

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

UTILIZAÇÃO DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO BIOINDICADOR NA AVALIAÇÃO DA LETALIDADE DE EXTRATO DE *NICOTIANA TABACUM*C. Moratore¹, M. Devicari¹, S.S. Cunha², D. Barcelos²¹Instituto Butantan, Departamento de Parasitologia, Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: moratorec@usp.br

RESUMO

Nicotiana tabacum Linnaeus é uma planta de importância econômica, explorada comercialmente em todo o mundo. Quimicamente, destaca-se pela presença de alcalóides pirimidínicos, como a anabasina e a nicotina, além de esteroides, cumarinas e terpenos. O objetivo do estudo foi verificar a concentração do extrato aquoso do tabaco que mata aproximadamente 50% da população do bioindicador *Drosophila melanogaster* Morgan em 24h (CL₅₀). Foram utilizados o total de 689 indivíduos da linhagem selvagem de *D. melanogaster* que foram expostos às concentrações 0, 5, 10 e 15% do extrato aquoso de tabaco. A mortalidade dos indivíduos foi contabilizada em 24h e 48h após aplicação do extrato. Os resultados obtidos mostraram que o extrato aquoso de *N. tabacum* promove morte dos indivíduos em todas as concentrações testadas. Em 24h, o extrato aquoso na concentração a 10% matou 50% das moscas. Houve uma correlação entre o aumento da concentração de fumo com aumento da mortalidade. Estes resultados reforçam a relevância das investigações sobre o tabaco, devido a suas propriedades tóxicas e por ser consumido por milhões de pessoas no mundo.

PALAVRAS-CHAVE: CL₅₀, *Nicotiana tabacum*, inseticida, *Drosophila melanogaster*, bioindicador.

ABSTRACT

USE OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* AS BIOINDICATORS IN THE EVALUATION OF THE LETHALITY OF EXTRACTS OF *NICOTIANA TABACUM*. *Nicotiana tabacum* Linnaeus is a plant of economic importance, raised commercially throughout the world. Chemically, there is the presence of pyrimidine alkaloids, such as anabasina and nicotine, along with steroids, coumarins and terpenes. The present study was aimed to measure the concentration of the aqueous extract of tobacco that will kill approximately 50% of the population of bioindicator *Drosophila melanogaster* Morgan in 24 hours (LC₅₀). A total of 689 individuals from the wild strain of *D. melanogaster* were exposed to the tobacco aqueous extract at concentrations of 0, 5, 10 and 15%. Mortality of individuals was recorded at 24h and 48h after exposure to the extract. The results showed that the aqueous extract of *N. tabacum* promoted death of individuals at all concentrations tested. In 24 hours, the 10% solution killed 50% of the flies. There was a correlation between increased solution concentration and increased mortality. These results underscore the relevance of research on tobacco, due to its toxic properties and its being consumed by millions of people around the world, along with the use of *D. melanogaster* as an efficient bioindicator organism due to its easy maintenance and large number of individuals.

KEY WORDS: LC₅₀, *Nicotiana tabacum*, insecticide, *Drosophila melanogaster*, bioindicator.

O tabaco (*Nicotiana tabacum*) é uma planta de importância econômica explorada comercialmente em todo o mundo. Também é utilizada como inseticida na agricultura e vermífugo na pecuária. Possui alcalóides pirimidínicos, como nicotina e anabasina, além de esteroides, cumarinas e terpenos (HUNZIKER, 1979).

Tanto o tabaco quanto a nicotina (um dos componentes do tabaco) foram denominados por Jean Nicot, um embaixador de Portugal, que enviou sementes de tabaco para Paris, em 1550. A nicotina é um composto orgânico e é um alcaloide presente no tabaco. Em 1571 já era conhecida em seu estado bruto e o produto purificado foi obtido em 1828. A nicotina está presente

²Universidade Guarulhos, Departamento de Ciências Biológicas, Guarulhos, SP, Brasil.

em toda a planta do tabaco, e pode agir de duas maneiras distintas: inicialmente tem um efeito estimulante e, após inalação profunda, tem efeito tranquilizante, bloqueando o stress. Seu uso causa dependência psíquica e física, provocando sensações desconfortáveis na abstinência. Em doses excessivas, é extremamente tóxica e pode provocar náusea, dores de cabeça, vômitos, convulsões, paralisia e até a morte. Em humanos, a dose letal (LD_{50}) de nicotina situa-se entre 40 a 60 mg/kg, sendo que um cigarro contém de 0,3 a 1 mg (ROSEMBERG, 1981).

A nicotina pode estar envolvida no câncer dos pulmões (RAIMONDI et al., 2006; BLONS et al., 2006), ser fator de risco no declínio coronariano (TAYLOR et al., 2006) no aumento da pressão arterial, em disfunções no sistema respiratório e no sistema digestório (PLETCHER et al., 2006) além de ter efeitos degenerativos em certos tipos de doenças como Parkinson (O'REILLY et al., 2005) e Alzheimer (BARRANCO-QUINTANA et al., 2005; COURT et al., 2000).

O efeito biológico dos componentes do tabaco tem sido avaliado em grande número de modelos animais. Entre esses modelos estão incluídos mamíferos e insetos, mas dípteros do gênero *Drosophila* ainda não foram incluídos nesses estudos. Apesar da utilização de *Drosophila melanogaster* como bioindicador ser conhecida e utilizada na análise ambiental (PANTALEÃO et al., 2006), nas avaliações de toxicidade (OUCHI et al., 2007) e genotoxicidade ainda são poucos os trabalhos que a utilizam como bioindicador de CL_{50} .

Este gênero de moscas é muito utilizado para as pesquisas genéticas, pois, além do baixo custo para sua manutenção, produz grande número de descendentes viáveis do ponto de vista reprodutivo por cruzamento, mecanismo genético simples e comum a muitos animais, incluindo o homem, e facilidade na análise dos resultados. A *Drosophila* foi introduzida ao mundo da genética em 1909 no laboratório de T.H. Morgan na Universidade de Columbia em Nova York. Desde então intensas pesquisas a tornaram um dos eucariontes mais bem compreendidos (NUSTAD; SIMMONS, 2001). No Brasil, em 1943, os levantamentos pioneiros no Estado de São Paulo foram realizados pelo pesquisador visitante Theodosius Dobzhansky e pelo professor Crodowaldo Pavan (PAVAN; CUNHA, 2003).

Recentemente, o gênero *Drosophila* foi empregado como bioindicador, conforme observado em ALMEIDA et al. (1999; 2001), que utilizaram indivíduos desse gênero em seu bioensaio submetendo-os ao inseticida carbofuran e também em HIRATA et al. (2002), ao testar esse e outros inseticidas organofosforados. Considerando-se a importância do tabaco e a utilidade de *Drosophila* como organismo-modelo, propôs-se neste trabalho a utilização de *D. melanogaster* como

bioindicador para verificar a concentração que mata aproximadamente 50% da população em 24h (CL_{50}), do extrato aquoso de *N. tabacum*.

Foram utilizados indivíduos de *D. melanogaster* da linhagem selvagem, mantidos a temperatura ambiente em frascos de vidro contendo meio de cultura ágar-banana preparado conforme protocolo STRICKBERGER (1962). O meio de cultura contaminado foi preparado com a substituição da água destilada pelo extrato aquoso de *N. tabacum* na concentração pretendida. Foram mantidos alguns indivíduos em meio controle padrão de "ágar-banana". O fumo de corda utilizado para o experimento foi adquirido em feira popular na região central do Município de Guarulhos, SP.

Para a obtenção do extrato aquoso na concentração a 15% foram adicionados 225 g de fumo de corda a 1.500 mL de água destilada por 12 horas em recipiente fechado para a extração dos compostos hidrossolúveis, conforme metodologia proposta por THOMAZINI, et al. (2000). Após esse período a mistura foi filtrada e armazenada em frascos fechados até a preparação do meio. A diluição para determinar a CL_{50} foi feita obtendo o extrato aquoso a 15% a partir do qual foram obtidas, por diluição, as concentrações menores de 10% e 5%.

Neste estudo foram utilizados 689 indivíduos, 67 permaneceram no meio padrão de "ágar-banana" sem exposição ao tabaco, os demais foram expostos às concentrações 5, 10 e 15%, respectivamente, 203, 202 e 217 indivíduos. A mortalidade dos indivíduos foi contabilizada em dois momentos: 24h e 48h após aplicação do extrato de tabaco.

Os dados obtidos estão demonstrados na Tabela 1 e nos gráficos da Figura 1. O teste de hipóteses aqui realizado indicou que o extrato de *N. tabacum* provocou mortalidade de indivíduos de *D. melanogaster* nas 3 concentrações utilizadas. A mortalidade no grupo controle foi igual a zero, o que reforça a hipótese de que o extrato de tabaco possui efeito letal.

O resultado obtido permitiu estimar que a concentração de 10% do extrato é a CL_{50} . Nos gráficos que descrevem os resultados de 24h é possível verificar correlação direta entre a concentração do extrato com a mortalidade dos indivíduos. Os gráficos indicaram ainda que a correlação observada entre a concentração do extrato do tabaco e a mortalidade dos indivíduos, também foi válida para o intervalo de tempo de 48hs.

Assim como observado aqui, trabalhos semelhantes também apontaram efeitos deletérios de extratos de tabaco sobre insetos. TIWARI et al. (1995) testaram o efeito inseticida do tabaco utilizando um extrato rico em alcalóides, obtido de *N. tabacum*, que produziu mortalidade de 20.000 a 50.000 ppm em *Tribolium castaneum*, conhecido como besouro da farinha. Em estudo feito com pulgão-da-couve (*Brevicoryne*

brassicae), utilizando extrato de *N. tabacum* a 10%, foi obtido efeito inseticida das substâncias do extrato sobre o inseto não permitindo sua transição para fase adulta e impedindo sua reprodução (LOVATTO *et al.*, 2004).

Efeitos adversos de substâncias de *N. tabacum* também foram verificados em mamíferos. Estudos utilizando ratos Wistar mostraram que a nicotina atua no aumento de áreas de necrose quando utilizada no pré-operatório e que a continuidade do seu uso no pós-operatório contribuiu para aumentar a necrose dos fragmentos de pele estudados (GOMES *et al.*, 1994). MEDEIROS *et al.* (2003a) concluíram que a utilização da nicotina por via subcutânea, também em ratos, exerce efeito deletério sobre a cicatrização de lesões da parede abdominal. Mesmo quando utilizada por via subcutânea, a nicotina atinge os pulmões à distância, provocando lesões nos brônquios, bronquíolos, septos alveolares e alvéolos (MEDEIROS *et al.*, 2003b).

A análise conjunta dos dados da literatura e dos presentes resultados leva a crer que há inúmeras situações em que o tabaco é prejudicial aos organismos. Novos estudos deverão ser feitos para identificar quais substâncias seriam responsáveis por tal mortandade e qual seu mecanismo de ação nesses organismos bioindicadores. Os presentes resultados reforçam a relevância das investigações sobre o tabaco, devido a suas propriedades tóxicas e por ser consumido por milhões de pessoas no mundo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Lincoln Suesdek Rocha, do Instituto Butantan, Departamento de Parasitologia, pela colaboração no desenvolvimento dos trabalhos. Ao Professor Ricardo da Silva Seabra, da Universidade Guarulhos, pelo auxílio com a análise estatística dos dados.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G.R.; REYES, F.G.R.; RATH, S. 1. *Drosophila melanogaster* Meigen: Sensibilidade ao Carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.58, n.2, p.15-24, 1999.

ALMEIDA, G.R.; REYES, F.G.R.; RATH, S. 3. *Drosophila melanogaster* Meigen: Sensibilidade ao Carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Química Nova*, v.24, n.6, p.768-72, 2001.

BARRANCO-QUINTANA, J.L.; ALLAM, M. F.; DEL CASTILLO, A.S.; NAVAIAIS, R.F. Risk factors for Alzheimer's disease. *Revista de Neurología*, v.40, n.10, p. 613-618, 2005.

BLONS, H.; COTE, J.F.; LE CORRE, D.; RIQUET, M.; FABRE-GUILEVIN, E.; LAURENT-PUIG, P.; DANIEL, C. Epidermal growth factor receptor mutation in lung cancer are linked to bronchioloalveolar differentiation. *American Journal of Surgical Pathology*, v.30, p.1309- 1315, 2006.

COURT, J.A.; PIGGOTT, M.A.; LLOYD, S.; COOKSON, N.; BALLARD, C.G.; MCKEITH, J.G.; PERRY, R.H.; PERRY, E.K. Nicotine binding in human striatum: elevation in schizophrenia and reductions in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Alzheimer's disease and in relation to neuroleptic medication. *Neuroscience*, v.98, p.79-87, 2000.

GOMES, H. CARVALHO; BUENO, P. C. S; SCARDOELI, C. A. C; LANDMAN, M. R. L; ISHIZUKA, M. M. A.; MARTINS, D. M. F. S; ANDREWS, J. M. Effect of nicotine in randomized skin flaps in rats. *Revista do Hospital São Paulo - Escola Paulista de Medicina*, v.5, n.3/4, p.13-17, 1994.

HIRATA, R.; DIAS, S.S.; ROSA, A.R. Detecção de inseticidas por bioensaio com *Drosophila melanogaster*. *Arquivos do Instituto biológico*, São Paulo, v.69, p.97-102, 2002.

HUNZIKER, A.T. South American Solanaceae: a synoptic survey. In: HAWKES, J.G.; LESTER, R.N.; SKELDING, A.D. (Ed). *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. London: Academic Press, 1979. p.49-85.

LOVATTO, P.B.; GOETZE, M.; THOMÉ, G.C.H. Efeito de extratos de plantas silvestres da família *Solanaceae* sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*). *Ciência Rural*, v.34, n.4, 2004.

MEDEIROS A.C.; LIMA, F.P.; DANTAS FILHO, A.M.; MELO, N.M.C.; AZEVÊDO, I.M. A nicotina atua como fator deletério na reparação da parede abdominal. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.18, p.19-23, 2003a. Suplemento 1.

MEDEIROS, A.C.; ROCHA, K.F.B.; DANTAS FILHO, A.M.; AIRES NETO, T.; AZEVÊDO, I.M. Lesões pulmonares provocadas pela nicotina por via subcutânea em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.18, p.24-27, 2003b. Suplemento 1.

O'REILLY, E.J.; MCCULLOUGH, M.L.; CHAO, A.; HENLEY, S.J.; CALLE, E.E.; THUN, M.J.; ASCHERIO, A. Smokeless tobacco use and the risk of Parkinson's disease mortality. *Official Journal of the Movement Disorders Society*, v.20, p.1383-1384, 2005.

OUCHI, R.Y.; MANZATO, A.J.; CERON, C.R.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Evaluation of the effects of a single exposure to ethidium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.78, p.489-493, 2007.

- PANTALEÃO, S. M.; SPANO, M. A.; MORELLI, S.; NEPOMUCENO, J. C.; TAKAHASHI, C. S.; ANDRA, H. H. R. Impacto genotóxico de poluentes químicos presentes na água e sedimento do Rio Japaratuba (Sergipe). 2006. Disponível em: <http://www.bdt.d.ufr.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=445>. Acesso em: 17 mai. 2009.
- PAVAN, C.; CUNHA, A.B. Theodosius Dobzhansky and the development of genetics in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v.26, n.3, p.387-395, 2003.
- PLETCHER, M.J.; HULLEY, B.J.; HOUSTON, T.KIEFE, C.I.; BENOWITZ, N.; SIDNEY, S. Menthol Cigarettes, smoking cessation, atherosclerosis, and pulmonary function: the Coronary Artery Risk Development in Yong Adults (CARDIA) Study. *Archives of Internal Medicine*, v.166, p.1915- 22, 2006.
- RAIMONDI, S.; PARACCHINI, V.; AUTRUP, H.; BARROS-DIOS, J.M.; BENHAMOU, S.; BOFFETA, P.; COTE, M.L.; DIALYNA, I.A.; DOLZAN, V.; FILIBERTI, R.; GARTE, S.; HIRVONEN, A.; HUSGAFVEL-PUURSIAINEN, K.; IMYANITOV, E.M.; KALINA, I.; KANG, D.; KIYOHARA, C.; KOHNO, T.; KREMERS, P.; LAN, Q.; LONDON, S.; POVEY, A.C.; RANNUG, A.; RESZKA, E.; RISCH, A.; ROMKES, M.; SCHEIDER, J.; SEOW, A.; SHIELDS, P.G.; SOBTI, R.C.; SORENSEN, M.; SPINOLA, M.; SPITZ, M.R.; STRANGE, R.C.; STUCKER, I.; SUGIMURA, H.; TO-FIGUERAS, J.; TOKUDOME, S.; YANG, P.; YUAN, J.M.; WARHOLM, M.; TAIOLI, E.
- Meta and pooled analysis of GSTT1 and lung cancer: A Huge – GSEC Review. *American Journal of Epidemiology*. v.164, n.11, p.1027-1042, 2006.
- ROSEMBERG, J. *Tabagismo, sério problema de saúde pública*. São Paulo: ALMED/EDUSP, 1981. 370p.
- SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. *Fundamentos de genética*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 756 p.
- STRICKBERGER, M. W. *Experiments in genetics with Drosophila*. Londres: John Wiley and Sons, 1962. 145p.
- TAYLOR, R.; DOBSON, A.; MIRZAEI, M. Contribution of changes in risk factors to the decline of coronary heart disease mortality in Australia over three decades. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, v.13, p.760-768, 2006.
- THOMAZINI, A.P.B.W.; VENDRAMIM, J.D.; LOPES, M.T.R. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. *Scientia Agricola*, v.57, n.1, p.13-17, 2000.
- TIWARI, A.; KUMAR, M.L.; SAXENA, R.C. Effect of *Nicotiana tabacum* on *Tribolium castaneum*. *International Journal of Pharmacognosy*, v.33, n.4, p.348-350, 1995.

Recebido em 14/3/08

Aceito em 18/5/9