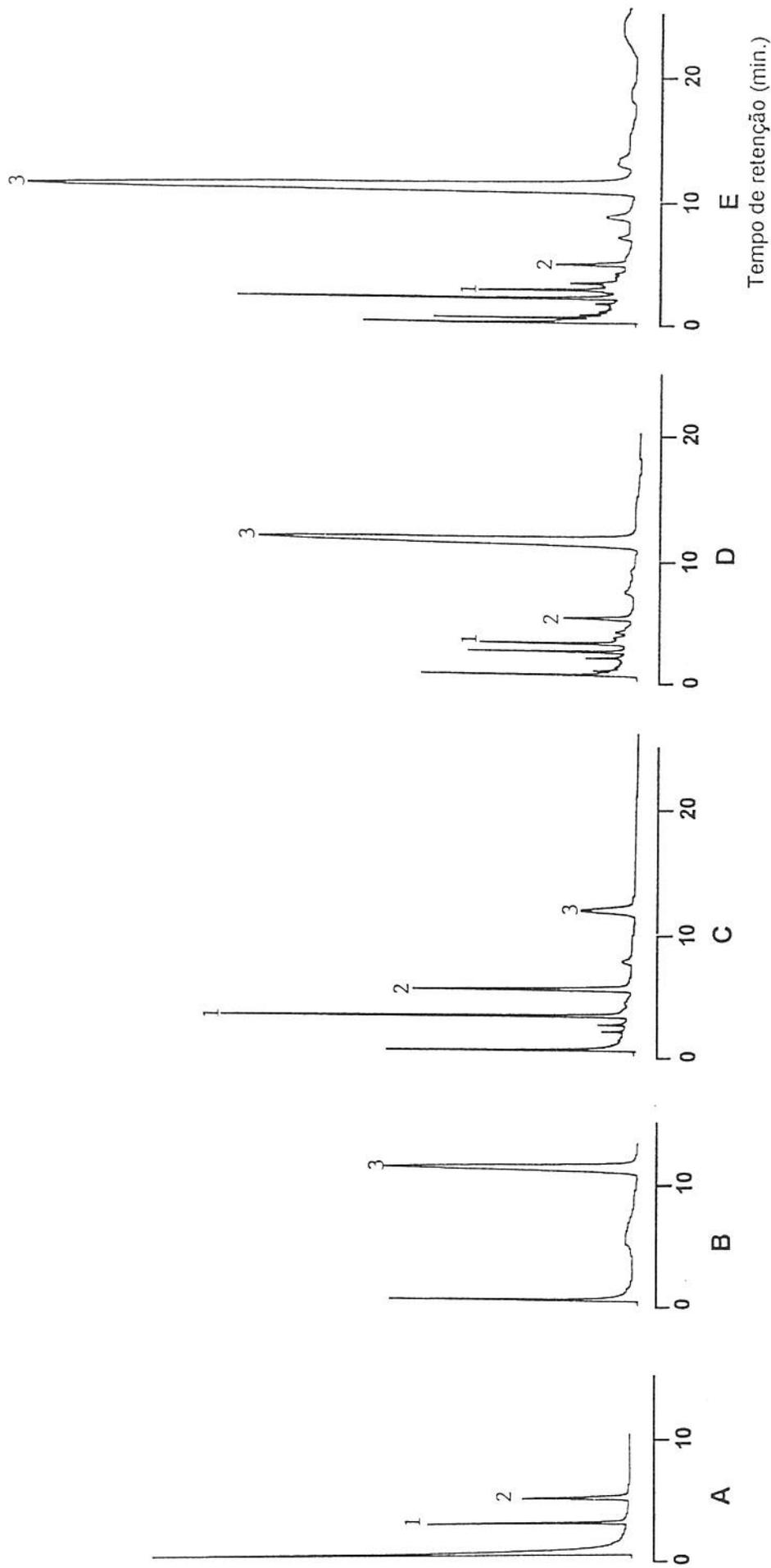


Figura 1A - Separação cromatográfica do endosulfan em extrato de couve. Padrão (A: alfa- e beta-endosulfan; B: endosulfan sulfato) e extrato de couve (C: 3^o dia; D: 10^o dia e E: 17^o dia)

Coluna: Megabore DB1; Fase móvel: N₂ a 20 mL/min.; Temperatura: isotérmica a 200 °C; Detecção: captura de elétrons;

Amostra: 1: alfa-endosulfan; 2: beta-endosulfan; 3: endosulfan sulfato.

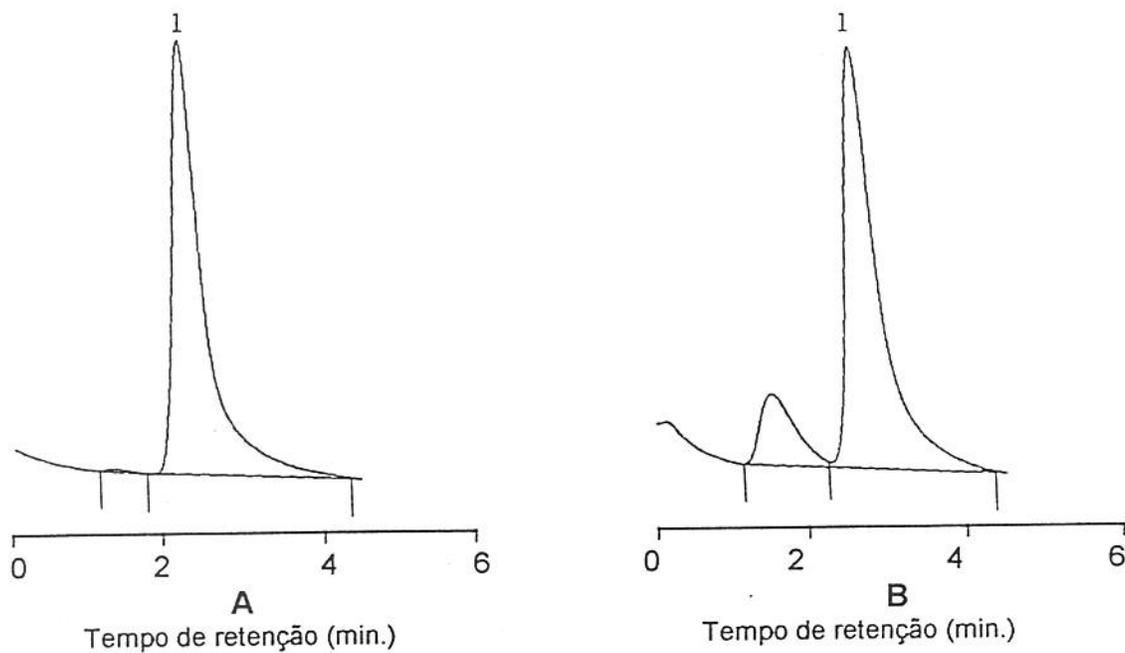


Figura 2A - Separação cromatográfica do paration metílico em extrato de couve. (A) padrão e (B) extrato de couve

Coluna: 10 % SE-30 em Chromosorb 100 – 120 mesh

Fase móvel: N₂ a 40 mL/min.; Ar a 120 mL/min.; H₂ a 5 mL/min.

Temperatura: isotérmica a 200 °C

Deteção: termiônica específica (TSD, pérola 6,4)

Amostra: 1: paration metílico.

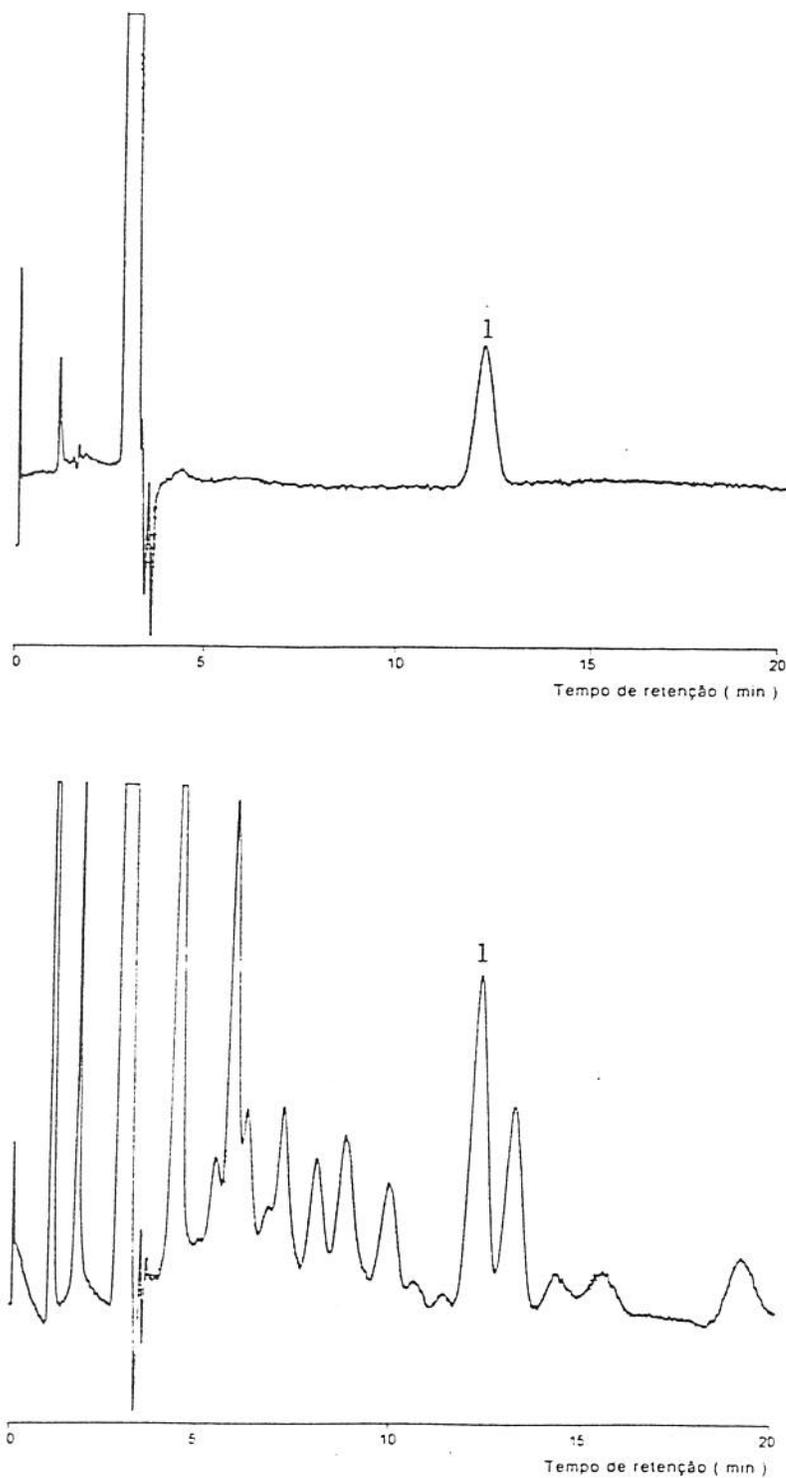


Figura 3A – Separação cromatográfica do carbofuran. (A) padrão e (B) extrato de repolho.

Coluna: C₁₈ Lichrocart

Fase móvel: acetonitrila:água (50:50) a 0,5 mL/min.

Deteção: por absorvância no UV (220 nm)

Amostra: 1: carbofuran.

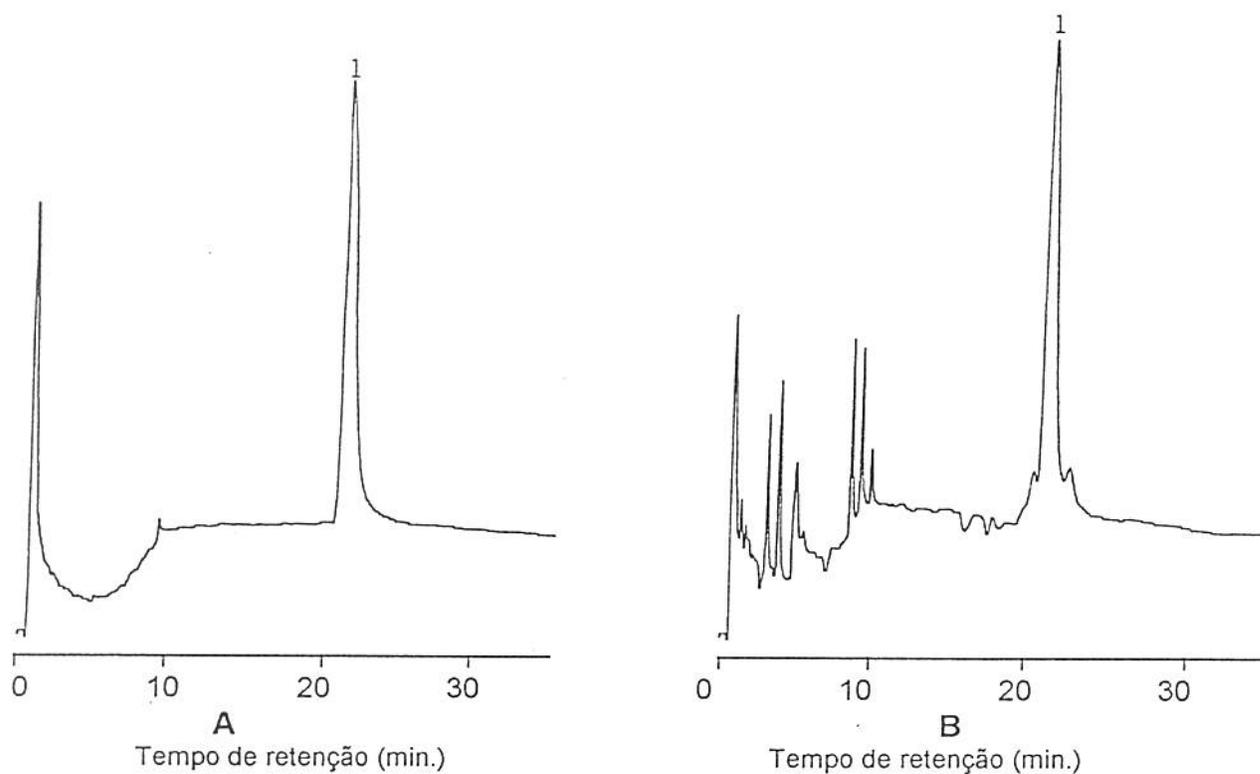


Figura 4A – Separação cromatográfica da deltametrina. (A) padrão e (B) extrato de couve.

Coluna: Megabore DB1

Fase móvel: N₂ a 10 mL/min.

Temperatura: isotérmica a 200 °C por 5 min., depois programada a 240 °C em 10 °C/min.

Deteccão: por captura de elétrons

Amostra: 1: deltametrina