

119

Circular
TécnicaPorto Velho, RO
Setembro, 2011

Autores

Fábio da Silva BarbieriMédico Veterinário, D.Sc. em
Ciências Veterinárias, pesquisador da
Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO,
fabio.barbieri@cnpafro.embrapa.br**Luciana Gatto Brito**Médica Veterinária, D.Sc. em
Ciências Veterinárias, pesquisadora
da Embrapa Rondônia, Porto Velho,
RO, luciana@cnpafro.embrapa.br**César Augusto Domingues Teixeira**Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em
Entomologia, pesquisador da
Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO,
cesar@cnpafro.embrapa.br**Maiara Maíra Lanzoni**Aluna do curso de Medicina
Veterinária das Faculdades
Integradas Aparício Carvalho,
(FIMCA), estagiária da Embrapa
Rondônia, Porto Velho, RO,
maiara_lanzoni@hotmail.com**Priscilla de Freitas Bandeira**Aluna do curso de Medicina
Veterinária da FIMCA, estagiária da
Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO,
freitasmedvet@gmail.com

Comparação in vitro entre duas técnicas para avaliação da eficácia de inseticidas em *Musca domestica*

Introdução

A ordem diptera constitui uma das maiores ordens da classe insecta, onde estão descritas cerca de 120.000 espécies holometabólicas, as quais apresentam estágios de ovo, larva pupa e adulto. Embora a maioria das espécies seja inofensiva para o homem e animais, é considerado o grupo mais importante sob o ponto de vista médico-veterinário, causando imensos prejuízos à pecuária e à saúde humana em todo o mundo (GUIMARÃES et al; 2001).

Dentre os dípteros, a *Musca domestica* (Muscidae) é uma das espécies de maior importância sanitária em decorrência de seu caráter sinantrópico, capacidade de se adaptar em diferentes ambientes e se desenvolver em diferentes substratos orgânicos, além de atuar como vetor mecânico de uma série de agentes patogênicos, transportando oocistos e trofozoítos de protozoários, ovos de helmintos e bactérias (WALLACE, 1971; MARKUS, 1980; KASPRZAK; MAJEWSKA, 1981; AKINBOADE, et al., 1984; UMECHE; MANDAH, 1989; GRACZYK et al., 1999).

O controle deste inseto é realizado quase que exclusivamente com inseticidas o que tem levado ao desenvolvimento da resistência às principais classes de inseticidas utilizados. Avaliação da eficácia de inseticidas em populações de moscas resistentes é realizada por meio de bioensaios tanto em campo como em laboratório. Em geral, os bioensaios para avaliação de inseticidas utilizam como modelos biológicos espécies de diptera, em função da facilidade de criação, rápida obtenção de gerações e respostas nos resultados. No Brasil, muitos autores têm realizado avaliações de resistência em *Haematobia irritans* para piretróides e organofosforados pelo método do papel filtro impregnado (SAUERESSIG; BARROS, 2003; BRAGA; BARROS, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; BARROS et al., 2007), sendo este um teste de fácil aplicação em campo.

O objetivo desse trabalho foi analisar duas metodologias diagnósticas para avaliação in vitro da eficácia do inseticida organofosforado, diazinon, em moscas: papel filtro impregnado e aplicação tópica de inseticidas. Para tanto, foi utilizado como modelo biológico nesta avaliação a espécie *M. domestica*, por se tratar de uma espécie de fácil manutenção e multiplicação em laboratório, além de ser um importante inseto sinantrópico de interesse médico-veterinário.

Material e métodos

O experimento foi realizado com moscas oriundas de colônia estoque de *Musca domestica* estabelecida no laboratório de Entomologia da Embrapa Rondônia. A colônia foi estabelecida a partir de espécimes capturados a campo, com auxílio de rede entomológica, mantidos em gaiolas teladas, alimentadas com uma mistura de leite em pó e açúcar (proporção de 1:1) e água. Diariamente, foram retiradas as posturas e colocadas em frascos de vidro com meio de criação para a fase larvar (cana-de-açúcar, farelo de trigo e farinha de carne, umedecida com água). Posteriormente, as pupas foram retiradas e colocadas em placas, as quais permaneceram em gaiolas para a emergência dos adultos. Todas as fases evolutivas da colônia permaneceram sob condições naturais de umidade e temperatura.

Foram realizados bioensaios pelo método de papel filtro impregnado e de aplicação tópica utilizando-se o inseticida organofosforado diazinon (O,O-dietil-O-(2-isopropil-4-metil 6 - pirimidil) fosforotionato) em grau técnico, o qual foi diluído em acetona P.A. para obtenção das seguintes concentrações: 0,013; 0,05; 0,2; 0,8; e 3,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Para ambos bioensaios o grupo controle foi avaliado somente com acetona.

O método de papel filtro impregnado foi realizado conforme foi proposto por Sheppard e Hinkle (1987) e os kits inseticidas produzidos de acordo com Barros et al. (2002), no laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Rondônia. Após a impregnação do papel filtro com as diferentes concentrações dos inseticidas e montagem nas placas de Petri, os kits foram armazenados em geladeira (4 °C a 8°C) até o momento da utilização.

Para o teste de aplicação tópica foram preparados dispositivos plásticos cilíndricos com cerca de 20 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro, onde as extremidades abertas foram vedadas com tecido de algodão preso com liga de borracha. As mesmas diluições utilizadas para a impregnação do papel filtro foram utilizadas para a aplicação tópica, as quais

foram armazenadas em microtubos de polipropileno para centrifuga com volume de 1,5 mL e também mantidas na geladeira até a realização do bioensaio.

Os bioensaios foram realizados simultaneamente, onde cada diluição da solução inseticida foi testada em grupos de 10 moscas, geração F4, com repetição em triplicata. As moscas foram removidas das gaiolas de criação com auxílio de um miniaspirador de pó, acondicionadas em frascos plásticos tampados, colocados no congelador por dois minutos para imobilização das moscas. As moscas foram distribuídas nas placas de Petri com papel filtro impregnado para que cada espécime recebesse uma aplicação de 3µl de solução inseticida sobre o tórax, realizada com auxílio de uma micropipeta automática (Figuras 1-6).



Figura 1. Gaiola de criação.



Figura 2. moscas nos frascos plásticos após a remoção das gaiolas.



Figura 3. Imobilização das moscas pelo frio.

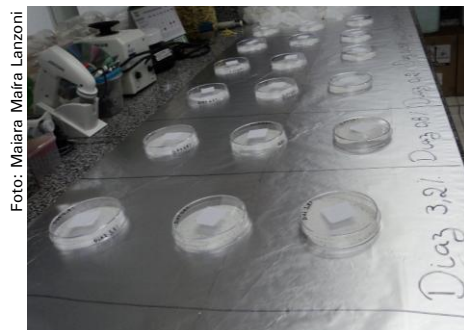


Figura 4. placas de Petri com papel filtro impregnado.



Figura 5. Diluições para teste de aplicação tópica.

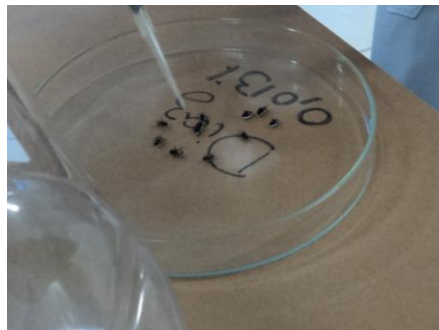


Figura 6. Aplicação tópica do inseticida.

Após a aplicação tópica, as moscas foram transferidas ainda imobilizadas pelo frio para os dispositivos plásticos (Figura 7). Tanto as placas de Petri quanto os dispositivos plásticos foram alocados em câmaras climatizadas tipo BOD a 25° ± 1 °C e 90% de umidade (Figura 8). Foram realizadas três leituras para avaliação da eficácia e comparação dos bioensaios, sendo estas: 30 minutos, duas e oito horas após a realização dos testes com as diferentes concentrações inseticidas. A leitura aos 30 minutos foi para verificar se não houve morte das moscas em decorrência da imobilização pelo frio ou por esmagamento durante a distribuição na placa.



Figura 8. Dispositivos e placas na BOD.



Figura 7. Dispositivos plásticos.

Considerou-se que moscas sem condições de vôo seriam contabilizadas como mortas. As moscas que sobreviveram nos bioensaios de aplicação tópica e do papel impregnado foram consideradas como resistentes à solução inseticida na concentração avaliada.

A partir do número de moscas mortas e vivas, em cada bioensaio, foi obtida a porcentagem de mortalidade para cada concentração e repetição, sendo realizado o cálculo da concentração letal 50 e 90 (CL50 e CL90) utilizando-se o programa Graph Pad Prism 5.01. Para o cálculo da CL50 e CL90 por meio do programa estatístico foi realizada a transformação logarítmica da porcentagem de mortalidade das moscas [Log(x)]. Tendo em vista essa transformação, o programa também transforma as concentrações dos inseticidas e para efeito de cálculo o controle foi considerado com uma concentração de 0,00001 µg/cm² (1.0 x 10⁻¹⁰) que é a mais baixa concentração aceita pelo programa. A partir da transformação logarítmica, seguida de normalização dos dados foi feita a regressão não linear da curva de dose X resposta.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos para as CL50 e CL90 de cada teste são apresentados na Tabela 1. Observou-se que no método de aplicação tópica as CL50 e CL90 foram menores do que no método do papel filtro impregnado. Nos dois métodos verificou-se diminuição nas CL50 e CL90 entre as duas leituras - duas e oito horas, provavelmente causada pelo tempo de exposição das moscas ao inseticida.

No Brasil, muitos bioensaios são realizados para verificação da eficácia de novos compostos e detecção da resistência a inseticidas. A maior parte destes estudos avalia a resistência inseticida para piretróides e organofosforados em mosca-dos-chifres (*H. irritans*) e são realizados em campo, utilizando-se o método do papel filtro impregnado (SAUERESSIG;

BARROS, 2003; BRAGA; BARROS, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; BARROS et al., 2007). Este método apresenta mais praticidade sobre o de aplicação tópica para ser executado em campo, pois, os kits com diferentes concentrações são preparados no laboratório e podem ser levados sob refrigeração para o local em que se avaliará a população alvo de estudo.

Tabela 1. Cálculo da concentração letal de 50% (CL50) e 90% (CL90) em *Musca domestica* para o inseticida organofosforado diazinon.

Tempo de exposição	2 horas		8 horas	
Método	CL50	CL90	CL50	CL90
Papel filtro impregnado	1,11	69,35	0,279	0,663
Aplicação tópica	0,003	0,1	0,0025	0,031

Concentração em µg/cm².

Fonte: Elaborada pelos autores.

O método de aplicação tópica tem sido utilizado em testes laboratoriais por ser mais complexa a sua execução em campo. Chaaban et al. (2005) avaliaram a susceptibilidade da *M. domestica* ao organofosforado O,O-dimetil-S-ftalimidometil ditiofosfato (Phosmet®), que também demonstrou toxicidade em baixas concentrações. Santos et al. (2007) testaram em *M. domestica* e *Stomoxys calcitrans* novas moléculas sintetizadas do grupo dos organofosforados pelo método de aplicação tópica, onde verificaram efeito inseticida sobre essas moscas.

De acordo com os resultados obtidos pelos dois métodos por meio da determinação das CL50 e CL90 pode-se concluir que o método da aplicação tópica foi mais sensível do que o do papel filtro impregnado, em decorrência das menores CL50 e CL90, sendo mais indicado para avaliação *in vitro* de eficácia de inseticidas em moscas oriundas de colônias estabelecidas em laboratório.

Referências

- AKINBOADE, O.A.; HASSAN, J.O.; ADEJINMI, A. Public health importance of market meat exposed to refuse flies and airborne microorganisms. *International Journal of Zoonoses*, Taipei, v. 11, p. 111-114, 1984.
- BARROS, A. T. M.; GOMES, A.; ISMAEL, A. P. K.; KOLLER, W. W. Susceptibility to Diazinon in Populations of the Horn Fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in Central Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, 905-907, 2002.
- BARROS, A.T.M.; GOMES, A.; KOLLER, W.W. Insecticide Susceptibility of Horn Flies, *Haematobia Irritans* (Diptera: Muscidae), in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 145-151, 2007.
- BRAGA, R. M.; BARROS, A. T. M. de. **Avaliação da susceptibilidade da mosca dos chifres, haematobia irritans (diptera: muscidae) a inceticida da classe dos organofosforados (diazinon) em Roraima.** Boa Vista: Embrapa Roraima, 2004. 6 p. (Embrapa Roraima. Comunicado Técnico, 6).

CHAABAN, A.; BARBIERI JUNIOR, E. RODRIGUES, J.M.; DACOSTA, J.B.N.; MOYA BORJA, G.E. Susceptibilidade de adultos de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758)(Diptera, Muscidae) a organofosforado (Phosmet®), em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zootecias**, Juiz de Fora, v. 7, n. 2, p. 327-331, 2005.

GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; FAYER, R.; BIXLER, H. House flies (*Musca domestica*) as transport hosts of *Cryptosporidium parvum*. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, Va., v.61, n.3, p. 500-504, 1999.

GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Plêiade, 2001. 213 p.

KASPRZAK, W.; MAJEWSKA, A. Transmission of *Giardia* cysts. I. Role of flies and cockroaches. **Wiadomości Parazytologiczne**, v. 27, p. 555-563, 1981.

MARKUS, M.B. Flies as natural transport hosts of *Sarcocystis* and other coccidia. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 66, p. 361-362, 1980.

OLIVEIRA, A. A.; AZEVEDO, H. C.; MELO, C. B.; BARROS, A. T. M. Susceptibilidade da Mosca-dos-Chifres (*Haematobia irritans*) a Inseticidas nos Tabuleiros Costeiros de Alagoas, Bahia e Sergipe, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 65-70, 2006.

SANTOS, V.M.R., SANT'ANNA, C.M.R.; MOYA BORJA, G.E.; CHAABAN, A.; CÔRTEZ, W.S.; DA COSTA, J.B.N. New bisphosphorothioates and bisphosphoroamidates: Synthesis, molecular modeling and determination of insecticide and toxicological profile. **Bioorganic Chemistry**, New York, v. 35, p. 68-81, 2007.

SAUERESSIG, T.M.; BARROS, A.T.M de. **Diagnóstico da susceptibilidade de populações da Mosca-dos-chifres a inseticidas em Goiás, Tocantins e Distrito Federal**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 16 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 82).

SHEPPARD, D.C.; HINKLE N.C. A field procedure using disposable materials to evaluate horn fly insecticide resistance. **Journal of Agricultural Entomology**, Clemson, v. 4, p. 87-89, 1987.

UMECHE, N.; MANDAH, L.E. *Musca domestica* as a carrier of intestinal helminths in Calabar, Nigeria. **East African Medical Journal**, Nairobi, v. 66, p. 349-352, 1989.

WALLACE, G.D. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii* by filth-flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, Va., v. 20, p. 411-413, 1971.

Circular Técnica, 119

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
PAÍS RICO E PAÍS SEM POBREZA

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Rondônia
BR 364 km 5,5, Caixa Postal 127,
CEP 76815-800, Porto Velho, RO.
Fone: (69)3901-2510, 3225-9384/9387
Telefax: (69)3222-0409
www.cpafrro.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2011): 100 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: Cléberson de Freitas Fernandes
Secretária: Marly de Souza Medeiros e Sílvia
Mária Gonçalves Ferradaes
Membros: Marília Locatelli
Rodrigo Barros Rocha
José Nilton Medeiros Costa
Ana Karina Dias Salman
Luiz Francisco Machado Pfeifer
Fábio da Silva Barbieri

Expediente

Normalização: Daniela Maciel
Revisão de texto: Wilma Inês de França Araújo
Editoração eletrônica: Marly de Souza Medeiros