

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

DDT, un insetticida che ha avuto un impatto rilevante nel mondo

Relatore: Prof. Fernando Formaggio

Laureando: Andrea Ton 2012424

Anno Accademico 2023/2024

Indice

1. Scoperta e impiego del DDT	4
1.1. Riscoperta e i primi utilizzi	4
1.2. Inquinamento ambientale e divieto	5
1.3. Scopo della tesi.....	5
2. Proprietà del DDT e dei suoi analoghi	7
2.1. Sintesi del DDT	7
2.2. Proprietà degli analoghi del DDT.....	7
2.3. Trasformazioni degli analoghi del DDT	9
2.3.1. Biodegradazioni del DDT e dei suoi analoghi	9
2.3.2. Trasformazioni fotochimiche del DDT e dei suoi analoghi.....	10
3. Effetti del DDT sugli organismi viventi.....	13
3.1. Contrasto nella chiusura dei canali Na_v	13
3.1.1. Canale del sodio voltaggio-dipendente.....	13
3.1.2. Metodo d'azione	15
3.1.3. Sito di legame del DDT	16
3.2. Assottigliamento del guscio delle uova degli uccelli.....	17
3.2.1. Formazione del guscio delle uova e interferenza con gli insetticidi	17
3.2.2. Disponibilità del calcio.....	18
3.2.3. Disponibilità del carbonato	18
3.3. Altri effetti sugli ecosistemi e sugli organismi.....	18
3.3.1. Bioaccumulo	18
3.3.2. Effetti sulla salute umana.....	19
4. Resistenza al knockdown	20
5. Conclusioni	21
Bibliografia	22

1. Scoperta e impiego del DDT

1.1. Riscoperta e i primi utilizzi

Era il 1874 quando Othmar Zeidler sintetizzò per la prima volta il DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) nei laboratori del professor Adolf von Baeyer durante il suo dottorato presso l'Università di Strasburgo. Questa sintesi aveva come unico scopo lo studio della condensazione dei composti aromatici e da qui in poi venne utilizzata come comune esperienza nei laboratori didattici. La ricerca di Zeidler non aveva nulla a che vedere con l'impiego che il mondo intero fece con il suo prodotto dopo un salto di 65 anni. Nel 1939 l'industria farmaceutica svizzera Geigy assunse il dottor Paul Müller per la ricerca di coloranti vegetali ed altri agenti concianti. Col passare degli anni, però, la necessità delle industrie del settore tessile di porre l'attenzione sugli insetticidi acquisì sempre più importanza. Lo studio dei pesticidi divenne così fondamentale non solo per le industrie conciarie e tessili, ma anche per il controllo degli insetti in ambito agroalimentare e nella lotta contro le malattie trasmesse dagli stessi. Müller si concentrò nella ricerca di composti a base di difeniltricloroetano (i quali mostravano una buona attività insetticida) arrivando anche al 2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano (DDT), sintetizzato precedentemente da Zeidler. Grazie a questa scoperta, Paul Müller ricevette il premio Nobel per la medicina nel 1948 per la "scoperta della grande efficienza del DDT come veleno da contatto contro numerosi artropodi". Dopo il successo dei primi test condotti da Müller sulle mosche e altri insetti iniziarono anche i primi test sul campo in Svizzera, anch'essi con molto successo. Il primo vero utilizzo del DDT come insetticida fu nel 1941 contro la dorifora della patata (*Leptinotarsa decemlineata*), un parassita di molte coltivazioni europee importato accidentalmente dall'America. Una volta ottenuta l'autorizzazione per l'utilizzo in Svizzera iniziò il suo commercio col nome di *Gerasol* nel 1942 e poi nella formulazione per l'uso umano, il *Neocid*, contro i pidocchi.^{1,2}

Questa riscoperta cadde in concomitanza con l'inizio della Seconda Guerra Mondiale, dove uno dei problemi più importanti erano le malattie trasmesse dalle zanzare come la malaria, il tifo e molte altre. Era quindi necessario un insetticida sintetico, economico e persistente ma comunque sicuro per l'uomo. Il DDT, almeno a prima vista, rientrava proprio in queste categorie. Vennero condotti dei test sul campo, su esseri umani e altri mammiferi per verificare degli eventuali effetti tossici che non vennero notati, anzi, si era visto che al contrario di molti altri insetticidi il DDT non irritava la pelle. Grazie al suo largo impiego, il DDT estirpò il tifo a Napoli nel 1943 e debellò la malaria a Latina e in Sardegna a partire dal 1945. L'Organizzazione Mondiale della Sanità diede il via all'eradicazione globale della malaria nel 1955 attraverso la nebulizzazione del DDT nelle case. Già nel 1972 la malaria era stata debellata in 37 paesi ed era sotto controllo in altri 80. In India, i casi di malaria diminuirono drasticamente dagli anni Trenta, salvando 50 milioni di vite; l'aspettativa di vita aumentò da 32 a 52 anni in circa vent'anni, contribuendo all'esplosione demografica di quell'epoca. Oltre che alla lotta contro le malattie, il DDT venne riconosciuto anche per il suo successo nel controllo dei parassiti in agricoltura. Le rese agricole aumentarono dal 56 al 68% a New York e nel Wisconsin rispetto ai precedenti trattamenti con arseniato di piombo.¹

1.2. Inquinamento ambientale e divieto

Dopo molti anni di utilizzo a livello globale, l'OMS ha constatato che i benefici del DDT come pesticida erano nettamente maggiori rispetto ai rischi nel suo utilizzo. Con molto ritardo però si iniziò a riscontrare l'effetto della sua grande stabilità: persistendo nell'ambiente e accumulandosi nei tessuti adiposi, metteva a repentaglio numerose specie animali e danneggiava gli ecosistemi. Si ritiene che per far sparire completamente il DDT da un individuo servano dai 19 ai 20 anni dal termine dell'esposizione, ma uno dei suoi principali metaboliti (il DDE, figura 1) può persistere per tutta la vita.

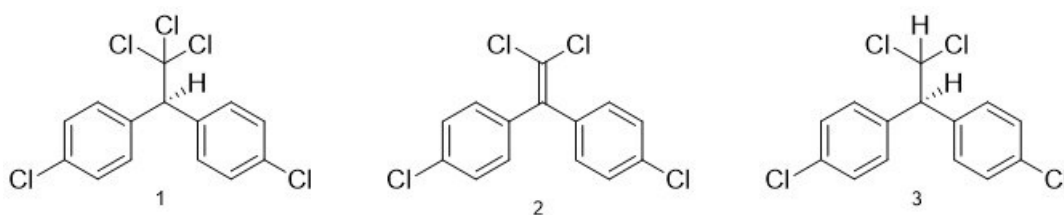


Figura 1 Strutture molecolari del DDT (1) e dei suoi metaboliti DDE (2) e DDD (3)

Oltre che per il controllo delle malattie come malaria, tifo e peste, il DDT veniva inizialmente usato per trattare la grafiosi dell'olmo, provocata da un fungo (*Ophiostoma ulmi*), nelle aree agricole. A seguito di un uso scriteriato di questo pesticida, già negli anni '40 furono individuate sue caratteristiche tossiche nei confronti uccelli. L'evidente correlazione tra l'utilizzo del DDT e il suo effetto nel sistema endocrino degli uccelli rappresentò il primo esempio di prodotto chimico in grado di colpire l'apparato riproduttore.^{3,4}

Il DDT è tossico per i microrganismi d'acqua dolce e salata, per i pesci, gli anfibi e gli uccelli e ci vollero molti anni per potersi rendere conto dei gravi danni che questo insetticida stava portando negli ecosistemi di tutto il mondo. A partire dal 1962, da quando la biologa Rachel Carson pubblicò il suo libro *Silent spring*, si diffuse sempre più a livello globale la consapevolezza dei danni che l'impiego su larga scala degli insetticidi aveva portato agli ecosistemi di tutto il mondo. Qualche anno dopo la pubblicazione, sempre più Paesi iniziarono ad abolire l'uso del DDT in ogni sua forma e funzione. La Svezia abolì per prima il DDT nel 1970 seguita dagli USA nel 1972 e successivamente da sempre più Paesi in tutto il mondo. La produzione e l'utilizzo del DDT diminuì drasticamente nei paesi industrializzati. Nel 1990 veniva prodotto esclusivamente in Italia, in India e in Indonesia. Nel 2001 la Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti propose il bando del DDT e di altri POP (*Persistent Organic Pollutant*), decisione che divenne operativa nel 2004 con poche eccezioni. Dal 2008 l'unico Paese che produce il DDT è l'India.^{3,5}

1.3. Scopo della tesi

Attraverso la seguente tesi verranno approfondite le proprietà del DDT e dell'insieme dei suoi composti analoghi al fine di osservare come questi composti (apparentemente semplici) siano riusciti ad entrare in gran parte degli ecosistemi del pianeta. Descrivendo il loro

meccanismo d'azione ed altri effetti riscontrati negli organismi bersaglio e non, si tratteranno i motivi che hanno portato a danneggiare profondamente i delicati equilibri che caratterizzano gli ecosistemi di tutto il mondo.

2. Proprietà del DDT e dei suoi analoghi

2.1. Sintesi del DDT

La sintesi condotta da Zeidler prevede la reazione tra clorobenzene e tricloroacetaldeide attraverso la condensazione di Baeyer e usando acido solforico come catalizzatore (figura 2). Alcuni metodi di preparazione più efficienti impiegano tricloroacetaldeide idrata, che risulta essere più stabile e più comoda da utilizzare rispetto al composto anidro usato da Zeidler. Altri metodi sfruttano invece altri tipi di catalizzatori come ad esempio l'acido clorosulfonico. Il prodotto si presenta allo stato solido come una polvere bianca o dei cristalli incolori; risulta solubile in etere e cloroformio ed è completamente insolubile in acqua. Il DDT corrisponde ad una molecola di etano in cui sono stati sostituiti tre atomi di cloro al posto degli atomi di idrogeno in uno dei due atomi di carbonio, e due sostituenti di clorobenzene in posizione para (od orto) nell'altro atomo di carbonio.⁶⁻⁸

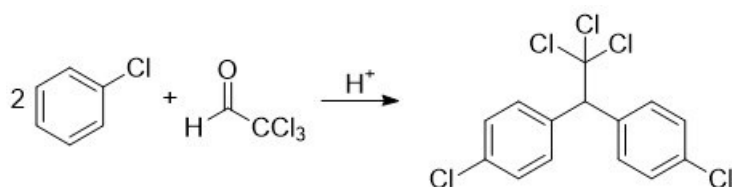


Figura 2 Sintesi del DDT.⁶

2.2. Proprietà degli analoghi del DDT

Quello che rende il DDT un importante insetticida è la sua struttura molecolare, nonché la sua forma e le sue dimensioni che ne influenzano l'attività. Una molecola della tipologia del DDT possiede delle specifiche posizioni in cui determinati sostituenti possono garantirne l'efficienza. I sostituenti nelle posizioni "X" sono generalmente alogeni o gruppi alchilici o alcossidici a catena corta. In posizione "Y" è presente nella maggior parte dei casi idrogeno. La posizione "Z" viene occupata, nel rispettivo ordine di efficacia, da CCl_3 , CHCl_2 , $\text{CH}(\text{NO}_2)\text{CH}_3$ o $\text{C}(\text{CH}_3)_3$. Il dicofol è un insetticida con la stessa struttura del DDT, ma in posizione Y è sostituito un gruppo ossidrilico che fa perdere l'affinità per il canale del sodio, eliminando la tossicità nelle mosche domestiche. Al contrario del *dicofol* (il cui sostituito nella posizione "Y" sembra avere un ruolo importante dell'effetto insetticida), un sostituito molto diverso da quelli elencati nella posizione "Z" del DDT non ne modifica in modo evidente la tossicità. Ciò fa supporre che questa posizione non sia cruciale per l'adattamento del tossiforo (il gruppo CCl_3 ha in ogni caso una tossicità notevolmente maggiore).⁹

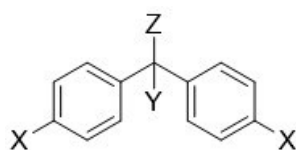


Figura 3 Struttura tipo del DDT.⁹

Quando si parla di DDT tecnico si fa principalmente riferimento ad una formulazione che unisce differenti composti con proprietà simili a quelle del DDT vero e proprio. Tutti questi analoghi hanno proprietà insetticida, ma il DDT ne è il principale responsabile. Utilizzare il DDT significa dunque utilizzare molti tipi di derivati, dove il DDT, il DDE e il DDD (figura 1 e tabella 1) sono le principali componenti e sono presenti nei loro isomeri para,para' (p,p') e orto,para' (o,p') nelle seguenti quantità: p,p'-DDT > o,p'-DDT > p,p'-DDE > o,p'-DDE > p,p'-DDD > o,p'-DDD. Gli isomeri para,para' sono quelli più abbondanti e vengono generalmente indicati senza il prefisso; i nomi sistematici di questi tre composti sono rispettivamente: 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano, 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etilene e 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano.^{4,10}

Tabella 1 Proprietà chimico-fisiche dei principali composti del DDT. I valori delle emivite fanno riferimento all'essere umano mentre le dosi letali ai ratti via orale.¹¹⁻¹³

		<i>p,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDE	<i>p,p'</i> -DDD
<i>Formula molecolare</i>		C ₁₄ H ₉ Cl ₅	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄
<i>Peso molecolare</i>	PM/g*mol ⁻¹	354.5	318.0	320.1
<i>Punto di fusione</i>	T _M /°C	109	88	109
<i>Pressione di vapore</i>	P _L /Pa	0.00048	0.0034	0.0012
<i>Solubilità in acqua</i>	S _w /mol*m ⁻³	0.00042	0.00079	0.0023
<i>Solubilità in ottanolo</i>	S _o /mol*m ⁻³	1053	6830	4986
<i>Ripartizione ottanolo-acqua</i>	log(K _{ow})	6.39	6.93	6.33
<i>Emivita</i>	t _{1/2} /anni	4.2-5.6	8.6	-
<i>Dose letale</i>	DL ₅₀ /mg*kg ⁻¹	113 (M), 118 (F)	880 (M), 1240 (F)	-

Il DDT e i suoi metaboliti sono dei pesticidi organoclorurati (OCP) e degli inquinanti organici persistenti (POP). Il DDE si trova prevalentemente all'interno degli organismi (viene comunemente utilizzato come marcatore dell'esposizione al DDT) mentre il DDD è più comune nei sedimenti. Per dare un'idea di come il DDT sia un inquinante così importante è utile dare uno sguardo alle proprietà chimico-fisiche (tabella 1) che danno informazioni circa la sua persistenza, il suo trasporto e la sua biodisponibilità. I valori bassi inerenti alla pressione di vapore e alla solubilità in acqua mostrano come il DDT e i suoi metaboliti più comuni siano poco volatili e molto poco solubili. Viceversa, la solubilità in ottanolo e il coefficiente di ripartizione tra l'ottanolo (riferimento per la materia organica dei sedimenti e dei lipidi degli organismi) e l'acqua confermano la preferenza di questi composti di depositarsi nei tessuti grassi degli animali. Inoltre, questo limita la diffusione degli insetticidi negli ecosistemi acquatici e la diffusione a livello continentale. Se da un lato tale caratteristica è positiva, dall'altro favorisce la deposizione nei fondali allungando la

persistenza nell'ambiente del DDT e dei suoi metaboliti. Infatti, la stretta interazione con le particelle dei sedimenti tiene lontano gli insetticidi dalla radiazione solare che potrebbe invece promuovere la loro degradazione.^{5,11,14,15}

2.3. Trasformazioni degli analoghi del DDT

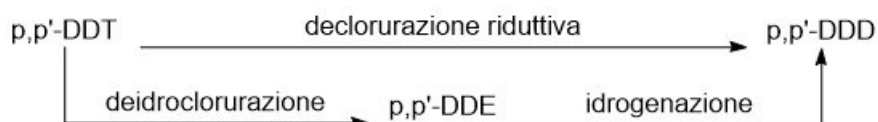


Figura 4 Le principali trasformazioni del DDT nei suoi analoghi.

Il DDT tecnico, come detto in precedenza, contiene oltre all'omonimo composto anche alcune tracce dei suoi metaboliti. Questi si possono formare come sottoprodotti della sintesi, ma possono anche entrare a far parte di processi di trasformazioni del DDT stesso, che possono decorrere per via biologica o fotochimica. La prima trasformazione biologica del DDT è stata osservata in *Drosophila melanogaster*, dove sono state trovate tracce di *dicofol* (2,2,2-tricloro-1,1-bis(4-clorofenil)etanolo). Successivamente, sono stati osservati molti processi di trasformazione parzialmente schematizzati in figura 4, che decorrono non solo in organismi superiori come la stessa *D. melanogaster* o nei roditori, ma anche nei microorganismi quali funghi e batteri.¹⁶⁻¹⁸

La trasformazione del DDT porta, in primo luogo, alla formazione prevalente di DDE e DDD. Questi entreranno poi in diversi processi di demolizione: il DDD partecipa facilmente a numerosi processi di decomposizione che portano rapidamente alla sua eliminazione (proprio per questo motivo l'emivita e la dose letale non vengono riportate in Tabella 1 in quanto la prima ha valori molto più bassi di DDT e DDE mentre la seconda non ha dei valori riportati perché viene eliminato molto più facilmente); il DDE, invece, partecipa con più difficoltà in questi processi, come evidenziato dal suo tempo di dimezzamento. La facilità con cui il DDD partecipa in queste reazioni e con cui viene eliminato spiega perché questo metabolita viene rilevato di meno rispetto agli altri all'interno di organismi e altri ambienti biotici.¹⁶⁻¹⁸

2.3.1. Biodegradazioni del DDT e dei suoi analoghi

Il DDT viene degradato per via microbica o più in generale biologica nei suoi due principali metaboliti: il DDE e il DDD. Il primo viene ottenuto per deidroclorurazione, il secondo per declorurazione riduttiva. Questi due metaboliti subiscono successivamente dei processi di degradazione da parte sia di organismi superiori (come l'uomo e i roditori studiati) sia dai microorganismi (batteri e funghi) (figura 5). In molte specie i percorsi metabolici del DDT sono simili. In generale, per tutti gli organismi il DDE è il composto metabolizzato più lentamente mentre il DDD subisce trasformazioni più rapide in specie abbastanza solubili in acqua da essere eliminate attraverso le urine.¹²

Alcuni esempi di microorganismi in grado di degradare queste specie sono i batteri *Escherichia coli* ed *Enterobacter aerogenes* e i funghi *Saccharomyces cerevisiae*. Questi ultimi sono in grado di attuare un processo co-metabolico, data la necessaria presenza di una fonte aggiuntiva di carbonio. Per il metabolismo batterico, l'alternanza di condizioni aerobiche ed anaerobiche favorisce la rottura degli anelli aromatici, assieme alla dechlorurazione riduttiva. Altri batteri (*P. aeruginosa*) sono invece in grado di rimuovere gli atomi di cloro dal DDT formando alcuni acidi carbossilici aromatici. L'ambiente anaerobico è essenziale per la dechlorurazione dei gruppi alifatici e aromatici. Anche alcuni funghi ligninolitici possono degradare il DDT attraverso un processo mediato dalle ligninasi. La prima fase di degradazione è seguita dalla fase di mineralizzazione. Questo è un processo che porta alla formazione di CO₂ a partire dai precedenti prodotti di degradazione. La velocità di questo processo dipende dall'apporto di carbonio di cui il microorganismo dispone (amido o cellulosa). In generale, in condizioni anaerobiche si forma il DDD e in ambienti aerobici il DDE. Nel terreno la degradazione avviene prevalentemente per via microbica e il DDD è il metabolita più comune. Studi sulla mineralizzazione condotti in condizioni sia aerobiche che anaerobiche (per mantenere la complessità dell'ambiente *in situ*) hanno mostrato dei tassi di conversione bassi: dopo oltre 42 giorni di incubazione, solo il 3.1% di DDT veniva convertito e rilasciato come CO₂. L'aggiunta di acqua ai campioni ha sfavorito ulteriormente il processo. Questi studi confermano che la degradazione del DDT è attribuibile all'azione dei microorganismi. Nonostante questi, tuttavia, gli insetticidi continuano a persistere nel terreno. Molte ragioni sono riconducibili al fatto che in laboratorio venivano utilizzate colture pure in condizioni ambientali controllate e con il corretto apporto di nutrienti, condizioni che non sempre sono verificate in natura.¹⁹

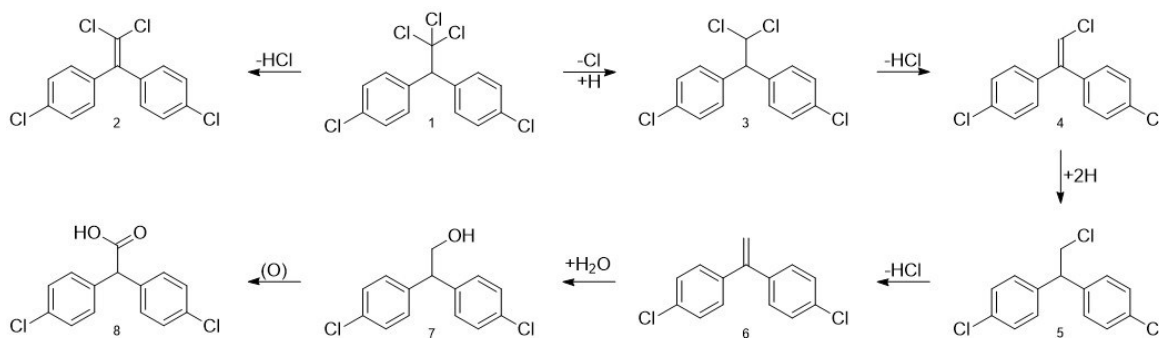


Figura 5 Processo di trasformazione biologica del DDT (1): DDE (2), DDD (3), DDMU (4), DDMS (5), DDNU (6), DDOOH (7), DDA (8); per trasformare DDOOH in DDA si passa per un intermedio aldeidico.²⁰

2.3.2. Trasformazioni fotochimiche del DDT e dei suoi analoghi

È stata studiata la stabilità fotochimica del DDT e di alcuni suoi analoghi sia in solventi organici che in acqua. Attraverso l'ossidazione fotochimica si generano dei radicali in grado di estrarre idrogeno dal solvente o dal substrato non ancora reagito, oppure di reagire con l'ossigeno.

Il foto-irraggiamento di una soluzione di DDT in metanolo, saturata di azoto, ha promosso la formazione di radicali cloro che hanno sottratto idrogeno dal solvente e generato DDD e DDMS (tabella 2). Facendo gorgogliare aria anziché azoto, i prodotti che si formano sono più complessi per via della reazione dei radicali con l'ossigeno (figura 6,A). Il DDE subisce

dei processi simili al DDT in assenza o in presenza di ossigeno; nel primo caso una dechlorurazione riduttiva e nel secondo caso prodotti come p,p'-diclorobenzofenone e 3,6-diclorofluorenone (figura 6,B). Il DDE ed il DMDE (un altro membro della famiglia del DDT) sono soggetti a un altro processo di fotoisomerizzazione in soluzione quando esposti alla luce solare che porta rispettivamente alla formazione di o-CI-DDMU e foto-DMDE (figura 6,C). La rottura del legame vinilico C-Cl produce una coppia di radicali che rimangono forzatamente vicini per via della "solvent cage". Una parte di questi radicali andrà a riformare il DDE e il DMDE, un'altra parte andrà a formare il rispettivo fotoisomero e invece un'altra piccola parte si allontanerà uscendo dalla gabbia reagendo con l'ossigeno o il solvente formando i prodotti sopra descritti. Questo meccanismo è in grado di spiegare perché la fotoisomerizzazione non avviene in fase vapore: non essendoci una "solvent cage", i radicali sono liberi di allontanarsi senza reagire tra loro.

Tutti questi composti assorbono la radiazione ultravioletta UV-B (< 320 nm) e i tassi di assorbimento della luce solare variano di molto in base a molti fattori quali la latitudine e l'altitudine del corpo idrico, le condizioni meteorologiche, l'ora del giorno (la posizione del sole) e lo spessore dello strato di ozono.^{21,22}

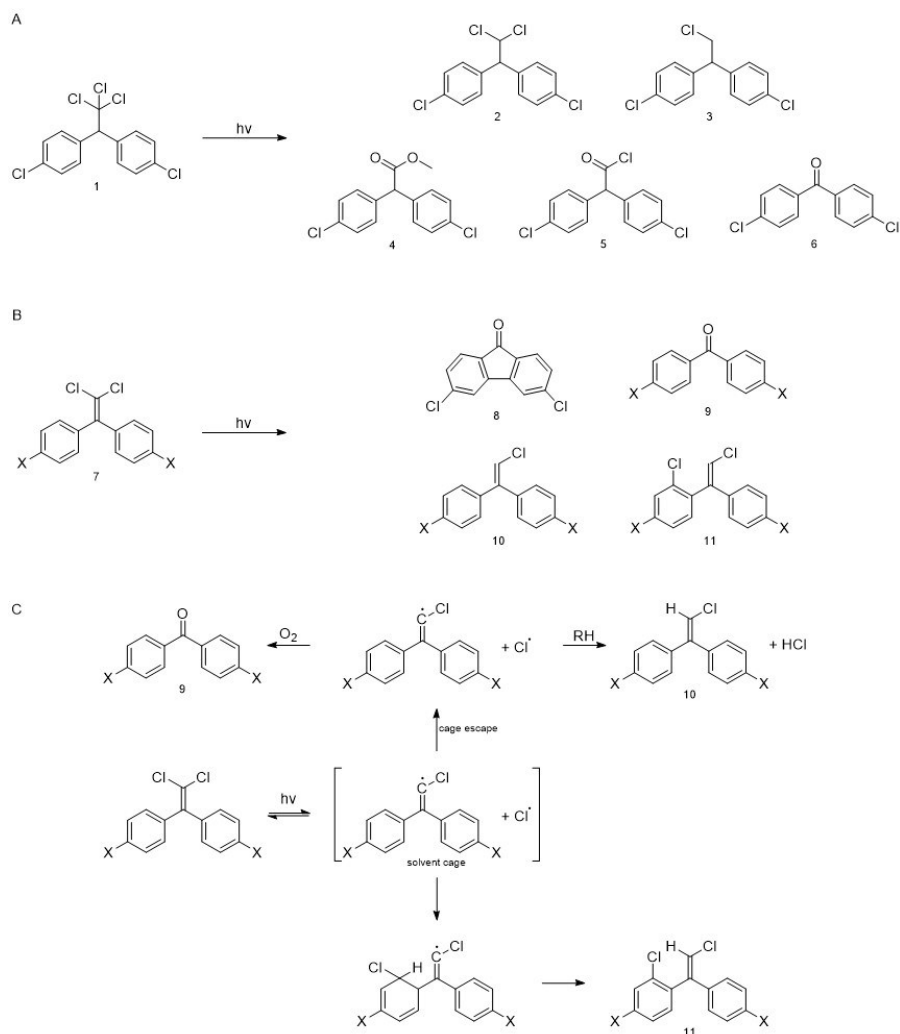


Figura 6 (A) I principali prodotti di degradazione fotochimica del DDT (1): DDD (2), DDMS (3), metil 2,2-bis-(p-clorofenil)acetato (4), cloruro di bis-(p-clorofenil)acetate (5), p,p'-diclorobenzofenone (6). (B) I principali prodotti di degradazione fotochimica di DDE e DMDE (7) (rispettivamente X= Cl, CH₃): diclorofluorene (8), p,p'-diclorobenzofenone e p,p'-dimetossibenzofenone (9), DDMU e 1,1-bis-(p-metossifeneil)-2-cloroetilene (10), o-CI-DDMU e foto-DMDE (11). (C) Il meccanismo di degradazione fotochimica di DDE e DMDE con l'azione della "solvent cage".^{21,22}

Tabella 2 Rese percentuali di alcuni composti del DDT (1 g/L in metanolo) a seguito di un periodo di irraggiamento. R è p-C₆H₄Cl.²¹

Irradiazione (h)	Resa %		
	R ₂ CHCCl ₃	R ₂ CHCHCl ₂	R ₂ CHCH ₂ Cl
1	76	8	4
2	61	11	5
4	44	13	6
8	24	15	6

3. Effetti del DDT sugli organismi viventi

Di seguito vengono riportati alcuni esempi di come il DDT agisce sugli organismi sia in termini di attività insetticida, ovvero quella per cui era iniziata la commercializzazione, sia come danno per gli ecosistemi e la fauna selvatica.

3.1. Contrasto nella chiusura dei canali Na_v

Negli organismi pluricellulari, i canali del sodio voltaggio-dipendenti rivestono un importante ruolo nella conduttanza selettiva degli ioni Na^+ attraverso le membrane assionali e permettono la propagazione del potenziale d'azione attraverso le cellule neuronali sia dei vertebrati che degli invertebrati. Il potenziale d'azione nelle cellule del sistema nervoso permette il passaggio di un impulso elettrochimico attraverso le cellule. Questo potenziale percorre tutta la lunghezza dell'assone che porta alla liberazione dei neurotrasmettitori responsabili dell'impulso nervoso. Negli insetti (*Drosophila melanogaster*) il canale del sodio voltaggio-dipendente (Na_v) "para", prende il nome dal locus della paralisi, cioè dalla sua posizione all'interno del cromosoma X di *D. melanogaster*. Altri studi hanno osservato la somiglianza strutturale e funzionale alla subunità α dei canali Na_v nei mammiferi oltre che negli insetti. L'importanza che il canale del sodio ricopre per garantire il funzionamento del sistema nervoso lo ha reso un ottimo bersaglio da parte di una vasta gamma di molecole nel corso dell'evoluzione, dagli anestetici e dagli anticonvulsivanti fino agli insetticidi. All'interno del canale sono stati individuati una decina di siti di legame differenti per i ligandi e il sito di legame per gli insetticidi come il DDT e le piretrine (un altro insetticida più potente del DDT stesso) è il sito "7", localizzato nei segmenti IS6, IIS6 e IIIS6.^{9,23,24}

3.1.1. Canale del sodio voltaggio-dipendente

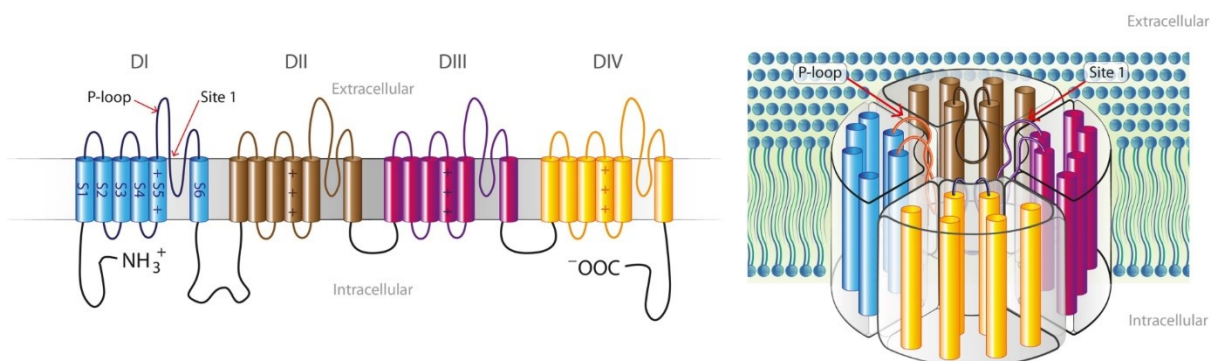


Figura 7 Rappresentazione di una subunità α di un canale Na_v voltaggio dipendente. A sinistra, vista della proteina dispiegata mettendo in evidenza i quattro domini (DI-DIV) (in alto) e, a destra, vista del canale formato dai P-loop dei segmenti S5 e S6.²⁵

Come mostrato in figura 7, il canale del sodio è composto da una sub-unità α , che rappresenta la parte formante il canale, e alcune unità β (non indispensabili per il corretto funzionamento del canale) che hanno delle funzioni minoritarie e pertanto non sono

rappresentate in figura. La sub-unità α è costituita da un'unica catena polipeptidica con quattro domini omologhi (DI - DIV) collegati da tre segmenti amminoacidici citoplasmatici. Ogni dominio è formato da sei α -eliche transmembrana (S1 - S6) unite da loop extracellulari con l'eccezione del P-loop, cioè il linker S5 - S6 che è transmembrana. Tutti i segmenti sono idrofobici con l'eccezione del segmento S4 che ha dei motivi ripetuti di amminoacidi carichi positivamente (solitamente arginina) e rappresenta il sensore di voltaggio per l'attivazione voltaggio-dipendente del canale. I domini si dispongono nella membrana in una struttura simmetrica formando il poro del canale dove l'interno è rivestito dalle eliche S5 e S6 e dai P-loop, con la funzione di filtro selettivo per gli ioni all'estremità extracellulare del poro. Le eliche S1 - S4 sono disposte all'esterno del canale in modo tale da formare quattro domini di rilevamento del voltaggio indipendente (VSD), sensibili alla tensione del canale. A seguito di una depolarizzazione, una modificazione conformazionale del canale permette il flusso selettivo attraverso il poro di ioni Na^+ . La dipendenza dalla tensione è osservabile dal movimento delle quattro eliche S4, cariche positivamente.^{9,26}

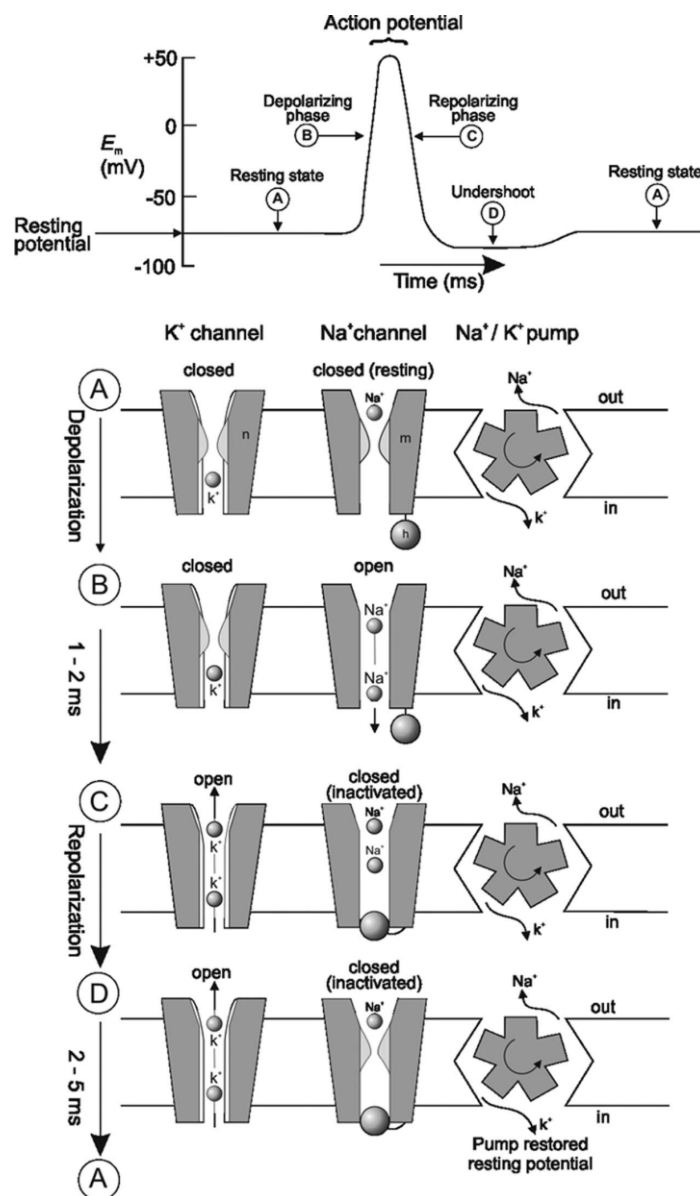


Figura 8 Diagramma della generazione del potenziale d'azione (in alto) e meccanismo del canale del sodio (in basso).⁹

La figura 8 mostra come viene generato il potenziale d'azione del canale del sodio. Nel versante esterno della membrana assonale, il fluido extracellulare presenta un'elevata concentrazione di ioni Na^+ e una bassa concentrazione di ioni K^+ , viceversa per l'interno della cellula. Nella membrana è presente un canale per il K^+ , uno per il Na^+ e una pompa Na^+-K^+ . Il canale Na_v ha due "cancelli": l'm-gate è il cancello di attivazione dipendente dalla tensione (determinato dalla posizione del segmento S4) e blocca il canale nel periodo di potenziale a riposo; l'h-gate è il cancello di inattivazione ed è formato da una triade di amminoacidi idrofobici che permettono l'aggancio dei loop intracellulari tra DII e DIV ad un sito recettore che si trova all'interno del poro. Durante il potenziale di riposo (A in figura 8) la membrana cellulare ha una leggera permeabilità verso K^+ che rende la parte interna della cellula più negativa rispetto a quella esterna, mantenendo una differenza di potenziale di circa -60 mV. In questa fase, l'm-gate blocca il poro mantenendo il canale del sodio chiuso. La carica negativa del versante interno della cellula attrae le cariche positive dei segmenti S4, spostandoli verso l'interno in una posizione piegata che chiude il canale. Quando avviene la stimolazione nervosa (B) il canale del sodio viene aperto aumentando la permeabilità della membrana assonale al Na^+ . La parte interna dell'assone diventa transitoriamente positiva, facendo aumentare il potenziale d'azione. Durante questa fase di depolarizzazione, dei cambiamenti conformazionali dovuti al movimento di IS4, IIS4 verso l'esterno della cellula e una rotazione laterale dei segmenti S6 permettono l'apertura dell'm-gate. Dopo circa 1-2 ms (C) avviene l'inattivazione del canale del sodio e l'apertura del canale del potassio che porta alla fuoriuscita degli ioni K^+ con la conseguente diminuzione del potenziale d'azione. L'attivazione del canale da parte dell'm-gate (quindi un'attivazione voltaggio-dipendente) porta alla chiusura dell'h-gate attraverso un'inattivazione rapida. L'inattivazione dell'm-gate è accoppiata all'attivazione dell'h-gate e questa risulta più veloce quando il canale è aperto, nonostante la poca dipendenza dalla tensione. Una pompa Na^+-K^+ mediata da ATP (D) permette di mantenere il gradiente ionico e ripristinare il potenziale di riposo. Questa ripolarizzazione inverte la conformazione a livello dell'm-gate che chiude il canale (viene disattivato). In questo momento entrambi i cancelli sono chiusi, ma il cambio di conformazione dell'm-gate impone la riapertura dell'h-gate, riportando il canale allo stato iniziale (A). Questo meccanismo applicato ad un singolo canale del sodio fa aumentare la concentrazione di ioni Na^+ in quella regione dell'assone, che andranno poi a influenzare i canali vicini portando ad una reazione a catena lungo tutto l'assone.^{9,27}

3.1.2. Metodo d'azione

I canali Na_v degli insetti, così come quelli dei mammiferi, possiedono dei domini di legame che sono bersaglio di numerose neurotossine e molti insetticidi, tra cui il DDT. Gli effetti del DDT si manifestano a livello del sistema nervoso periferico. La stimolazione spontanea dei neuroni induce nell'insetto bersaglio una serie di spasmi muscolari e tremori che coinvolgono tutto il copro e le appendici dell'artropode, definiti "tremori da DDT". Nel giro di qualche ora o pochi giorni sotto l'effetto dell'insetticida, sopraggiunge la paralisi eccitatoria e di conseguenza la morte dell'organismo. Tra tutti gli insetticidi prodotti negli ultimi anni, il DDT è relativamente lento ad agire e molti di loro agiscono nello specifico attraverso il canale del sodio voltaggio-dipendente. L'effetto a livello della giunzione neuromuscolare è riconducibile alla depolarizzazione, che è causata da un incremento della frequenza del potenziale post-sinaptico, dovuto al rilascio spontaneo accelerato dei neurotrasmettitori.

Continuando la depolarizzazione, l'esaurimento dei neurotrasmettitori blocca la giunzione neuromuscolare.⁹

Il DDT stimola le cellule nervose modificando solamente un numero ristretto di canali del sodio, inducendole così a produrre scariche ripetitive che porteranno alla paralisi. L'insetticida impedisce la chiusura del canale per inattivazione o disattivazione, in questo modo la conduzione degli ioni Na⁺ perdura. L'attivazione del poro attraverso l'apertura dell'm-gate è determinata dalla curvatura delle eliche S6 attorno ad un residuo di glicina. La glicina funge da cerniera di attivazione grazie alla sua particolarità di orientarsi con un grande numero di angoli diedri, rendendo la catena polipeptidica molto flessibile. Questo residuo di glicina si trova nei segmenti S6 dei domini DI, DII e DIII; il dominio DIV presenta invece un residuo di serina che ne riduce la flessibilità. L'interazione del DDT con IIS5 stabilizza nella conformazione attiva le eliche IIS6 e IIS6, preservando la conformazione aperta del poro e portando quindi alle correnti prolungate da parte del continuo ingresso degli ioni Na⁺. Il potenziale di membrana sotto l'effetto del DDT viene spostato portando le cellule nervose a uno stato di ipereccitabilità anomalo ma comunque stabile. Questo stato relativamente stabile di ipereccitazione non è letale ma porta ad un effetto incapacitante, il "knockdown". L'ipereccitabilità continua fintanto che la cellula riesce a mantenere attiva la pompa del sodio. Un insetticida particolarmente lipofilo è in grado di penetrare agevolmente verso il bersaglio, migliorando il tasso di knockdown, ma non garantisce una buona uccisione dell'organismo bersaglio.^{9,23}

3.1.3. Sito di legame del DDT

Per studiare l'interazione e per prevedere la posizione dei siti di legame degli insetticidi con il canale del sodio è stato costruito un modello omologo della porzione di membrana con il canale della mosca domestica (*Musca domestica*), basato sulla struttura cristallina del canale del potassio Kv1.2 del cervello del ratto. All'interno del canale Nav, è presente un sito di legame putativo in grado di contenere vari tipi di strutture molecolari, nonché insetticidi del tipo DDT (figura 9). Questo sito è collocato all'interno di una cavità idrofobica, accessibile quindi agli insetticidi liposolubili attraverso il doppio strato lipidico ed è delimitata dai linker dei segmenti S4 – S5 del DII e dalle eliche IIS5 e IIS6. L'accessibilità al sito di legame dipende dallo stato in cui si trova il canale all'arrivo dell'insetticida: la posizione che il linker assume quando il canale è chiuso blocca l'ingresso della molecola, ma è invece libera di entrare nella fase aperta del canale, stabilizzandolo. In questo modo la transizione dallo stato attivato (aperto) allo stato inattivato/disattivato viene impedita, lasciando entrare continuamente gli ioni Na⁺ e prolungando la corrente del potenziale d'azione del sodio quando è presente l'insetticida. Questa persistente depolarizzazione della membrana induce una continua attivazione del nervo e una ipereccitabilità che porta alla morte dell'insetto.^{9,23}

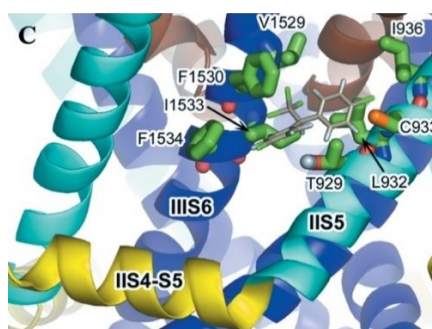


Figura 9 Alloggiamento del DDT nel canale del sodio voltaggio-dipendente della mosca domestica.²³

3.2. Assottigliamento del guscio delle uova degli uccelli

Uno degli effetti ecotossicologici più importanti che ha colpito i volatili è l'assottigliamento del guscio delle uova (tabella 3). È stato osservato che in molte specie di uccelli l'esposizione ad alcuni insetticidi ha portato a delle ripercussioni nella riproduzione degli stessi, nonché nella loro efficienza nella formazione delle uova. Diversi studi hanno riportato una diminuzione del quantitativo di calcio nel guscio delle uova. La causa di questi effetti è da ricercare nelle alterazioni che avvengono all'interno dell'utero degli uccelli. La Ca^{2+} -ATPasi è responsabile del trasporto del calcio nelle ghiandole responsabili alla formazione del guscio durante la produzione dell'uovo e sembra essere inibito dal DDT e dal DDE.^{28,29}

Tabella 3 Effetti del DDT sui gusci delle uova di anatra selvatica (*Anas platyrhynchos*) dopo un'assunzione di 50 ppm di DDT per 6 mesi rispetto a un gruppo di controllo. Il parametro R corrisponde a peso/lunghezza*larghezza.¹²

Parametro	Controllo	50 ppm DDT
Spessore/ mm	0.412 ± 0.004	0.337 ± 0.005
Peso/ g	5.30 ± 0.11	4.68 ± 0.14
R	0.236 ± 0.004	0.198 ± 0.14
Ca^{2+} totale/ g	2.12 ± 0.29	1.57 ± 0.08
Ca-ATPasi	9.75 ± 1.01	6.36 ± 0.66

Come riportato nella tabella 3, sono state osservate delle variazioni nelle caratteristiche delle uova di anatre domestiche. Nello specifico è stato evidenziato un assottigliamento del 18% dello spessore del guscio, una riduzione del peso del 12% e una riduzione del parametro R del 16%. Diversamente, i parametri di lunghezza e larghezza non hanno mostrato differenze significative. Un altro dato che differisce tra il gruppo di controllo e quello esposto al DDT è il contenuto di calcio nelle uova: nello specifico è la quantità di calcio ad essere diminuita, ma non la sua concentrazione. Da quest'ultimo aspetto si può ipotizzare che la perdita di peso è riconducibile alla diminuzione del calcio. Anche l'attività enzimatica della Ca-ATPasi è stata ridotta del 65%.²⁸

3.2.1. Formazione del guscio delle uova e interferenza con gli insetticidi

L'assottigliamento è causato da alterazioni che coinvolgono il sito adibito alla formazione del guscio delle uova. Il fatto che non ci sia una diminuzione nella quantità di calcio nel sangue durante un'esposizione ad un insetticida suggerisce che l'assottigliamento sia dovuto a una modifica nella funzionalità della ghiandola responsabile alla formazione del guscio piuttosto che alla riduzione dell'apporto di calcio alla ghiandola. La funzione primaria della ghiandola è quella di secernere ioni calcio e carbonato durante la formazione dell'uovo, acquisiti rispettivamente dal sangue e dal metabolismo della CO_2 , che andranno poi a calcificare per formare il guscio. Per il corretto apporto di calcio e carbonato, nella ghiandola sono presenti ATPasi dipendenti da calcio e carbonato (Ca^{2+} -ATPasi e (HCO_3^{2-}) -ATPasi), più la proteina che lega il calcio (CaBP) e l'anidrasi carbonica (CA). Gli insetticidi organoclorurati come DDT e DDE interferiscono con questi enzimi provocando l'assottigliamento. Si ipotizza che a prendere parte a questo processo siano coinvolti numerosi meccanismi. Pertanto, non è facilmente definibile una chiara spiegazione per questo effetto. È stato osservato che l'assottigliamento è collegato alla diminuzione dell'attività di alcuni enzimi, nello specifico Ca^{2+} -ATPasi e CA.³⁰

3.2.2. Disponibilità del calcio

Alcuni meccanismi atti al trasporto del calcio dal lume intestinale al sangue dipendono dalla vitamina D e nello specifico un suo derivato 25-idrossi (calcidiolo). Inoltre, le cellule dell'epitelio della ghiandola trasportano gli ioni calcio provenienti dal sangue al lume della ghiandola. Gli ioni, precedentemente immagazzinati all'interno dei mitocondri, vengono trasportati dalla vitamina D₃ attraverso il reticolo endoplasmatico. È stato visto che l'interazione della vitamina D con alcuni insetticidi organoclorurati induce l'idrossilazione in siti diversi da quelli preposti per il normale trasporto del calcio, portando così alla formazione di molecole inattive. Un altro possibile meccanismo ipotizza che gli OCP possano inibire le ATPasi coinvolte nel trasporto attivo del calcio attraverso la parete intestinale o la ghiandola. L'inibizione sembra essere provocata dall'impedimento dell'incorporazione del fosforo dell'ATP.³¹

3.2.3. Disponibilità del carbonato

Lo ione carbonato è trasportato dal sangue alla ghiandola predisposta alla formazione del guscio, oppure direttamente al sito di sviluppo del guscio. Non tutto il bicarbonato presente nel sangue andrà a comporre il guscio dell'uovo e questo, si ritiene, è derivato dal metabolismo della CO₂, dove l'anidrasi carbonica permette il corretto equilibrio tra CO₂ e H₂CO₃. Gli effetti degli OCP nella disponibilità del carbonato riguardano la possibile interazione con l'anidrasi carbonica; si tratta di un'ipotesi difficile da considerare in quanto prevede l'interazione tra un insetticida lipofilo e una proteina idrofila, localizzate in zone differenti della cellula. Si pensa che in alcuni casi gli insetticidi si possano legare a queste proteine, oppure che la proteina stessa possa essere legata alla membrana in alcune specie. Questo effetto che lega la disponibilità degli ioni carbonato agli insetticidi non è consolidato e non tutti gli esperimenti in merito portano a questa conclusione. Si può dire che in generale l'effetto degli OCP non è così importante da inibire considerevolmente l'attività dell'anidrasi carbonica e quindi di portare ad un assottigliamento del guscio delle uova.³¹

3.3. Altri effetti sugli ecosistemi e sugli organismi

3.3.1. Bioaccumulo

Quando il DDT tecnico viene applicato, si diffonde simultaneamente in piante, aria e terreno. Una volta che l'insetticida si deposita sulle piante, questo può essere facilmente accessibile agli esseri umani così come agli animali, e successivamente finire nel terreno attraverso gli escrementi. Questo è solo un esempio delle tante vie che portano il DDT ad arrivare al terreno, dove poi può facilmente contaminare i sistemi idrici sotterranei. Il suo trasporto per mezzo dell'aria, dell'acqua e degli animali (compreso l'uomo) ha enormemente contribuito alla sua diffusione, andando a raggiungere regioni remote come l'Artico. Questa classe di insetticidi può quindi raggiungere tutti i livelli della catena alimentare attraverso il bioaccumulo. I mammiferi marini e gli uccelli piscivori che si trovano in posizioni apicali della catena alimentare acquatica sono stati studiati per la biomagnificazione e il bioaccumulo

nelle catene trofiche. Generalmente i mammiferi terrestri hanno attività enzimatica maggiore rispetto a quelli acquatici e per entrambe le classi sono inferiori rispetto alle attività degli uccelli. Numerosi studi si sono concentrati sui predatori all'apice della catena alimentare, dove l'effetto del bioaccumulo è più marcato. Non appena una preda contaminata da un POP diventa nutrimento di un predatore, il contaminante, una volta arrivato nello stomaco, viene trasportato attraverso i tessuti e il sangue. Con la continua esposizione, il contaminante verrà accumulato nelle zone del corpo con maggiore contenuto lipidico.

Tutti questi effetti del DDT furono scoperti inizialmente negli uccelli, per il processo di assottigliamento del guscio delle uova. È stato poi osservato come gli uccelli carnivori presentino livelli di DDE superiori rispetto a quelli onnivori e insettivori. A loro volta i rapaci che si nutrono di altri uccelli hanno livelli di bioaccumulo maggiore rispetto ai rapaci piscivori. L'uso incessante del DDT ha ridotto drasticamente la popolazione dell'aquila di mare testabianca (*Haliaeetus leucocephalus*), portandola vicina all'estinzione.^{4,5,32}

3.3.2. Effetti sulla salute umana

L'esposizione dell'essere umano al DDT può avvenire per vie differenti: per inalazione di aria, per ingerimento di cibo o acqua contaminati, oppure per esposizione dermica alla polvere o all'aria stessa (nei suoi primi utilizzi nella Seconda Guerra Mondiale, veniva applicato direttamente sulle persone per controllare il tifo e la malaria, successivamente si è passati all'irrorazione degli interni delle case). Nonostante il DDT sia stato bandito da ormai molti anni in gran parte dei Paesi del mondo, le persone possono comunque avere un certo grado di esposizione attraverso i cibi provenienti da zone ancora contaminate. Nonostante molti studi smentiscano le correlazioni tra il DDT e il cancro, altrettante ricerche mostrano questa correlazione; il DDT è infatti classificato come possibile agente cancerogeno. Si tratta di un interferente endocrino associato al cancro al seno. Inoltre, le ragazze le cui madri hanno avuto un'esposizione al DDT durante la gravidanza sono maggiormente a rischio.⁵

Sono stati osservati anche problemi nella riproduzione, in entrambi i sessi. Diversi studi condotti su diversi campioni maschili hanno evidenziato delle correlazioni tra la concentrazione di DDT e DDE e la diminuzione della concentrazione degli ormoni sessuali come il testosterone, oltre che nella riduzione del volume dello sperma e nel numero degli spermatozoi. Altri studi condotti sulla popolazione femminile mostrano associazioni negative tra i metaboliti sierici del DDT e la coniugazione dell'estrone e la concentrazione dei metaboliti del progesterone. Le madri che hanno vissuto nel periodo di massimo impiego del DDT possono esporre i propri figli al DDT attraverso la gravidanza e all'allattamento. Il DDT può tranquillamente oltrepassare la placenta, incidendo sulla nascita del nascituro. Sono state osservate (e in altri studi confutate) incidenze tra assunzione di DDT prima della nascita e la diminuzione del peso del nascituro, oltre che una diminuzione del periodo di gestazione. Altri studi mostrano delle relazioni tra l'assunzione prenatale e transplacentare del DDT con ritardi nello sviluppo nella prima infanzia o nelle capacità verbali e di memoria.⁵

4. Resistenza al knockdown

L'uso diffuso del DDT ha esercitato una forte selezione sugli insetti, favorendo lo sviluppo di mutazioni che li rendono più resistenti. Questa resistenza ha in parte eliminato il controllo chimico su molti insetti, influenzando negativamente sul programma di eradicazione della malaria dell'OMS.¹

Come descritto alla fine della Sezione 3.1.2., l'effetto del DDT nei canali del sodio non è di per sé letale, ma porta al così definito knockdown, che poi porterà alla morte dell'insetto. Proprio in questo aspetto, l'evoluzione degli insetti per rispondere agli effetti degli insetticidi ha portato a mutazioni che ne determinano la resistenza. Questa resistenza al knockdown (*kdr*) è il primo meccanismo di resistenza ad essere stato identificato (documentato la prima volta nella mosca domestica) ed è anche quello in grado di colpire una vasta gamma di insetticidi, gli analoghi del DDT, piretroidi e piretrine. Il tratto *kdr* conferisce la resistenza all'azione paralizzante dell'insetticida. Indagini sulla relazione tra *kdr* e mutazioni genetiche hanno confermato il collegamento tra *kdr* e i canali del sodio. Oltre al tratto *kdr* esiste anche un altro tratto che conferisce una resistenza maggiore, chiamato *super-kdr*. Entrambi questi tratti sono localizzati nel cromosoma 3 della mosca domestica.^{33,34}

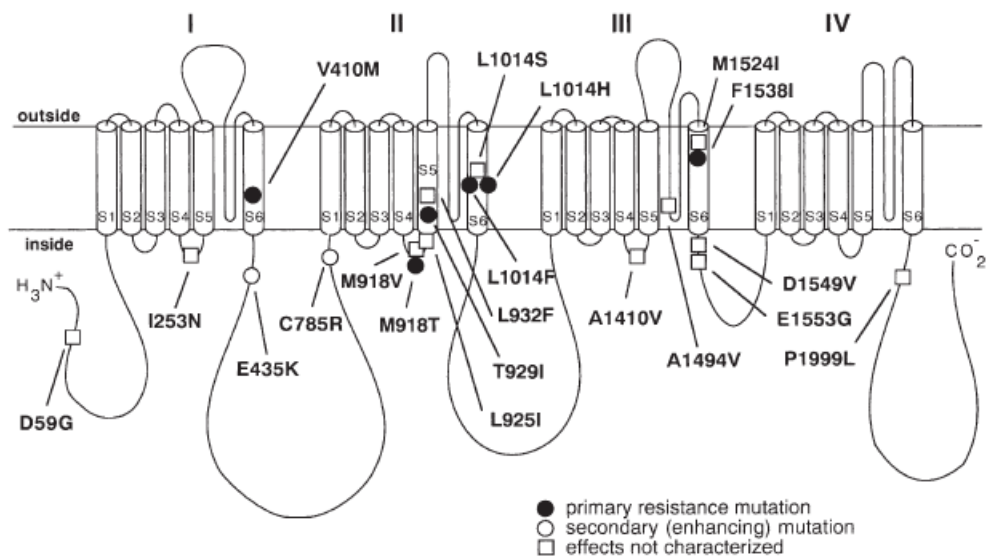


Figura 10 Subunità α del canale del sodio voltaggio-dipendente e i principali siti di mutazione associati a *kdr*.³⁴

Una volta scoperto che il gene *Vssc1* è responsabile della mutazione *kdr*, è stato possibile determinare la sequenza codificante completa del gene. Le due mutazioni più importanti che sono state osservate sono due: la mutazione di leucina in fenilalanina (L1014F), presente in entrambi i tratti *kdr* e *super-kdr*, e la mutazione di metionina in treonina (M918T), presente solo nei ceppi *super-kdr*. La mutazione M918T non è stata osservata senza L1014F (almeno nella mosca domestica). Procedendo con gli studi sono stati scoperti anche altri siti di mutazioni, presenti anche in specie diverse dalla mosca domestica. Queste mutazioni non avvengono casualmente all'interno del gene che codifica la proteina che costituirà il canale del sodio; gran parte di queste sono localizzate nei segmenti S5 e S6 dei domini DI, DII e DIII, cioè in prossimità del poro del canale dove l'insetticida andrà ad alloggiarsi per impedirne la chiusura.^{33,34}

5. Conclusioni

In questa tesi sono state analizzate le proprietà che hanno reso il DDT la soluzione a molte delle problematiche del secondo '900 e che allo stesso tempo hanno provocato una parte dei problemi che hanno afflitto quello stesso periodo. La sua grande persistenza e stabilità l'hanno reso un importante aiuto umanitario, prima di danneggiare pesantemente la biosfera. Osservando nel dettaglio il suo meccanismo d'azione e il sito bersaglio all'interno degli organismi è stato visto come agisca nel dettaglio questo insetticida e come abbia influito nella riproduzione degli uccelli. È stato anche approfondito il modo in cui l'evoluzione ha trovato un modo di difendersi dall'attacco chimico condotto dall'uomo.

L'esempio del DDT mostra come la nostra società sia strettamente legata al delicato equilibrio dei sistemi del nostro pianeta, e di come l'abuso di una nuova scoperta sia in grado di cambiare profondamente l'ambiente circostante. Solo attraverso lo studio di come le nostre scoperte influiscono sul mondo possiamo comprendere e mettere in atto le corrette strategie per poter vivere in perfetta armonia con il pianeta in cui abitiamo.

Bibliografia

- (1) Metcalf, R. L. *J. Agric. Food Chem.* **1973**, 21 (4), 511–519.
- (2) Jarman, W. M.; Ballschmitter, K. *Endeavour* **2012**, 36 (4), 131–142.
- (3) Turusov, V.; Rakitsky, V.; Tomatis, L. *Environ. Health Perspect.* **2002**, 110 (2), 125–128.
- (4) Hellou, J.; Lebeuf, M.; Rudi, M. *Environ. Rev.* **2013**, 21 (1), 53–69.
- (5) Li, B. A.; Li, B. M.; Bao, Z.; Li, Q.; Xing, M.; Li, B. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2023**, 111 (4), 45.
- (6) Zeidler, O. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1873**, 7, 19.
- (7) Darling, S. F. *J. Chem. Educ.* **1945**, 22 (4), 170.
- (8) Castonguay, T. T.; Ferm, R. L. *Trans. Kans. Acad. Sci.* 1903- **1946**, 49 (2), 167.
- (9) Davies, T. G. E.; Field, L. M.; Usherwood, P. N. R.; Williamson, M. S. *IUBMB Life* **2007**, 59 (3), 151–162.
- (10) Haller, H. L.; Bartlett, P. D.; Drake, N. L.; Newman, M. S.; Cristol, S. J.; Eaker, C. M.; Hayes, R. A.; Kilmer, G. W.; Magerlein, B.; Mueller, G. P.; Schneider, A.; Wheatley, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, 67 (9), 1591–1602.
- (11) Shen, L.; Wania, F. *J. Chem. Eng. Data* **2005**, 50 (3), 742–768.
- (12) Kirman, C. R.; Aylward, L. L.; Hays, S. M.; Krishnan, K.; Nong, A. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2011**, 60 (2), 172–180.
- (13) Gaines, T. B. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1960**, 2 (1), 88–99.
- (14) Kelly, B. C.; Gobas, F. A. P. C.; McLachlan, M. S. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, 23 (10), 2324–2336.
- (15) Mackay, D.; Fraser, A. *Environ. Pollut.* **2000**, 110 (3), 375–391.
- (16) Tsukamoto, M. *Sci. Pest Control* **1959**, 24 (3), 141–151.
- (17) Datta, P. R.; Laug, E. P.; Klein, A. K. *Science* **1964**, 145 (3636), 1052–1053.
- (18) Bumpus, J. A.; Aust, S. D. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, 53 (9), 2001–2008.
- (19) Aislable, J. M.; Richards, N. K.; Boul, H. L. *N. Z. J. Agric. Res.* **1997**, 40 (2), 269–282.
- (20) Peterson, J. E.; Robison, Wm. H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1964**, 6 (3), 321–327.
- (21) Plimmer, J. R.; Klingebiel, U. I.; Hummer, B. E. *Science* **1970**, 167 (3914), 67–69.
- (22) Zepp, R. G.; Wolfe, N. L.; Azarraga, L. V.; Cox, R. H.; Pape, C. W. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1977**, 6 (1), 305–314.
- (23) O'Reilly, A. O.; Khambay, B. P. S.; Williamson, M. S.; Field, L. M.; Wallace, B. A.; Davies, T. G. E. *Biochem. J.* **2006**, 396 (2), 255–263.
- (24) Wang, S. *Cell. Signal.* **2003**, 15 (2), 151–159.
- (25) Cembella, A. D.; Durán-Riveroll, L. M. *Advances in Neurotoxicology*; Elsevier, 2021; Vol. 6, pp 1–47.
- (26) Loughney, K.; Kreber, R.; Ganetzky, B. *Cell* **1989**, 58 (6), 1143–1154.
- (27) Catterall, W. A. *Neuron* **2000**, 26 (1), 13–25.
- (28) Kolaja, G. J.; Hinton, D. E. *J. Toxicol. Environ. Health* **1977**, 3 (4), 699–704.
- (29) Holm, L.; Blomqvist, A.; Brandt, I.; Brunström, B.; Ridderstråle, Y.; Berg, C. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, 25 (10), 2787–2793.
- (30) Miller, D. S.; Kinter, W. B.; Peakall, D. B. *Nature* **1976**, 259 (5539), 122–124.
- (31) Cooke, A. S. *Environ. Pollut.* 1970 **1973**, 4 (2), 85–152.
- (32) Stokstad, E. *Science* **2007**, 316 (5832), 1689–1690.
- (33) Soderlund, D. M.; Knipple, D. C. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1999**, 92 (6), 909–915.
- (34) Soderlund, D. M.; Knipple, D. C. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2003**, 33 (6), 563–577.