



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

Campus São Gabriel

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE INDUZIDA PELO
ORGANOFOSFORADO TRICLORFON EM MODELO
EXPERIMENTAL DE INSETOS

GRAZIELE DAIANE STÜRMER

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE INDUZIDA PELO
ORGANOFOSFORADO TRICLORFON EM MODELO EXPERIMENTAL
DE INSETOS

GRAZIELE DAIANE STÜRMER

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Cháriston André Dal Belo

Rio Grande do Sul
Dezembro de 2010

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE INDUZIDA PELO ORGANOFOSFORADO
TRICLORFON EM INSETOS

GRAZIELE DAIANE STÜRMER

ORIENTADOR: PROF. DR. CHÁRISTON ANDRÉ DAL BELO

Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada por:

Presidente, Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

Prof. Dr. Jéferson Luis Franco

Prof. Dr. Frederico Costa Beber Vieira

Profª Drª Nara Rejane Zamberlan dos Santos - Suplente

São Gabriel, dezembro de 2010.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Elton Stürmer, pelo amor, apoio, conselhos, exemplo de força, competência e superação. Por sempre me incentivar, mesmo quando eu não acreditava mais.

A minha irmã, Mônica, meu Tio Sérgio e Minha Avó, Olga, pela união, carinho, e apoio que ofereceram durante esta etapa de minha vida e principalmente por sempre estarem perto, mesmo a longas distâncias.

Ao meu orientador. Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e pela paciência.

Ao Prof. Dr. Jéferson Luis Franco pela disponibilidade e ajuda nos testes bioquímicos.

A Prof^a. Dr^a. Thaís Posser pela paciência, disponibilidade e ajuda na determinação da DI_{50} .

Ao Prof. Dr. Cláudio Vinícius De Senna Gastal Júnior, pelo incentivo sempre.

A minha amiga, Marines de Avila Heberle, pela ajuda nos experimentos laboratoriais, pela presença sempre, pela amizade e principalmente pelo companheirismo.

As minhas cinco amigas inseparáveis, Aline, Angélica, Pricila e Cássia, por serem meu porto seguro.

A Ana Paula Lucho, Joelio Dias, Thiago Carrazoni e a Paola Bolzan, pela ajuda nos experimentos.

Ao Hospital Militar de São Gabriel por ter gentilmente cedido o sulfato de atropina.

A todos, que apesar de não citados nominalmente, ajudaram direta ou indiretamente para o meu crescimento pessoal e profissional e para a realização deste trabalho.

RESUMO

Avaliação da toxicidade induzida pelo organofosforado triclorfon em modelo experimental de insetos

Triclorfon é um organofosforado que inibe a atividade da acetilcolinesterase, tanto em insetos como em mamíferos. O objetivo deste trabalho foi o de estudar os efeitos toxicológicos induzidos pelo Triclorfon em insetos. Foram utilizadas baratas e moscas adultas, das espécies *Phoetallia palida* e *Drosophila melanogaster*, respectivamente. Foram realizados testes de inibição *In vitro* da acetilcolinesterase, determinação da DL₅₀, preparação de coração semi isolado, teste de grooming e teste da atividade neurolocomotora. A análise estatística foi realizada usando-se os métodos teste “t” de Student ou Anova. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$. Nossos dados demonstraram que o Triclorfon na dose de 50µM foi o DL₅₀ encontrada, quando testada em *Drosophila melanogaster*. Esta dose é menor que a descrita na bula do composto e demonstra que uma superdosagem tem sido recomendada aos usuários aumentando a chance de intoxicação. Em nossas condições experimentais, o Triclorfon induziu alterações no cronotropismo cardíaco, este efeito foi antagonizado pela atropina, sugerindo que não apenas os nervos estudados para o coração podem regular a frequência de batimento, mas provavelmente os receptores muscarínicos em fibras Purkinge devem estar envolvidos. Os efeitos sobre o sistema nervoso central e periférico também foram evidenciados e demonstraram que em ambos os sistemas, existem enzimas acetilcolinesterase suscetíveis às ações do Triclorfon. Em conclusão, o Triclorfon é um inseticida organofosforado que induziu alterações em ambos os sistemas cardiovascular e nervoso de *Phoetallia palida*. Esses efeitos estão associados à inibição da acetilcolinesterase e demonstram a presença de diferentes receptores colinérgicos envolvidos na frequência cardíaca e envolvidos também na neurotransmissão periférica glutamatérgica.

Palavras- chave: agrotóxicos; acetilcolinesterase; frequência cardíaca; grooming; atropina.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE TOXICITY INDUCED BY THE ORGANOPHOSPHATE TRICHLORFON IN INSECTS EXPERIMENTAL MODEL

Triclorfon is an organophosphate that inhibits the acetylcholinesterase activity in both insects and mammals. The objective of this work was to study the toxicological effects induced by Triclorfon in insects. We used cockroach and adult flies of the species *Phoetallia palida* and *Drosophila melanogaster*, respectively. Tests were conducted in vitro inhibition of acetylcholinesterase, determining the LD50, semi-isolated heart preparation, test grooming and test neurolocomotora activity. Statistical analysis was performed using the methods "t" Student test or ANOVA. Results were considered significant when $p < 0.05$. Our data demonstrated that Triclorfon 50 μ M was the LD50 dose when assayed in *Drosophila melanogaster*. This dose is lesser than those described in the compound information and denotes that a super dosage has been applied by users improving the chance of intoxication. In our experimental conditions the Triclorfon induced alterations in the cardiac chronotropism. This effect was antagonized by atropine suggesting that not only the nerves assayed to the heart can regulate the frequency of beating but probably muscarinic receptors at Purkinje fibers must be involved. The effects on central and peripheral nervous system were also evidenced and demonstrated that in both systems there are acetylcholinesterase enzymes susceptible to the Triclorfon actions. In conclusion Triclorfon is an organophosphate insecticide that induced alterations in both cardiovascular and nervous systems of *Phoetallia palida*. These effects are associated to the acetylcholinesterase inhibition and demonstrated the presence of different cholinergic receptors involved in the cardiac frequency and also cholinergic receptors involved in the peripheral neurotransmission other than glutamatergic.

Keywords: pesticides; acetylcholinesterase; heart rate; grooming; atropine.

SUMÁRIO

Resumo	5
Abstract	6
Sumário	7
1. LISTA DE FIGURAS.....	9
2. INTRODUÇÃO	10
2.1. Pesticidas	10
2.1.1 Organofosforados.....	12
2.1.1.1. Triclorfon.....	16
2.2. Resistência em Insetos.....	17
2.3. Considerações sobre as espécies estudadas	18
2.3.1. Insetos	18
2.3.1.1. Aparelho circulatório.....	19
2.3.1.2. Sistema nervoso	20
2.3.2. Baratas.....	20
2.3.3. Moscas.....	22
3.OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivos específicos.....	23
4.MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Solução Nutritiva para Insetos.....	24
4.2. Reagentes.....	24
4.3. Animais	25
4.3.1. Baratas	25
4.3.2. Moscas	25
4.4. Ensaio Bioquímico	25
4.4.1. Medida da atividade anticolinesterásica	25
4.5. Preparação biológica	26
4.5.1. Determinação da DI_{50} do Triclorfon em ensaios com <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>	26
4.5.2. Preparação de coração semi isolado de barata	26
4.5.3. Teste de grooming	27

4.5.4. Teste de atividade neurolocomotora.....	28
4.6. Análise estatística.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Análise bioquímica	30
5.1.1. Análise da atividade anticolinesterásica	30
5.2. Ensaio Biológico	31
5.2.1. Determinação da DL ₅₀ em <i>Drosophila melanogaster</i>	31
5.2.2. Efeito do Triclorfon em Coração semi isolado de barata	32
5.2.3. Atividade da Atropina em Coração semi isolado de barata.....	33
5.2.4. Avaliação do efeito do Triclorfon sobre o sistema nervoso central de <i>Phoetallia palida</i> , através do teste de grooming	34
5.2.5. Avaliação do efeito do triclorfon sobre o sistema neurolocomotor de barata.....	35
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÕES	39
8. REFERÊNCIAS	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química básica de inseticidas organofosforados.....	12
Figura 2. Bloqueio dos receptores muscarínicos da Acetilcolina pela Atropina.....	13
Figura 3. Inibição e Regeneração da Acetilcolinesterase.....	14
Figura 4. Síntese e hidrólise da molécula de Acetilcolina.....	14
Figura 5. Transmissão do impulso nervoso pela Acetilcolina.....	15
Figura 6. Estrutura química do Triclorfon.....	16
Figura 7. Transformações estruturais na molécula de triclorfon.....	17
Figura 8. Coração de barata.....	19
Figura 9. Sistema nervoso central de um Orthoptera.....	20
Figura 10. <i>Phoetallia palida</i>	21
Figura 11. <i>Drosophila melanogaster</i>	22
Figura 12. Forma comercial do Triclorfon utilizado nos experimentos - Triclorvet®.....	24
Figura 13. Preparação do coração semi-isolado de barata.....	27
Figura 14. Atividade de grooming em baratas.....	28
Figura 15. Análise da atividade da enzima Acetilcolinesterase em substrato de cérebro de barata da espécie <i>Phoetallia palida</i>	30
Figura 16. Determinação da DI_{50} em moscas da fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>) adiministradas em diferentes concentrações, resultados obtidos em 24 e 48 horas.....	31
Figura 17. Média dos efeitos cronotrópicos induzidos pelo organofosforado Triclorfon em preparação de coração semi isolado de <i>Phoetallia palida</i>	32
Figura 18. Avaliação dos efeitos cronotrópicos induzidos pelo Triclorfon + Atropina em preparação de coração semi isolado de <i>Phoetallia palida</i>	33
Figura 19. Avaliação do comportamento de grooming em baratas da espécie <i>Phoetallia palida</i> tratadas com diferentes concentrações de Triclorfon	34

Figura 20. Avaliação do efeito sobre a atividade neurolocomotora em *Phoetallia palida* após a administração do Triclorfon.....35

2. Introdução

2.1. Pesticidas

Os agrotóxicos estão entre os principais instrumentos do atual modelo de desenvolvimento da agricultura brasileira, apesar dos efeitos adversos que podem causar à exposição humana e ao meio ambiente¹. Os agrotóxicos são introduzidos no meio ambiente obedecendo a critérios técnicos, com o objetivo de impedir a ação ou destruir, direta ou indiretamente, formas de vida animal ou vegetal prejudiciais a agricultura. Para registro da formulação de um agrotóxico no Brasil, três ministérios são envolvidos: o da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento, que avalia aspectos agronômicos; o da Saúde, que trata dos aspectos da toxicologia ao homem, inclusive de resíduos de alimentos; e o do Meio Ambiente, por meio do Ibama, que julga a interação do agrotóxico com o meio ambiente e seus componentes bióticos.²

Até dezembro de 1999, 322 ingredientes ativos tiveram seu uso agrícola aprovado no País, com quase 2.000 produtos registrados, os quais incluem inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, reguladores de crescimento, feromônios, moluscidas e protetores de sementes.³

Do ponto de vista toxicológico, eles podem ser mais ou menos tóxicos para o homem, existindo para cada um o estudo da avaliação toxicológica correspondente. O parâmetro toxicológico mais comum e importante é a dose letal 50 (DL₅₀) geralmente estudada em ratos albinos; uma das mais importantes é a dose aguda oral, havendo ainda a dose aguda dérmica ou a dose inalatória. A DL₅₀ é definida como a dose que previsivelmente causará uma resposta de 50% em uma população na qual se procurará determinar o efeito letal. A exposição ao tóxico pode dar-se em doses subletais, dadas repetidamente, quando então se caracteriza a toxicidade crônica.² O estudo de avaliação de risco crônico da ingestão de pesticidas é o processo no qual a exposição humana a um dado composto por meio de dieta é comparada a um parâmetro toxicologicamente seguro. O risco pode existir quando a exposição ultrapassa o parâmetro toxicológico.^{4,5}

Os inseticidas são mais tóxicos ao homem e aos animais superiores do que os fungicidas e herbicidas. Isso se explica pelo fato de que, tanto em insetos como nos animais superiores

(incluindo-se o homem), os inseticidas tem o mesmo modo e local de ação, que é, comumente, o sistema nervoso.²

A utilização dos agrotóxicos no meio rural brasileiro tem trazido uma série de conseqüências tanto para o ambiente como para a saúde do trabalhador rural. Em geral, essas conseqüências são condicionadas por fatores intrinsecamente relacionados, tais como o uso inadequado dessas substâncias, a alta toxicidade de certos produtos, a falta de utilização de equipamentos de proteção e a precariedade dos mecanismos de vigilância. Esse quadro é agravado pelo baixo nível socioeconômico e cultural da grande maioria desses trabalhadores.^{6,15}

No Brasil, o consumo de agrotóxicos tem sido crescente e já está relacionado entre os países de maior consumo no mundo. No âmbito da América Latina, o Brasil desponta como o maior consumidor de agrotóxicos, com um consumo estimado em 50% da quantidade comercializada nesta região.⁷ O aumento na venda de agrotóxicos no Brasil entre os anos de 1991 e 1998 foi da ordem de 160%.⁸

Agrotóxicos quando aplicados podem contaminar o solo e os sistemas hídricos, culminando numa degradação ambiental que teria como conseqüência prejuízos à saúde e alterações significativas nos ecossistemas. Os agrotóxicos são desenvolvidos visando potencializar suas características químicas de tal forma que sejam tóxicos a certos tipos de insetos, animais, plantas ou fungos. Embora, essa função letal dos agrotóxicos seja direcionada, estes também podem causar danos fora do seu alvo.⁹

Mesmo em concentrações baixas, os agrotóxicos representam riscos para algumas espécies de organismos vivos que podem concentrar estes produtos até 1000 vezes, transferindo os efeitos tóxicos para outros organismos da cadeia alimentar.^{10,11}

A toxidez de uma substância química em insetos não a qualifica necessariamente como inseticida. Diversas propriedades devem estar associadas à atividade, tais como eficácia mesmo em baixas concentrações, ausência de toxidez frente a mamíferos e animais superiores, ausência de fitotoxicidade, fácil obtenção, manipulação e aplicação, viabilidade econômica e não ser cumulativo no tecido adiposo de seres humanos e de animais domésticos. Fica evidente que as características citadas referem-se àquele inseticida tido como ideal, o que raramente será o caso.¹²

No Brasil, de acordo com a Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde, o limite para organofosforados é de 15 ou 20% de inibição da acetilcolinesterase, quando a enzima utilizada for proveniente de insetos ou mamíferos, respectivamente.¹³

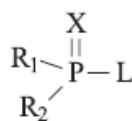
A seletividade de um inseticida para insetos úteis, como abelhas, é uma característica que deve ser levada em consideração. Infelizmente, em muitos casos é difícil alcançar a seletividade, dadas as características de toxicidade do inseticida, que atua no mesmo local de ação, tanto nos insetos nocivos como dos úteis.²

Estudos realizados nos municípios de Antônio Prado e Ypê no Estado do Rio Grande do Sul¹⁴, e no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil¹⁵ indicaram que a ocorrência de intoxicações agudas provocadas pela exposição aos agrotóxicos está fortemente associada à prevalência de transtornos psiquiátricos menores, sendo a depressão e a ansiedade os diagnósticos mais frequentes. Tentativas de suicídios estão relacionadas a esse quadro clínico. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorram cerca de três milhões de intoxicações agudas por agrotóxicos anualmente no mundo, provocando um total aproximado de 220 mil mortes.¹⁶

2.1.1. Organofosforados

Os primeiros compostos organofosforados foram preparados por alquimistas na Idade Média, mas seu estudo sistemático teve início no século XIX, por Lassaigne em 1820, com a esterificação de ácido fosfórico¹⁷. A descoberta das propriedades tóxicas e inseticidas de alguns compostos de fósforo por Shrader e colaboradores, em 1930, criou novos compostos organofosforados nas indústrias.¹⁸

Os inseticidas organofosforados são a classe de maior interesse comercial e toxicológico, são ésteres ou tióis derivados de ácidos fosfóricos, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico e usualmente têm a estrutura geral descrita na figura 1.¹⁹



X = O, S e Se

R₁; R₂ = alquil, SR', OR' ou NHR'

L = halogênios; alquil, aril ou heterocíclicos

Figura 1- Estrutura química básica de inseticidas organofosforados

Fonte: Dos Santos, *et al* 2007²⁰

Os organofosforados são ésteres fosfóricos amplamente utilizados na agropecuária como inseticidas, ocasionando intoxicações acidentais em animais e humanos, e mesmo sendo utilizados em tentativas de suicídio.^{20,14,15}

No Sistema de Informações sobre Agrotóxicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estão registrados 38 ingredientes ativos da classe dos organofosforados, entre eles, acefato, bromofós, clorpirifós, diazinona, diclorvós, etoprofós, fenclorfós, fentiona, malationa, metamidofós, parationa metílica, pirimifós e temefós.³

A principal razão para o sucesso dos compostos organofosforados como inseticidas é sua forte atividade biológica acoplada com sua relativa instabilidade na biosfera, que se traduz em uma meia-vida em plantas da ordem de 2 até 10 dias.¹⁹ No meio ambiente estes compostos organofosforados são degradados no período de 1 a 12 semanas,²¹ no entanto, existe a possibilidade de permanecerem na água resíduos e subprodutos em níveis relativamente nocivos para o consumo humano.^{9,22}

Em casos de intoxicação humana com organofosforados é indicada a ingestão de Atropina, comumente encontrada na forma de Sulfato de atropina. A atropina é um alcalóide, encontrado na planta *Atropa belladonna* e outras de sua família.²³ Como antídoto, a atropina antagoniza as ações dos inibidores da colinesterase, diminuindo as secreções salivar e brônquica e o estreitamento dos brônquios²⁴ (Figura 2). Em doses elevadas, a atropina bloqueia as funções do sistema nervoso parassimpático.²⁵

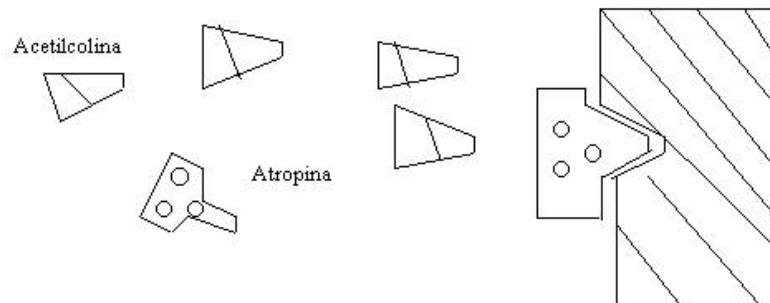


Figura 2. Bloqueio dos receptores muscarínicos da Acetilcolina pela Atropina.

Disponível em: Larini 1993²⁶

Existe um outro grupo de fármacos que pode ser usado no tratamento da intoxicação colinérgica e tem como objetivo a regeneração da acetilcolinesterase destruída pelos anticolinesterásicos. Trata-se do grupo das oximas, incluindo a pralidoxima, a diacetilmoxima e a obidoxima (Figura 3). A pralidoxima regenera especialmente a colinesterase da placa mioneural. Por ser carregada positivamente, a pralidoxima não consegue atravessar a barreira hematoencefálica, não sendo capaz de converter os efeitos de intoxicação ao nível do sistema nervoso central. A diacetilmoxima é uma oxima que atravessa a barreira hematoencefálica, sendo capaz de regenerar grande parte da colinesterase central, em animais experimentais.²⁵

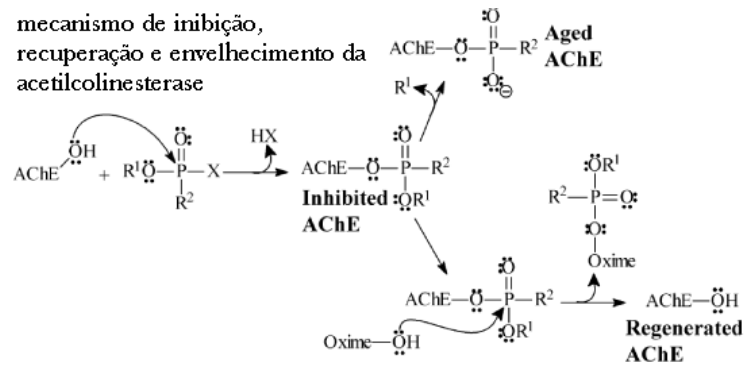


Figura 3. Inibição e Regeneração da Acetilcolinesterase.

Disponível em: <http://neuromed87.blogspot.com/>²⁷

Os organofosforados exercem sua ação principalmente por inibição enzimática, o que determina sua toxicidade. Dentre as enzimas, as esterases e, mais especificadamente, a acetilcolinesterase, constituem o principal alvo da toxicidade.²⁸

A acetilcolina é sintetizada em neurônios a partir da acetilcoenzima A e da colina (Figura 4). É inativada por hidrólise sob ação da acetilcolinesterase, com formação de colina e ácido acético que, por sua vez, são reutilizados para formação da acetilcolina.²⁹

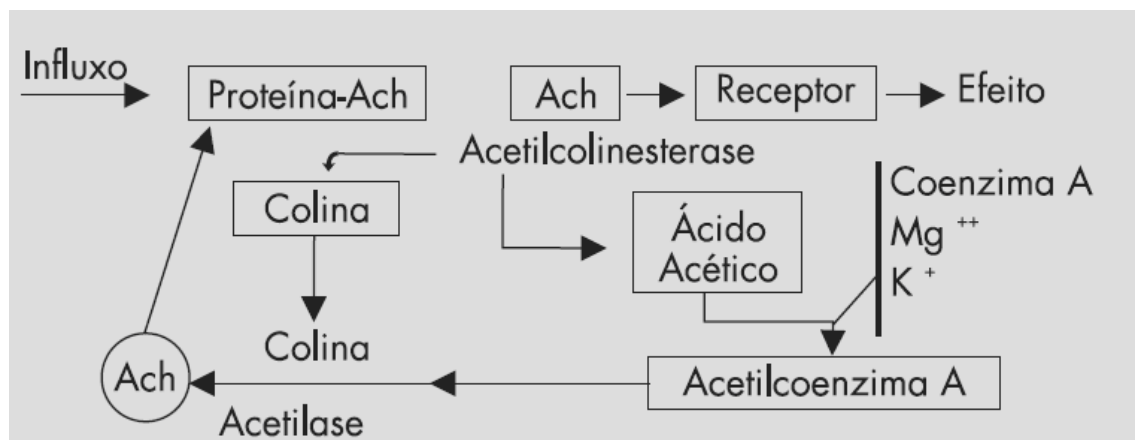


Figura 4 – Síntese e hidrólise da acetilcolina

Fonte: Schwartsman, S. 1991²⁹

A acetilcolina é o mediador químico necessário para transmissão do impulso nervoso em todas as fibras pré ganglionares do SNA, todas as fibras parassimpáticas pós-ganglionares e algumas fibras simpáticas pós-ganglionares (Figura 5). Ainda é o transmissor neuro-humoral do nervo motor do músculo estriado (placa mioneural) e algumas sinapses interneurais do SNC. Para que haja a transmissão sináptica é necessário que a acetilcolina seja liberada na fenda sináptica e se ligue a um receptor pós-sináptico. Em seguida, a acetilcolina disponível é hidrolizada pela acetilcolinesterase. Quando há a inibição da acetilcolinesterase, ocorre um acúmulo de acetilcolina na fenda, faz com que a transmissão colinérgica pós-sináptica não cesse no tempo adequado, levando a uma hiperestimulação colinérgica.^{30,31}

O sítio alvo da acetilcolinesterase é composto por uma tríade catalítica composta por resíduos de aminoácidos serina, histidina e glutamato. O mecanismo de hidrólise envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da acetilcolina, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. Ao final a hidrólise do grupo acetila da serina pela água, recupera o sítio catalítico da enzima.³²

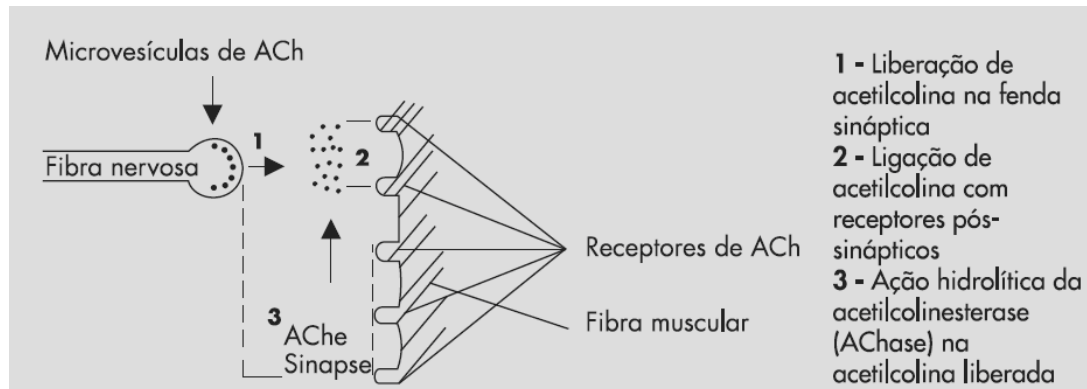


Figura 5 – Transmissão do impulso nervoso pela acetilcolina

Fonte: Larini, L. 1979³³

Os organofosforados inibem a acetilcolinesterase através da interação do sítio ativo da serina para formar um derivado fosforilado. A reação é análoga aquela com o substrato acetilcolina, exceto que o derivado é muito mais resistente a hidrólises subsequentes que o derivado acetilado e a inibição é, basicamente, irreversível.²⁸

Na presença de alguns inibidores, este ácido é hidrolisado lentamente, levando dias ou semanas, ou podendo durar meses, sendo determinada pelo tempo requerido para a síntese de novas moléculas de acetilcolinesterase. A frequência de reativação varia de acordo com a estrutura química do organofosforado, localização celular e forma da enzima. Existem diferentes formas polimórficas da acetilcolinesterase mesmo em uma mesma espécie, cada qual com seu padrão de inibição e reativação.^{28,34} Quando há inibição prolongada, ocorrem alterações nos grupos básicos, e a enzima fosforilada não pode ser recuperada com a ajuda de reativadores. Este fenômeno é conhecido como envelhecimento.²⁸

2.1.1.1. Triclorfon

O Triclorfon (dimetil 2,2,2, tricloro-1-hidroxi metil fosfonato) (Figura 6) é um inseticida e acaricida organofosforado, solúvel em água, amplamente utilizado no controle de várias pragas em campos, lares, plantas e contra parasitas em animais domésticos e comerciais.³⁵

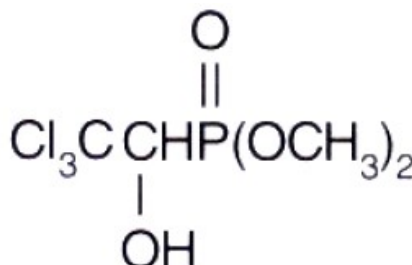


Figura 6- Estrutura química do Triclorfon
Fonte: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007³

No ambiente, o Triclorfon possui curta duração e é degradado rapidamente em solos aeróbios, com meia vida estimada entre 3 e 27 dias. Apresenta baixa persistência no solo, não sendo adsorvido, e desta forma, tende a migrar para terras subterrâneas. É solúvel em água e estável em condições ácidas, apresentando meia-vida de 31 minutos em pH 9, de 34 horas em pH 7 e de 104 dias em pH 5.^{36,37} É importante conhecer o comportamento dos agrotóxicos em função do pH de suas soluções ou suspensões aquosas, a fim de reduzir a perda da atividade inseticida e, ainda, controlar eventuais problemas de intoxicações pelo aumento da toxicidade³⁸. Segundo a ANVISA o Triclorfon é classificado como de classe toxicológica II – altamente tóxico ao meio ambiente.³

A hidrólise do Triclorfon ocorre rapidamente, gerando o metabólito diclorvós, que é um organofosforado altamente tóxico, devido a sua alta atividade anticolinesterásica. O metabólito diclorvós, e não o triclorfon, é o agente potencialmente tóxico.³⁸ O diclorvós, formado a partir da desidrocloração do triclorfon, sofre posteriormente processo de hidrólise reduzindo sua ação tóxica pela formação de produtos não-tóxicos, como mostra a equação C da Figura 7.³⁹

como resultado do uso persistente de pesticidas que matam indivíduos com alelos suscetíveis e não matam aqueles que possuam alelos resistentes.⁴¹

Apesar dos vários estudos documentados sobre a resistência, o número de mecanismos envolvidos é bastante pequeno e inclui diminuição da taxa de penetração pela cutícula, detoxificação metabólica aumentada e diminuição da sensibilidade do sítio alvo. Todos esses mecanismos são inespecíficos e, geralmente, conferem resistência cruzada a outro inseticida estruturalmente relacionado.⁴²

O processo de resistência é multifatorial, um mecanismo bem caracterizado é a superexpressão da glicoproteína P, Esta proteína funciona como uma bomba de efluxo dependente de energia, capaz de transportar drogas para o exterior da célula, diminuindo a concentração intracelular a níveis subletais.⁴³ O bombeamento de drogas e xenobióticos realizado por essas proteínas conferem ao organismo a característica de resistência a multidrogas (MDR) ou multixenobióticos (MXR).⁴⁴

Desde a década de 1990, vem se alertando que o uso intensivo dos compostos químicos é o fator mais importante para o aparecimento da resistência parasitária.⁴⁵ Mais de 540 espécies de insetos e ácaros resistentes a pelo menos uma classe de composto químico já foram documentadas até o final da década de 90. A resistência já foi detectada para praticamente todos os grupos de inseticidas incluindo o DDT, ciclodienos, organofosforados, carbamatos, piretróides, etc.²

Dentre as consequências drásticas da evolução da resistência, estão: a aplicação mais freqüente de inseticidas; aumento da dosagem do produto; uso de misturas indevidas de produtos e substituição por um outro produto, geralmente de maior toxicidade.²

2. 3. Considerações sobre as espécies estudadas

2.3.1. Insetos

O número de espécies de insetos descritas é estimado em aproximadamente um milhão, das quais cerca de 10% são pragas, prejudicando plantas, animais domésticos e o próprio homem. A Classe Insecta difere das demais classes de artrópodes com 3 pares de pernas, pelo aparato bucal ectógnato (peças bucais fora da cavidade bucal). O corpo dos insetos é dividido em 3 regiões típicas e distintas: cabeça, tórax e abdome.^{2,46}

A cabeça apresenta um par de antenas, dois olhos compostos, nenhum ou até 3 ocelos, armadura bucal composta de lábios superior e inferior, mandíbulas, maxilas, epi e hipofarige. O tórax é composto por três segmentos, todos com um par de pernas, além de apresentarem ou não asas no 2º e 3º segmentos. Pelo número de pernas são considerados hexápodes (6 pernas), e pelo número de asas podem ser ápteros (sem asas), dípteros (duas asas) ou tetrápteros (4 asas); o abdome com 6 a 11 segmentos verdadeiros, termina ou não com apêndices sensoriais, locomotores e genitais. ^{2,46}

2. 3. 1. 1. Aparelho circulatório

O sistema circulatório em insetos serve principalmente como um meio de trocas químicas entre os órgãos do corpo, funcionando no transporte de materiais nutritivos, produtos de excreção, hormônios, etc., o meio circulante se chama hemolinfa. O aparelho circulatório consta de um vaso que percorre o inseto dorsal e longitudinalmente, chamado vaso dorsal, tecidos associados a esse, além de órgãos pulsáteis acessórios. O vaso dorsal apresenta um tubo mais ou menos simples, fechado em sua extremidade posterior e aberto em sua extremidade anterior, formado por fibras musculares envolvidas por uma cobertura de tecido fibroso. O coração mostra evidência de segmentação(Figura 8). A aorta que é a porção anterior do vaso dorsal, abre-se diretamente na cabeça, sendo o cérebro livremente banhado pela hemolinfa. ^{2,46,47}

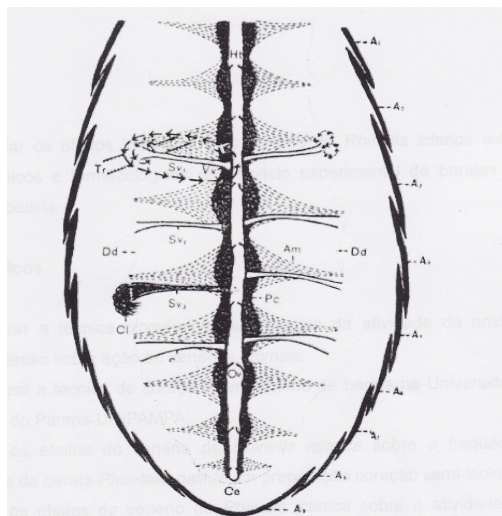


Figura 8 – Coração de barata
Fonte: ADIYODI, K.G. 1981 ⁴⁸

2.3.1.2. Sistema nervoso

O sistema nervoso é composto por células nervosas conhecidas por neurônios. Um outro importante componente do sistema nervoso são as células gliais. O sistema nervoso dos insetos está localizado ventralmente e consiste no cérebro localizado na região da cabeça, que está conectado por um par de nervos ao redor do estomodeu a uma série de gânglios da corda nervosa ventral. Tipicamente, cada segmento do corpo possui um par de gânglios ligados por comissuras e unidos aos gânglios dos segmentos adjacentes por conectivos (Figura 9). O sistema nervoso dos insetos é constituído do sistema nervoso central, sistema nervoso visceral e sistema nervoso periférico. Nenhum dos gânglios contém centro absolutamente vital, razão pela qual um inseto decapitado ainda pode caminhar. Acetilcolina, glutamato, octopamina e GABA são os principais neurotransmissores envolvidos na condução de impulso nervoso.^{2,47}

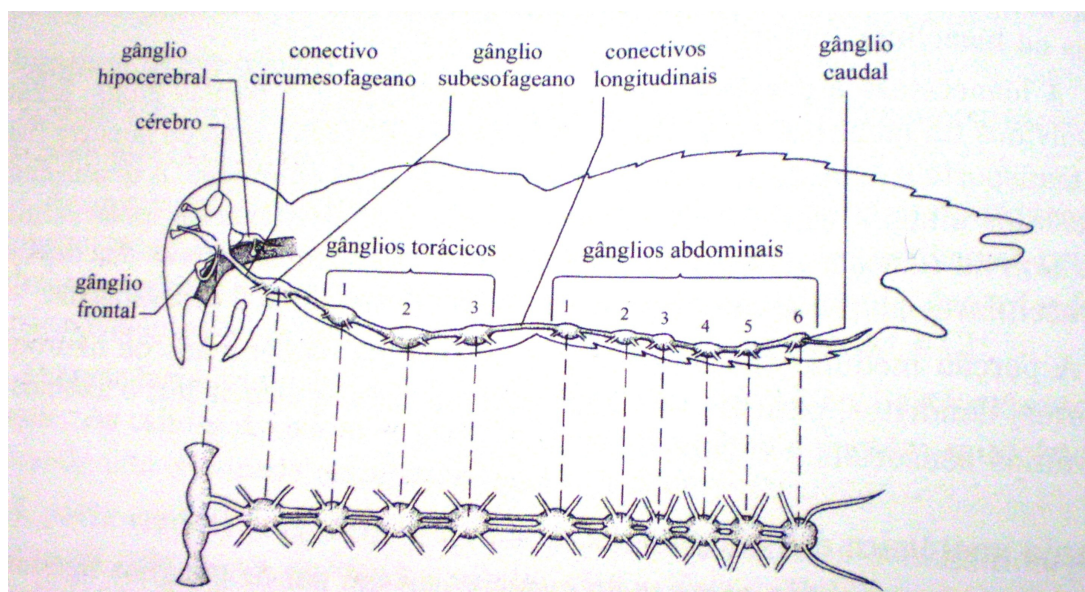


Figura 9 - Sistema nervoso central de um Orthoptera
Fonte: Romoser e Stoffolano, 1998⁴⁹

2.3.2. Baratas

São pertencentes à ordem Blattodea, descrita por Brunner, 1882. Possuem corpo ovalado, deprimido. O tamanho varia de alguns milímetros a alguns centímetros. Em geral tem coloração parda, marrom ou negra. Cabeça curta, subtriangular; olhos grandes;

geralmente, dois ocelos. Antenas filiformes ou setáceas inseridas entre os olhos compostos. Aparelho bucal mastigador. Pronoto largo, achatado, cobrindo a cabeça. Pernas ambulatórias, coxas grandes, fêmures e tíbias com espinhos; tarsos em geral pentâmeros. Asas anteriores do tipo tégmina e as posteriores membranosas, geralmente com área anal bem desenvolvida. Abdome sésil, alargado e deprimido, em geral, com 10 segmentos. ²

As baratas (Figura 10) constituem um grupo de insetos muito utilizados em bioensaios para identificação de novas substâncias com atividade inseticida ou repelente, havendo a possibilidade de se avaliar a atividade inseticida por contato, ingestão ou ainda como reguladora de crescimento. A facilidade de criação com baixo custo e o elevado potencial reprodutivo contribuíram para o uso destes insetos na presente pesquisa.⁵⁰ As baratas, no entanto, possuem também papel importante em saúde pública, transportam diversos agentes patogênicos⁵¹ que ficam aderidos ao corpo, principalmente, em pêlos e cerdas das pernas, sendo transportados mecanicamente de uma área contaminada para a uma área limpa.⁵²

O coração da barata tem sido objeto de estudos em bioensaios de agentes farmacológicos e hormônios. Frequentemente a preparação de coração semi-isolado de barata é empregada, após a remoção da cabeça, tórax e dos órgãos internos. O coração exposto, anexado à cutícula dorsal é banhado em solução salina que deverá conter os compostos a serem testados. Assim até o momento foram descritos os efeitos de várias drogas como a acetilcolina, 5-hidroxitriptamina, dopamina, sinefrina, octopamina, triptamina, aminofilina, e prostaglandinas cujos respectivos receptores devem estar presentes nesse órgão ⁵³. E mais recentemente foi testado o veneno de *Rhinella icterica*. ⁵⁴



© josef dvořák 2001

Figura 10 - *Phoetallia palida*
Disponível em: www.insect.cz ⁵⁵

2.3.3. Moscas

São pertencentes à ordem Díptera, descrita por Linnaeus em 1758.²

Quanto a sua morfologia, *Drosophila melanogaster* (Figura 11) apresenta o corpo dividido em cabeça, tórax e abdome. Na cabeça, distinguem-se as antenas, os olhos e as peças bucais; no tórax, que é constituído por 3 segmentos, apresenta 3 pares de patas; no abdome, possui uma nítida segmentação e é este que constitui o centro de nutrição. O uso da mosca da fruta como modelo experimental tem como principais vantagens: fácil cultivo no laboratório; ciclo de vida curto; reduzidas dimensões (3 a 4 mm); produz grande descendência; apresenta dimorfismo sexual, sendo fácil a distinção dos sexos; as culturas ocupam pouco espaço; fácil manuseamento e observação.⁵⁶



Figura 11 - *Drosophila melanogaster*

Disponível em: <http://www.biology-blog.com/blogs/permalinks/7-2007/fruit-fly-gene-from-out-of-nowhere.html>⁵⁷

3. Objetivos

Estudar os efeitos toxicológicos induzidos pelo Triclorfon sobre parâmetros biológicos, farmacológicos e bioquímicos em modelo experimental de insetos.

3.1. Objetivos específicos

- 1- Determinar a dose letal mínima (DL50) do composto Triclorfon em moscas da espécie *Drosophila melanogaster* (mosca das frutas);
- 2- Determinar a neurotoxicidade central induzida pelo Triclorfon por meio do teste de “grooming” em insetos da espécie *Phoetallia palida*;
- 3- Determinar a neurotoxicidade periférica induzida pelo Triclorfon por meio da avaliação da atividade neurolocomotora em insetos da espécie *Phoetallia palida*;
- 4- Determinar os efeitos cronotrópicos induzidos pelo organofosforado Triclorfon em preparação coração semi isolado de *Phoetallia palida*.
- 5- Avaliar o efeito da atropina na resposta cronotrópica ao Triclorfon em preparação coração semi-isolado de *Phoetallia palida*.

4. Materiais e Métodos

4.1. Solução Nutritiva para insetos

Solução fisiológica para insetos (pH 7,4) – composição em 15 μ M- NaCl. Origem do sal: Quimibrás Industrias Químicas Rio de Janeiro. As soluções testes foram preparadas imediatamente antes dos experimentos.

4.2. Reagentes

No presente trabalho foi utilizada a formulação comercial do pesticida organofosforado triclorfon (dimetil 2,2,2, tricloro-1-hidroximetil fosfonato $C_4H_8Cl_3O_4P$), marca comercial Triclorvet® - Allvet. (Foto 12).

Santropina, ou Sulfato de atropina , disponível na dose de 0,5 mg- 2 ml, gentilmente cedido pelo Hospital Militar de São Gabriel – RS.



Figura 12 – Forma comercial do Triclorfon utilizado nos experimentos - Triclorvet®

4.3. Animais

4.3.1. Baratas

Foram utilizadas baratas adultas, de ambos os sexos, da espécie exótica *Phoetallia palida*, compradas de criadouro legalizado (Insetos on-line, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e acondicionadas em caixa especial para insetos medindo 30cmx20cm. Os animais foram alimentados com ração de cachorro (Purina®) e água potável *ad libitum* e mantidos em temperatura ambiente até o momento dos experimentos.

4.3.2. Moscas

Foram utilizadas moscas-da-fruta, *Drosophila melanogaster*. Conservadas em estufa a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e $90 \pm 3\%$ de umidade, cerca de 300 moscas *Drosophila melanogaster* foram mantidas em frascos de vidro (250 mL) contendo meio nutritivo preparado.

4.4. Ensaio Bioquímico

4.4.1. Medida da atividade anticolinesterásica

A inibição *in vitro* da Acetilcolinesterase foi avaliada de acordo com os ensaios descritos por ELMANN *et al* (1961)⁵⁸ com algumas modificações (FRANCO *et al*, 2009)⁵⁹. Os animais tiveram suas cabeças removidas e homogeneizadas em tampão fosfato salina fria (pH 7,0) e centrifugado a 500 rpm por 5 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade da acetilcolinesterase em espectrofotômetro a 412 nm. (Thermo Scientific Evolution 60S UV - Visible Spectrophotometer, Espectrofotômetro NanoVue Plus)

4.5. Preparação biológica

4.5.1. Determinação da DL₅₀ do Triclorfon em ensaios com *Drosophila melanogaster*

Nas determinações da DL₅₀ foram preparadas soluções do inseticida em várias concentrações. Para cada concentração, alíquotas de 500 µL destas soluções foram distribuídas em papel-filtro colocado sobre a superfície interna de frascos de vidro de 12 cm de altura por 5 cm de diâmetro interno. A cada teste realizado, foi preparado um frasco controle contendo 500µL de sacarose. As moscas, anestesiadas com baixas temperaturas, foram distribuídas nos frascos em número de 50 (sexo1:1) e, em seguida mantidos em estufa a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e $90 \pm 3\%$ de umidade. As percentagens de mortalidade foram determinadas após 24 e 48 horas de exposição e, para se estabelecer os valores da DL₅₀ a partir da mortalidade.

38

4.5.2. Preparação coração semi isolado de barata

A cardiotoxicidade do composto foi observada em preparação coração semi-isolado de barata.⁶⁰ As baratas adultas (*Phoetallia palida*) são anestesiadas com algumas gotas de éter etílico e imobilizadas com alfinetes entomológicos, com o lado ventral para cima. As margens laterais do abdome são cortadas ao longo de cada lado, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e após a remoção da cutícula abdominal com a ajuda de uma pinça, expondo as vísceras que são afastadas com a ajuda de alfinetes para expor o coração (Figura 13). O coração foi banhado em solução salina 15µM em temperatura ambiente. Após 5 minutos iniciais para estabilização da frequência cardíaca, as diferentes concentrações do composto foram adicionadas sobre o coração, em um volume final de 150µl/animal. A frequência cardíaca foi monitorada durante 30 minutos com a ajuda de um microscópio estereoscópio (Olympus, Damstat, Alemanha). E após esse tempo a preparação foi lavada com solução salina para ver se há recobro na frequência cardíaca.

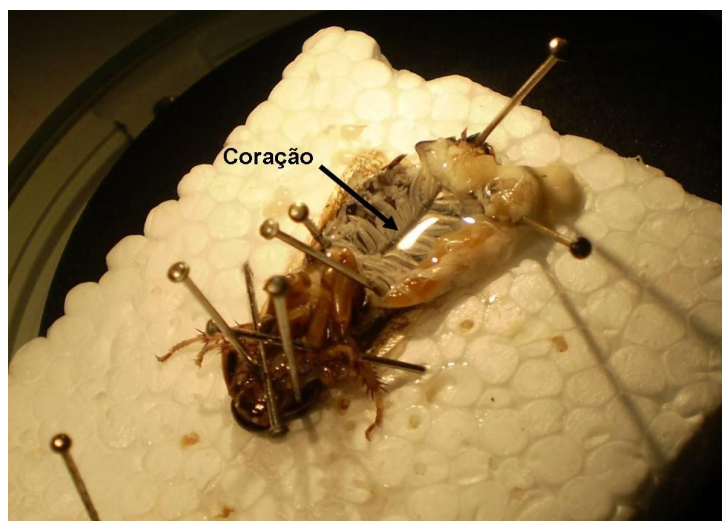


Figura 13 – Preparação Coração semi isolado de barata

4.5.3. Teste de *grooming*

O comportamento de *grooming* é típico de insetos e se reflete no ato do animal limpar as antenas e as patas com a boca várias vezes ao dia (Figura 14). Esse hábito tem sido caracterizado como um reflexo da estimulação do sistema nervoso central pela liberação de neurotransmissores monoaminérgicos.⁶¹ Dessa forma, durante um período de 30 minutos observou-se os animais e o número de groomings foi anotado antes e após o tratamento com o pesticida, num volume final de 20 μ l/g animal. Para tal foi usada uma caixa de plástico (29x18x13 cm) com tampa transparente removível. Os animais nunca usaram a caixa anteriormente, e, portanto, será um ambiente novo em todos os casos. A temperatura na sala de ensaios se foi mantida em 25 a 30°C.

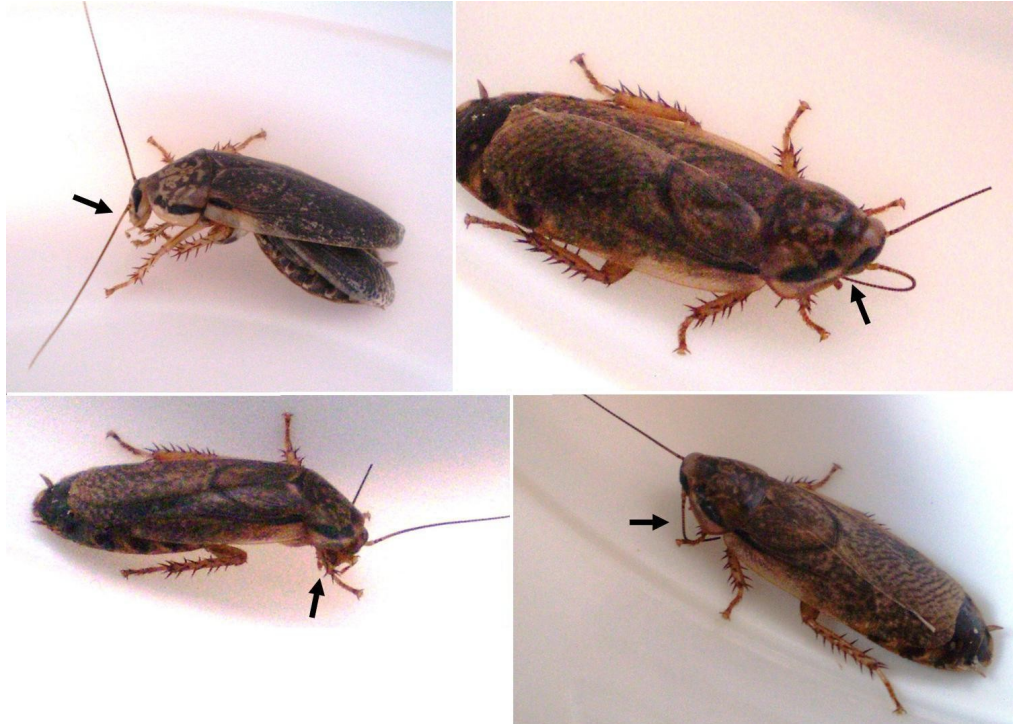


Figura 14 - Atividade de grooming em baratas

4.5.4. Teste de atividade neurolocomotora

O teste da atividade neurolocomotora foi realizado como descrito por KAGABU *et al* (2007)⁶² adaptado para nossas condições experimentais. Dessa forma, as baratas da espécie *P.palida* foram colocadas em um recipiente preenchido com água (2L). A água consiste em um estímulo estressante para o animal fazendo com que o mesmo movimente as patas posteriores intermitentemente. Esse movimento foi observado durante 3 minutos, para o controle e para o animal tratado. O animal foi injetado, num volume final de 20 μ l/animal, com diferentes concentrações de Triclorfon e as modificações no comportamento (hiper ou hipocinesia) foram anotadas.

4.6. Análise estatística

Os dados foram plotados ponto a ponto como média e erro padrão de dos experimentos, com auxílio do programa Microsoft Excell (Microsoft Windows 97. A análise estatística foi realizada usando-se os métodos teste “t” de Student ou Anova para medidas repetidas por meio do software OriginPro 8 (OriginLab Co, Northampton, MA, USA).). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

5. Resultados

5.1. Análise bioquímica

5.1.1. Análise da atividade anticolinesterásica

A medida da atividade da enzima colinesterase demonstrou que o organofosforado Triclorfon inibe reversivelmente essa enzima, nas concentrações testadas. Quando os homogenizados de cabeça de barata foram incubados com Triclorfon (0,6 μ M; 1,2 μ M e 2,4 μ M) uma alteração significativa na dose de 1,2 μ M foi observada quando comparada ao controle sem veneno. (n=3 p <0,05. Figura 15).

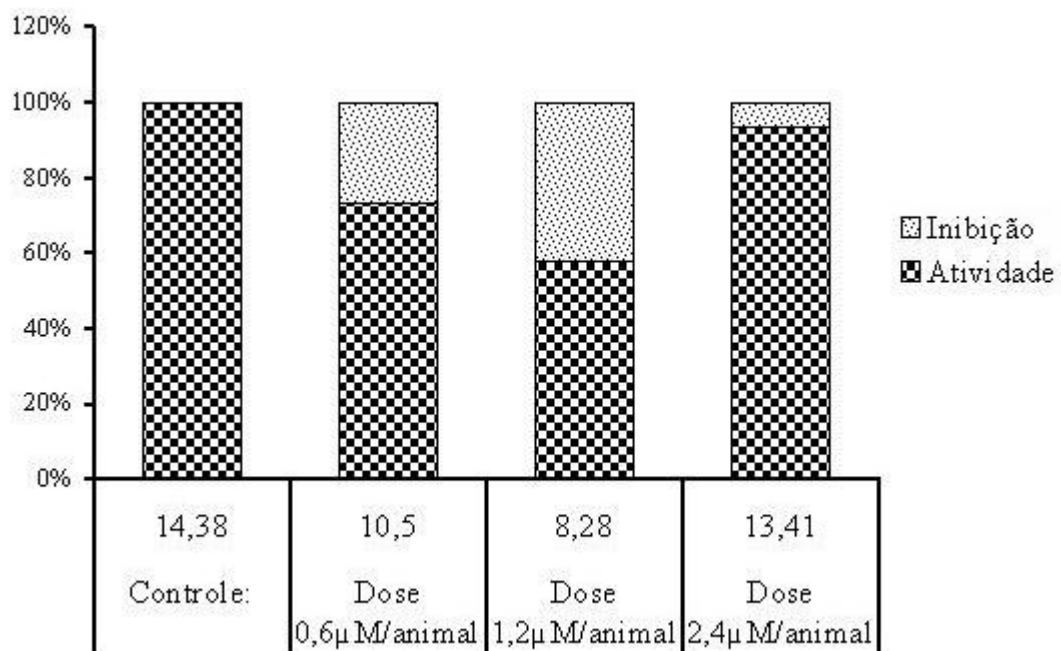


Figura 15 - Análise da atividade da enzima Acetilcolinesterase em substrato de cérebro de barata da espécie *Phoetallia palida*. O gráfico representa a média dos tratamentos. * significância para p<0.05.

5.2. Ensaio Biológicos

5.2.1. Determinação da DL_{50} em *Drosophila melanogaster*

Dose Letal 50 - DL_{50} que é a quantidade de uma substância química que, quando é administrada em um grupo de animais, produz a morte de 50% dos indivíduos em um período de observação de 24 e 48 horas. Os resultados dos testes de avaliação de DL_{50} estão expressos na figura 16.

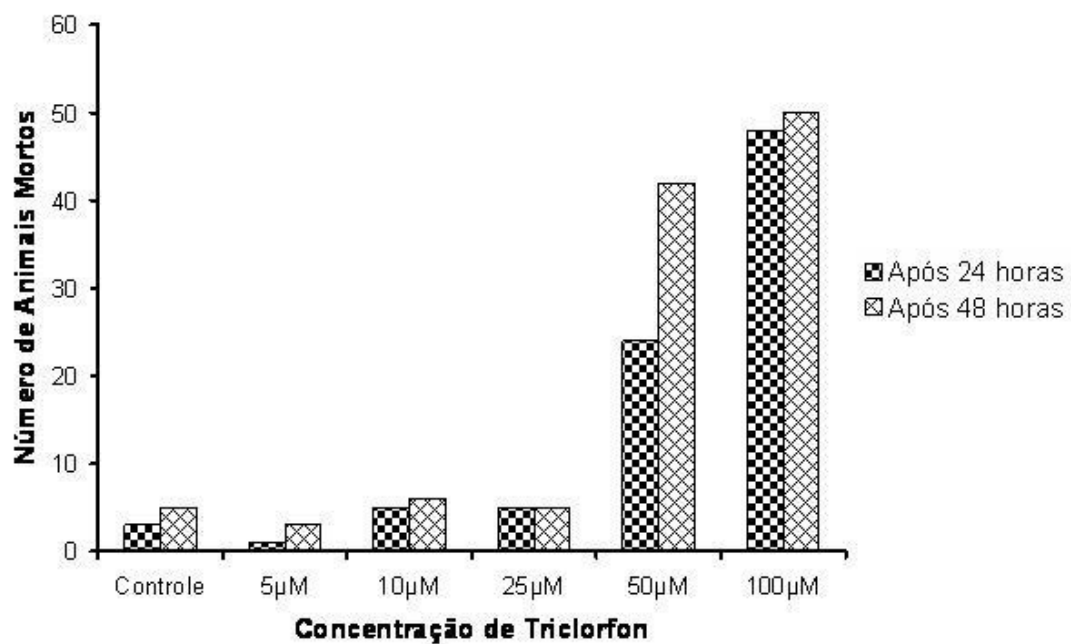


Figura 16 - Determinação da DL_{50} em moscas da fruta (*Drosophila melanogaster*) administradas com diferentes concentrações de Triclorfon após 24 e 48 horas. * significância para $p < 0.05$

5.2.2. Efeito do Triclorfon em Coração semi isolado de barata

Em preparação CSIB, o Triclorfon em doses de 0,6 μ M; 1,2 μ M e 2,4 μ M por animal induziu um efeito dose e tempo-dependente sobre a frequência cardíaca. Experimentos controle somente com solução salina também foram realizados.

Assim, um efeito cronotrópico positivo máximo de $15 \pm 4\%$ foi observado já aos 4 min após a aplicação da droga (0,6 μ M/animal; n=3, p<0,05). Por outro lado, após a administração do Triclorfon (2,4 μ M) houve uma diminuição gradativa da frequência cardíaca que atingiu $50 \pm 1\%$ aos 15 min não havendo recobro em 30 min (n=3, p<0,05). Em todos os testes a substituição da droga por solução salina ao final do experimento recobrou a frequência cardíaca aos níveis controle (Figura 17).

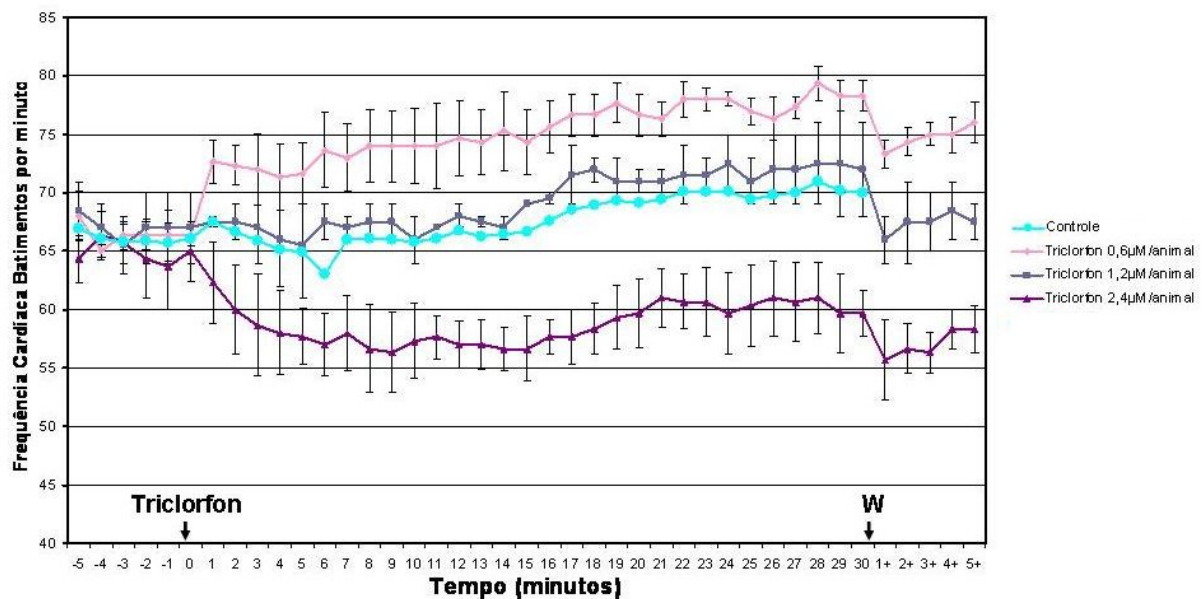


Figura 17 - Média dos efeitos cronotrópicos induzidos pelo organofosforado Triclorfon em preparação coração semi isolado de *Phoetallia palida*. O gráfico apresenta a média \pm erro padrão dos três experimentos.

W: lavagem da preparação com solução salina

5.2.3. Atividade da Atropina em Coração semi isolado de barata

A administração de atropina em mamíferos serve como antídoto, atuando como antagonista às ações da acetilcolina sobre receptores muscarínicos. Assim, o objetivo desse protocolo foi o de avaliar o efeito da Atropina sobre a frequência cardíaca da barata tratada com Triclorfon. Dessa forma, quando a atropina foi administrada $9\mu\text{M}/\text{animal}$ observou-se um recobro da frequência cardíaca aos níveis iniciais, de antes da adição do Triclorfon (Figura 18). A retirada da droga por meio da substituição da solução salina (wash) foi eficaz em retornar os batimentos cardíacos ao nível do controle. Esses resultados demonstram a presença de receptores metabotrópicos colinérgicos responsivos a atropina em baratas.

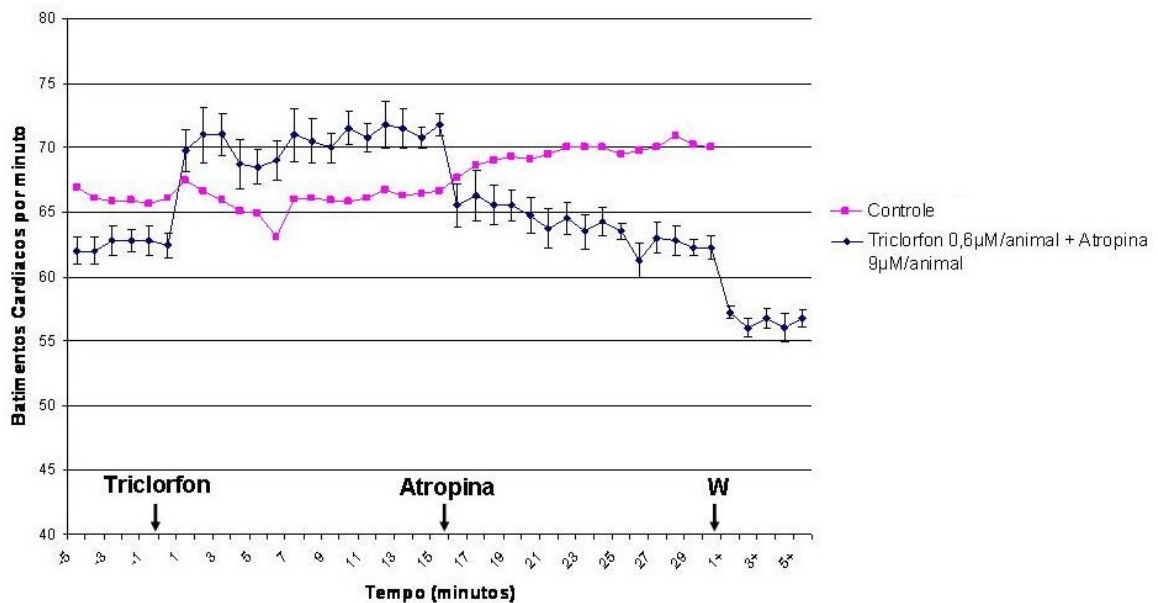


Figura 18 - Avaliação dos efeitos cronotrópicos induzidos pelo Triclorfon + Atropina em preparação de coração semi isolado de *Phoetallia palida*. O gráfico apresenta a média \pm erro padrão. **W**: Lavagem da preparação com solução salina para insetos. * significância para $p < 0.05$.

5.2.4. Avaliação do efeito do Triclorfon sobre o sistema nervoso central de *Phoetallia palida*, através do teste de *grooming*

O *grooming* em insetos serve como o comportamento de limpar a superfície exterior do corpo. O triclorfon, como um inibidor da acetilcolinesterase, aumenta a quantidade do neurotransmissor acetilcolina no sistema nervoso central do inseto. Neste protocolo observou-se um aumento significativo do comportamento de *grooming* nas três doses administradas (0,6 μ M; 1,2 μ M e 2,4 μ M/animal) em um volume total de 20 μ l por animal (n=5 p<0.05 Figura 19). Assim, quando a dose de 1,2 μ M/animal foi administrada houve um aumento máximo de 380 \pm 5% na taxa de *grooming* quando comparado com o controle (p<0.0, n=5).

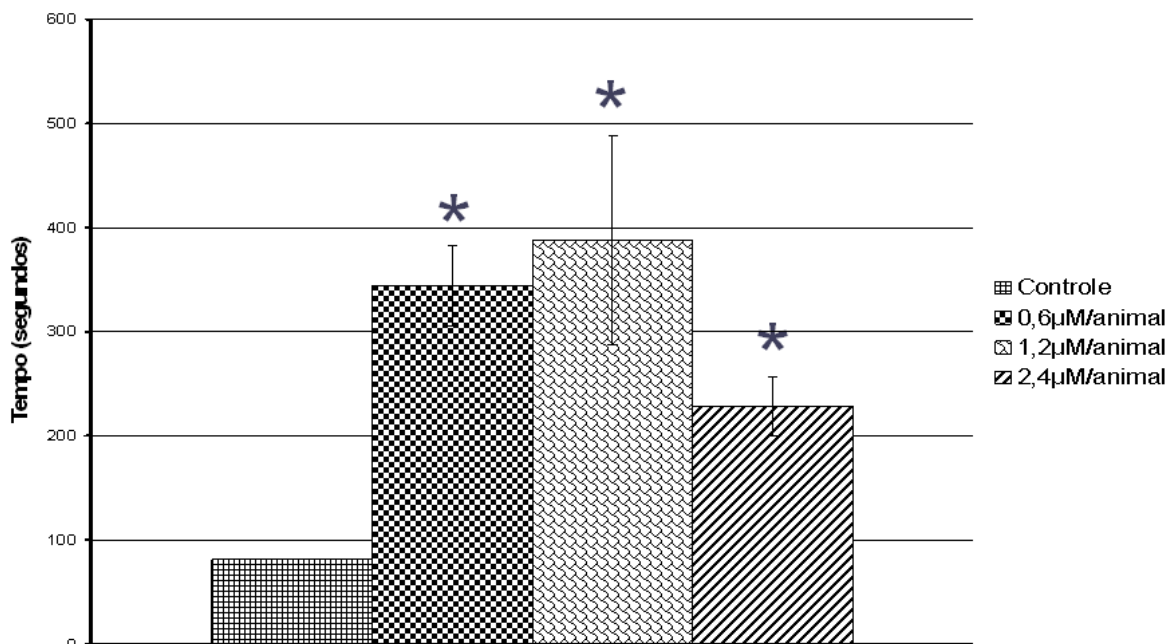


Figura 19 - Avaliação do comportamento de grooming em baratas da espécie *Phoetallia palida* tratadas com diferentes concentrações de triclorfon. * significância para p<0.05.

5.2.5. Avaliação do efeito do triclorfon sobre o sistema neurolocomotor de barata

O glutamato é o neurotransmissor excitatório presente em junções neuro-musculares de insetos. Existem alguns inibidores competitivos que inibem a despolarização, induzida por glutamato, em membranas pós-sinápticas. Contudo, não existem ainda produtos comerciais que tenham como sítio de ação os receptores de glutamato.⁵⁷ O triclorfon sendo um organosforado legítimo, inibe a acetilcolinesterase, resultando numa hiperestimulação causada pelo acúmulo do neurotransmissor acetilcolina nas membranas pós-sinápticas. Nesse protocolo observou-se que o tempo de bloqueio neuromuscular diminui em animais tratados com triclorfon, ou seja, há uma facilitação dos movimentos. (Figura 20)

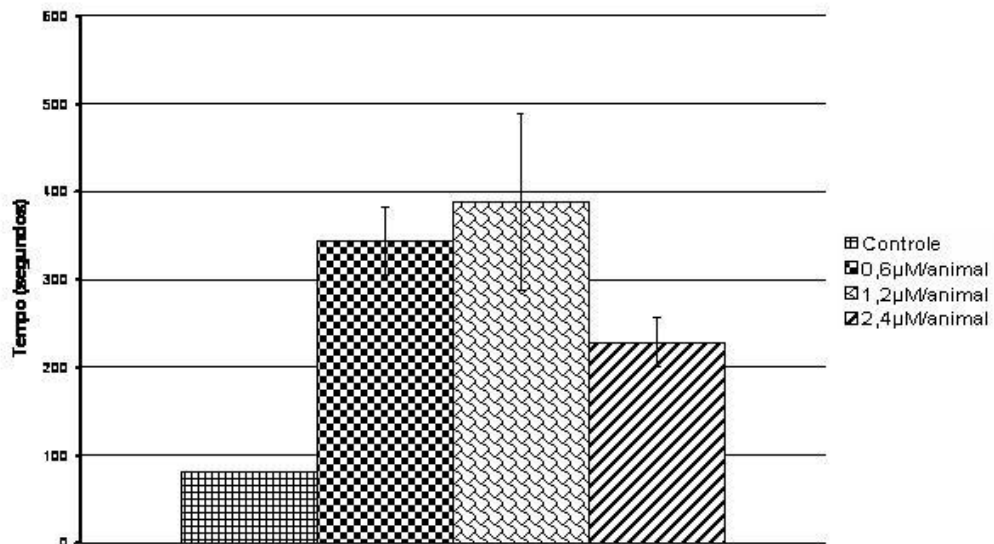


Figura 20 – Avaliação do efeito sobre a atividade neurolocomotora em *Phoetallia palida* após a administração do Triclorfon.

6. Discussão

Nesse trabalho foi evidenciado o efeito do organofosforado Triclorfon como inibidor da atividade da enzima colinesterase em insetos. Esse efeito pode ser evidenciado como um aumento no desenvolvimento do grooming, da atividade neurolocomotora bem como uma alteração no cronotropismo cardíaco. Os detalhes inerentes a essa inativação nesses diferentes sistemas serão discutidos abaixo.

Acetilcolinesterase (AChE), uma serina hidrolase, vital para a regulação do neurotransmissor acetilcolina em mamíferos e em insetos, tem sido usada como alvo para os inseticidas organofosforados e carbamatos. Estes últimos, reagem com um resíduo de serina no sítio catalítico, desativando assim a função da AChE.⁶³ Em testes bioquímicos realizados por nós foi demonstrado que o Triclorfon inibe a AChE principalmente nas doses de 0,6 e 1,2 μ M/animal. Por outro lado, na concentração de 2,4 μ M/animal houve uma inibição de 6% da atividade da enzima, possivelmente devido à ativação de algum mecanismo para a expressão de genes, para a produção de mais enzimas de AChE.⁶⁴ Esse mecanismo poderia demonstrar um efeito compensatório para o animal.

Em nossas condições experimentais evidenciou-se uma DL₅₀ de 50 μ M, inferior à indicada na bula do pesticida (97g/100ml). Esse dado reflete a superdosagem prescrita freqüentemente nas bulas o que provavelmente tenha o objetivo de diminuir a incidência de resistência em insetos. A utilização de pesticidas anticolinesterásicos tem sido limitada por problemas de resistência em insetos, por exemplo, em mosquitos da espécie *Anopheles gambiae* existe uma AChE mutante, como o G119S que é resistente aos organofosforados.⁶³ Enquanto que no mosquito *Culex quinquefasciatus* altos níveis de resistência foram associados à elevada produção de esterases,⁶⁵ em simulídeos, é a elevada atividade de esterases que tem sido associada à resistência aos organofosforados.^{66,67,68,69}

A preparação coração semi-isolado de barata tem sido usada em bioensaios de agentes farmacológicos e hormônios. Várias drogas já foram testadas até o momento e seus efeitos cardiomoduladores descritos.⁴⁸ A Acetilcolina, um colinérgico de ação direta sobre os receptores nicotínicos e muscarínicos, acelera a frequência cardíaca, provavelmente por atuar nos nervos cardíacos laterais.⁵³ Em preparação CSIB o Triclorfon induziu um efeito dose e tempo-dependente sobre a frequência cardíaca. Nos dados obtidos, na preparação coração semi isolado mostram que o composto quando administrado diretamente sobre o órgão alvo produz um efeito diferente do esperado, baseando-se na inibição da acetilcolinesterase. Isso

ocorreu porque o coração é um órgão muito sensível, e como foi exposto tornou-se mais suscetível a ação da droga. A dose de 1,2 μ M não alterou a frequência cardíaca do animal. Já na dose de 2,4 μ M ocorreu uma diminuição da frequência cardíaca, possivelmente, por intoxicação colinérgica. E associando esses dados, com a DI_{50} encontrada, mostra-se que possivelmente com uma dose acima de 2,4 μ M o animal, desenvolva algum mecanismo compensatório, por exemplo, induzindo o animal a expressar genes que produzam mais enzimas acetilcolinestases,⁶⁴ até chegar a um limite onde o animal não reage mais a droga, que acaba sendo letal. Dessa forma torna-se claro o papel da acetilcolina como substância moduladora da frequência cardíaca nesses animais, provavelmente por atuar em ambos os nervos, em receptores nicotínicos, e diretamente nas fibras de Purkinge, em receptores muscarínicos.⁷⁰

A atropina é o principal antídoto para intoxicações por inibidores da atividade colinesterásica como os organofosforados e carbamatos. Na literatura, a atropina é citada somente para casos de intoxicações em mamíferos, mostrando-se um antídoto eficaz quando administrada logo após os primeiros sinais de intoxicação. Com o objetivo de evidenciar o seu efeito em insetos a atropina foi administrada após a administração do Triclorfon no coração semi isolado de barata. A Atropina diminuiu a hiperestimulação, demonstrada através do aumento da frequência cardíaca, com o antídoto a frequência cardíaca voltou aos níveis iniciais, antes da administração do triclorfon. Esse é mais um dado importante e que evidencia a presença de receptores muscarínicos envolvidos também na modulação da frequência cardíaca em insetos.

O grooming em insetos, é uma atividade que tem a função de limpar a superfície exterior do corpo. Na barata, uma rotina de aliciamento de resposta consiste em algumas das atividades a seguir: limpeza das antenas, palpos e pernas com o bucais; fricção da cabeça e dos segmentos basais do antenas com os anteriores; fricção do abdome e cercos com as patas traseiras, e esfregando a parte inferior das asas com abdome.⁶¹ Em nossas condições experimentais ficou evidenciado que a acetilcolina é um neurotransmissor também envolvido no processo de grooming, já que houve aumento significativo dessa função após a aplicação do Triclorfon.

O triclorfon sendo um organofosforado legítimo inibe a acetilcolinesterase, o que ficou comprovado nesse estudo através de testes bioquímicos. Quando esse composto é administrado em concentrações ideais causa uma hiperestimulação em insetos pela inativação da AchE e conseqüente acúmulo de acetilcolina nas terminações nervosas. Em junções neuromusculares de insetos o neurotransmissor excitatório presente é o glutamato. Pode-se

notar através do teste de atividade locomotora, que o Triclorfon não age sobre o glutamato. Mas sim atua através da hiperestimulação demonstrando em todas as doses administradas que houve uma facilitação nos movimentos, demonstrados pelo menor tempo de bloqueio neuromuscular. Não foi possível em nossas condições experimentais determinar a maneira pela qual o Triclorfon atua sobre a junção neuromuscular de *Phoetallia palida*. Por outro lado, não podemos descartar a presença de grupos musculares colinérgicos também nas junções neuromusculares de insetos.

As evidências obtidas nesse trabalho demonstram que bioensaios com insetos são eficazes na determinação do mecanismo de ação de drogas e compostos químicos. Ficou também demonstrado o perigo no uso indiscriminado de agentes organofosforados, pela falta de seletividade dentre espécies animais e risco de contaminação e resistência quanto ao uso como inseticidas.

Conclui-se que o Triclorfon determina tanto ações em nível central como periférico em insetos e que essas ações juntamente com o importante efeito cardiotoxico, são oriundas da inativação da enzima acetilcolinesterase.

7. Conclusões

Os ensaios bioquímicos e biológicos realizados com o organofosforado Triclorfon permitem concluir que:

- O triclorfon inibe a enzima Acetilcolinesterase;
- A atropina atua como antídoto para organofosforados também em insetos;
- O triclorfon produz uma modulação do cronotropismo cardíaco possivelmente por atuar tanto em nervos como diretamente na fibra muscular cardíaca de *Phoetallia palida*;
- O triclorfon atua diretamente sobre os sistema nervoso central e periférico de insetos demonstrando a presença de enzimas colinesterases sensíveis à ação desse composto nesses sistemas.

8. Referências

- ¹ Marques, M. N.; Cotrim, M. B.; Pires, M. A. F.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1171.
- ² GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Volume 10. Piracicaba- SP. FEALQ, 2002.
- ³ Agência Nacional de vigilância sanitária – ANVISA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br> Acesso em: Setembro de 2010.
- ⁴ [WHO] World Health Organization. Global Environment Monitoring System/Codex Alimentarius Commission. **Guidelines for predicting dietary intake of pesticides residues**. Geneva; 1997
- ⁵ CALDAS, E. D. e Kenupp, L.C. **Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira** Rev. Saúde Pública, 34 (5): 529-37, 2000 www.fsp.usp.br/rsp
- ⁶ OLIVEIRA-SILVA, J.J., *et al.* **Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil**. Rev Saúde Pública 2001;35(2):130-135
- ⁷ Garcia EG. **Pesticide control experiences in Brazil**. *Pestic Saf* 1997;2:5.
- ⁸ Oliveira-Silva JJ, Meyer A. **O sistema de notificação das intoxicações: o fluxograma da joeira**. In: Peres F, Moreira JC, organizadores. **É veneno ou remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. p. 317-26.)
- ⁹ VEIGA, M.M. *et al* . **Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 22(11):2391-2399, nov, 2006
- ¹⁰ Dores, E. F. G. C.; Freire, E. M. L.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 27.
- ¹¹ Vlaming, V.; DiGiorgio, C.; Fong, S.; Deanovic, L. A.; Carpio-Obeso, M. P.; Miller, J. L.; Miller, M. J.; Richard, N. J.; *Environ. Pollut.* **2004**, *132*, 213.
- ¹² Mariconi, F. A. M.; **Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas**, 5ª ed., Nobel, São Paulo, 1981, vol. 1.
- ¹³ Brasil, Ministério da Saúde, Portaria n. 518 de 25 de março de 2004. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências; Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2004.
- ¹⁴ Faria NMX, Facchini LA, Fassa ACG, Tomasi E. **Processo de produção rural e saúde na serra gaúcha: um estudo descritivo**. Cad Saúde Pública 2000; 16:115-28.
- ¹⁵ Pires, D.X.; Caldas, E.D.; Recena, M.C.P. **Uso de agrotóxicos e suicídios**

no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 21(2):598-605, mar-abr, 2005

¹⁶ Organização Pan-Americana da Saúde. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos.** Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; 1996.

¹⁷ Toy, D. F.; *Phosphorus Chemistry in Everyday Living*, American Chemical Society: Washington, D. C., 1976.

¹⁸ Stoddart, J. F.; *Comprehensive Organic Chemistry: The synthesis and reaction of organic compounds.* 6th ed., Oxford, C1979.

¹⁹ Dos Santos *et al.* **COMPOSTOS ORGANOFOSFORADOS PENTAVALENTES: HISTÓRICO, MÉTODOS SINTÉTICOS DE PREPARAÇÃO E APLICAÇÕES COMO INSETICIDAS E AGENTES ANTITUMORAIS.** *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 1, 159-170, 2007

²⁰ CAVALIERE, M.J. *et al.* **Miotoxicidade por organofosforados.** Revista de Saúde publica. 30 (3) 1996

²¹ Larini, L.; *Toxicologia dos praguicidas*, Manole: São Paulo, 1999

²² Silva, F. C.; Matos, A. R.; Carvalho, C. R.; Cardeal, Z. L.; *Quim. Nova* **1999**, 22, 197.

²³ <http://acasatorta.wordpress.com/2008/11/03/atropina/> Acesso em: novembro de 2010.

²⁴ http://www.medicinanet.com.br/conteudos/medicamentos/180/atropina_injetavel.htm
Acesso em: novembro de 2010.

²⁵ Silva, Penildon. **Farmacologia.** 3ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro – RJ. 1989. p: 276.

²⁶ LARINI, L. Inseticidas. In: Larine, L.. Toxicologia, 2a ed. São Paulo; Editora Manole Ltda.; 1993, p. 136-163.

²⁷ <http://neuromed87.blogspot.com/> Acesso em: Novembro de 2010.

²⁸ Oga, Seizi . **Fundamentos de toxicologia/** Sezi Oga, Márcia Maria de Almeida Camargo, José Antônio de Oliveira Batistuzzo. 3ª ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

²⁹ Schvartsman, S. **Intoxicações Agudas.** 4a. ed. Sarvier, São Paulo; 1991. 335 p.

³⁰ Caldas, L. Q. A. **INTOXICAÇÕES EXÓGENAS AGUDAS POR CARBAMATOS, ORGANOFOSFORADOS, COMPOSTOS BIPYRIDÍLICOS E PIRETRÓIDES.** CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ANTÔNIO PEDRO UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE 2000

- ³¹ Filho AA, Campolina D, Dias MB. **Toxicologia na Prática Clínica**. 1a ed. Belo Horizonte: Folium; 2001.
- ³² VIEGAS JUNIOR, C. ; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. **Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer**. Química Nova, v.27, n.4, p. 655-660, 2004.
- ³³ Larini, L. **Toxicologia dos Inseticidas**. p. 57-86, Sarvier, São Paulo; 1979. 281 p.
- ³⁴ INESTROSA, N.C.; PERELMAN, A. **Distribution and anchoring of molecular forms of acetylcholinesterase**. Trends Pharmacol. Sci, v.10, p. 325-329, 1989
- ³⁵ Lopes, R.B. et al. **Bioconcentration of trochlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. Chemosphere, v.64, 2006.
- ³⁶ EXTTOXNET – Extension Toxicology Network. **Pesticide Information Profiles – Trichlorfon**. Disponível em: <http://extoxnet.orst.edu/pips/trichlor.htm> Acesso em 8/11/2010.
- ³⁷ EPA – ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY -. **Registration Eligibility Decision (Red) Trichlorfon**. Office of prevention, pesticides and toxic substances, 1997.
- ³⁸ HIRATA et al. **Avaliação de degradação de inseticidas, em função do pH, utilizando *Drosophila melanogaster* e teste de inibição enzimática**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.70, n.3, p.359-365, jul./set., 2003
- ³⁹ MATTSON, A.M., SPILLANER, J.T.; PEARCE, G.W. **Dimethyl 2,2-dichlorovinyl phosphate (DDVP), an organic phosphate compound highly toxic to insects**. J. Agric.Food Chem., v.3, p.319- 321, 1955)
- ⁴⁰ ALMEIDA, M. A. O.; AYRES, M.C.C. **Considerações gerais sobre os anti-helmínticos**. In: SPINOSA H. S.; GÓRNIAC S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 519-550.
- ⁴¹ Ima Aparecida Braga e Denise Valle. ***Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência*** Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília,16(4):279-293, out-dez, 2007.
- ⁴² Ferrari JA. **Insecticide resistance** In: The Biology of Disease Vectors. Colorado: University Press of Colorado; 1996.
- ⁴³ Wagner-Souza, K.; Meletti-de-Oliveira, M.C; Maia, R.C.; e Rumjanek. V.M. **Ciclosporina A e seus análogos como reversores da resistência a múltiplas drogas em células tumorais**. Revista Brasileira de Cancerologia, 2003, 49(2): 103-112

- ⁴⁴ BOARD, P.G. et al. **Identification, Characterization and Crystal Structure of the Omega Class Glutathione Transferases**. The Journal of Biological Chemistry, v.275, n. 32, pp. 24798-24806, 2000.
- ⁴⁵ THOMAZ-SOCCOL, V.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F. P. and CASTRO, E. A. **Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Paraná State, Brazil**. Veterinary Record, 139, 421-422, 1996.
- ⁴⁶ Ruppert, E.W.; Fox, R. S.; Barnes, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 7 ed. Roca: São Paulo, 2005.
- ⁴⁷ Randall, D.; Burggren, W.; French, K. **Fisiologia Animal**. 4 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.
- ⁴⁸ ADIYODI, K.G. **The American cockroach**. Kluwer Academic Publishers, 6ª edição. P 34-35, 1981.
- ⁴⁹ ROMOSER, W.S.; STOFFOLANO, J.G. **The Science of Entomology**. New York: McGraw-Hill, 1998. 605p.
- ⁵⁰ POTENZA, M.R., et al. **AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS IRRADIADOS PARA O CONTROLE DE *BLATTELLA GERMANICA* (L.) DICTYOPTERA: BLATTELLIDAE)*** *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.71, n.4, p.485-492, out./dez., 2004)
- ⁵¹ CORNWELL, P.B. **The cockroach. A laboratory insect and na industrial pest**. London: Hutchinson, 1968. v.1.,
- ⁵² SERRA-FREIRE, N. M. **Protozoários parasitos de baratas: mais um problema no controle da *Periplaneta americana***. *Vetores & Pragas*, v.2, n.5, p.16-19, 1999.
- ⁵³ COLLINS, C. & MILLER, T. **Studies on the action of biogenic amines on cockroach heart**. Department of Entomology. Division of Toxicology and Physiology; University of Califórnia, Exp. Bio. V 67, p 1-15, 1977.
- ⁵⁴ Pesamosca, M.E.; **Caracterização farmacológica preliminar do veneno do sapo *Rhinella ictérica* em sistema cardiovascular de inseto**. Monografia apresentada a comissão de trabalhos de conclusão de curso de Ciências Biológicas na UNIPAMPA, 2010.
- ⁵⁵ <http://www.insect.cz/> Acesso em: novembro 2010
- ⁵⁶ http://www.mokidros.ibmc.up.pt/materiais_grupo_garcia/Relatorio1_Observacao_de_individuos.pdf Acesso em Novembro de 2010.
- ⁵⁷ <http://www.biology-blog.com/blogs/permalinks/7-2007/fruit-fly-gene-from-out-of-nowhere.html> Acesso em: Novembro de 2010.

- ⁵⁸ Elmann, G.L. *et al.* M.A. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochemical Pharmacology*. v 7. p 88, 1961.
- ⁵⁹ Franco, J.L.; Posser, T.; Mattos, J.J. *et al.* **Zinc reverses malathion-induced impairment in antioxidant defenses.** *Toxicology Letters*. V 187 (3). P 137-143, 2009.
- ⁶⁰ BAUMANN, H. & GERSCH, M. **Purification and identification of neurohormone D, a heart accelerating peptide from the corpora cardiaca of the cockroach, *Periplaneta Americana*.** *Insect Biochem.* 12, 7-14, 1982.
- ⁶¹ Weisel-Eichler, A.; Haspel, G.; Libersat, F. **VENOM OF A PARASITOID WASP INDUCES PROLONGED GROOMING IN THE COCKROACH.** *The Journal of Experimental Biology* 202, 957–964 (1999)
- ⁶² KAGABU, S.; ISHIHARA, R.; HIEDA, Y.; NISHIMURA, K.; NARUSE, Y. **Insecticidal and neuroblocking potencies of variants of the imidazolidine moiety of imidacloprid-Related neonicotinoids and the relationship to partition coefficient and charge density on the pharmacophore.** *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 812-818.
- ⁶³ Pang Y-P (2006) **Novel Acetylcholinesterase Target Site for Malaria Mosquito Control.** *PLoS ONE* 1(1): e58. doi:10.1371/journal.pone.0000058
- ⁶⁴ Seibt, K. J. *et al.* **Efeito dos antipsicóticos típicos e atípicos sobre a atividade da acetilcolinesterase e expressão gênica de cérebro de zebrafish (*Danio rerio*).** III Mostra de Pesquisa da Pós-Graduação – PUCRS, 2008
- ⁶⁵ MOUCHÈS, C.; MAGNIN, M.; BERGE, J. B.; DE SILVESTRI, M.; BEYSSAT, V.; PASTEUR, N. & GEOURGHIOU, G. P., 1987. **Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 84:2113-2116.
- ⁶⁶ HEMINGWAY, J. & CALLAGHAN, A., 1989. **Temephos resistance in *Simulium damnosum* Theobald (Diptera: Simuliidae): A comparative study between larvae and adults of the forest and savanna strains of this species complex.** *Bulletin of Entomological Research*, 79:659-669.
- ⁶⁷ MAGNIN, M.; KURTAK, D. & PASTEUR, N., 1987. **Caractérisation des estérases chez des larves du complexe *Simulium damnosum* résistantes aux insecticides organophosphorés.** *Cahiers ORSTOM, Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, 25: 57-62.
- ⁶⁸ PARKER, P. J. A. N. & CALLAGHAN, A., 1997. **Esterase activity and allele frequency in field populations of *Simulium equinum* (L) (Diptera: Simuliidae) exposed to organophosphate pollution.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16:2550-2555
- ⁶⁹ CAMPOS, J. & ANDRADE, C. F. S. **Resistência a inseticidas em populações de *Simulium* (Diptera, Simuliidae)** *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 18(3):661-671, mai-jun, 2002

⁷⁰ Pan et al., *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, **152**, 266-270, 2009.