

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE INSETICIDAS, EM FUNÇÃO DO PH, UTILIZANDO *DROSOPHILA MELANOGASTER* E TESTE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

R. Hirata, B. Skortzaru*, E.S. Narciso

Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental, Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

Na maior parte das formulações de inseticidas como os organofosforados diazinon e triclorfon, e o carbamato carbofuran usa-se a água como veículo. A estabilidade química desses três agrotóxicos foi avaliada em função do pH de suas soluções aquosas, utilizando-se bioensaio com *Drosophila melanogaster* e o teste de inibição da acetilcolinesterase. Foi avaliada a degradação dos inseticidas em solução de pH 6,0; 7,8 e 10,5, mantidas à temperatura de 25,0° C. A porcentagem de mortalidade das drosófilas expostas aos inseticidas mostrou que as transformações estruturais das moléculas inseticidas foram mais acentuadas para o pH 10,5 e menos para o 6,0. Os dados da inibição da acetilcolinesterase, em diferentes intervalos de tempo, mostraram que enquanto o carbofuran foi o responsável direto pela variação dos níveis da inibição enzimática, para o triclorfon ela foi devida ao seu metabólito mais tóxico diclorvos; nenhuma informação sobre modificações estruturais no diazinon pode ser obtida por este parâmetro de toxicidade. Os resultados levam a conclusão de que é importante conhecer o comportamento dos agrotóxicos em função do pH de suas soluções ou suspensões aquosas, a fim de reduzir a perda da atividade inseticida e, ainda, controlar eventuais problemas de intoxicações pelo aumento da toxicidade.

PALAVRAS-CHAVE: Diazinon, triclorfon, carbofuran, acetilcolinesterase, concentração letal mediana, relação estrutura-atividade.

ABSTRACT

EVALUATION OF INSECTICIDES DEGRADATION, AS A FUNCTION OF PH, UTILIZING *DROSOPHILA MELANOGASTER* AND ENZYMATIC INHIBITION TEST. In the majority of insecticide formulations, such as organophosphorus diazinon and trichlorfon and carbamate carbofuran, water is used as a vehicle. Chemical stability of these pesticides has been evaluated as a function of their aqueous solution pH, using *Drosophila melanogaster* bioassay and acetylcholinesterase inhibition test. Degradation of the insecticides has been evaluated in solutions at pH 6.0; 7.8 and 10.5, maintained at 25.0° C. The percent mortality of drosophilas exposed to insecticides demonstrated that structural transformations of insecticide molecules were higher at pH 10.5 and lower at 6.0. Data on acetylcholinesterase inhibition, in different time intervals, indicate that whereas carbofuran is the direct agent responsible for the variation of the enzymatic inhibition levels, in the case of trichlorfon it is due to its more toxic metabolite dichlorvos; no information on structural modifications in diazinon was attained through this toxicity parameter. Observed results lead to conclude that the knowledge about the pesticides behavior as a function of pH of their aqueous solutions or suspensions is important for reducing insecticide activity loss and also for controlling eventual intoxication problems due to toxicity enhancement.

KEY WORDS: Diazinon, trichlorfon, carbofuran, acetylcholinesterase, median lethal concentration, structure-activity relationships.

INTRODUÇÃO

Inseticidas das classes dos organofosforados e carbamatos são amplamente utilizados na agropecuária e, também, muito estudados devido

a problemas ambientais (McLEAY & HALL, 1999; WERNER *et al.*, 2000) e intoxicações, tanto para o homem (ZWIENER & GINSBURG, 1988; FERRER & CABRAL, 1991; GOELLNER, 1993) como para os animais (HAYES, 1975-a).

*Bolsista PIBIC/CNPq/IB

Muitas das formulações para aplicação de agrotóxicos, como concentrado emulsionável e pó molhável, envolvem a água como veículo. Pelo fato da grande maioria dos inseticidas organofosforados e carbamatos apresentarem na estrutura a função éster, o seu comportamento em água é importante sob dois aspectos: eles estão sujeitos à reação de hidrólise que pode diminuir a ação inseticida como, também, aumentar a toxicidade pela formação de subprodutos mais tóxicos (VASQUES *et al.*, 1987; HIRATA *et al.*, 1999).

O bioensaio com moscas *Drosophila melanogaster* é utilizado como método de triagem para detectar a presença de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos e dos componentes abióticos (JOSEPH JR. & KNOBEL, 1980; BAGDONAS *et al.*, 1988; PAULINO *et al.*, 1992; ALMEIDA & REYES, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2001), e o teste de inibição da enzima acetilcolinesterase, por inseticidas organofosforados e carbamatos, uma técnica para avaliar clinicamente a extensão de uma intoxicação por essas duas classes de agrotóxicos (PEREZ *et al.*, 1987; ESPIGARES *et al.*, 1998).

Foi objetivo do presente trabalho, determinar a extensão da degradação de três inseticidas em função do pH utilizando essas duas técnicas e correlacionar os resultados obtidos com a estrutura química das moléculas inseticida.

MATERIAL E MÉTODOS

Inseticidas

Nos experimentos foram utilizados os organofosforados diazinon-60% (Novartis) e triclofon-96% (Bayer), e o carbamato carbofuran-85% (FMC).

Manutenção das moscas

Para o fim proposto, em estufa a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $90 \pm 3\%$ de umidade, cerca de 300 moscas *Drosophila melanogaster* foram mantidas em frascos de vidro (250 mL) contendo meio nutritivo preparado com 1.000 mL de água desionizada, 30 g de ágar (Difco), 100 g de levedura em pó, 60 g de açúcar e 15 mL de solução fungicida (40 mL de ácido ortofosfórico, 400 mL de ácido propiônico e 560 mL de água desionizada). Os repiques foram realizados a cada 5 dias, transferindo-se as moscas para outros frascos contendo meio nutritivo e retirando-as destes após 2 dias, restando apenas os ovos depositados. As moscas foram utilizadas 3 dias após a transformação das pupas em adultos.

Determinação da concentração letal mediana dos inseticidas (CL_{50})*, por bioensaio com *Drosophila melanogaster*

Nas determinações da CL_{50} foram preparadas soluções acetônicas de cada inseticida em várias concentrações. Para cada concentração, alíquotas de 1 mL destas soluções foram distribuídas em papel-filtro Whatman nº 1, com área aproximada de 25 cm², colocado sobre a superfície interna de frascos de vidro de 1 cm de altura por 1,6 cm de diâmetro interno. A cada teste realizado, foi preparado um frasco controle contendo 1 mL do solvente acetona. Os conteúdos dos frascos foram evaporados até a secura, acrescentando-se, a seguir, a cada um deles 0,1 g de meio nutritivo.

As moscas, anestesiadas com éter etílico, foram distribuídas nos frascos em número de 50 (sexo 1:1) e, em seguida mantidos em estufa a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $90 \pm 3\%$ de umidade. As percentagens de mortalidade foram determinadas após 24 horas de exposição e, para se estabelecer os valores da CL_{50} a partir dos dados de mortalidade, utilizou-se o método dos probitos como descrito por BROWN (1980) e, CASSARETH & DOULL (1991). Para cada inseticida, foram realizados testes preliminares a fim de se conhecer a concentração que causava uma mortalidade de drosófilas próxima a 50%. Em seguida, foram conduzidos ensaios, com cinco repetições, para concentrações inseticida acima e abaixo do valor da CL_{50} provisória, inclusive, para se calcular o valor final desse parâmetro de toxicidade.

Avaliação da degradação dos inseticidas, dissolvidos em água, por bioensaio com *Drosophila melanogaster*

A degradação dos inseticidas diazinon, triclofon e carbofuran, dissolvidos em água, utilizando *D. melanogaster*, foi avaliada em soluções tampão de pH 6,0 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{NaOH}$); 7,8 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{NaOH}$) e 10,5 ($\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{HCl}$), preparadas segundo ASSUMPÇÃO & MORITA (1968). Em diferentes intervalos de tempo, uma mistura de 1 mL de solução inseticida e 2 mL de acetona foi evaporada até a secura em frascos de vidro contendo papel-filtro, seguindo-se, depois, o mesmo procedimento utilizado na determinação da CL_{50} , como descrito na etapa anterior. A extensão da degradação dos inseticidas, relacionada com a mortalidade das drosófilas, foi comparada, em seguida, com os valores de suas CL_{50} .

*Concentração letal mediana é uma estimativa estatística da concentração de um agente tóxico no meio ambiente, necessária para causar a morte de 50% dos animais em experimentação, sob certo tempo de exposição e condições específicas (HAYES, 1975-b).

Avaliação do nível de degradação dos inseticidas, dissolvidos em água, por inibição da enzima acetilcolinesterase

Como fonte da enzima acetilcolinesterase, foi utilizado o plasma sangüíneo de ratos albinos da linhagem Wistar. O sangue foi coletado por punção cardíaca com seringa heparinizada com 100 UI.mL⁻¹ e seca a 37° C. Em seguida, o plasma foi separado por centrifugação a 2000 rpm por 20 minutos (MELLO & PUGA, 1980). A atividade da acetilcolinesterase do plasma, em presença da solução inseticida, foi imediatamente determinada pelo método espectrofotométrico de Elman (1961) modificado por Wilhelm (1968), utilizando um espectrofotômetro Varian UV/vis. Esta operação foi repetida para diferentes intervalos de tempo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação do método do probito para os dados da Tabela 1 forneceu o valor 4,49µg.mL⁻¹ para a concentração letal mediana (CL₅₀) do carbofuran, para a *Drosophila melanogaster* (Fig. 1). O mesmo procedimento de cálculo, para os inseticidas diazinon e triclorfon, resultou nos valores da Tabela 2, que mostram que o diazinon foi o inseticida mais tóxico e o triclorfon, o menos tóxico para as

drosófilas, e o carbofuran, um carbamato, o de toxicidade intermediária. Uma diferença marcante entre este carbamato e os dois organofosforados em estudo é que estes últimos sofrem, inicialmente, uma transformação estrutural para exercer uma ação tóxica. Assim, o diazoxon (SHISHIDO *et al.* 1972) e o diclorvos (ARTHUR & CASIDA, 1957) são os dois metabólitos tóxicos do diazinon e do triclorfon, respectivamente, e que causam a morte das drosófilas nos experimentos. (BARTHEL *et al.* 1955) detectaram a presença de diclorvos, como impureza, no triclorfon e demonstraram sua origem por um rearranjo molecular com liberação de HCl, como mostra a Figura 2 (A).

A desidrocloração do triclorfon foi, também, estudada por METCALF *et al.* (1959) que mostraram ser ela despresível a pH 5,4, atingindo, porém, a taxa de 60% após 2 horas a pH 8,0. Os resultados deste trabalho são condizentes com esses dados, pois, a toxicidade para as drosófilas e o potencial anticolinesterásico aumentaram acentuadamente quando se passou do pH 6,0 para 10,5, como se constata pelas Tabelas 3 e 4.

O mecanismo da transformação do triclorfon em diclorvos ou DDVP, como mostra a Figura 2 (B), foi sugerido primeiramente por KHARASCH & BENGELSDORF (1955). Foi postulado, por METCALF *et al.*, (1959) e MIYAMOTO (1959), que a inibição da enzima acetilcolinesterase por triclorfon, tanto *in vitro* como *in vivo*, é devida ao DDVP formado a partir de suas moléculas.

Tabela 1 - Mortalidade de *Drosophila melanogaster* expostas ao inseticida carbofuran.

Concentração (µg.mL ⁻¹)	Mortalidade (%)*	Desvio padrão
2,50	04	1,7
3,75	39	2,3
5,00	57	1,8
6,25	83	1,8
7,50	94	2,6

*Média de cinco valores

Tabela 2 - Concentração letal mediana de inseticidas para *Drosophila melanogaster*.

Inseticida	CL ₅₀ (ig.mL ⁻¹)
diazinon	0,638 ± 0,088
carbofuran	4,49 ± 0,60
triclorfon	15,8 ± 1,6

A incerteza expandida da CL₅₀ foi calculada de acordo com EUROCHEM/CITAC Guide (2000) e Harris, D.C. (2001), considerando apenas a incerteza padrão tipo A e aplicando fator de abrangência k igual a 2.

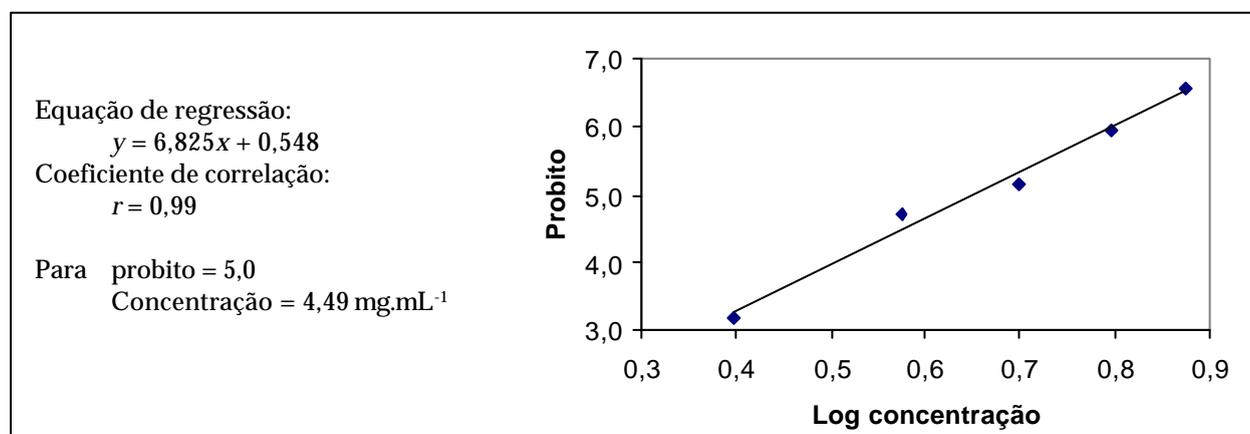


Fig. 1 - Gráfico probito x logaritmo da concentração inseticida para cálculo da CL₅₀ do carbofuran para *Drosophila melanogaster*

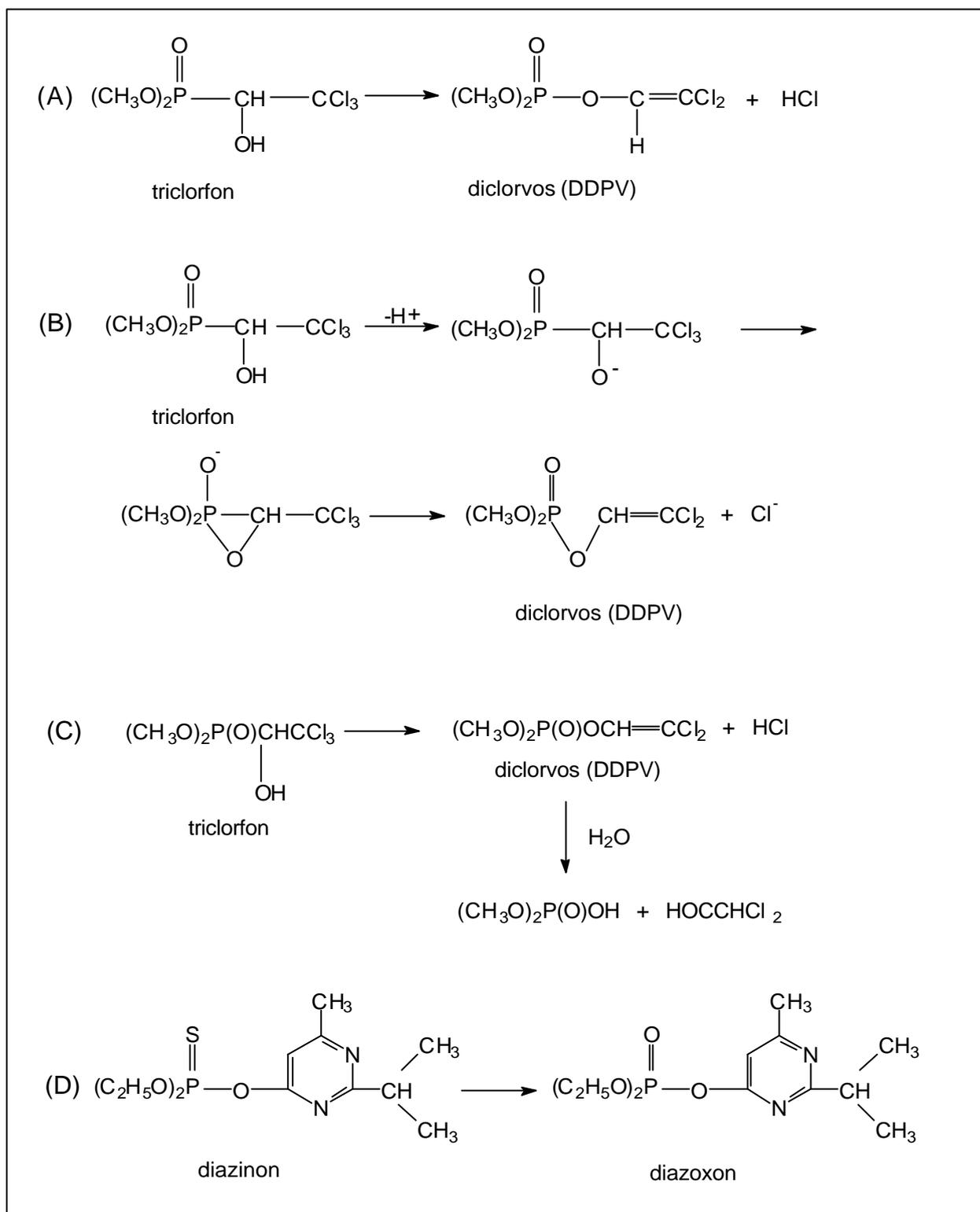


Fig. 2 – Transformações estruturais nas moléculas inseticida triclorfon e diazinon.

A transformação metabólica do triclorfon pode ser constatada pelos dados da inibição da acetilcolinesterase apresentados na Tabela 3. Como este inseticida é um inibidor fraco de acetilcolinesterase de mamíferos *in vitro*, a alta atividade anticolinesterásica para os

pH 7,8 e 10,5 no início do experimento, pode ser explicada pela transformação triclorfon® diclorvos, este último um organofosforado com alta atividade anticolinesterásica. Da mesma maneira como essa transformação verifica-se mais rapidamente quanto

Tabela 3 - Percentagem de inibição *in vitro* da acetilcolinesterase plasmática de rato, por soluções aquosas de triclorfon com diferentes pH.

Tempo (h)	pH		
	6,0	7,8	10,5
2	4	37	82
24	22	94	0
48	40	85,2	0
72	49	82,2	—
144	55,6	37,1	—
168	55,4	17,0	—
192	55,0	0	—
240	62,7	0	—
336	74,7	—	—

Tabela 4 - Percentagem de mortalidade (média de três valores e desvio padrão) de *Drosophila melanogaster* expostas a resíduos de evaporação de soluções aquosas de triclorfon com diferentes pH.

Tempo (h)	pH				
	6,0	7,8	10,5		
1	2	1,2	17	1,2	100
24	21	1,2	100		0
48	80	1,2	100		0
72	100		100		—
192	100		0		—
216	100		0		—
336	100		—		—
840	100		—		—
1032	100		—		—

Tabela 5 - Percentagem de inibição *in vitro* da acetilcolinesterase plasmática de rato por soluções aquosas de diazinon com diferentes pH.

Tempo (h)	pH		
	6,0	7,8	10,5
2	0	0	0
24	0	0	0
48	0	0	0
72	0	0	0
168	0	0	0
188	0	0	0
288	0	0	0
432	0	0	0
624	0	0	0

mais alto o valor do pH, no mesmo sentido, também, é a rapidez com que se verifica a degradação do metabólito diclorvos: enquanto sua formação ainda se verifica após 336 horas de experimento em pH 6,0,

em 10,5 todo o diclorvos formado já havia se degradado nas primeiras 24 horas do experimento. Segundo MATTSON *et al.* (1955), o diclorvos, formado a partir da desidrocloração do triclorfon, sofre posteriormente processo de hidrólise reduzindo sua ação tóxica pela formação de produtos não-tóxicos, como mostra a equação C da Figura 2.

Uma análise dos dados da Tabela 4, mostra que há uma relação direta entre o aumento da percentagem de mortalidade das drosófilas e a inibição da acetilcolinesterase (Tabela 3), um indicativo, também, de que o metabólito diclorvos, e não o triclorfon, é o agente potencialmente tóxico, pois, se assim não fosse, os valores desses dois parâmetros diminuiriam muito lentamente com o tempo, devido ao fato da hidrólise do triclorfon ser desprezível nas condições do experimento.

REINER *et al.* (1975) demonstraram que a velocidade de inibição da acetilcolinesterase de eritrócito bovino por diclorvos é, praticamente, a mesma para os pH 7,4 e 6,0. Conseqüentemente, para o caso deste experimento, a diferença verificada para os pH 7,8 e 6,0 (Tabela 3) pode ser atribuída à mais rápida transformação do triclorfon em diclorvos para o pH 7,8. Os dados mostram, ainda, que esta transformação foi mais acentuada para pH 10,5, o que é coerente com o mecanismo da passagem do triclorfon para diclorvos, pois, quanto mais alcalino o meio, mais facilmente ocorrerá a liberação do próton (H⁺) e, conseqüentemente, a do HCl da molécula do triclorfon.

O organofosforado diazinon não é um inibidor direto da acetilcolinesterase, o que pode ser constatado pelos dados da Tabela 5 onde, no intervalo de 624 h, a atividade da enzima em presença deste inseticida, foi praticamente de 100%, ou seja, a acetilcolinesterase não foi inibida *in vitro*. Entretanto, no experimento *in vivo*, o diazinon apresentou alta atividade inseticida, resultado, como já mencionado anteriormente, de sua transformação metabólica, no inseto, para o diazoxon (Fig. 2-D), um inibidor direto da acetilcolinesterase (Tabela 6) e a causa da alta mortalidade das drosófilas. Esta dedução é coerente com estudos conduzidos por FORGASH *et al.* (1966) e KRUGER *et al.* (1960), com diazinon em insetos, mostrando que o único metabólito identificado foi o análogo diazoxon.

MARGOT & GYSIN (1957) e RADELEFF (1964) fazem referência sobre a possibilidade do diazinon transformar-se, por hidrólise, em produtos muito mais tóxicos para mamíferos como o monotionotep e o sulfotep. Essas transformações estruturais do diazinon ocorrem quando o inseticida contém pequena quantidade de água residual. Ao contrário, nos casos em que o diazinon se encontra em presença de grande quantidade de água, como acontece com o uso normal desse produto, e que é o caso, também, do presente experimento, sua hidrólise leva à formação de subs-

Tabela 6 - Percentagem de mortalidade (média de três valores e desvio padrão) de *Drosophila melanogaster* expostas a resíduos de evaporação de soluções aquosas de diazinon com diferentes pH.

Tempo (h)	pH					
	6,0		7,8		10,5	
0	100		100		100	
24	100		100		100	
48	100		100		100	
72	100		100		37	
120	100		100		0	
168	100		100		0	
288	98	3,5	98	2,0	---	
432	92	1,2	90	4,0	---	
600	86	2,0	84	2,0	---	

Tabela 7 - Percentagem de inibição *in vitro* da acetilcolinesterase plasmática de rato por soluções aquosa de carbofuran com diferentes pH.

Tempo (h)	pH		
	6,0	7,8	10,5
2	100	100	100
24	100	100	0
48	100	100	0
72	100	100	---
96	100	100	---
120	100	100	---

Tabela 8 - Percentagem de mortalidade (média de três valores e desvio padrão) de *Drosophila melanogaster* expostas a resíduos de evaporação de soluções aquosas de carbofuran com diferentes pH.

Tempo (h)	pH					
	6,0		7,8		10,5	
0	74	1,2	64	1,2	46	3,5
24	74	1,2	64	1,2	14	1,2
48	68	2,0	50	2,0	4	1,2
72	60	1,2	40	2,3	0	
168	56	1,2	24	2,0	0	
192	56	1,2	24	4,0	---	
216	52	2,0	24	1,2	---	
312	10	1,2	02	1,2	---	

tâncias, praticamente, não tóxicas. Realmente, como se verifica pelos dados da Tabela 5, o diazinon *in vitro* não passa para diazoxon nas três faixas de pH analisadas, pois, não houve inibição da acetilcolinesterase: a inibição dessa enzima seria acentuada no caso da presença desse metabólito. Embora, pelos dados desta tabela não se constate transformações estruturais do inseticida, os da

Tabela 6 indicam claramente que, para o pH 10,5 e no intervalo de tempo 72-120 horas, o inseticida diazinon foi degradado totalmente para produtos não-tóxicos para as drosófilas: sua mortalidade foi reduzida, praticamente, a zero. Este comportamento do diazinon é coerente com dados de sua degradação por hidrólise, em função do pH (WORTING & WALKER, 1987).

Os dados das Tabelas 7 e 8 para o carbofuran mostram que este inseticida é um inibidor direto da acetilcolinesterase e de alta toxicidade para as drosófilas. Diferentemente dos dois organofosforados, esse carbamato não sofre transformações metabólicas para produtos mais tóxicos. Ele simplesmente sofre hidrólise básica para metabólitos não-tóxicos para drosófilas, o que pode ser constatado pela queda contínua nos valores da mortalidade com o tempo de incubação. Esta transformação hidrolítica é muito mais acentuada para a solução de pH mais alcalino, dado esse, coerente com as observações de McEWEN & DAVIS (1965).

CONCLUSÃO

No preparo de soluções aquosas de inseticidas deve-se levar em conta o pH da água utilizada e o período de aplicação da solução, a fim de se evitar a perda da atividade tóxica do princípio ativo e, o que é mais importante, acidentes com intoxicações devido ao aumento da sua toxicidade.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Helena Rossi, do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, pela confecção das fórmulas químicas.

À Dra. Yukie Saito Hirata, da CPTI-Tecnologia e Desenvolvimento, pela análise estatística dos dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, G.R. & REYES, F.G.R. *Drosophila melanogaster* Meigen: 1. Sensibilidade ao endossulfan e biomonitoramento de seus resíduos em couve-manteiga. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.58, n.2, p.15-24, 1999.
- ALMEIDA, G.R.; REYES, F.G.R.; RATH, S. *Drosophila melanogaster* Meigen: 3. Sensibilidade ao carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Quím. Nova*, v.24, n.6, p.768-772, 2001.
- ARTHUR, B.W & CASIDA, J.E. Metabolism and selectivity of 0,0-dimethyl 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphate and its acetyl and vinyl derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, v.5, p.186-192, 1957.

- ASSUMPCÃO, R.M.V. & MORITA, T. *Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização – preparação – purificação*. São Paulo: Edgard Blücher, 1968. p.274.
- BAGDONAS, M.; DE MELLO, M.H.S.H.; GUINDANI, C.M.A.; FERREIRA, M.S.; GAETA, R. Ensaios biológicos como testes preliminares na detecção de resíduos de inseticidas em frutas e hortaliças. *Rev. Bras. Toxicol.*, v.1, n.1, p.3-5, 1988
- BARTEL, W.F.; ALEXANDER, B. H.; GIANG, P.A. Insecticidal phosphates obtained by a new rearrangement reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, v.77, p.2424-2427, 1955.
- BROWN, V.K. *Acute toxicity in theory and practice*. Norwich: John Wiley, 1980. p.20-21
- CASARETT, L.J. & DOULL, J. *Toxicology: the basic science of poisons*. New York: Pergamon Press, 1991. p.21-22.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, D.; ANDRES JR., V.; FEATHERSTONE, R.M. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, v.7, p.88-95, 1961.
- ESPIGARES, M.; CROVETTO, G.; GÁLVEZ, R. *In vitro* evaluation of the toxicity of several dithiocarbamates using an *Escherichia coli* growth inhibition bioassay and the acetylcholinesterase inhibition test. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, v.13, n.2, p.165-174, 1998.
- EURACHEM/CITAC Guide. Appendix A. Examples. In: *Quantifying uncertainty in analytical measurement* 2. ed., 2000. p.31-94
- FERRER, A. & CABRAL, R. Toxic epidemics caused by alimentary exposure to pesticides: a review. *Food Add. Contam.*, v.8, p.755-776, 1991.
- FORGASH, A.J., COOK, B.J.; RILEY, R.C. Mechanisms of resistance in diazinon selected multiresistant *Musca domestica*. *J. Econ. Entomol.*, v.55, p.544-551, 1966.
- GOELLNER, C.I. *Utilização dos defensivos agrícolas no Brasil: análise do seu impacto sobre o ambiente e a saúde humana*. São Paulo: ArtGraf, 1993. p.39-41.
- HARRIS, D.C. Propagação da incerteza. In: *Análise química quantitativa*. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC editora, 2001. p.52-57.
- HAYES, W.J., JR. *Toxicology of pesticides*. Baltimore: Williams & Wilkins Comp., 1975-a. p.478-482.
- HAYES, W.J., JR. *Toxicology of pesticides*. Baltimore: Williams & Wilkins Comp., 1975-b. p.53.
- HIRATA, R.; ROSA, A.R.; PUGA, F.R.; SAVOY, V.L.T. Variação da toxicidade do diazinon devido a produtos de sua degradação. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.66, n.1, p.113-115, 1999.
- JOSEPH JR., H. & KNOBEL, M.G. Estudo preliminar da sensibilidade de moscas *Drosophyla melanogaster* a diversos pesticidas organoclorados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.40, n.1, p.43-47, 1980.
- KHARASH, M.S. & BENGLSDORF, I.S. The reaction of triethyl phosphite with μ -trichloromethyl carbonyl compounds. *J. Org. Chem.*, v.20, p.1356-1362, 1955.
- KRUEGER, H. R., O'BRIEN, R.D.; DAUTERMAN, W.C. Relationships between metabolism and differential toxicity in insects and mice of diazinon, dimethoate, parathion, and acethion. *J. Econ. Entomol.*, v.53, p.25-31, 1960.
- MARGOT, A. & GYSIN, H. Diazinon seine zersetzungsprodukte und ihre eigenschaften. *Helv. Chim. Acta*, v.40, p.1562-1573, 1957.
- MATTSON, A.M., SPILLANER, J.T.; PEARCE, G.W. Dimethyl 2,2-dichlorovinyl phosphate (DDVP), an organic phosphate compound highly toxic to insects. *J. Agric. Food Chem.*, v.3, p.319-321, 1955.
- MC EWEN, F.L. & DAVIS, A.C. Test with insecticides for seed-corn maggot control in lima beans. *J. Econ. Entomol.*, v.58, p.369-370, 1965.
- MC LEAY, M.J. & HALL, K.J., 1999. Monitoring agricultural drainage ditches and the receiving water (Nicomekl River, Surrey, BC) for toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and probable cause due to organophosphate contamination. *Water Qual. Res. J. Canada*, v.34, n.3, p.423-453, 1999.
- MELLO, M.A.R. & PUGA, F.R. Efeito da oxima Contration na reativação das colinesterases plasmática e cerebral de ratos intoxicados por malation. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.47, n.1/2, p.15-17, 1980.
- METCALF, R.L.; FUKUTO, T.R.; MARCH, R.B.. Toxic action of Dipterex and DDVP to the housefly. *J. Econ. Entomol.*, v.52, p. 44-49, 1959.
- MİYAMOTO, J. Non-enzymatic conversion of Dipterex into DDVP and their inhibitory action on enzymes. *Botyu-Kagaku*, v.24, p. 130-137, 1959.
- PAULINO, C.A.; MAZANTI, M.T.; GAETA, R. Método de triagem para detecção de intoxicações pelo carbofuran usando moscas *Drosophila melanogaster*. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.27, n.1, p. 209-212, 1992.
- PEREZ, O.A. DE; BREM, J.J.; ROUX, J.P.; DE PEREZ, O.A. Biochemical and clinical evaluation of cattle given therapeutic applications of a diazinon preparation. *Veterinaria*, v.4, n.37, p. 629-630, 1987.
- RADELEFF, R.D. *Veterinary toxicology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1964. p.314.
- REINER, E.; KRAUTHACKER, B.; SIMEON, V.; SPOLJAR-SKRINJARIC, M. Mechanism of inhibition in vitro of mammalian acetylcholinesterase and cholinesterase in solutions of 0,0-dimethyl 2,2,2-trichloro-1-hidroxyethyl phosphonate (trichlorfon). *Biochem. Pharmacol.*, v.24, p.717-722, 1975.
- SHISHIDO, T.; USUI, K.; FUKAWA, J. Oxidative metabolism of diazinon by microsomes from rat liver and cock roach fat body. *Pest. Biochem. Physiol.*, v.2, n.1, p.27-38, 1972.
- VASQUES, R.M.P.; MATSUNAGA, A.K.; YONEDA, H. Níveis do sulfotepp no diazinon. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.54, n.1/4, p. 31-35, 1987.
- WERNER, I.; DEANOVIC, L.A.; CONNOR, V.; DE VLAMING, V.; BAILEY, H.C.; HILTON, D.E. Insecticide-caused toxicity to *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera) in the Sacramento-San Joaquin Delta, California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.19, n.1, p.215-227, 2000.
- WILHELM, K. Determination of human plasma cholinesterase activity by adapted Ellman's method. *Arh. Hig. Rada, Toksikol.*, v.19, p.199-207, 1968.
- WORTING, C.R. & WALKER, S.B. *The Pesticide Manual: a world compendium*. Lavenham: The British Crops Protection Council, 1987. p.248.
- ZWIENER, R.I. & GINSBURG, C.M. Organophosphate and carbamate poisoning in infants and children. *Pediatrics*, v.81, p.121-126, 1988.

Recebido em 10/2/03
Aceito em 18/3/03