

**UTILIZAÇÃO DO BIOINDICADOR ARTEMIA SALINA NA AVALIAÇÃO  
TOXICOLÓGICA EM EXTRATOS VEGETAIS DE ALLIUM SATIVUM COM PRESENÇA  
DE PRAGUICIDAS.**

Felipe Fidelis Camilo

Ligiane Aparecida Florentino

Paulo Henrique de Siqueira Sabino.

**RESUMO:** O Brasil é um dos maiores produtores agropecuários do mundo, conseqüentemente, se torna um dos maiores consumidores de praguicidas do mundo. Quando utilizado de forma incorreta, os praguicidas podem gerar contaminação direta ou indireta. Todo praguicida tem um tempo de carência, sendo o tempo em que leva para o agente químico ser degradado do alimento, no entanto, quando não respeitado, leva a contaminações agudas aos consumidores. A pesquisa em questão teve como objetivo a presença de resíduos de agrotóxicos utilizando a *Artemia salina* como bioindicador e avaliar a influência do tempo de carência nos resultados obtidos. Foram cultivados dez bulbos de alhos, nos quais cinco receberam o praguicida da classe dos inseticidas, o *Tiofanato-metilico*, e cinco não receberam. Para avaliar o tempo de carência, o cultivo ocorreu em T0, T7 e T14. Para a determinação da toxicidade, utilizou-se o bioensaio com *A. salina*. Os resultados foram obtidos pela contagem de artemias mortas. A partir desses dados foi possível a determinação da DL<sub>50</sub>, no qual foi necessário utilizar amostras dos extratos em diferentes concentrações. Os resultados obtidos indicam que quando não há utilização do praguicida, a toxicidade se mostra diminuída em relação às plantas que receberam o praguicida.

**Palavras-chave:** Agrotóxico, Limite Máximo de agrotóxico em Alimentos, Bioindicador, Alho.

**USE OF THE BIOINDICATOR ARTEMIA SALINA IN THE TOXICOLOGICAL  
EVALUATION IN PLANT EXTRACTS OF ALLIUM SATIVUM WITH THE PRESENCE  
OF PESTICIDES.**

**Abstract:** Brazil is one of the largest agricultural producers in the world, consequently becoming one of the largest consumers of pesticides in the world. When used incorrectly, pesticides can generate direct or indirect contamination. Every pesticide has a grace period, being the time it takes for the chemical agent to be degraded in the food, however, when not respected, it leads to acute contamination to consumers. The research in question aimed at the presence of pesticide residues using *Artemia salina* as a bioindicator and to evaluate the influence of the grace period on the results obtained. Ten garlic bulbs were grown, in which five received the pesticide of the class of insecticides, thiophanate-methyl, and five did not. To evaluate the waiting time, cultivation occurred at T0, T7 and T14. For the determination of toxicity, the bioassay with *A. salina* was used. The results were obtained by counting dead artemia. From these data it was possible to determine the LD<sub>50</sub>, in which it was necessary to use samples of the extracts in different concentrations. The results obtained indicate that when there is no use of the pesticide, the toxicity is reduced in relation to the plants that received the pesticide.

**Keywords:** Pesticide, Maximum Pesticide Limit in Food, Bioindicator, Garlic.

## USO DEL BIOINDICADOR ARTEMIA SALINA EM LA EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA EM EXTRACTOS DE PLANTAS DE ALLIUM SATIVUM COM PRESENCIA DE PESTICIDAS.

**Resumen:** Brasil es uno de los mayores productores agrícolas del mundo, por lo que se convierte en uno de los mayores consumidores de plaguicidas del mundo. Cuando se usan incorrectamente, los plaguicidas pueden generar contaminación directa o indirecta. Todo plaguicida tiene un período de gracia, siendo el tiempo que tarda el agente químico en degradarse en los alimentos, sin embargo, cuando no se respeta, conduce a una contaminación aguda a los consumidores. La investigación en cuestión tuvo como objetivo la presencia de residuos de plaguicidas utilizando Artemia salina como bioindicador y evaluar la influencia del período de gracia en los resultados obtenidos. Se cultivaron diez bulbos de ajo, en los cuales cinco recibieron el pesticida de la clase de insecticidas, tiofanato-metilo, y cinco no. Para evaluar el tiempo de espera, el cultivo se realizó en T0, T7 y T14. Para la determinación de la toxicidad se utilizó el bioensayo con A. salina. Los resultados se obtuvieron contando artemia muerta. A partir de estos datos se pudo determinar la DL50, en la que fue necesario utilizar muestras de los extractos en diferentes concentraciones. Los resultados obtenidos indican que cuando no hay uso del plaguicida, la toxicidad se reduce en relación a las plantas que recibieron el plaguicida.

**Palabras clave:** Plaguicida, Límite Máximo de Plaguicidas en Alimentos, Bioindicador, Ajo.

## INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014)<sup>1</sup>, diz que frutas, verduras e legumes são essenciais para uma dieta saudável, no qual, a redução do consumo desses alimentos está ligada diretamente com uma saúde precária e aumento do risco de doenças não transmissíveis. Em 2020<sup>2</sup> declarou que esses alimentos podem ser folhas, flores, frutos, caules, sementes, tubérculos e raízes, sendo elas boas fontes de vitaminas, sais minerais, fibras e água, ajudando a promover saúde.

Durante as últimas décadas a população tem adquirido um hábito mais saudável, isso fez que fossem além de frutas, legumes e verduras, buscando ervas e

especiarias culinárias nas quais são relatadas por possuírem propriedades benéficas para saúde, tais como antioxidantes, anti-inflamatórias, anticâncer entre outras<sup>3</sup>. Entre as especiarias mais utilizadas pela população brasileira, está o alho (*Allium sativum*), pertencente à família *Liliaceae*, no qual possui uma substância ativa chamada alicina, responsável pela atividade antiviral, antifúngica e antibiótica, mas também possui um elevado teor de selênio, no qual, age como antioxidante<sup>4</sup>.

No entanto, muitos desses alimentos recebem aplicações de agrotóxicos, segundo um estudo realizado<sup>5</sup>, 23% dos alimentos estudados foram avaliados com resíduos de agrotóxicos acima do limite permitido. Em 1988, foi criada uma constituição que restringe propagandas envolvendo tais produtos químicos, exigindo a inserção de mensagens de advertência quanto aos seus riscos associados<sup>6</sup>.

Há um reconhecimento sobre os riscos que os agrotóxicos representam para a saúde humana, podendo causar intoxicações agudas ou crônicas<sup>7</sup>. Não são apenas os agricultores que correm risco quando se trata de agrotóxicos, mas toda população, isso ocorre, pois cada agrotóxico tem seu tempo de segurança, que é o tempo necessário para que o agente químico seja eliminado do plantio, quando não respeitado o tempo de segurança, o risco de intoxicação aumenta, tendo a possibilidade de haver resquício da substância química no alimento<sup>8</sup>.

Os problemas mais relatados na intoxicação por praguicidas são: transtornos mentais, dores de cabeça, náuseas, gastrite, depressão, ansiedade, mialgia, irritabilidade, cólicas abdominais, entre outros. Sendo de grande importância a inspeção desses produtos químicos e seu uso para que não ocorram problemas para o meio ambiente e para saúde dos seres vivos<sup>9</sup>.

Tendo em vista os problemas decorridos no uso do praguicida e intoxicações por resíduos químicos em alimentos, esse trabalho tem objetivo a presença de resíduos de agrotóxicos utilizando a *Artemia salina* como bioindicador e avaliar a influencia do tempo de carência nos resultados obtidos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **Instalação do Experimento**

Foram usados dez bulbos de alho chinês caseiro, aplicou-se uma técnica para quebrar a dormência do bulbo. Essa técnica consiste em deixar os bulbos em contato com água corrente durante 24h até o aparecimento de pequenas raízes, estando prontos para o plantio.

Os testes após a colheita foram realizados no laboratório de Microbiologia do solo da Universidade José do Rosário Vellano, com orientação da Prof<sup>ª</sup>:Dra. Ligiane Aparecida Florentino. O experimento ocorreu no período de maio de 2019 á janeiro de 2020.

O sistema de cultivo dos alhos seguiu algumas etapas com o preenchimento linear dos vasos com solo devidamente analisado e peneirado, no qual foi separada uma porção em contato com o praguicida e a outra porção com a ausência do praguicida. O plantio contou com irrigação manual. Após aproximadamente 16 semanas os alhos foram colhidos e submetidos ao processo de limpeza (retirada das raízes, da areia dos bulbos e lavagem com água corrente) e seguindo-se para o preparo das análises.

## **Tempo de Carência**

O agrotóxico utilizado foi da classe dos fungicidas, o cercobin (*Tiofanato-metilico*), segundo sua bula, ele apresenta um mecanismo de ação de Montagem de  $\beta$ -tubulina na mitose, pertencente ao Grupo B1, também apresenta o tempo de carência de 14 dias, no qual foram feitas três aplicações antes da colheita.

Para o preparo da solução de aplicação, a bula recomenda 7g para cada 1L de água, no qual foi necessário a utilização de 1ml da solução por planta, sendo assim, pesou-se 0,7 g de *Tiofanato-metilico* para cada 100 ml de água. Após a terceira aplicação, os alhos foram colhidos respeitando diferentes tempos de carência do fungicida, o plantio foi realizado nos seguintes tempos, 24h após aplicação, sete dias após aplicação e a quatorze dias após aplicação.

## **Extrato Bruto**

Os bulbos foram descascados e triturados, posteriormente, pesou-se os bulbos (TAB. 1) e utilizando o álcool etílico a 70% como líquido extrator na proporção de 50 g de alho para cada 200 ml de álcool.

O extrato foi deixado em repouso por 24 horas numa estufa com circulação de ar e temperatura controlada de 37°C para reduzir uma porção do volume. A temperatura em questão não altera a composição do extrato, no entanto, para evaporação total foi necessário à utilização do rotoevaporador á 35°C e 50rpm para obtenção do extrato puro.

**Tabela 1- Quantidade proporcional de gramas de alho por mililitros de álcool etílico 70%**

<b>Amostras dos extratos de alhos</b>	<b>Quantidade em grama (g)</b>	<b>Quantidade de álcool etílico 70% em mililitros (ml)</b>
<b>Sem praguicida</b>	9,65	38,6
<b>Sem praguicida</b>	12	48
<b>Com praguicida (T0)</b>	13,58	54,32
<b>Com praguicida (T7)</b>	17	68
<b>Com praguicida (T14)</b>	18	72

Fonte: Aatoria do autor (2020)

### **Bioensaio com *Artemia salina***

#### ***Eclosão dos ovos***

O ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* foi baseada nas análises de Meyer et al (1982)<sup>10</sup> e com as devidas adaptações. No qual, foi realizado com o preparo de uma solução com sal marinho na concentração de 20g L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado para 8,5, por meio da utilização de solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de NaOH (Hidróxido de Sódio).

A solução é utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia salina* e no preparo das demais diluições. Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina, dentro de

um recipiente devidamente esterilizado, por 24 horas, sem o uso de aeração e com temperatura ambiente.

### *Preparo das amostras*

As análises foram baseadas segundo Bueno e Piovezan (2015)<sup>11</sup> com as devidas alterações como sugerido no artigo. Todas as vidrarias utilizadas foram devidamente esterilizadas antes das análises.

Após a eclosão foram transferidas 10 larvas de *Artemia salina* com auxílio de pipetas de Pasteur para tubos contendo solução salina a serem testadas nas diferentes concentrações (TAB. 2). As amostras foram preparadas a partir de soluções aquosas de estoque á 1000 ppm (partes por milhão), a partir dela obteve-se amostras nas concentrações de 25ppm, 50ppm, 100ppm, 200ppm e 300ppm, as análises foram realizadas em duplicata. Para os tubos controles, utilizou-se apenas solução salina.

**Tabela 2 - Concentração e volume das amostras serem testadas, volume de solução salina e quantidade de Artêmia a ser utilizada por tubo.**

<b>Identificação dos tubos de ensaio conforme as concentrações</b>	<b>Concentração das substâncias em ppm (<math>\mu\text{l L}^{-1}</math>)</b>	<b>Volume das substâncias testadas (mL)</b>	<b>Volume de solução salina (mL)</b>	<b>Quantidade de Artemia (unidades)</b>
<b>Controle</b>	0	0	10	10
<b>1</b>	25	0,05	9,95	10
<b>2</b>	50	0,1	9,9	10
<b>3</b>	100	0,2	9,8	10
<b>4</b>	200	0,4	9,6	10
<b>5</b>	300	0,6	9,4	10

Fonte: Autoria do autor (2020)

### **Análises Estatísticas**

No bioensaio frente *Artemia salina*, para obtenção dos valores de DL<sub>50</sub> foi foram construídos gráficos de progressão linear para obtenção das equações de segundo grau, através do software Excel. Foram feitas as médias da quantidade de A. Salina mortas, nas quais foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey) para construção dos gráficos.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Contagem de Artemias Mortas

Para obtenção dos resultados, utilizou as técnicas baseada<sup>12,11</sup>, no qual foram feita as devidas adaptações. Sendo feitas as contagem das Artemias mortas com o auxilio de uma lupa trinocular com zoom estereoscópio microscópio após 24 horas de aplicação das amostras nos tubos.

A morte do micro crustáceo é definida pela ausência de movimentação e pela sedimentação.

O teste de Tukey faz uma comparação de todos os possíveis pares de médias, para a determinação de quais amostras se diferem entre si por comparação entre colunas e linhas, sendo representadas pelas letras A, B e C (colunas) e *a*, *b* e *c* (linhas)<sup>13</sup>. A (TAB. 3) apresenta as médias após as análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

**Tabela 3: Artemias mortas após imersão em soluções aquosas oriundas de extrato etanoico do alho cultivado com e sem agrotóxicos.**

Tratamentos	Concentrações (ppm)				
	25	50	100	200	300
<b>Controle</b>	6 Bb	6 Bb	6 Bb	6 aB	6 aC
<b>Sem praguicida</b>	6.25 Bb	6.50 Bb	7.50 aB	7.50 aB	8.00 aC

<b>Com praguicida T0</b>	6.25 cB	6.00 Bc	8.00 bB	8.00 bB	9.00 aB
<b>Com praguicida T7</b>	7.00 Ad	8.00 Ac	8.00 cA	9.00 bA	10.00 aA
<b>Com praguicida T14</b>	6.00 Bd	8.00 A	8.00 cA	9.00 bA	10.00 aA

Legenda: Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas e minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey á 5%. Fonte: Aatoria do autor (2020)

### Porcentual de Artemias mortas

A obtenção das porcentagens das médias (TAB. 4) se da necessária, pois, assim é possível a construção dos gráficos de concentração vs porcentagem de artemias mortas, para realização dos cálculos de DL<sub>50</sub>.

Para obtenção da porcentagem de artemias mortas é necessário à utilização da formula:

$$\% \text{ mortas} = \frac{(\text{teste} - \text{controle}) * 100}{\text{controle}}$$

Tabela 4: Porcentagem (%) da quantidade de Artemias mortas

Tratamentos	Porcentagem					
	Concentrações (ppm)					
	0	25	50	100	200	300
<b>Controle</b>	-					
<b>Sem praguicida</b>		4,16%	8,33%	25,00%	25,00%	33,33%
<b>Com praguicida T0</b>	-	4,16%	-	33,33%	33,33%	50,00%
<b>Com praguicida T7</b>	-	16,66%	33,33%	33,33%	50,00%	66,66%



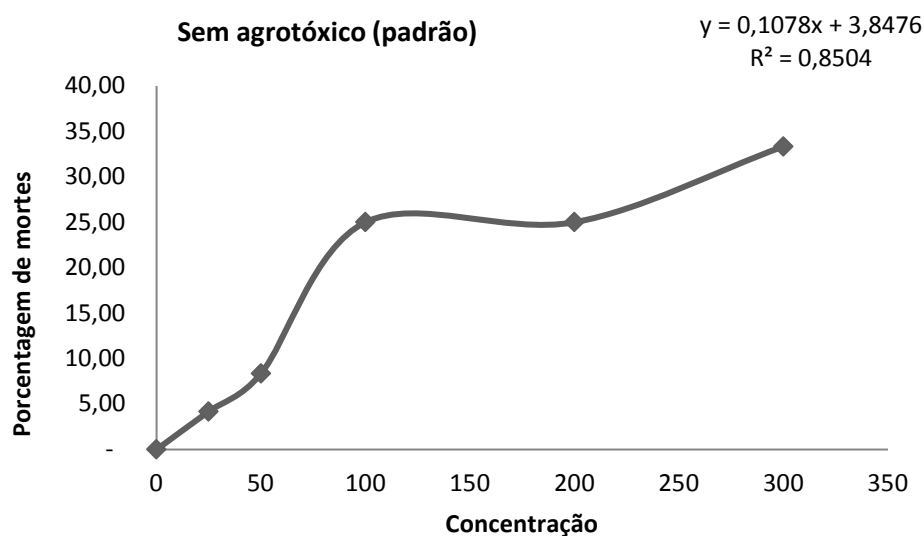
<b>Com praguicida T14</b>	-	-	33,33%	33,33%	50,00%	66,66%
-----------------------------------	---	---	--------	--------	--------	--------

Fonte: Autoria do autor (2020)

### Construção dos gráficos de concentração vs porcentagem de Artemias mortas e determinação da DL<sub>50</sub>

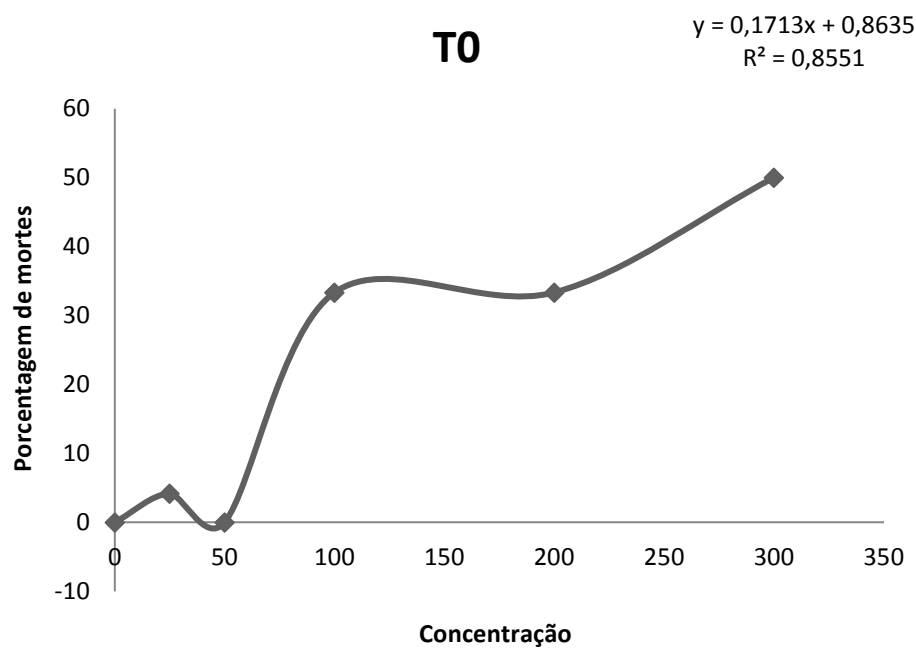
Através da obtenção dos valores da porcentagem, foi possível a construção dos gráficos de progressão linear (GRAF. 1, 2, 3 e 4), nos quais estão representando a concentração vs porcentagem em relação à quantidade de Artemias mortas.

Gráfico 1: Curva de concentração de artemias mortas na amostra sem agrotóxico.



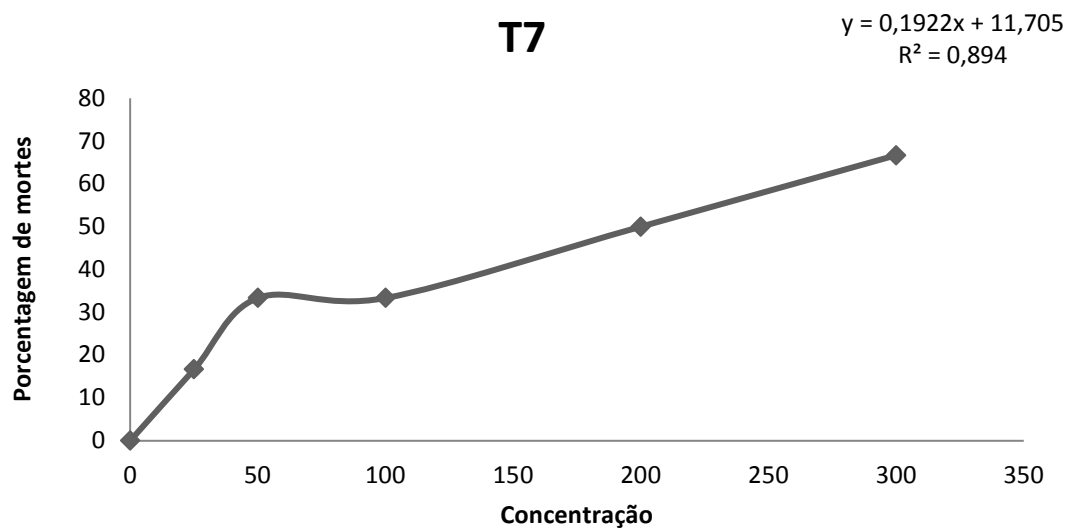
Fonte: Autoria do autor (2020).

**Gráfico 2: Curva de concentração de artemias mortas na amostra com agrotóxico T0.**



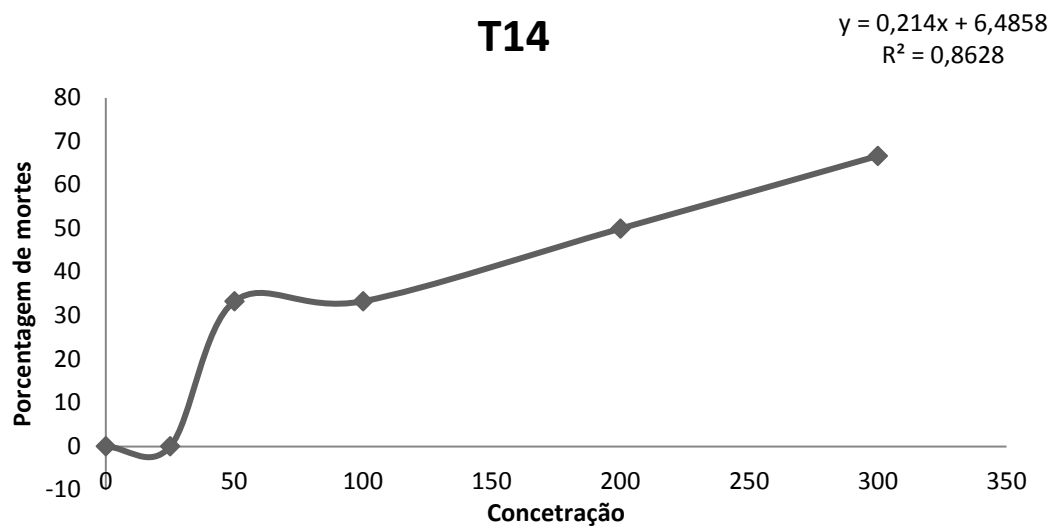
Fonte: Autoria do autor (2020)

**Gráfico 3: Curva de concentração de artemias mortas na amostra com agrotóxico T7.**



Fonte: A autoria do autor (2020)

Gráfico 4: Curva de concentração de artemias mortas na amostra com agrotóxico T14.



Fonte: A autoria do autor (2020)

A partir dos gráficos obtido pelo do software, Excel, foi possível obter a equação de segundo grau:

$$y = a.x + b$$

y = Substitui por 50%

Segundo MacLaughlin et al (1991)<sup>14</sup> e Fonseca et al (2014)<sup>4</sup>, para o cálculo da DL<sub>50</sub> para *Artemia salina* se utiliza o método GraphPadPrism, que considera: baixa toxicidade quando a dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) for superior a 500 µg mL<sup>-1</sup>; toxicidade moderada para DL<sub>50</sub> entre 100 a 500 µg mL<sup>-1</sup> e muito tóxico quando a DL<sub>50</sub> foi inferior 100 µg mL. Baseando-se no método de GraphPadPrism, observa-se na (TAB. 5) a DL<sub>50</sub> encontrada para cada amostra.

**Tabela 5: Dose letal de cada amostra em µl L<sup>-1</sup> (ppm)**

<b>Amostras</b>	<b>DL 50 (ppm)</b>	<b>Classificação</b>
<b>Sem Praguicida</b>	428ppm	Moderada
<b>Com Praguicida T0</b>	286ppm	Moderada
<b>Com Praguicida T7</b>	199ppm	Moderada
<b>Com Praguicida T14</b>	203ppm	Moderada

Fonte: A autoria do autor (2020)

<sup>7</sup>O Brasil é um dos maiores consumidores de produtos agrícolas do mundo e por conta dessa grande demanda, pode-se ocorrer o uso incorreto, fazendo com que problemas aconteçam, entre eles, a absorção do praguicida pelo alimento.

O programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos (PARA), criado pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), realiza pesquisas para monitorar a presença de praguicidas em alimentos<sup>15</sup>. Conforme a Resolução-RE N° 2.048, De 27 de julho de 2018, o limite máximo de resíduos (LMR) para o princípio ativo *Tiofanato-metílico* no alho é 5mg/kg (5ppm).

<sup>16</sup>Foram detectados 0,03mg/kg (30ppm) de resíduos em alhos que tiveram aplicações de praguicidas que continham em sua composição química o princípio ativo Tiofanato.

A maioria dos experimentos que visam á toxicidade utilizam modelos baseados em ratos em crescimento, apresentando uma desvantagem para o método das Artemias como o gasto de quantidade de amostra e o elevado custo<sup>17</sup>. Por se tratar de análises

de triagem, o bioensaio facilita nas análises, por apresentar resultados que indicam se será necessário ou não o emprego de técnicas mais avançadas e de maior custo, reduzindo o risco de análises com resultados insatisfatórios<sup>18</sup>.

A pesquisa em questão obteve resultados satisfatórios ao ponto que seria necessário o emprego de técnicas mais avançadas e complexas para detecção do *Tiofanato metílico* nas amostras de alho.

## CONCLUSÃO

Segundo a Resolução-RE N° 2.048, De 27 de julho de 2018, o limite máximo de resíduos (LMR) para o *Tiofanato-metílico* no alho é 5mg/kg (5ppm). No entanto, o trabalho realizado obteve resultados muito acima do que é recomendado. Levando em conta os resultados podemos concluir que a utilização do *Tiofanato metílico* nas amostras de alho e os diferentes tempos de segurança, demonstraram que a toxicidade aumenta com o tempo de exposição.

O bioensaio com *Artemia salina* possibilitou de uma forma barata e rápida a detecção elevada da toxicidade nas amostras comparada com o LMR. Porém, não podemos confirmar que o aumento da toxicidade é exclusivamente por conta do praguicida, podendo ter interferência da luz, da temperatura ambiente, da salinidade e da limpeza das vidrarias. Sendo assim, é necessário o emprego de análises mais sensíveis e complexas como a utilização de técnicas que utilizam ratos ou análises por HPLC.

## AGRADECIMENTO

A Deus; á minha orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>: Ligiane Aparecida Florentino. Aos meus pais e amigos que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto me dedicava à realização deste trabalho.

Aos professores, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional. E a todas as pessoas que ajudaram essa pesquisa se tornar realidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA, Três Lagoas, v. 12, n. 1, p.31-45, janeiro/julho. 2021. ISSN: 2447-8822.

1. Organização Mundial Da Saúde. Aumento do consumo de frutas e hortaliças para reduzir o risco de doenças não transmissíveis. Setembro de 2019. [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5964:folha-informativa-alimentacao-saudavel&Itemid=839](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5964:folha-informativa-alimentacao-saudavel&Itemid=839)
2. Ministério Da Saúde. Ministério da Saúde lança Guia Alimentar para a População Brasileira. Novembro de 2020. <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6036868/Guia+n.37+-+Especificas+A7%B5es+Ingredientes+Alimentares/efd623d4-2d72-4b0b-ad08-4be47ae953a3>.
3. P.V, Del Ré; N, Jorge. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. Rev. Bras. Pl. Med, Botucatu, v. 14, ed. 2, p. 389-399, 2012.
4. G.M., Fonseca; T.C, Passos; M.F.M.L, Ninahuan; A.S, Caroci; L.S, Costa. Avaliação da atividade antimicrobiana do alho (*Allium sativum* Liliaceae) e de seu extrato aquoso. Rev. Bras. Pl. Med, Campinas, v. 16, ed. 3, p. 679-684, 2014.
5. Anvisa. Na Cozinha Frutas Legumes Verduras. SETEMBRO DE 2013. [https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/cozinha\\_frutas\\_legumes\\_verduras.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/cozinha_frutas_legumes_verduras.pdf)
6. Grigori P. Agrotóxico mais encontrado em frutas e verduras no Brasil é fatal para abelhas. 2019. <https://portrasdoalimento.info/2019/12/16/agrotoxico-mais-encontrado-em-frutas-e-verduras-no-brasil-e-fatal-para-abelhas/>
7. Comissão Nacional De Incorporação De Tecnologia No SUS. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas para Intoxicações por Agrotóxicos. 2018: [http://conitec.gov.br/images/Protocolos/DDT/DDT\\_Intoxicaoporagrotoxico\\_2018.pdf](http://conitec.gov.br/images/Protocolos/DDT/DDT_Intoxicaoporagrotoxico_2018.pdf)
8. Gusmão L.C de. Agrotóxicos e segurança alimentar: incertezas e necessidades. 2019. <https://domtotal.com/noticia/1356645/2019/05/agrotoxicos-e-seguranca-alimentar-incertezas-e-necessidades/>.
9. Moraes R.F. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. AGROTÓXICOS NO BRASIL: PADRÕES DE USO, POLÍTICA DA REGULAÇÃO E PREVENÇÃO DA CAPTURA REGULATÓRIA. 2019;:7-64.

10. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnan, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., Mcl. Aughlin, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.
11. Bueno, A.C; Piovezan, M. Bioensaio toxicológico utilizando *Artemia salina*: fatores envolvidos em sua eficácia. 2017. 6 f. TCC (Graduação)-Instituto Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2017.
12. Silva S.L. *Acta Amazonica*. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). 2016; 46(1):73 - 80.
13. Oliveira B. TESTE DE TUKEY PARA COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS. 2019. <https://operdata.com.br/blog/comparacoes-multiplas-teste-de-tukey/>.
14. Mclaughlin, J.L.; Chang, C.J.; Smith, D.L. “Benchtop” bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: RAHMAN, A. *Studies in Natural Product Chemistry* 9. Amsterdam: Elsevier, 1991, p.383-409
15. Anvisa. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. 2020. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>
16. Anvisa. Limites máximos de agrotóxicos em produtos vegetais in natura. 2017. [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/INCN1DE28DEJUNHODE2017\\_Limitesmximosdeagrotxicosemprodutosv egetaisinnatura.pdf/view](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/INCN1DE28DEJUNHODE2017_Limitesmximosdeagrotxicosemprodutosv egetaisinnatura.pdf/view)
17. Rios, F. J. B. Digestibilidade in vitro e toxicidade de lectinas vegetais para náuplios de *Artemia* sp.1995. Dissertação (mestrado em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.
18. Sorgeloos, P.; Van Der Wielen, C. R.; Persoone, G. The use of *Artemia Nauplii* for Toxicity Tests – A critical Analysis. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 2, 1978, 249 – 255.