

**DROSOPHILA MELANOGASTER MEIGEN: 3. SENSIBILIDADE AO CARBOFURAN E BIOMONITORAMENTO DE SEUS RESÍDUOS EM REPOLHO****Garcia Rodrigues de Almeida\***

Faculdade Adventista de Biologia, Centro Universitário Adventista, CP 12630, 05858-001 São Paulo - SP

**Felix G. R. Reyes\*\***

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CP 6121, 13083-970 Campinas - SP

**Susanne Rath\*\*\***

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas - SP

Recebido em 11/9/00; aceito em 23/3/01

*DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIGEN: 3. SUSCEPTIBILITY TO CARBOFURAN AND BIOMONITORING OF ITS RESIDUES IN CABBAGE. The susceptibility of *Drosophila melanogaster* to carbofuran and the use of this organism in biomonitoring residues of the insecticide in cabbage was evaluated. Under the conditions of the bioassay, residues-film bioassay in Petri dish, carbofuran degraded depending on the temperature and time of exposure. Bioassays conducted with *D. melanogaster* showed that its toxicity increases with temperature (20 to 35 °C). LC<sub>50</sub> values, calculated as a function of temperature, ranged from 3.6 to 10.5 mg/g body weight (bw) for males and from 2.9 to 8.7 mg/g bw for females. The formulated product Furadan® G was applied on cabbage (*Brassica oleracea*, var. *capitata*) and the residues of carbofuran were determined by bioassay. The determination limit of the bioassay was 0.1 mg/kg and the method presented reproducibility with coefficient variation of 17 %. The validation of the bioassay by high performance liquid chromatography confirms the viability of the bioassay with *D. melanogaster* in monitoring the residues of carbofuran in cabbage.

Keywords: carbofuran; bioassay; *D. melanogaster*; cabbage.**INTRODUÇÃO**

Carbofuran (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-N-metil carbamato) é um inseticida e nematicida do grupo dos carbamatos, que apresenta curta persistência no ambiente e pequeno deslocamento para regiões adjacentes, sendo efetivo por contato, ingestão e por ação sistêmica<sup>1,2</sup>.

O inseticida é aplicado no solo em culturas de algodão, amendoim, arroz, milho, trigo, feijão, banana, batata, café, cana-de-açúcar, cenoura, repolho, tomate, e utilizado no tratamento de sementes de algodão, arroz, trigo, milho e feijão, na época do plantio<sup>1</sup>.

O carbofuran é biotransformado por reações de hidrólise, hidroxilação e/ou oxidação produzindo nos animais e plantas, o 3-hidroxi-carbofuran como metabólito principal<sup>2</sup>. Este, por sua vez, se oxida a 3-ceto carbofuran, o qual por hidrólise produz o 3-ceto carbofuran fenol<sup>3,4</sup>. Os metabólitos 3-hidroxi carbofuran e 3-ceto carbofuran têm curta persistência no solo<sup>5, 6</sup>, são formados lentamente e apresentam baixa toxicidade aguda para insetos<sup>3,4</sup>.

No ambiente, a biodegradação do carbofuran é dependente da temperatura, da umidade, do pH do solo, da biomassa disponível, assim como da atividade degradativa da mesma<sup>7</sup>. Aplicações periódicas de carbofuran, no mesmo solo, aumentam a atividade degradativa do composto<sup>5,8</sup>, o que é devido ao maior crescimento de microrganismos capazes de utilizá-lo como fonte de carbono e nitrogênio<sup>9</sup>.

O valor da DL<sub>50</sub> do carbofuran, reportado para mosca doméstica (*Musca domestica*) é de 4,6 - 6,7 mg/kg pc (exposição tópica) e de 2,0 mg/kg pc para camundongos (exposição oral)<sup>3,10,11</sup>. O Comitê de Peritos da FAO/OMS sobre Resíduos de Pesticidas (Joint Meeting on Pesticide Residues - JMPR)<sup>12</sup>

relatou valores de DL<sub>50</sub> (exposição oral) de 14,4 mg/kg pc para camundongos e de 6,0 -18,0 mg/kg pc para ratos.

O carbofuran é absorvido rapidamente, independentemente da via de administração e distribui-se nos órgãos, tecidos moles e esqueleto, sendo excretado como carbofuran nas fezes e seus metabólitos pelas vias urinária e pulmonar<sup>3,13,14,15</sup>. Os processos de detoxificação ocorrem por hidrólise, N-, S- e O-dealquilação e hidroxilação do anel fenólico<sup>10</sup>.

Os bioensaios com a mosca *Drosophila melanogaster* (Meig.) têm sido usados por alguns pesquisadores como indicador de resíduos de agrotóxicos em alimentos<sup>16,17,18</sup> e da presença, no ambiente, de substâncias químicas com potencial mutagênico<sup>19</sup>. Cabe destacar que as drosófilas, além da sua elevada sensibilidade para detectar a presença de substâncias tóxicas, são insetos de fácil criação, manutenção e manipulação em condições de laboratório apresentando, assim, vantagens frente a outros organismos para a realização de bioensaios<sup>20,21</sup>.

Com o propósito de detectar resíduos de inseticidas em quantidades que possam apresentar perigo à saúde humana é necessário pesquisar e avaliar métodos alternativos de triagem que sejam satisfatórios, práticos e que reduzam significativamente os custos para o controle de qualidade de produtos alimentícios, especialmente os hortifrutigranjeiros, quanto à presença de agrotóxicos em geral e de inseticidas em particular<sup>22</sup>.

O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade das moscas *D. melanogaster* ao carbofuran e a viabilidade da sua utilização no biomonitoramento dos resíduos desse inseticida em produtos hortigranjeiros.

**PARTE EXPERIMENTAL****Equipamentos**

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em Cromatógrafo Líquido Waters, modelo 486, com detector UV/VIS Waters, injetor Rheodyne e integrador

\* e-mail: garcia@cablenet.com.br

\*\* e-mail: reyesfgr@fea.unicamp.br

\*\*\* e-mail: raths@iqm.unicamp.br

CHROMJET. Como fase estacionária foi utilizada coluna cromatográfica de fase reversa RP-18 LiChroCart, 125 mm x 4 mm (Merck).

A aplicação do inseticida foi realizada mediante pulverizador costal Jato (20 L) provido com bico tipo jato cônico para aplicação em alto volume.

### Solventes e reagentes

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau para análise de resíduos, Merck. O sulfato de sódio anidro e o florisil foram aquecidos a 400 °C, durante 8 horas; antes do uso, a resina foi desativada com 2 % de água. Como padrão analítico foi utilizado carbofuran (99,5 %) e para os experimentos, o produto comercial Furadan® G.

### Criação das moscas *D. melanogaster*

As moscas *D. melanogaster*, usadas para a realização dos bioensaios, foram criadas em ambiente com temperatura de 25 ± 2 °C, a partir de cepas cedidas pelo Laboratório de Toxicologia do Instituto Biológico de São Paulo.

O meio de cultura foi preparado conforme Joseph & Knobel<sup>23</sup>, com modificações sugeridas por Almeida & Reyes<sup>16</sup>. O meio, recém-preparado, foi distribuído em frasco de vidro transparente, de boca larga (50 mL/frasco) e conservados em refrigerador até o momento do uso.

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

### Bioensaio

No bioensaio utilizou-se o método do filme seco<sup>24</sup> em placa de Petri (50 x 20 mm). O filme foi preparado mediante aplicação de 0,10 mL de solução inseticida por placa. O procedimento do bioensaio foi realizado conforme descrito por Almeida & Reyes<sup>16</sup>.

Para avaliação da concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) foi utilizada a formulação Furadan® G, sendo que as concentrações do princípio ativo, carbofuran, nas soluções utilizadas variaram entre 0,3 a 2,5 µg/mL para as temperaturas 20, 25, 30 e 35 °C. Alíquotas de 0,10 mL dessas soluções foram aplicadas nas placas de Petri.

### Estabilidade do carbofuran no bioensaio

A estabilidade do carbofuran foi avaliada nas condições do bioensaio aplicando-se na placa de Petri 0,10 mL de solução inseticida de concentração 50 µg/mL e seguido o procedimento descrito por Almeida & Reyes<sup>16</sup>. O carbofuran residual foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas seguintes condições de trabalho: fase móvel: metanol:água (1:1 v/v), fluxo 0,5 mL/min e detecção UV a 220 nm.

### Ensaio de campo

Repolho (*Brassica oleracea*, var. *capitata*) foi cultivado, segundo as boas práticas agrícolas, no campo experimental do Instituto Adventista São Paulo, em Hortolândia, SP.

As mudas foram plantadas em junho, com espaçamento de 60 x 80 cm, em área com aproximadamente 200 m<sup>2</sup>, dividida em duas partes iguais. Por ocasião do repique das mudas, foi aplicado, na metade da área cultivada, o produto formulado Furadan® G, na proporção de 4,0 - 5,0 g/cova, equivalente a 0,2 - 0,25 g do ingrediente ativo/cova. A área não tratada serviu como controle.

Amostras de repolho foram colhidas aleatoriamente 30 dias

após o plantio, embaladas em sacos de plástico, transportadas para o laboratório e congeladas a - 20 °C, no máximo 30 min após a colheita.

### Validação do bioensaio

Para validação do método de bioensaio, extratos de amostras de repolho tratado com Furadan® G foram também analisados por CLAE conforme o fluxograma apresentado na Figura 1.

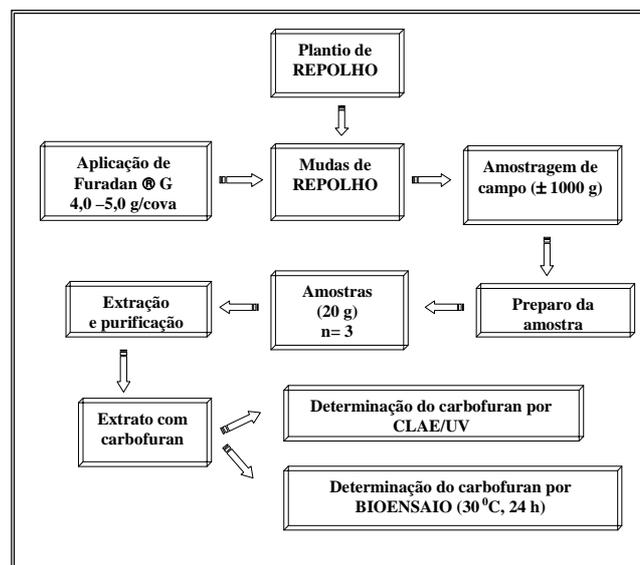


Figura 1. Esquema do procedimento de campo e laboratorial empregado para a determinação do carbofuran em repolho pelo método de bioensaio e CLAE.

Na quantificação por CLAE os resíduos do carbofuran foram determinados conforme a metodologia proposta por Lawrence & Leduc<sup>25</sup>, com modificações. Para tanto, de uma amostra de repolho triturado e homogêneo, de aproximadamente 1 kg, foram transferidos 20 g para um erlenmeyer (250 mL) e, após ser adicionado 100 mL de acetona e agitado durante 5 minutos, a mistura foi filtrada em funil de Büchner, com papel-filtro Whatman n° 1 e o resíduo lavado com 50 mL de acetona. Ao filtrado, transferido para um funil de separação (500 mL), acrescentou-se 200 mL de diclorometano:hexano (1:1 v/v). Após agitação vigorosa da mistura por 2 minutos, separou-se a fase orgânica. A fase aquosa foi transferida para outro funil de separação (250 mL), contendo 15 mL de solução aquosa saturada de NaCl, sendo extraída com duas porções de 20 mL de diclorometano. A fase orgânica total, adicionada de 5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, foi agitada, deixada em repouso durante 10 min e, posteriormente, percolada por uma coluna de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e lavada com 10 mL de diclorometano. O eluato foi transferido para um balão de fundo redondo, concentrado em evaporador rotatório à temperatura de 30 °C, até aproximadamente 1 mL, o qual foi transferido para um tubo concentrador e ressuspenso, em metanol para 10 mL.

A limpeza do extrato foi realizada em uma coluna cromatográfica (200 x 15 mm) contendo 5 g de florisil desativado com 2 % de água e, no topo, cerca de 1 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e, previamente lavada com 50 mL de n-hexano. Após a adição de 5 mL do extrato, o resíduo foi eluído da coluna com 100 mL de n-hexano. O eluato foi concentrado em evaporador rotatório a 30 °C até quase à secura e transferido com 10 mL de n-hexano para tubo concentrador graduado. O solvente foi removido com nitrogênio, o tubo lavado com n-hexano, seco novamente com

nitrogênio, diluído com 2 mL de metanol e injetado 10 µL no cromatógrafo líquido, nas condições de trabalho anteriormente estabelecidas.

Para avaliação da metodologia quanto à recuperação e sensibilidade, amostras de repolho (20 g) livre de inseticidas, foram adicionadas de 2 mL de solução padrão do inseticida nas concentrações de 10,0 e 1,0 µg/mL, caracterizando fortificações de 1,0 e 0,1 mg/kg de amostra, respectivamente.

Para quantificação dos resíduos do carbofuran por bioensaio (Figura 2), placas testemunha e aquelas preparadas com diferentes alíquotas do extrato (número de repetições para as diferentes alíquotas do extrato, n=3), foram mantidas durante 24 h a 30 °C, para calcular o volume de extrato necessário para provocar a morte de 50 % da população teste.

### Cálculo da CL<sub>50</sub>

Na avaliação da CL<sub>50</sub> levou-se em consideração as moscas mortas e as moribundas, observadas no momento da contagem<sup>20</sup>. Os cálculos dos valores da CL<sub>50</sub> foram efetuados por análise de probito<sup>26</sup>.

### Análise estatística

Os dados obtidos no bioensaio foram avaliados por análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey (P < 0,05) foi utilizado para verificar se havia diferença entre os resultados obtidos para as moscas machos e fêmeas e também para as temperaturas consideradas no bioensaio. Os cálculos foram feitos utilizando-se um software estatístico S.A.S.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A toxicidade dos inseticidas depende da temperatura de exposição e de outros fatores como sua formulação, concentração, método de administração, espécie e estágio de desenvolvimento do inseto<sup>27</sup>.

Os valores de CL<sub>50</sub> para as moscas *D. melanogaster*, machos e fêmeas, em função da variação da temperatura, são apresentados na Tabela 1. Os dados mostram que as drosófilas machos e fêmeas apresentaram susceptibilidade semelhante ao carbofuran, sendo que as fêmeas mostraram-se significativamente (P < 0,05) mais susceptíveis a ação do inseticida nos bioensaios realizados a 20 e 35 °C. Verifica-se, ainda, que a 35 °C a sensibilidade ao carbofuran foi, aproximadamente, 3 vezes maior do que a 20 °C, o que pode ser devido a uma absorção mais rápida do inseticida com o aumento da temperatura. Esse comportamento é semelhante ao relatado por outros pesquisadores, utilizando diferentes inseticidas e sistemas biológicos<sup>27,28,29</sup>. Ainda, essa diferença na resposta foi sugerida como um artifício para aumentar a sensibilidade do bioensaio<sup>30</sup>.

O estudo da degradação do carbofuran em função do tempo de exposição e da variação da temperatura foi conduzido para avaliar a quantidade do inseticida que estaria disponível nas placas, durante a realização do bioensaio, pelo método do filme seco<sup>24</sup>. Os valores da percentagem residual do carbofuran, remanescente nas placas de Petri, após 6, 12 e 24 h nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C, são apresentados na Figura 3. Verifica-se que a degradação do carbofuran é proporcional tanto ao tempo de exposição, como à variação da temperatura.

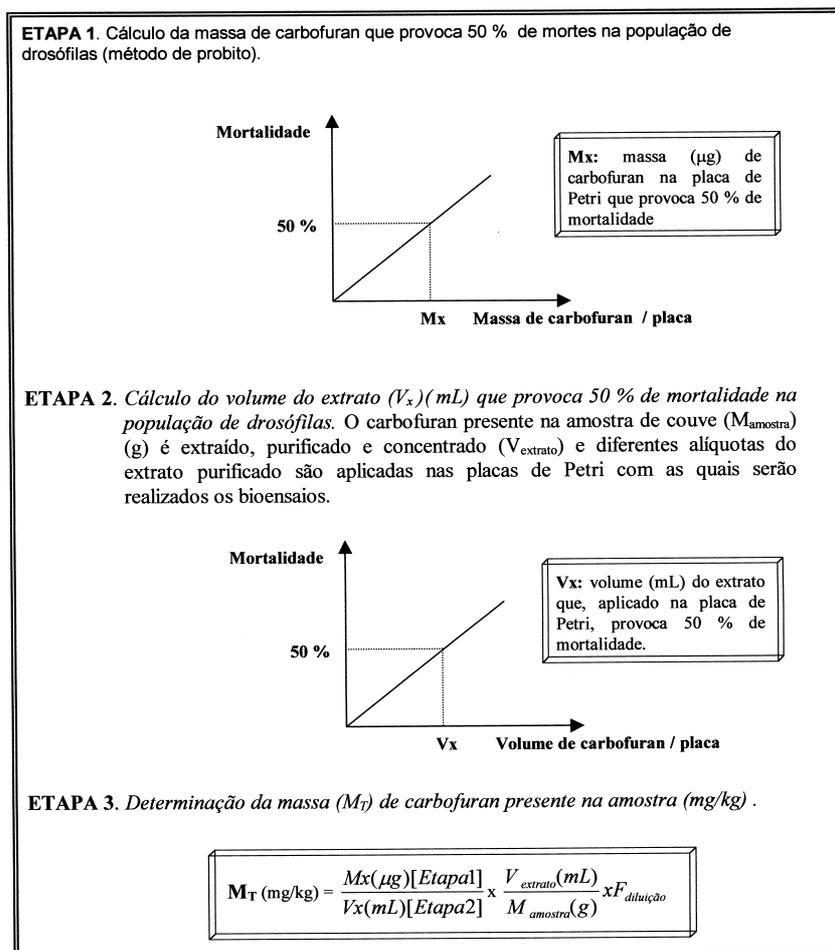
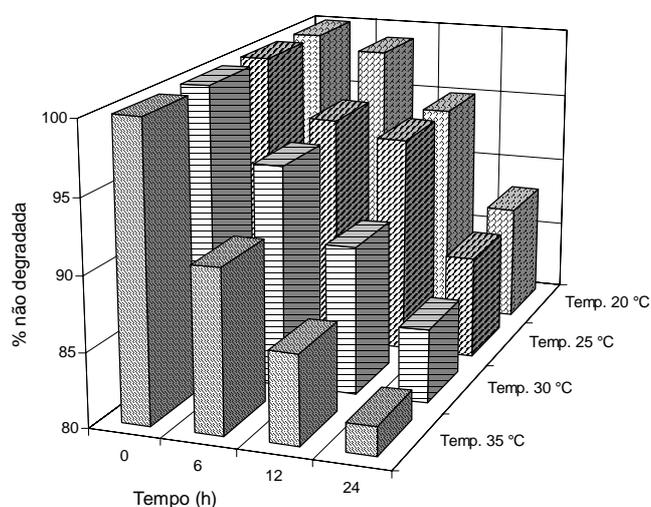


Figura 2. Representação esquemática das etapas realizadas para determinar a quantidade de carbofuran na amostra de repolho pelo método de bioensaio.

**Tabela 1.** Concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) do carbofuran (Furadan® G) para *D. melanogaster*, em função da temperatura.

Temp. (°C)	MACHOS	FÊMEAS
	CL <sub>50</sub> ± s <sup>(a)</sup> (µg/g pc)	CL <sub>50</sub> ± s <sup>(a)</sup> (µg/g pc)
20	10,5 ± 0,8 (A, a) <sup>(b)</sup>	8,7 ± 0,4 (B, a)
25	5,3 ± 0,7 (A, b)	4,9 ± 0,8 (A, b)
30	4,8 ± 0,9 (A, b, c)	3,9 ± 0,3 (A, c)
35	3,6 ± 0,3 (A, d)	2,9 ± 0,5 (B, d)

<sup>a</sup>s=estimativa do desvio padrão absoluto e pc = peso corporal.;  
<sup>b</sup> Comparação entre médias. As letras "A e B" indicam comparação de médias entre machos e fêmeas para uma mesma temperatura e as letras "a, b, c, d" indicam comparação de médias entre temperaturas para o mesmo sexo. Médias com mesma letra não são diferentemente significativas (P < 0,05).

**Figura 3.** Percentagem residual do carbofuran em placas de Petri em função da temperatura, para 5mg do inseticida aplicada nas placas.

Os bioensaios com *D. melanogaster* para detecção dos resíduos do carbofuran em repolho foram conduzidos em temperatura de 30 °C, durante 24 h de exposição. Assim, diferentes volumes do extrato foram usados para determinar o volume necessário para provocar a morte de 50 % da população teste. A massa do carbofuran contida nesse volume (Tabela 2), relacionada àquela correspondente à CL<sub>50</sub> a 30 °C (Tabela 1) permitiu estimar o nível de resíduo do carbofuran no repolho (Tabela 3).

**Tabela 2.** Massa do carbofuran aplicado nas placas de Petri que correspondem aos valores de CL<sub>50</sub> das moscas *D. melanogaster*, machos e fêmeas, em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Machos (ng/placa)	Fêmeas (ng/placa)
20	144	185
25	74	105
30	66	85
35	50	62

A sensibilidade dos métodos químicos de análise de resíduos, assim como os valores do limite máximo de resíduos estabelecidos pela legislação de agrotóxicos, exigem que os organismos usados nos bioensaios sejam suficientemente sensíveis

**Tabela 3.** Resíduo do carbofuran (média ± s)<sup>a</sup> aplicado em repolho e determinado por CLAE e por bioensaio com *D. melanogaster*, após 30 dias da aplicação do inseticida.

MÉTODO		
BIOENSAIO (mg/kg) <sup>b</sup>		
CLAE (mg/kg) <sup>c</sup>	Machos	Fêmeas
0,43 ± 0,06	0,65 ± 0,05	0,66 ± 0,11

<sup>a</sup>s=Estimativa do desvio padrão absoluto; <sup>b</sup> n = 6; <sup>c</sup> n = 3

para detectar níveis residuais menores do que 1,0 mg/kg<sup>17,18</sup>.

O limite de determinação calculado para o método do bioensaio, foi de 0,07 e 0,09 mg de carbofuran/kg de amostra para as drosófilas machos e fêmeas, respectivamente. Esse valor foi obtido considerando-se que de 2 mL de um extrato purificado de couve (20 g), uma alíquota de 0,1 mL provocou a morte de 50 % da população teste. Ainda, três repetições na análise de uma mesma amostra de repolho mostraram para o método de bioensaio um coeficiente de variação de 17 %, indicando boa reprodutibilidade, quando comparado aos de até 20 %, considerados aceitáveis na determinação de contaminantes traço<sup>31</sup>. Esses resultados confirmam a elevada sensibilidade das moscas *D. melanogaster* ao carbofuran e fortalecem a confiabilidade de sua utilização nos bioensaios com a finalidade de quantificar resíduos de inseticidas em produtos agrícolas.

Para detectar a possível presença, no repolho, de substâncias naturais com ação inseticida que poderiam interferir nos resultados do bioensaio<sup>32</sup>, amostras de extratos isentos de agrotóxicos foram avaliados pelo bioensaio. Todas as moscas sobreviveram ao teste, resultado que indica ausência ou a presença em níveis não-letais de substâncias tóxicas para esse inseto.

Com intuito de validar o método biológico, os mesmos extratos utilizados nos bioensaios foram analisados, quanto ao teor de carbofuran, por CLAE. Na Tabela 3, são apresentados os níveis de resíduos do carbofuran determinados no repolho 30 dias após a aplicação do inseticida. Verifica-se que não existe diferença significativa entre os valores obtidos por ambos os métodos (P < 0,01).

Na determinação por CLAE, a faixa de linearidade da curva analítica ( $y = 26148,86x + 1828,12$ , onde y: área do pico em 12,4 min e x: concentração de carbofuran em µg/mL) foi de 1,0 a 10,0 µg/mL, com um coeficiente de correlação linear de 0,999. Os limites de detecção e determinação do método, calculados a partir da curva analítica, foram de 0,03 e 0,1 mg de carbofuran/kg de amostra, respectivamente. Os valores de recuperação do carbofuran nas amostras de repolho fortificadas com teores de inseticida de 0,1 mg/kg e 1,0 mg/kg foram, respectivamente, 100 % e 71 %, valores que se encontram dentro ou próximos da faixa de 80 a 120 % aceita internacionalmente<sup>31</sup>, o que indica que as modificações introduzidas no método de Lawrence & Leduc<sup>25</sup>, não afetaram a sua confiabilidade e aplicabilidade.

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

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

## CONCLUSÕES

Os bioensaios com *Drosophila melanogaster* demonstraram a sua elevada sensibilidade para a detecção de resíduos de carborfuran em repolho, ficando evidente a possibilidade de utilização desses organismos para os bioensaios destinados ao monitoramento de resíduos de carborfuran nesta ou em outras matrizes. Em comparação à CLAE, o método de bioensaio apresenta baixo custo e simplicidade de execução, sem comprometer o padrão de acuidade necessário para o monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. F. Puga, Instituto Biológico de São Paulo, pela doação das cepas de *D. melanogaster*, ao Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada / Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas do ITAL, pela doação do padrão analítico e ao Serviço de Análise e Diagnósticos / Laboratório de Agrotóxicos da CATI, Campinas, SP, pela doação do produto técnico. G. R. de Almeida agradece a CAPES pela bolsa de estudos e ao Instituto Adventista de Ensino - Campus São Paulo, pelo apoio recebido.

## REFERÊNCIAS

1. ILSI BRASIL; *Relação de substâncias para uso fitossanitário e domissanitário: Portarias do Ministério da Saúde*. International Life Sciences Institute do Brasil, São Paulo, 1995; p 716.
2. Kuhr, R. J.; Dorough, H. W.; *Carbamate insecticides: Chemistry, Biochemistry and Toxicology*; CRC Press; Cleveland, Ohio, 1976; p 178.
3. Metcalf, R. L.; Fukuto, T. R.; Collins, C.; Borck K.; El-Aziz, S. A.; Munoz, R.; Cassil, C. C.; *J. Agric. Food Chem.* **1968**, *16*, 300.
4. Talebi, K.; Walker, C. H.; *Pestic. Sci.* **1993**, *39*, 65.
5. Felsot, A.; Maddox, J. V.; Bruce, W.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1981**, *26*, 781.
6. Williams, I. H.; Pepin, H. S.; Brown, M. J.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1976**, *15*, 244.
7. Parkin, T. R.; Shelton, D. R.; *Pestic. Sci.* **1994**, *40*, 163.
8. Felsot, A. S.; *Ann. Rev. Entomol.* **1989**, *34*, 453.
9. Charnay, M. P.; Fournier, J. C.; *Pestic. Sci.* **1994**, *40*, 207.
10. Metcalf, R. L.; Osman, M. F.; Fukuto, T. R.; *J. Econ. Entomol.* **1967**, *60*, 445.
11. Yu, C.; Metcalf, R. L.; Booth, G. M.; *J. Agric. Food Chem.* **1972**, *20*, 923.
12. JMPR – Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues in Food. 1996 Evaluations Part II – Toxicological. World Health Organization; Geneva. 1997; p 23-43.
13. Ahdaya, S.; Guthrie, F. E.; *Toxicol.* **1982**, *22*, 311.
14. Dorough, H. W.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1968**, *16*, 319.
15. Shah, P. V.; Monroe, R. J.; Guthrie, F. E.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1981**, *59*, 414.
16. Almeida, G. R.; Reyes, F. G. R.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **1999**, *58*, 15.
17. Bagdonas, M.; Mello, M. H. S. H.; Ungaro, M. T. S.; Guindani, C. M. A.; Ferreira, M. S.; Gaeta, R.; *Rev. Soc. Brasil. Toxicol.* **1988**, *1*, 3.
18. Puga, F. R.; Rubano, S. In *Métodos prácticos para detección de residuos de plaguicidas*; Almeida, V. F., Ed.; Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, Mexico, 1987; p 37.
19. Zimmering, S.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1975**, *269*, 26.
20. Bartlett, B. R.; *J. Econ. Entomol.* **1951**, *44*, 621.
21. Sun, Y. P.; Pankaskie, J. E.; *J. Econ. Entomol.* **1954**, *47*, 180.
22. Almeida, W. F. *Métodos prácticos para detección de residuos de plaguicidas*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, México: 1987; p 1-54.
23. Joseph Jr, H.; Knobel, M. G.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **1980**, *40*, 43.
24. Laug, E. P.; *Jour. Pharm. Exptl. Terap.* **1946**, *86*, 324.
25. Lawrence, J. F.; Leduc, B.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1978**, *61*, 872.
26. Hoffmann, R.; Análise de probito com determinação da dose letal mediana – Programa probito. *Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)*, USP, Piracicaba, SP, Maio de 1990.
27. Harris, C. R.; *J. Econ. Entomol.* **1971**, *64*, 1044.
28. Guthrie, F. E.; *J. Econ. Entomol.* **1950**, *43*, 559.
29. Harris, C. R.; Kinoshita, G. B.; *J. Econ. Entomol.* **1977**, *70*, 215.
30. Sun, Y. P.; Johnson, E. R. Pankaskie, J. E. Earle, N. W.; Sun, J. T.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1963**, *46*, 530.
31. Horwitz, W.; Kamps, L. R.; Boyer, K. W.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1980**, *63*, 1344.
32. Lichtenstein, E. P.; Morgan, D. G.; Mueller, C. H.; *J. Agric. Food Chem.* **1964**, *12*, 138.