

***Drosophila melanogaster* MEIGEN: 2. SENSIBILIDADE AO PARATION METÍLICO E BIOMONITORAMENTO DE SEUS RESÍDUOS EM COUVE-MANTEIGA**

GARCIA R. DE ALMEIDA *

JORGE V. OLIVEIRA **

FELIX G. R. REYES ***

A sensibilidade das moscas *Drosophila melanogaster* ao Paration metílico e o seu uso no biomonitoramento de resíduos do inseticida em couve foram avaliados. Nas condições do bioensaio, pelo método do filme seco em placa de Petri, o Paration metílico se degrada em função da temperatura e do tempo de exposição. Os bioensaios com *D. melanogaster* indicaram que a toxicidade do Paration metílico aumenta com o aumento da temperatura ($p < 0,05$) e, variaram entre 3,0 a 10,5 µg/g pc para machos e 3,0 a 9,5 µg/g pc para fêmeas. Os resíduos do Paration metílico em couve-manteiga foram determinados pelo método de bioensaio, que apresentou limites de determinação da ordem de 0,1 mg/kg, além de boa reprodutibilidade, com coeficiente de variação inferior a 20%. A validação do bioensaio por cromatografia em fase gasosa corrobora a viabilidade do emprego da *D. melanogaster* no monitoramento de resíduos do Paration metílico em couve.

1 INTRODUÇÃO

O Paration metílico (O,O-dimetil-O-p-nitrofenil-fosforotioato) é um inseticida e acaricida fitossanitário, que se apresenta como cristais brancos na forma pura e como líquido castanho claro, com odor de alho em grau técnico. Em meio aquoso, sua meia vida se reduz de 175 dias

- * Doutor em Ciência de Alimentos da Faculdade Adventista de Biologia, Instituto Adventista de Ensino, São Paulo, SP. (e-mail: garcia@cosmo.com.br).
- ** Mestre em Ciência de Alimentos do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, Laboratório de Análise de Pesticidas do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, SP. (e-mail: jorgevvo@ital.org.br).
- *** Doutor em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, SP. (e-mail: reyesfg@fea.unicamp.br).

para 11 horas pela elevação da temperatura de 20 °C para 70 °C. É pouco solúvel em meio aquoso (55 mg/L a 20 °C), em éter de petróleo e óleos minerais e facilmente solúvel na maioria dos solventes orgânicos (1, 2, 3).

A taxa da degradação do Paration metílico depende da temperatura, da natureza do solo e do pH do meio (4, 5, 6). Nos vegetais e no solo degrada-se em *p*-nitrofenol, amino-Paration metílico e 4-nitrofenol (7, 8, 9, 10), por fotólise forma o O₃S-trimetil fosforiato e trimetil fosfato (11) e, por biotransformação em camundongos, origina os ácidos fosfórico, metil e dimetil fosfórico, desmetil fosfato e desmetil fosforiato (12).

Efeitos fitotóxicos têm sido reportados para o Paration metílico, como redução do tamanho e da densidade da cabeça de alface (9, 13), interferência nos processos de fotossíntese no trigo, que resulta em redução do comprimento da raiz e do gomo da cana da planta, bem como da quantidade de clorofila e de carotenóides (14). Dependendo do número de aplicações afeta a fotossíntese, o crescimento e a frutificação do algodoeiro (15).

O Paration metílico apresenta ampla ação inseticida e acaricida, sendo a pulverização foliar o método recomendado para sua aplicação em frutas e hortaliças (16). No Brasil, a tolerância do Paration metílico em bulbos, cereais, frutos, leguminosas, hortaliças folhosas e não folhosas e na batata é de 0,5 ppm (17). Todavia, a presença dos seus resíduos tem sido reportada em culturas para as quais seu uso não é permitido, como na mandiocinha (18) e na cenoura (19, 20), o que justifica o desenvolvimento de metodologia simples para monitoramento dos resíduos deste inseticida em vegetais comestíveis.

Bioensaios com a mosca *D. melanogaster* têm sido usados por pesquisadores como indicadores de resíduos de agrotóxicos em alimentos (21, 22) e da presença, no ambiente, de substâncias químicas com potencial mutagênico (23). Cabe destacar que as drosófilas, além da sua sensibilidade para detectar pequenas quantidades de substâncias de natureza tóxica, são insetos de fácil manipulação, criação e manutenção nas condições de laboratório, facilitando a realização de bioensaios (24, 25).

Com o propósito de detectar resíduos de inseticidas em quantidades que possam apresentar perigo à saúde humana torna-se necessário pesquisar e avaliar métodos alternativos de triagem que sejam satisfatórios, práticos e que reduzam significativamente os custos para o controle de qualidade de produtos alimentícios, especialmente os hortifrutigranjeiros, quanto à presença de agrotóxicos em geral e de inseticidas em particular (26).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a sensibilidade das moscas *D. melanogaster* ao Paration metílico e a viabilidade de sua utilização no biomonitoramento dos resíduos deste inseticida em hortifrutigranjeiros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 APARELHOS

- Cromatógrafo a gás Varian, modelo 3700, equipado com detector TSD, pérola 6,4 e coluna 10% SE-30 em Chromosorb 100 - 120 mesh.
- Evaporador rotativo a vácuo Tecnal, modelo 120.
- Homogeneizador de tecidos Tecnal, modelo 102.
- Pulverizador costal Jato (20 L), provido com bico tipo jato cônico para aplicação em alto volume.

2.2 SOLVENTES E REAGENTES

Foram utilizados solventes e reagentes de grau para resíduos (Merck), sendo o sulfato de sódio anidro aquecido a 400 °C, durante 8 h.

Como padrão analítico foi utilizado Paration metílico, com grau de pureza de 95,86%, o qual foi cedido pelo Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada/Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) e, para os experimentos, o produto comercial Folido® CE.

2.3 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 (27), com modificações sugeridas por ALMEIDA & REYES (28). 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 este que foi repetido a cada 48 h, para obtenção de novos lotes de moscas.

2.4 BIOENSAIO

Para o bioensaio utilizou-se o método do filme seco (29) em placa de Petri (50 x 20 mm). O filme foi preparado transferindo-se 0,1 mL de

solução inseticida para cada placa, conforme procedimento descrito por ALMEIDA & REYES (28).

Para avaliação da concentração letal mediana (CL_{50}) foi utilizada a formulação Folidol® CE, sendo que as concentrações do princípio ativo, Paration metílico, nas soluções utilizadas variaram entre 0,4 a 3,0 µg/mL para as temperaturas 20; 25 e 30; e 35 °C. Aliquotas de 0,1 mL destas soluções foram pipetadas e transferidas para as placas de Petri.

2.5 ESTABILIDADE DO PARATION METÍLICO NO BIOENSAIO

A estabilidade do Paration metílico foi avaliada, nas condições do bioensaio, aplicando-se na placa de Petri 0,1 mL de solução inseticida de concentração 1 µg/mL, de acordo com procedimento descrito por ALMEIDA & REYES (28). O Paration metílico residual foi determinado por cromatografia em fase gasosa nas seguintes condições de trabalho: temperatura da coluna 200 °C; do injetor 220 °C e do detector 290 °C; fluxo de ar 120 mL/min; hidrogênio 5 mL/min e nitrogênio 40 mL/min.

2.6 ENSAIO DE CAMPO

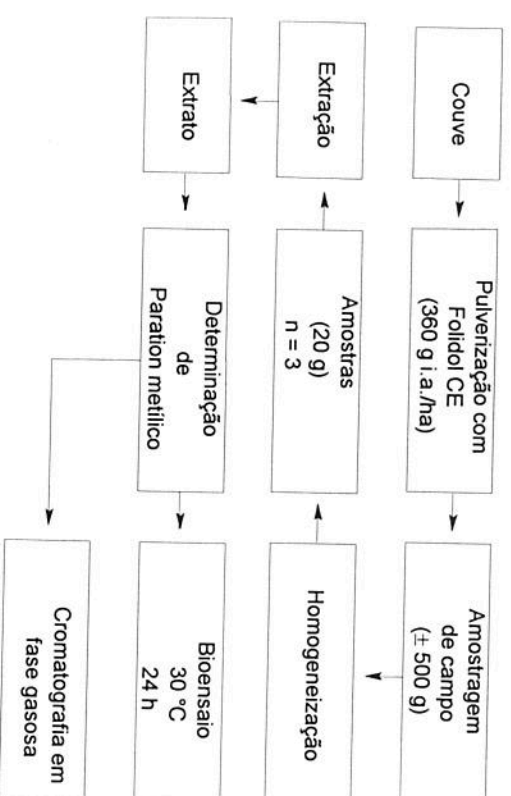
Couve-manteiga (*Brassica oleracea*, var. *acephala*) foi cultivada, segundo as boas práticas agrícolas, no campo experimental do Instituto Adventista São Paulo, em Hortolândia, São Paulo. As mudas foram plantadas em outubro, com espaçamento de 1,0 x 0,5 m, em área de aproximadamente 100 m² e pulverizadas com Folidol® CE após 60 dias do plantio. O produto diluído em água (1:1000) foi aplicado, com pulverizador costal, na dosagem de 360 g do ingrediente ativo por hectare de área cultivada, sendo colhidas amostras testemunhas da mesma plantação, antes da aplicação do inseticida.

Amostras de couve foram analisadas após 0, 3 e 7 dias da pulverização. A amostragem foi aleatória, colhendo-se uma folha de cada planta selecionada, em diferentes pontos da área cultivada, no período entre 9 h e 10 h (sempre depois da perda da unidade superficial das folhas). As amostras foram transportadas para o laboratório, imediatamente após a colheita e estocadas a -18 °C.

2.7 VALIDAÇÃO DO BIOENSAIO

Para validação do método de bioensaio, extratos de amostras de couve pulverizada com Folidol®, CE foram também analisados por cromatografia em fase gasosa conforme fluxograma apresentado na Figura 1.

FIGURA 1 - ESQUEMA DE PULVERIZAÇÃO, EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS RESÍDUOS DO PARATION METÍLICO APLICADO EM COUVE



Na quantificação por cromatografia em fase gasosa os resíduos de Paration metílico foram determinados conforme metodologia proposta por LUKE *et al.* (30), com as seguintes modificações. Transferiu-se de uma amostra de couve homogeneizada, 20 g para erlenmeyer (250 mL). Após a adição de 100 mL de acetona, a amostra foi triturada em homogeneizador de tecido e filtrada à vácuo em funil de Büchner, com papel de filtro Whatman n°1. Transferiu-se o filtrado para funil de separação (500 mL), acrescentaram-se 150 mL de água e 100 mL de n-hexano, agitando-se o funil vigorosamente por 2 min. Após separação das fases, a fase aquosa foi transferida para outro funil de separação (250 mL), ao qual foi adicionado 100 mL de n-hexano. Após agitação por 2 min, juntou-se a fase orgânica separada à primeira extração. A fase orgânica, filtrada em Na_2SO_4 anidro, foi colocada em balão de fundo redondo (500 mL), concentrada em evaporador rotatório, em temperatura de 40 °C até volume em torno de 1 mL e transferida com 10 mL de acetona para tubo concentrador graduado. O extrato foi seco com nitrogênio, o tubo lavado com acetona, seco novamente com nitrogênio e o resíduo ressuspendido a 10 mL de acetona e injetado no cromatógrafo a gás, nas condições de trabalho anteriormente estabelecidas.

Para avaliação da metodologia quanto à recuperação e sensibilidade, amostras de couve (20 g), livre de inseticidas, foram adicionadas de 2 mL de solução padrão do inseticida nas concentrações de 1,02 e 10,2 µg/mL, caracterizando fortificações de 0,102 e 1,02 mg/kg de amostra, respectivamente. A faixa de linearidade (curva padrão) de resposta do detector do cromatógrafo foi determinada com diluições de 0,102 e 1,02 µg/mL. De cada uma destas soluções foram injetados, no cromatógrafo, 4 µL.

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

2.8 CÁLCULO DA CL₅₀

No cálculo da CL₅₀ levou-se em consideração as moscas mortas e as moribundas, observadas no momento da contagem (24). Os cálculos dos valores de CL₅₀ foram efetuados por análise de probito (31).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

3 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 (32).

Os valores de CL₅₀ para as moscas *D. melanogaster*, machos e fêmeas, em função da variação da temperatura, são apresentados na Tabela 1. Os dados mostraram que a sensibilidade das drosófilas machos e fêmeas ao inseticida foi semelhante para a mesma temperatura. Verificou-se, ainda, para as drosófilas de ambos os sexos, que a toxicidade aguda do Paration metílico a 35 °C foi, aproximadamente, três vezes maior que a 20 °C. Tal fato pode ter ocorrido pela absorção mais rápida do inseticida com o aumento da temperatura. Este comportamento assemelha-se ao relatado por outros pesquisadores, utilizando diferentes inseticidas e sistemas biológicos (32, 33, 34). Além disso, esta diferença

na resposta foi sugerida como dispositivo para aumentar a sensibilidade do bioensaio (35).

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO LETAL MEDIANA (CL₅₀) DO PARATION METÍLICO (FOLIDOL® CE) PARA *D. melanogaster*, EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

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

^(a) s = estimativa do desvio padrão absoluto e pc = peso corporal.

^(b) Comparação entre médias. As letras "A e B" indicam comparação de médias entre machos e fêmeas na mesma temperatura e as letras "a, b, c, d" indicam comparação de médias entre temperaturas para o mesmo sexo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (P < 0,05).

O estudo da degradação do Paration metílico, em função do tempo de exposição e da variação da temperatura, foi conduzido para avaliar a quantidade de inseticida que estaria disponível nas placas, durante a realização do bioensaio (29). Os valores da percentagem residual de Paration metílico, remanescente nas placa de Petri, após 6, 12 e 24 h nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C, são apresentados na Figura 2. Verificou-se que a degradação de Paration metílico é proporcional tanto ao tempo de exposição como a variação da temperatura.

Os bioensaios com *D. melanogaster* para determinação dos resíduos de Paration metílico em couve foram conduzidos em temperatura de 30 °C, durante 24 h de exposição. Para tanto, diferentes volumes do extrato, obtido conforme descrito no item de validação do bioensaio (item 2.7), foram usados para determinar o volume necessário para provocar a morte de 50% da população teste (VL₅₀). Este volume, quando relacionado com a massa de Paration metílico que provoca 50% de mortalidade na Placa Petri (ML₅₀) (Tabela 2), permite estabelecer a seguinte relação: ML₅₀ (µg)/VL₅₀ (mL), a partir da qual é possível calcular o nível de resíduo de Paration metílico na couve (Figura 3).

A sensibilidade dos métodos químicos de análise de resíduos, assim como os valores do limite máximo de resíduo (LMR) estabelecidos pela legislação de agrotóxicos, exigem que os organismos usados nos bioensaios sejam suficientemente sensíveis para detectar níveis residuais menores do que 1,0 mg/kg (21, 22).

FIGURA 2 - PERCENTAGEM RESIDUAL, EM PLACAS DE PETRI, DO PARATION METÍLICO, EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, PARA 1 µg DO INSETICIDA APLICADO NAS PLACAS

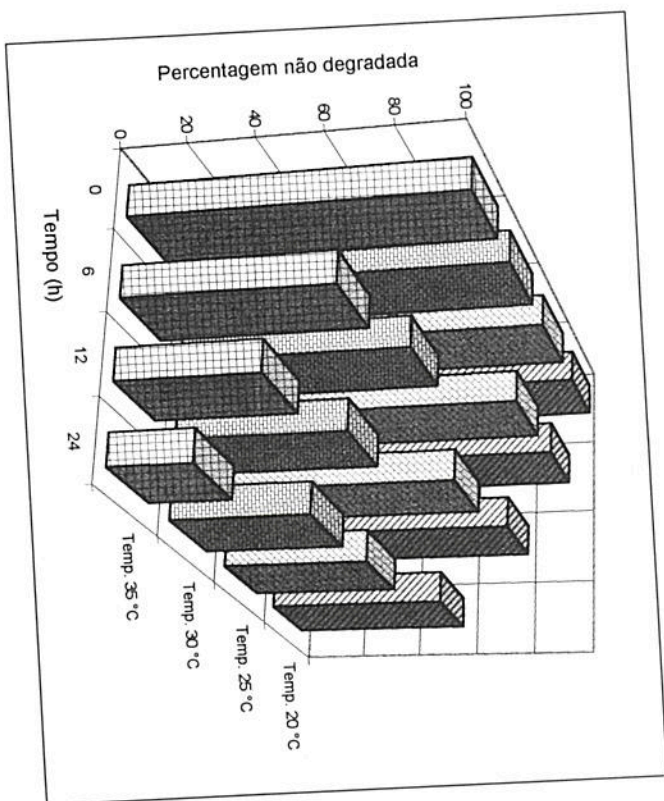
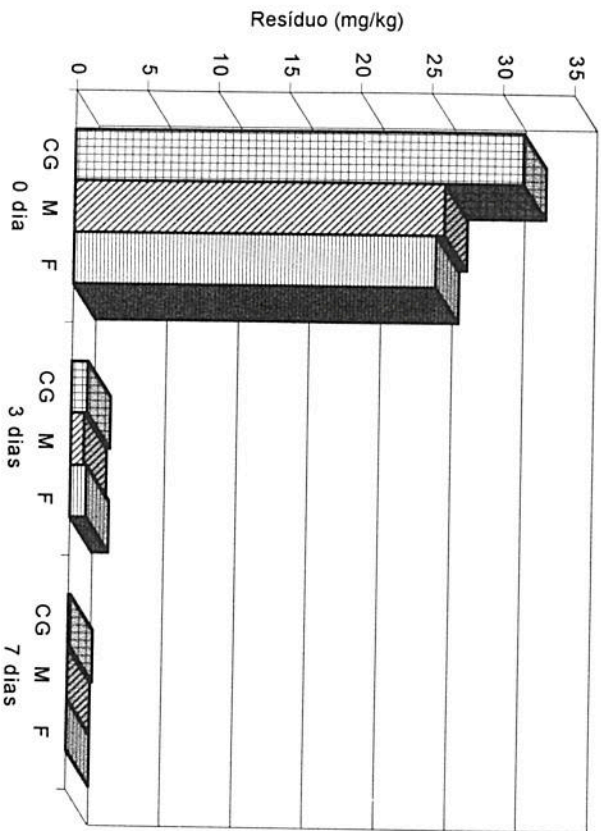


TABELA 2 - MASSA DO PARATION METÍLICO APLICADO NAS PLACAS DE PETRI QUE CORRESPONDEM AOS VALORES DE CL₅₀ DAS MOSCAS *D. melanogaster*, MACHOS E FÊMEAS, EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

Temperatura (°C)	Machos (µg/placa)	Fêmeas (µg/placa)
20	0,15	0,20
25	0,09	0,14
30	0,08	0,11
35	0,04	0,06

FIGURA 3 - RESÍDUOS DE PARATION METÍLICO APLICADO EM COUVE E DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (CG) E POR BIOENSAIO COM *D. melanogaster* MACHO (M) E FÊMEA (F), APÓS DIVERSOS DIAS DA APLICAÇÃO DO INSETICIDA



O limite de determinação encontrado, para o método do bioensaio, foi da ordem de 0,1 mg de Paration metílico/kg de amostra para as drosófilas machos e fêmeas. Este valor foi obtido considerando-se que de 2 mL do extrato purificado de couve (20 g), uma alíquota de 0,1 mL provocou a morte de 50% da população teste. Três repetições na análise da mesma amostra de couve mostraram para o método de bioensaio, coeficiente de variação menor que 20%, indicando boa reprodutibilidade (36). Estes resultados confirmam a elevada sensibilidade das moscas *D. melanogaster* ao Paration metílico 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, na couve, de substâncias naturais com ação inseticida que poderiam interferir nos resultados do bioensaio (37), amostras de extratos isentos de agrotóxicos foram avaliadas pelo bioensaio. Todas as moscas sobreviveram ao teste, resultado que indica

ausência ou a presença em níveis não-letais de substâncias tóxicas para o inseto teste.

Com intuito de validar o método biológico, os mesmos extratos utilizados nos bioensaios foram analisados, quanto ao teor de Paration metílico, por cromatografia em fase gasosa. Na Figura 3 são apresentados os níveis de resíduos de Paration metílico determinados na couve, após períodos de 0, 3 e 7 dias de aplicação do inseticida. Verificou-se que não existe diferença significativa entre os métodos, no nível de confiança de 0,05.

Na determinação por cromatografia em fase gasosa, os valores de recuperação de Paration metílico nas amostras de couve fortificadas com teores de inseticida de 0,102 mg/kg e 1,02 mg/kg foram, respectivamente, 70% e 84%. Tais valores encontram-se muito próximos, ou dentro da faixa, de 80 a 120%, aceita internacionalmente, o que indica que as modificações introduzidas no método de LUKE et al. (30) não afetaram a sua confiabilidade e aplicabilidade.

Embora os métodos cromatográficos sejam de grande sensibilidade, sua utilização, sob o 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. Nestes países, inseticidas e outros praguicidas frequentemente são usados em culturas para as quais não são autorizados e/ou de modo excessivo e indiscriminado, o que pode resultar em resíduos acima dos níveis permitidos em alimentos.

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

4 CONCLUSÃO

As moscas *Drosophila melanogaster* apresentaram elevada sensibilidade ao Paration metílico e para detecção de resíduos deste inseticida em couve, o que indica a viabilidade da utilização do método do filme seco para o monitoramento de resíduos do Paration metílico nesta hortaliça.

Abstract

The sensibility of the flies *Drosophila melanogaster* to Methyl Parathion and its use in the biological monitoring of residues of the insecticide in kale were appraised. Under the conditions of the bioassay, by the dry film method in the Petri dish, Methyl Parathion degrades depending on temperature and on the time of exposure. The bioassays with *D.*

melanogaster showed that the toxicity of the insecticide increases ($p < 0.05$) according to the increase of temperature and, they varied among 3,0 to 10,5 µg/g pc for males and 3,0 to 9,5 µg/g pc for females. The residues of Methyl Parathion in kale were determined by bioassays, that presented limit of determination of the order of 0,1 mg/kg, besides good reproducibility, with coefficient of inferior variation at 20%. The validation of the bioassay by gas chromatography confirms the viability of the utilization of *D. melanogaster* in the monitoring of residues of Methyl Parathion in kale.

REFERÊNCIAS

- 1 FEST, C.; SCHMIDT, K. J. **The chemistry of organophosphorus pesticides: reactivity, synthesis, mode of action, toxicology.** Berlin: Springer-Verlag, 1973. 339 p.
- 2 WHO. Methyl Parathion. **Environmental Health Criteria 145.** Geneva: World Health Organization, 1993. 225 p.
- 3 MELNIKOV, N. N. **Chemistry of pesticides.** Transl. Ruth L. Busbey. New York: Springer Verlag, 1971. 480 p.
- 4 SHARMILA, M.; RAMANAND, K.; SETHUNATHAN, N. Hydrolysis of methyl parathion in a flooded soil. **B. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 43, n. 1, p. 45 - 51, 1989a.
- 5 SHARMILA, M.; RAMANAND, K.; SETHUNATHAN, N. Effect of yeast extract on the degradation of organophosphorus insecticides by soil enrichment and bacterial cultures. **Canadian J. Microbiol.**, v. 35, n. 12, p. 1105-1110, 1989b.
- 6 JAGLAN, P. S.; GUNTHER, F. A. Comparison of hydrolysis rates of methyl parathion and methyl paraoxon by gas liquid chromatography and spectrometry. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 8, n. 8, p. 483-485, 1970.
- 7 ADHYA, T. K.; SUDHAKAR-BARIK; SETHUNATHAN, N. Stability of commercial formulation of fenitrothion, methyl parathion, and parathion in anaerobic soils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 29, n. 1, p. 90-93, 1981a.
- 8 ADHYA, T. K.; SUDHAKAR-BARIK; SETHUNATHAN, N. Hydrolysis of selected organophosphorus insecticides by two bacteria isolated from flooded soil. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 50, n. 1, p. 167-172, 1981b.
- 9 YOUNGMAN, R. R. et al. Degradation of methyl parathion to p -nitrophenol on cotton and lettuce leaves and its effects on plant growth. **J. Econ. Entomol.**, v. 82, n. 5, p. 1317-1322, 1989.

- 10 OU, L. T.; SHARMA, A. Degradation of methyl parathion by a mixed bacterial culture and a *Bacillus* sp. isolated from different soils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 37, n. 6, p. 1514 - 1518, 1989.
- 11 CHUKWUDEBE, A.; MARCH, R. B.; OTHMAN, M.; FUKUTO, T. R. Formation of trialkyl phosphorothioate esters from organophosphorus insecticides after exposure to either ultraviolet light or sunlight. **J. Agric. Food Chem.**, v. 37, n. 2, p. 539-545, 1989.
- 12 HOLLINGWORTH, R. M.; METCALF, R. L.; FUKUTO, T. R. The selectivity of sumithion compared with methyl parathion: Metabolism in the white mouse. **J. Agric. Food Chem.**, v. 15, n. 2, p. 242 - 249, 1967.
- 13 JOHNSON, M. W.; WELTTER, S. C.; TOSCANO, N. C.; IWATA, Y.; TING, I. P. Lettuce yield reductions correlated with methyl parathion use. **J. Econ. Entomol.**, v. 76, n. 6, p. 1390 - 1394, 1983.
- 14 MOORTHY, P.; GOPINANDHAN, T. N.; SANTHANAM, R.; BALAKUMAR, T.; ANBUDURAI, P. R. Phytotoxicity of methyl parathion with special reference to photosynthesis in wheat seedlings. **B. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 48, n. 1, p. 138-143, 1992.
- 15 YOUNGMAN, R. R.; LEIGH, T. F.; KERBY, T. A.; TOSCANO, N. C.; JACKSON, C. E. Pesticides and cotton: effect on photosynthesis growth, and fruiting. **J. Econ. Entomol.**, v. 83, n. 4, p. 1549-1557, 1990.
- 16 BAYER. **Catálogo de defensivos agrícolas Bayer.** São Paulo: Gifto, 1989. 112 p.
- 17 ILSI Brasil. **Relação de substâncias para uso fitossanitário e domissanitário:** Portarias do Ministério da Saúde. São Paulo, 1995. 716 p.
- 18 SOARES, I. A. A.; GOULART, M. C. B.; QUEIROZ, R. L.; MELLO, S. M. M.; AZEVEDO, S. F.; ÁVILA, J. T. Levantamento de resíduos de inseticidas organoclorados e de Malation e Paration em frutas e hortaliças na CEASAMG - 1983-1986. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS, 11., São Paulo, jun. 1987. **Relatório...** São Paulo: Inst. Adolfo Lutz, 1987. p. 75-84.
- 19 UNGARO, M. T. S.; GUINDANI, C. M. A.; FERREIRA, M. S.; BAGDONAS, M. Resíduos de inseticidas clorados e fosforados em frutas e hortaliças (III). **Biológico**, São Paulo, v. 53, n. 7/12, p. 51-56, 1987.
- 20 BARRETO, H. H. C.; INOMATA, O. N. K.; LEMES, V. R. R.; KUSSUMI, T. A.; SCORSAFAVA, M. A.; ROCHA, S. O. Monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos comercializados no Estado de São Paulo em 1994. **Pesticidas R. Téc. Cient.**, v. 6, p. 1-12, 1996.
- 21 PUGA, F. R.; RUBANO, S. Determinação de resíduos de inseticidas através de bioensaio com *Drosophila melanogaster*. In: ALMEIDA, V. F. (ed.). **Métodos práticos para detecção de resíduos de plaguicidas.** México: Centro Panamericano de Ecologia Humana y Salud, OPS/OMS, 1987. p. 37-43.
- 22 BAGDONAS, M.; MELLO, M. H. S. H.; UNGARO, M. T. S.; GUINDANI, C. M. A.; FERREIRA, M. S.; GAETA, R. Ensaio biológicos como testes preliminares na detecção de resíduos de inseticidas em frutas e hortaliças. **R. Soc. Bras. Toxicol.**, v. 1, n. 1, p. 3-5, 1988.
- 23 ZIMMERLING, S. Utility of *Drosophila* for detection of potential environmental chemical mutagens. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 269, p. 26-33, 1975.
- 24 BARTLETT, B. R. A new method for rearing *Drosophila* and a technique for testing insecticides with this insect. **J. Econ. Entomol.**, v. 44, n. 4, p. 621, 1951.
- 25 SUN, Y. P.; PANKASKIE, J. E. *Drosophila*, a sensitive insect, for the microbiassay of insecticide residues. **J. Econ. Entomol.**, v. 47, n. 1, p. 180 - 181, 1954.
- 26 ALMEIDA, W. F. **Métodos práticos para detecção de resíduos de plaguicidas.** México: Centro Panamericano de Ecologia Humana y Salud, OPS/OMS, 1987. 54 p.
- 27 JOSEPH Jr., H.; KNOBEL, M. G. Estudo preliminar da sensibilidade de moscas *Drosophila melanogaster* a diversos pesticidas organoclorados. **R. Inst. Adolfo Lutz**, v. 40, n. 1, p. 43-47, 1980.
- 28 ALMEIDA, G. R.; REYES, F. G. R. *Drosophila melanogaster* MEIGEN: 1. Sensibilidade ao endossulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. **R. Inst. Adolfo Lutz**, v. 58, n. 2, p. 15-24, 1999.
- 29 LAUG, E. P. A biological assay method for determining 2,2 bis (p-chlorophenyl)-1,1,1, trichloroethane (DDT). **J. Pharm. Exptl. Therap.**, v. 86, p. 324 - 31, 1946.

- 30 LUKE, M. A.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 58, n. 5, p. 1020-1026, 1975.
- 31 HOFFMANN, R. **Análise de proibito com determinação da dose letal mediana:** programa proibito. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), USP, maio de 1990.
- 32 HARRIS, C. R. Influence of temperature on the biological activity of insecticides in soil. *J. Econ. Entomol.*, v. 64, p. 1044-1049, 1971.
- 33 HARRIS, C. R.; KINOSHITA, G. B. Influence of posttreatment temperature on the toxicity of pyrethroid insecticides. *J. Econ. Entomol.*, v. 70, n. 2, p. 215-218, 1977.
- 34 GUTHRIE, F. E. Effect of temperature on the toxicity of certain organic insecticides. *J. Econ. Entomol.*, v. 43, n. 4, p. 559-560, 1950.
- 35 SUN, Y. P.; JOHNSON, E. R.; PANKASKIE, J. E.; EARLE, N. W.; SUN, J. T. Factors affecting residues-film bioassay of insecticide residues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 46, n. 3, p. 530-542, 1963.
- 36 HORWITZ, W.; KAMPS, L. R.; BOYER, K. W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 63, p. 1344-1354, 1980.
- 37 LICHTENSTEIN, E. P.; MORGAN, D. G.; MUELLER, C. H. Naturally occurring insecticides in cruciferous crops. *J. Agric. Food Chem.*, v. 12, n. 2, p. 138-161, 1964.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. F. Puga, Instituto Biológico de São Paulo, pela doação das cepas de *D. melanogaster* 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, Campinas São Paulo, pelo apoio recebido.