

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

ANÁLISE DE PRAGUICIDAS POR BIOENSAIO COM MOSCA *DROSOPHILA MELANOGASTER* E CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

E.S. Narciso; L.E. Nakagawa

Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: emerson@biologico.sp.gov.br

RESUMO

A intoxicação de animais por praguicidas é diagnosticada por um conjunto de avaliações, entre elas, a detecção destas substâncias no próprio animal ou em amostras ambientais. Neste trabalho, verificou-se a sensibilidade do bioensaio com *Drosophila melanogaster* e da cromatografia em camada delgada na detecção dos praguicidas diazinon, diclorvós, alfa-cipermetrina, deltametrina, carbofuran e carbaril. No bioensaio, moscas *D. melanogaster* foram expostas a diferentes concentrações dos praguicidas para determinar a quantidade capaz de provocar 70% de mortalidade (CL_{70}). Na análise por cromatografia em camada delgada, soluções dos praguicidas foram aplicadas em placas cromatográficas e tratadas com reagente de orto-toluidina para determinação da quantidade mínima detectável. Os valores de CL_{70} obtidos no bioensaio foram de $0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o diazinon, $0,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o diclorvós, $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a alfa-cipermetrina, $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a deltametrina, $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o carbofuran e $21.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o carbaril. As quantidades mínimas detectáveis pela cromatografia em camada delgada foram $20,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para diazinon, diclorvós, alfa-cipermetrina, deltametrina, carbofuran e carbaril, respectivamente. Embora a sensibilidade dos dois métodos na detecção dos praguicidas tenha sido bastante variável, ambos podem ser utilizados como métodos de triagem e identificação destes compostos, tendo como vantagem o baixo custo e a simplicidade de execução, podendo ser implantados em laboratórios com poucos recursos.

PALAVRAS-CHAVE: Inseticidas, piretróides, organofosforados, carbamatos, intoxicação.

ABSTRACT

ANALYSIS OF PESTICIDES BY BIOASSAY WITH *DROSOPHILA MELANOGASTER* FLIES AND THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY. The intoxication of animals by pesticides is diagnosed by a set of evaluations including the detection of these substances in the animal or in environmental samples. The present study verified the sensibility of the bioassay with *Drosophila melanogaster* and thin-layer chromatography in the detection of the pesticides diazinon, dichlorvos, alpha-cypermethrin, deltamethrin, carbofuran and carbaryl. In the bioassay, *Drosophila melanogaster* flies were exposed to different concentrations of pesticides to determine the quantity able to cause 70% of mortality (CL_{70}). In the analysis by TLC, solutions of pesticides were applied in thin-layer chromatography plates and treated with ortho-toluidine reagent to determine the minimum detectable quantity. The values of CL_{70} obtained by the bioassay were $0.6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for diazinon, $0.14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for dichlorvos, $1.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for alpha-cypermethrin, $1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for deltamethrin, $5.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for carbofuran, and $21.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for carbaryl. The minimum quantities detectable by chromatography were $20.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $200.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $0.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for diazinon, dichlorvos, alpha-cypermethrin, deltamethrin, carbofuran and carbaryl, respectively. Although the sensibility of both methods in the detection of the pesticides was variable, they can be used as methods in the triage and identification of these compounds with the advantages of low cost and easy execution, thus allowing the implantation of these methods in laboratories with scarce resources.

KEY WORDS: Insecticides, pyrethroids, organophosphate, carbamates, intoxication.

Os compostos praguicidas são substâncias amplamente utilizadas na agropecuária e muitas vezes são responsáveis por problemas ambientais (MCLEAY; HALL, 1999; WERNER *et al.*, 2000) e de intoxicações

humanas e de animais (ZWIENER; GINSBURG, 1988; FERRER; CABRAL, 1991; HAYES JUNIOR, 1975). A intoxicação de animais por praguicidas pode ser diagnosticada por um conjunto de informações obti-

das por meio da anamnese, do exame físico, dos sinais clínicos, de exames complementares e análise toxicológica, e, em caso de óbito, pelos dados colhidos nos exames de macro ou microscopia "post mortem", verificação da existência de lesões e determinação da presença do praguicida e/ou seus metabólitos em amostras de sangue, fígado, conteúdo gástrico e conteúdo ruminal ou em amostras ambientais como alimento, pasto, água e solo (OSWEILER, 1998).

Visando auxiliar no diagnóstico de morte de animais decorrente de intoxicação por praguicidas, estudamos a sensibilidade de dois métodos, um biológico e outro analítico, que poderiam servir de ferramenta de fácil aplicação e baixo custo para esclarecer a causa de possíveis óbitos.

Ensaio biológicos com a mosca da espécie *Drosophila melanogaster* podem ser realizados para a detecção de praguicidas presentes em amostras alimentares e outras matrizes como água, solo, plantas e tecido animal, visto que esses insetos apresentam baixa tolerância à presença de substâncias tóxicas com caráter inseticida (JOSEPH JUNIOR; KNOBEL, 1980; BAGDONAS *et al.*, 1988; ALMEIDA; REYES, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2001; PAULINO *et al.*, 1992; GRANT, 2001; HIRATA *et al.*, 2002; HIRATA *et al.*, 2003). Estes insetos são modelos experimentais de fácil criação, manipulação, manutenção, exigem poucos recursos financeiros e podem ser mantidos em condições de laboratório (ALMEIDA *et al.*, 2001).

Entretanto, a identificação dos praguicidas requer a utilização de métodos analíticos como a cromatografia em camada delgada, apropriada para a rotina de "screening" e identificação de praguicidas pertencentes a diferentes grupos como organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, entre outros, variando quanto à capacidade de separação e sensibilidade conforme a característica química de cada composto (AKERBLUM; COX, 1996).

Os objetivos deste trabalho foram verificar a sensibilidade do bioensaio e da cromatografia em camada delgada com *D. melanogaster* na detecção dos praguicidas diazinon, diclorvós, alfa-cipermetrina, deltametrina, carbofuran e carbaril.

Neste estudo foram utilizadas soluções de padrões técnicos dos praguicidas diazinon 93,9%, diclorvós 100%, alfa-cipermetrina 96,5%, deltametrina 98%, carbofuran 95% e carbaril 98% dissolvidos em acetona grau para análise (PA).

Para o fim proposto, o bioensaio foi realizado utilizando-se, como modelo experimental animal, moscas da espécie *D. melanogaster* mantidas no interior de uma estufa a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $90 \pm 3\%$, contidas em frascos de vidro (250 mL) com meio nutritivo e tampados com gaze. Moscas com idade de três dias foram selecionadas e sexadas 25:25 (machos:fêmeas) para o ensaio (HIRATA *et al.*, 2003).

Aliquotas de 1,0 mL de soluções de diazinon nas concentrações de $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de diclorvós nas concentrações de $0,016 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,032 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,064 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,096 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,160 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de alfa-cipermetrina nas concentrações de $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $3,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de deltametrina nas concentrações de $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de carbofuran nas concentrações de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $9,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $13,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $17,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e de carbaril nas concentrações de $5.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $20.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $30.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram impregnadas em papel de filtro colocados no interior de tubos de vidro, medindo 5,0 cm de altura e 2,0 cm de diâmetro, e evaporadas até a secura. Em seguida, 50 moscas da espécie *D. melanogaster* foram colocadas em exposição, no interior desses tubos. Calculou-se o valor da CL_{70} (concentração letal mediana 70%), que corresponde à quantidade de praguicida capaz de provocar mortalidade de 70% das moscas, após o período 24h de exposição. Este valor, determinado por meio do método estatístico dos probitos (HIRATA *et al.*, 2002), foi o parâmetro utilizado para avaliar a sensibilidade do método na detecção de cada praguicida.

Aliquotas de 5,0 μL de soluções de diazinon nas concentrações de $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $8,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $9,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de diclorvós nas concentrações de $20,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $150,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $200,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de alfa-cipermetrina nas concentrações de $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $8,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de deltametrina nas concentrações de $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $8,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $9,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de carbofuran nas concentrações de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e de carbaril nas concentrações de $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram aplicadas em placas de cromatografia em camada delgada preparadas em laboratório tendo como adsorvente sílica gel G Merck. Uma mistura de clorofórmio:acetato de etila (9:1v/v) foi utilizada para a eluição dos praguicidas na placa de cromatografia em camada delgada e a visualização dos praguicidas na placa foi feita por um tratamento com cloro e reagente de orto-toluidina conforme metodologia descrita por MORAES *et al.* (2003). A quantidade mínima visível na placa de cromatografia, considerada a quantidade mínima detectável (QMD), determinou a sensibilidade do método para a detecção de cada composto.

Os valores obtidos no bioensaio com as moscas *D. melanogaster* e aplicados ao método estatístico do proibito forneceram os seguintes resultados referentes à CL_{70} : $0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o diazinon, $0,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o diclorvós, $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a alfa-cipermetrina, $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a deltametrina, $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o carbofuran e $21.000,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o carbaril (Tabela 1).

Entre os praguicidas do grupo dos organofosforados observamos uma variação no nível de sensibilidade das moscas, que foi maior para o diclorvós do que para o diazinon. Já entre os piretróides, as moscas demonstraram maior sensibilidade a deltametrina, do que para a alfa-cipermetrina, e quanto aos carbamatos a maior sensibilidade foi constatada pela ação do carbofuran. Segundo demonstrado por HIRATA *et al.* (2002), os praguicidas pertencentes ao mesmo grupo químico podem demonstrar atividade inseticida notadamente diferente, variando em seu nível de toxicidade, relato coerente com os dados aqui apresentados. A sensibilidade do bioensaio depende do grau de toxicidade de cada praguicida, portanto, correlacionada à estrutura química e à atividade biológica de cada composto (HIRATA, 1995; HIRATA *et al.*, 2002).

As quantidades mínimas detectáveis por cromatografia em camada delgada foram de 20,0 µg.mL⁻¹, 200,0 µg.mL⁻¹, 10,0 µg.mL⁻¹, 10,0 µg.mL⁻¹, 1,0 µg.mL⁻¹ e 0,4 µg.mL⁻¹ para diazinon, diclorvós, alfa-cipermetrina, deltametrina, carbofuran e carbaril, respectivamente (Tabela 1). Portanto, a cromatografia em camada delgada foi menos sensível na detecção de diazinon, diclorvós, alfa-cipermetrina e deltametrina e mais sensível na detecção de carbofuran e carbaril. Este resultado também foi observado por MORAES *et al.* (2003) que obtiveram valores de quantidade mínima detectável de 50 ng de carbaril e 125 ng de carbofuran, utilizando o mesmo método.

Tabela 1 - Detecção dos praguicidas diazinon, diclorvós, alfa-cipermetrina, deltametrina, carbofuran e carbaril por bioensaio com mosca *Drosophila melanogaster* e cromatografia em camada delgada.

| Praguicida | Bioensaio CL ₇₀ ^a | Cromatografia em (µg.mL ⁻¹) camada delgada QMD ^b (µg.mL ⁻¹) |
|-------------------|---|--|
| Diazinon | 0,60 | 20,0 |
| Diclorvós | 0,14 | 200,0 |
| Alfa-cipermetrina | 1,50 | 10,0 |
| Deltametrina | 1,00 | 10,0 |
| Carbofuran | 5,00 | 1,0 |
| Carbaril | 21.000,00 | 0,4 |

^aConcentração letal 70%.

^bQuantidade mínima detectável.

Portanto, o bioensaio com mosca *D. melanogaster* apresentou uma boa sensibilidade na detecção da maior parte dos praguicidas estudados, com exceção do carbaril. Por outro lado, embora menos sensível, a

cromatografia em camada delgada é um método analítico que permite a identificação destes compostos. Assim, embora a sensibilidade dos dois métodos tenha sido bastante variável, ambos podem ser utilizados em conjunto, como métodos de triagem e identificação de praguicidas, tendo como vantagem o baixo custo e a simplicidade de execução, podendo, por isso, serem implantados em laboratórios com poucos recursos.

REFERÊNCIAS

AKERBLOM, M.; COX, J. Appropriate technology for pesticide analysis in developing countries. In: EKSTROM, G. (Ed.). *World directory of pesticide control organizations*. 3rd ed. Cambridge, U.K.: Royal Society of Chemistry, 1996. p.19-40.

ALMEIDA, G.R.; REYES, F.G.R. *Drosophila melanogaster* Meigen: 1. Sensibilidade ao endossulfan 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. *Drosophila melanogaster* meigen: 3. sensibilidade ao carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Química Nova*, v. 24, n.6, p.768-772, 2001.

BAGDONAS, M.; DE MELLO, M.H.S.H.; GUINDANI, C.M.A.; FERREIRA, M.S.; GAETA, R. Ensaios biológicos como testes preliminares na detecção de resíduos de inseticidas em frutas e hortaliças. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v.1, n.1, p.3-5, 1988.

FERRER, A. ; CABRAL, R. Toxic epidemics caused by alimentary exposure to pesticides: a review. *Food Additives and Contaminants*, v.8, p.755-776, 1991.

GRANT, R.J. A Bioassay for measurement of insecticide concentration. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.41, p.319-324, 2001.

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

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

HIRATA, R.; DIAS, S.S.; ROSA, A.R. Detecção de inseticidas por bioensaio com *Drosophila melanogaster*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.69, n.3, p.97-102, 2002.

HIRATA, R.; SKORTZARU, B.; NARCISO, E.S. Avaliação da degradação de inseticidas, em função do pH, utilizando *Drosophila melanogaster* e teste de inibição enzimática. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.70, n.3, p.359-365, 2003.

JOSEPH JUNIOR, H.; KNOBEL, M.G. Estudo preliminar da sensibilidade de moscas *Drosophyla melanogaster* a diversos pesticidas organoclorados. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.40, n.1, p.43-47, 1980.

McLEAY, M.J. ; HALL, K.J. Monitoring agricultural drainage ditches and the receiving water (Nicomekl River, Surrey, BC) for toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and probable cause due to organophosphate contamination. *Water Quality Research Journal of Canada*, v.34, n.3, p.423-453, 1999.

MORAES, S.L.; REZENDE, M.O.O.R.; NAKAGAWA, L.E.; LUCHINI, L.C. Multiresidue screening methods for the determination of pesticides in tomatoes. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, v.B38, n.5, p.605-615, 2003.

OSWEILER, G.D. (Ed.). *Toxicologia veterinária*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. 526p.

PAULINO, C.A.; MAZANTI, M.T.; GAETA, R. Exposição aguda ao inseticida carbofuran avaliada em bioensaio com moscas *Drosophyla melanogaster*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.27, n.1, p.209-212, 1992.

WERNER, I.; DEANOVIC, L.A. ; CONNOR, V.; VLAMING, V. de; BAILEY, H.C.; HILTON, D.E. Insecticide-caused toxicity to *Ceriodaphnia dubia* (*Cladocera*) in the Sacramento-San Joaquin River Delta, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.19, n.1, p.215-227, 2000.

ZWIENER, R.I.; GINSBURG, C.M. Organophosphate and carbamate poisoning in infants and children. *Pediatrics*, v.81, p.121-126, 1988.

Recebido em 30/4/08

Aceito em 18/2/09