

Drosophila melanogaster MEIGEN: 1. SENSIBILIDADE AO ENDOSULFAN E BIOMONITORAMENTO DE SEUS RESÍDUOS EM COUVE-MANTEIGA

Garcia R. de ALMEIDA¹
Felix G. R. REYES²

RIALA 06/860

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

RESUMO: A sensibilidade das moscas *Drosophila melanogaster* ao endosulfan e o seu uso no biomonitoramento dos resíduos do inseticida em couve, foram avaliados. Nas condições do bioensaio, método do filme seco em placa de Petri, o endosulfan se degrada em função da temperatura, sendo mais rápida para o isômero alfa do que para o beta. Os bioensaios com *D. melanogaster* indicaram que a toxicidade do endosulfan aumenta com a temperatura (25 a 35 °C) e que as fêmeas são mais sensíveis ao inseticida. Os valores da CL_{50} , calculados em função da temperatura, variaram entre 4,2 e 11,7 µg/g pc para machos e 2,8 e 8,1 µg/g pc para fêmeas. Os resíduos de endosulfan em couve-manteiga foram determinados pelo método de bioensaio, que apresentou um limite de quantificação da ordem de 0,1 mg/kg e reprodutibilidade com coeficiente de variação de 10 %. A validação do bioensaio por cromatografia a gás corrobora a viabilidade do emprego da *D. melanogaster* no monitoramento de resíduos de endosulfan em couve.

DESCRIPTORIOS: Bioensaio com *Drosophila melanogaster*, CL_{50} , resíduos de endosulfan em couve, validação de bioensaio.

INTRODUÇÃO

Endosulfan (6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexaidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepín-3-óxido) é um inseticida fitossanitário, formado pelos estereoisômeros alfa- e beta- endosulfan em proporção aproximada de 7:3, respectivamente. Pertence ao grupo éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico clorado^{10, 21, 39}. Os produtos de degradação são seus análogos endosulfan sulfato, diol, éter, hidroxiéter e lactona^{9, 10, 26}, formados através de reações de oxidação e hidrólise^{9, 12, 26}, fotólise^{2, 32} e biodegradação^{12, 25, 26}.

No solo^{31, 34} e em vegetais^{7, 11, 27, 38} o isômero beta e o endosulfan sulfato têm-se mostrado mais estáveis do que o isômero alfa³⁴, o que parece estar relacionado com as condições de umidade do solo e com a quantidade de inseticida aplicado³¹.

No Brasil, o endosulfan tem uso permitido apenas em culturas de algodão, cacau, café, soja e cana-de-açúcar. Entretanto, a presença dos seus resíduos por uso indevido, reportada em produtos agrícolas como batata²¹, cenoura³⁸, couve³⁸, couve-flor³³, pepino³⁸, tomate^{5, 21} e morango²⁹, justifica o desenvolvimento de metodologia

1. Centro Universitário Adventista de São Paulo — Faculdade Adventista de Ciências Exatas e Naturais — Caixa Postal 12630 — São Paulo, SP CEP 05858-001 — Tel (11) 5821-5000.

2. Faculdade de Engenharia de Alimentos — Universidade Estadual de Campinas — Caixa Postal 6121 — CEP 13081-970 — Campinas, SP, — Tel.: (019) — 788 7276 / 8653 / Fax: (019) — 788 7890 — E-mail: reyesfgr@fea.unicamp.br — Apoio financeiro: CAPES

simples para monitoramento do endossulfan em culturas onde o seu emprego não é autorizado.

Bioensaio com a mosca *Drosophila melanogaster* tem sido usado por alguns pesquisadores como indicador de resíduos de agrotóxicos em alimentos^{3, 8, 30} e da presença, no ambiente, de substâncias químicas com potencial mutagênico¹⁰. Cabe destacar que as drosófilas, além da sua elevada sensibilidade para detectar a presença de substâncias tóxicas, são insetos de fácil criação, manutenção e manipulação em condições de laboratório, facilitando a realização de bioensaios^{6, 37}.

Com o propósito de detectar resíduos de inseticidas em quantidades que possam apresentar perigo à saúde humana torna-se 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 endossulfan e a viabilidade da sua utilização no biomonitoramento dos resíduos desse inseticida em hortifrutigranjeiros.

MATERIAL E MÉTODOS

Aparelhos

Cromatógrafo a gás Varian 3400, equipado com detector de captura de elétrons, fonte de ⁶³Ni; coluna megabore DB-1 (30 m de comprimento x 0,54 mm de diâmetro interno), acoplado a um integrador processador CG 300.

Evaporador rotativo a vácuo Tecnal 120.

Homogeneizador de tecidos Tecnal 102.

Pulverizador costal Jato (20 L) provido com bico tipo jato cônico para aplicação em alto volume.

Solventes e reagentes

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau para análise de resíduos, Merck. Sulfato de sódio anidro e florissil foram aquecidos a 400 °C, durante 8 h; antes do uso a resina foi ativada em estufa a 120 °C. Cloreto de sódio foi lavado, previamente, com acetona. Como padrão analítico foi utilizado endossulfan (isômeros alfa-, beta- e endossulfan sulfato) Hoechst (99,0 %) e, para os experimentos, o produto comercial Thiodan CE.

Criação das moscas *D. melanogaster*

As moscas *D. melanogaster*, usadas para a realização dos bioensaios, foram criadas em ambiente com tempe-

ratura de 25 ± 2 °C, a partir de cepas cedidas pelo Laboratório de Toxicologia do Instituto Biológico de São Paulo.

O meio de cultura foi preparado conforme descrito por JOSEPH e KNOBEL¹⁹, com modificação no procedimento de esterilização, feito em microondas ao invés de autoclave. O meio, recém-preparado, foi distribuído em frascos de vidro transparente de boca larga (50 mL/frasco) e conservado em refrigerador até o momento do uso.

Drosófilas machos (15) e fêmeas (15) foram transferidas para os frascos de cultura e mantidas à temperatura de 25 ± 2 °C. No oitavo dia, foram removidas dos frascos, remanescendo as larvas. Após 48 h do início da emergência, as novas moscas foram transferidas para um outro frasco de cultura, procedimento este que foi repetido a cada 48 h, para obtenção de novos lotes de moscas.

Bioensaio

No bioensaio utilizou-se o método do filme seco²⁰ em placa de Petri (50 x 20 mm). O filme foi preparado pipetando-se, por placa, 0,1 mL de solução inseticida. Placas controle foram preparadas com 0,1 mL de acetona, solvente utilizado na preparação da solução inseticida. O solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio. Para a alimentação das moscas durante o teste colocou-se, nas placas, cerca de 0,5 g do meio de cultura. Moscas com idade de 3 a 5 dias, contidas em um frasco de vidro, foram imobilizadas por resfriamento em ambiente a 10 °C, durante 5 min⁶, e, em seguida, distribuídas em um vidro de relógio revestido com papel-filtro mantido a uma temperatura de 5 °C. Nessas condições, as moscas, uma vez separadas por sexo pela observação do tamanho e das características do abdômen^{16, 30, 35}, foram contadas e transferidas para as placas teste. Estas, cada uma com 20 moscas, machos ou fêmeas, foram colocadas em recipiente de vidro, contendo no fundo uma placa de Petri com água para manter a umidade do ambiente. O conjunto foi tampado e mantido em estufa a 20; 25; 30 e 35 °C.

Para avaliação da concentração letal mediana (CL₅₀) foi utilizada a formulação Thiodan CE, sendo que as concentrações de princípio ativo, alfa- e beta-endossulfan, nas soluções utilizadas variaram entre 1,00 e 2,07; 0,83 e 1,73; e, 0,42 e 0,73 µg/mL, para as temperaturas 20; 25; e, 30 e 35 °C, respectivamente. Alíquotas de 0,1 mL dessas soluções foram pipetadas nas placas de Petri.

Estabilidade do endossulfan no bioensaio

A estabilidade do endossulfan foi avaliada nas condições do bioensaio aplicando-se na placa de Petri 0,1 mL de solução inseticida de concentração 1,2 µg/mL. Evaporado o solvente, as placas foram tampadas, coloca-

das em recipiente de vidro e mantidas a 20, 25, 30 e 35 °C. Após 6, 12 e 24 h da aplicação, o inseticida foi extraído das placas com n-hexano, transferido para um tubo concentrador e levado para volume final de 1,0 mL. O endossulfan foi determinado por cromatografia a gás, nas seguintes condições de trabalho: temperatura da coluna, 200 °C; do injetor, 220 °C e do detector, 300 °C; fluxo de N₂, 20 mL/min.

Ensaio de campo

Couve-manteiga (*Brassica oleracea*, var. *acephala*) foi cultivada, segundo a boa prática agrícola, no campo experimental do Instituto Adventista São Paulo, em Hortolândia, São Paulo.

As mudas foram plantadas em outubro, com espaçamento de 1,0 x 0,5 m, num canteiro com aproximadamente 100 m² e pulverizadas com Thiodan CE após 50 dias do plantio. O produto diluído em água (1 : 2000) foi aplicado, com pulverizador costal, na dosagem de cerca de 440 g do ingrediente ativo por hectare de área cultivada. Amostras testemunha foram colhidas da mesma plantação, antes da aplicação do inseticida.

Amostras de couve foram analisadas após 3, 10 e 17 dias da pulverização. A amostragem foi aleatória, colhendo-se uma folha de cada planta selecionada, em diferentes pontos da área cultivada, no período 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 a validação do método de bioensaio, extratos de amostras de couve pulverizada com Thiodan CE foram também analisados por cromatografia a gás conforme o fluxograma apresentado na Figura 1.

Na quantificação por cromatografia a gás os resíduos de endossulfan 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 (250 mL). Após a adição de 150 mL da mistura acetona — água bidestilada (2:1), a amostra foi triturada em homogeneizador de tecido e filtrada a vácuo em funil de Büchner, com papel-filtro Whatman nº 1. Ao filtrado, transferido para um funil de separação (500 mL), acrescentou-se 100 mL do sistema solvente n-hexano — diclorometano (1:1) e agitou-se vigorosamente por 2 min. Separou-se a fase orgânica e, a fase aquosa, transferida para outro funil de separação (250 mL) contendo 5,0 g de NaCl, foi agitada vigorosamente até a completa dissolução do NaCl, adicionando-se

a seguir, 50 mL de diclorometano. Após agitar por 2 minutos, a fase orgânica foi separada e juntada à da primeira extração. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. A fase orgânica total foi colocada em um balão de fundo redondo (500 mL), concentrada em evaporador rotatório à temperatura de 40 °C até cerca de 1 mL e, ressuspendida em 10 mL de n-hexano.

A limpeza do extrato foi realizada em uma coluna cromatográfica (200 x 10 mm) contendo 8 cm³ de florisil e, no topo, cerca de 1 cm³ de Na₂SO₄, previamente condicionado com 10 mL de n-hexano. Após a adição de 5,0 mL do extrato, a coluna foi lavada com 20 mL de n-hexano e o resíduo eluído com 40 mL da mistura n-hexano — diclorometano (1:1) e mais 60 mL do sistema solvente n-hexano — diclorometano — acetona (49,5 : 50 : 0,5). O eluato recolhido foi concentrado em evaporador rotatório à temperatura de 40 °C até quase à secura e transferido com 10 mL de n-hexano para um tubo concentrador graduado. O extrato foi seco com nitrogênio, o tubo lavado com n-hexano, seco novamente com nitrogênio, diluído a 1 mL com n-hexano e injetado no cromatógrafo a gás, nas condições de trabalho anteriormente estabelecidas.

Para avaliação da metodologia quanto à recuperação e sensibilidade, amostras de couve (20 g) livre do inseticida, foram adicionadas de 1 mL da solução padrão do inseticida nas concentrações de 0,5 e 1 µg/mL de alfa- e de beta- endossulfan, caracterizando fortificações de 0,025 e 0,05 mg/kg de amostra, respectivamente. A faixa de linearidade da resposta do detector do cromatógrafo foi estabelecida usando diluições de 0,005 a 0,20 µg/mL para o alfa- e beta- 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.

Para a quantificação dos resíduos de endossulfan por bioensaio, placa testemunha e as preparadas com diferentes alíquotas do extrato purificado na coluna de florisil (número de repetições para as diferentes alíquotas do extrato, n=3), foram mantidas a 30 °C, durante 24 h para que pudesse ser estimado o volume de extrato necessário para matar 50 % da população teste.

Cálculo da CL₅₀

Na avaliação da CL₅₀ levou-se em consideração as moscas mortas e as moribundas, observadas no momento da contagem⁶. Os cálculos dos valores da CL₅₀ foram efetuados por análise de proibito¹⁷.

Análise estatística

Os dados obtidos no bioensaio foram avaliados por análise de variância (ANOVA). O teste de TUKEY (P <

0,05) foi utilizado para verificar se havia diferença entre os resultados obtidos para as moscas machos e fêmeas, como, também, para as temperaturas consideradas no bioensaio. Os cálculos foram feitos utilizando-se um software estatístico S.A.S.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A toxicidade dos inseticidas depende da temperatura de exposição e de outros fatores como sua formulação, concentração, método de administração, espécie e período de desenvolvimento do inseto¹⁴.

Os valores de CL_{50} para as moscas *D. melanogaster*, machos e fêmeas, em função da variação da temperatura, são apresentados na Tabela 1. Os dados mostram que as drosófilas fêmeas são mais sensíveis ao inseticida, sendo que o valor da CL_{50} difere significativamente ($P < 0,05$) entre machos e fêmeas para a mesma temperatura e, entre as diferentes temperaturas para um mesmo sexo. Verifica-se, ainda, que a 35 °C a sensibilidade ao endossulfan foi, aproximadamente, 3 vezes maior do que a 25 °C, o que pode ser devido a uma absorção mais rápida do inseticida com o aumento da temperatura. Esse comportamento é semelhante ao relatado por outros pesquisadores, utilizando diferentes inseticidas e sistemas biológicos^{13, 14, 15}. Ainda, essa diferença na resposta foi sugerida como um artifício para aumentar a sensibilidade do bioensaio³⁵.

Entretanto, para machos e fêmeas, o endossulfan apresentou toxicidade a 20 °C ligeiramente superior àquela apresentada a 25 °C, o que pode ser devido a maior tempo de residência das drosófilas no filme de endossulfan, como consequência de sua menor mobilidade na temperatura mais baixa. Comportamento semelhante, em relação à exposição ao DDT, foi observado para *M. domestica*³⁶ na faixa de 18 a 36 °C e na de 21 a 33 °C para larvas de grilo¹⁴.

O estudo da degradação do endossulfan em função do tempo de exposição e da variação de temperatura foi conduzido para avaliar a quantidade do inseticida que, durante os bioensaios estaria disponível, como isômero alfa e beta, já que estes e o metabólito endossulfan sulfato, são mais tóxicos para insetos do que os outros produtos de sua degradação^{4, 23}. Os valores da percentagem residual do alfa- e beta- endossulfan remanescente na placa de Petri, após 6; 12 e 24 h nas temperaturas de 20; 25; 30 e 35 °C, são apresentados na Figura 2. Verifica-se que a degradação dos isômeros é proporcional ao tempo de exposição e à variação da temperatura e que o alfa-endossulfan se degrada mais rapidamente do que o beta. Após 24 h, a concentração do isômero alfa cai para valo-

res 2 a 3 vezes menores que a do beta. Resultados semelhantes foram relatados por BEARD & WARE⁷.

Os bioensaios com *D. melanogaster* para detecção dos resíduos do endossulfan em couve foram conduzidos em temperatura de 30 °C, durante 24 h de exposição. Assim, diferentes volumes do extrato obtido, após purificação em coluna de florissil, foram usados para determinar o volume necessário para provocar a morte de 50 % da população teste. A massa de endossulfan contida nesse volume (Tabela 2), relacionada àquela correspondente à CL_{50} a 30 °C (Tabela 1) permitiu estimar o nível de resíduo de endossulfan na couve (Figura 3).

A sensibilidade dos métodos químicos de análise de resíduos, assim como os valores do limite máximo de resíduo (LMR) 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}. O limite de quantificação encontrado, para o método de bioensaio, foi da ordem de 0,1 mg de endossulfan/kg de amostra, para as drosófilas machos e fêmeas. Esse valor foi obtido considerando-se que, de 2 mL de um extrato purificado de couve (20 g), uma alíquota de 0,1 mL provocou a morte de 50 % da população teste. Ainda, três repetições na análise de uma mesma amostra de couve mostraram para o método de bioensaio um coeficiente de variação de 10 %, indicando uma boa reprodutibilidade, quando comparado aos de até 20 %, considerados aceitáveis na determinação de contaminantes traço¹⁸. Esses resultados confirmam a elevada sensibilidade das moscas *D. melanogaster* ao endossulfan e fortalecem a confiabilidade de sua utilização nos bioensaios com a finalidade de quantificar resíduos de inseticida em produtos agrícolas.

Para detectar a possível presença, na couve²², de substâncias naturais com ação inseticida que poderiam interferir nos resultados do bioensaio, amostras de extratos isentos de agrotóxicos foram avaliados pelo bioensaio. Todas as moscas sobreviveram ao teste, resultado que indica ausência ou a presença em níveis não-letais de substâncias tóxicas para esse inseto teste.

Com o intuito de validar o método biológico, os mesmos extratos utilizados no bioensaio foram analisados, quanto ao teor de endossulfan, por cromatografia a gás. Na Tabela 3 são apresentados os níveis de resíduo de alfa- e beta-endossulfan e endossulfan sulfato determinados na couve após períodos de 3, 10 e 17 dias da aplicação do inseticida e na Figura 3 o endossulfan total, assim determinado, é comparado àqueles valores obtidos pelo método de bioensaio. Verifica-se que não existe diferença significativa entre os dois métodos, a um nível de confiança de 0,05.

Cabe ressaltar, como pode ser observado na Figura 3, que mesmo após 17 dias da aplicação, resíduos de endo-

Tabela 1. Concentração letal mediana (CL₅₀) do endossulfan (produto comercial Thiodan CE) para *D. melanogaster*, em função da temperatura.

Temp. (°C)	Machos	Fêmeas
	CL ₅₀ ± s ^(a) (µg/g pc)	CL ₅₀ ± s ^(a) (µg/g pc)
20	10,2 ± 0,7 (A, a) ^(b)	6,5 ± 0,5 (B, a)
25	11,7 ± 1,0 (A, b)	7,9 ± 0,6 (B, b)
30	8,7 ± 0,3 (A, c)	6,0 ± 0,1 (B, a)
35	4,3 ± 0,1 (A, d)	2,8 ± 0,2 (B, c)

^(a) s = estimativa do desvio padrão absoluto.

^(b) 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 significativamente diferentes (P < 0,05).

Tabela 2. Massa de endossulfan aplicado nas placas de Petri que correspondem aos valores de CL₅₀ das moscas *D. melanogaster*, machos e fêmeas, em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Machos (µg/placa)	Fêmeas (µg/placa)
20	0,14	0,14
25	0,16	0,17
30	0,12	0,13
35	0,06	0,06

Tabela 3. Resíduos de alfa-, beta-endossulfan e endossulfan sulfato determinados em couve, por cromatografia a gás, após diferentes períodos da aplicação de Thiodan CE (440 g i.a./ha)

Período após aplicação (dias)	Endossulfan (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

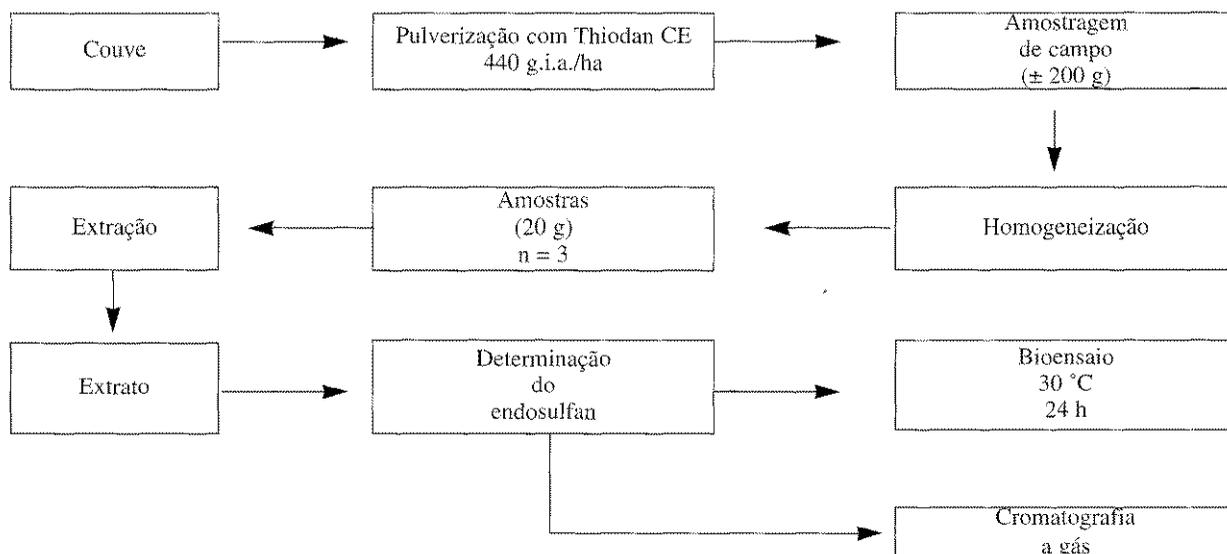


Figura 1 — Fluxograma do procedimento experimental utilizado na validação do bioensaio na determinação de endossulfan em couve.

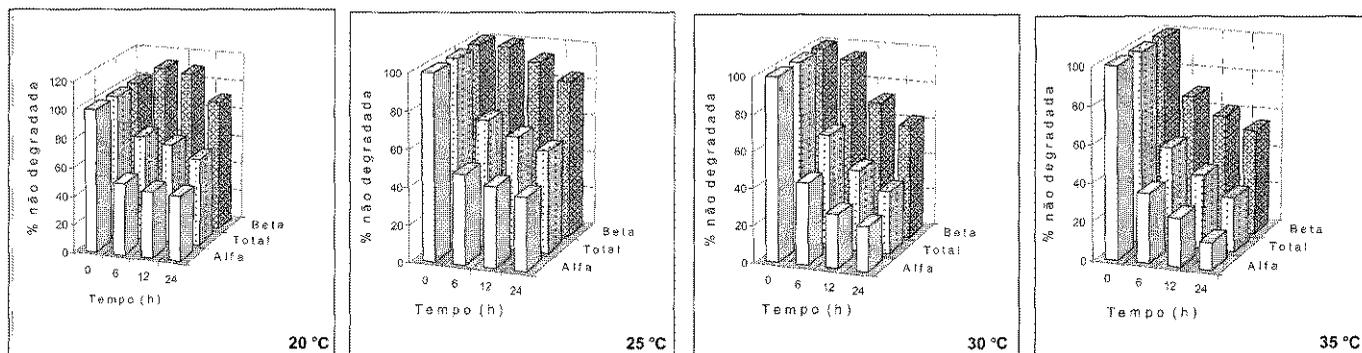


Figura 2 — Percentagem residual, em placa de Petri, de alfa e beta-endossulfan e endossulfan total (alfa + beta), em função da temperatura, para 0,12 µg do inseticida nas placas.

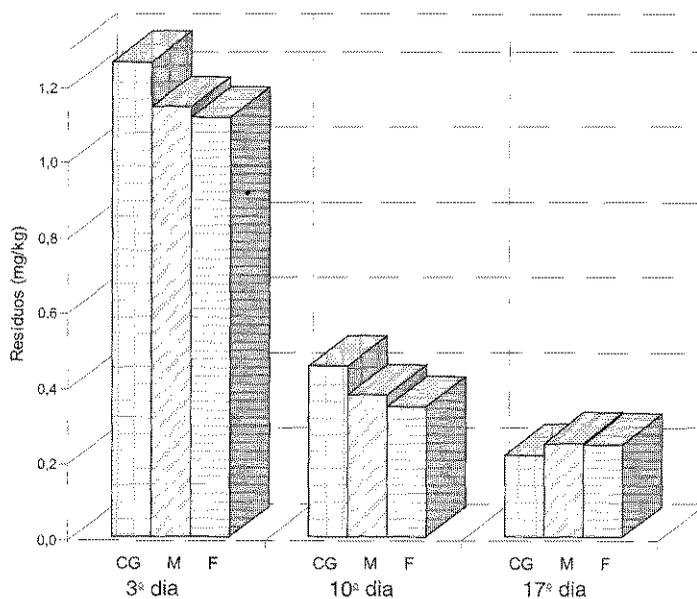


Figura 3 — Resíduos de endossulfan aplicado em couve, determinado por cromatografia a gás (CG) e por bioensaio com *Drosophila melanogaster* machos (M) e fêmeas (F), após diversos períodos da aplicação do inseticida.

sulfan foram detectados na couve em níveis de 0,2 mg/kg, o que sugere lenta degradação do inseticida, justificando o seu monitoramento nessa matriz.

Na determinação por cromatografia a gás, os valores de recuperação do endossulfan nas amostras de couve fortificadas com teores de inseticida de 0,025 e 0,05 mg/kg foram, respectivamente, 104 e 90 % para o alfa-endossulfan e, 85 e 96 % para o beta-endossulfan (média de três determinações; coeficiente de variação entre 4 e 11%). Esses valores de recuperação encontram-se dentro da faixa 80 — 120 % aceita internacionalmente¹⁸. O limite de detecção do instrumento, considerando relação sinal-ruído da linha base igual a 3:1, foi de 20 pg para endossulfan alfa- e beta- e 100 pg para endossulfan sulfato. O limite de quantificação do método foi de 4 µg/kg de amostra para endossulfan alfa- e beta- e 20 µg/kg para endossulfan sulfato. Esses valores de recuperação e limite de quantificação indicam que as modificações introduzidas no método de Luke et alii²⁴, não afetaram a sua confiabilidade e aplicabilidade.

Embora os métodos cromatográficos sejam de grande sensibilidade, a utilização destes, do ponto de vista econômico, é limitada para o monitoramento de resíduos de inseticidas em alimentos, especialmente nos países emergentes, devido aos custos elevados de equipamentos e reagentes. Ainda, nesses países, inseticidas e outros praguicidas frequentemente são usados em culturas para as quais não são autorizados e/ou de modo excessivo e

indiscriminado o que pode resultar em resíduos acima dos níveis permitidos em alimentos.

Comparado ao método de cromatografia a gás o de bioensaio apresenta, além de baixo custo e simplicidade de execução, adequado limite de quantificação e boa reprodutibilidade, qualidades necessárias para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

CONCLUSÕES

As moscas *Drosophila melanogaster* Meigen apresentam, através de bioensaio pelo método do filme seco, elevada sensibilidade ao endossulfan e para detecção de resíduos desse inseticida em couve, o que indica a viabilidade da sua utilização para o monitoramento de resíduos de endossulfan nessa hortaliça.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Flavio R. Puga, Instituto Biológico de São Paulo, pela doação das cepas de *D. melanogaster*, à Hoechst pela doação dos padrões analíticos e a Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI) pela doação do Thiodan CE. G. R. de Almeida agradece a CAPES pela bolsa de estudo recebida e ao Instituto Adventista de Ensino, Campus São Paulo, pelo apoio recebido.

RIALA 06/860

ALMEIDA, G.R. de & REYES, F.G. R — *Drosophila melanogaster* Meigen: I. Susceptibility to Endossulfan and biomonitoring of Its residues in kale — Rev. Inst. Adolfo Lutz 58(2): 15-24, 1999

ABSTRACT: The susceptibility of flies *Drosophila melanogaster* to endossulfan and the use of this organism in biomonitoring residues of the insecticide in kale was evaluated. In the condition of the bioassay, residues-film bioassay in the Petri dish, endossulfan degraded depending on the temperature and alpha isomer degrades faster than beta isomer. Bioassays conducted with *D. melanogaster* showed that the toxicity of the insecticide increases with the temperature (25 to 35 °C) and that the females are more susceptible to the insecticide. LC₅₀ values calculated as a function of temperature, varied from 4.2 to 11.7 µg/g bw for the males and 2.8 to 8.1 µg/g bw for the females. The formulated product Thiodan CE was applied on kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the residues of endossulfan were determined by bioassay. The determination limit by bioassay is in the order of 0.1 mg/kg and the method presented a reproducibility with a coefficient of variation of 10%. The validation of the bioassay by gas chromatography confirm the viability of the bioassay with *D. melanogaster* in monitoring the residues of endossulfan in kale.

KEY WORDS: Bioassay with *Drosophila melanogaster*, LC₅₀, endossulfan residues in kale, bioassay validation

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, W. F. *Métodos prácticos para detección de resíduos de plaguicidas*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, México: 1987. 54p.
2. ARCHER, T. E. Endossulfan residues on alfalfa hay exposed to drying by sunlight, ultraviolet light and air. *Pestic. Sci.* 4: 59 — 68, 1973.
3. BAGDONAS, M.; MELLO, M. H. S. H.; UNGARRO, M. T. S.; GUINDANI, C. M. A.; FERREIRA, M. S. & GAETA, R. Ensaios 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 endossulfan 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 insecticides with this insect. *J. Econ. Entomol.* 44(4): 621, 1951.
7. BEARD, J. E. & WARE, G. W. Fate and endossulfan on plants and grass. *J. Agric. Food Chem.* 17(2): 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(6) 809 — 814, 1985.
9. CHOPRA, N. M. & MAHFOUZ, A. M. Metabolism of endossulfan I, endossulfan II, and endossulfan sulfate in tobacco leaf. *J. Agric. Food Chem.* 25(1): 32 — 36, 1977.
10. GOEBEL, H. Chemical and physical properties of endossulfan and its degradation products. *Residue Reviews*, 83: 6 — 12, 1982.
11. GOPAL, M. & MUKHERJEE, I. Determination of residues of endossulfan and endossulfan sulfate on eggplant, mustard and chickpea. *Pestic. Sci.* 37(1): 67 — 72, 1993.
12. GREVE, P. A. & WIT, S. L. Endossulfan in the Rhine river. *J. Water Pollution Control Fed.* 43(12): 2338 — 2348, 1971.
13. GUTHRIE, F. E. Effect of temperature on the toxicity of certain organic insecticides. *J. Econ. Entomol.* 43(4): 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(2): 215 — 218, 1977.
16. HENNEBERRY, T. J.; MCGOVERN, W. L.; YEOMANS, A. H. & MASON, H. C. Sexing large numbers of *Drosophila melanogaster* adults by a size differential. *J. Econ. Entomol.* 57(5): 769 — 770, 1964.
17. HOFFMANN, R. Análise de probito com determinação da dose letal mediana — Programa probito. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), USP, Piracicaba, SP, Maio de 1990.
18. 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.
19. JOSEPH Jr, H. & KNOBEL, M. G. Estudo preliminar da sensibilidade de moscas *Drosophila melanogaster* a diversos pesticidas organoclorados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 40(1): 43-47, 1980.
20. 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 — 31, 1946.
21. LEMES, V. R. R.; INOMATA, O. N. K. & BARRETO, H. H. C. Resíduos de endossulfan em tubérculos e frutos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 53(1/2): 49-54, 1993.
22. LICHTENSTEIN, E. P., MORGAN, D. G. & MUELLER, C. H. Naturally occurring insecticides in cruciferous crops. *J. Agric. Food Chem.* 12(2): 158 — 161, 1964.
23. LINDQUIST, D. A. & DAHM, P. A. — Some chemical and biological experimental with thiodan. *J. Econ. Entomol.* 50: 483 — 6, 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(5): 1020 — 1026, 1975.
25. MARTENS, R. Degradation of [8,9-¹⁴C]endossulfan by soil microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 31(6): 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 fluvalinate residue behavior in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48(1): 163 — 70, 1992.
28. MUKHERJEE, I. M. & GOPAL, M. Interconversion of stereoisomers of endossulfan on chickpea crop under field conditions. *Pestic. Sci.* 40(2): 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 práticos para detección de resíduos de plaguicidas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, México: 1987. p. 37-43.
31. RAO, D. M. R. & MURTY, A. S. Persistence of endossulfan in soils. *J. Agric. Food Chem.* 28(6): 1099 — 1101, 1980.
32. SINGH, N. C.; DASGUPTA, T. P. ROBERTS, E. V. & MANSINGH, A. Dynamics of pesticides in tropical conditions. I. Kinetic studies of volatilization, hydrolysis, and photolysis of dieldrin and — and endossulfan. *J. Agric. Food Chem.* 39(3): 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. STEWART, D. K. R. & CAIRNS, K. G. Endossulfan persistence in soil and uptake by potato tubers. *J. Agric. Food Chem.* 22(6): 984 — 986, 1974.
35. 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.
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.* 46(3): 530 — 542, 1963.
37. SUN, Y. P. & PANKASKIE, J. E. *Drosophila*, a sensitive insect, for the microbioassay of insecticide residues. *J. Econ. Entomol.* 47(1): 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.
39. World Health Organization (WHO/IPCS): Endossulfan. *Environmental Health Criteria* 40. Geneva, 1984. 62p.
40. ZIMMERING, S. — Utility of *Drosophila* for detection of potential environmental chemical mutagens. *Ann. New York Acad. Sci.* 269: 26 — 33, 1975.

Recebido para publicação em 24/09/1997

