

Karbosulfan İnhalasyonunun Lipit Peroksidasyonu ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi

¹Canacankatan N., ²Karataşlı M., ³Attila G., ⁴Hastürk S.

¹Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

²Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi, Adana

³Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Adana

⁴Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Adana

THE EFFECT OF CARBOSULFAN INHALATION ON LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT SYSTEM

SUMMARY

Farmers are often exposed to carbosulfan, the carbamate pesticide, at toxic doses due to rare use of special masks minimizing inhalation. The present investigation was designed to evaluate the effects of chronic carbosulfan inhalation on lipid peroxidation and antioxidant system. In this study, rats in the groups B and C received inhalational carbosulfan at doses of 1/20 and 1/10 LC50 respectively for 45 days, 30 min/day. GSH level and SOD enzyme activity were assayed according to the method of Beutler and the method of Mc Cord et al, respectively. GSH level was found to be significantly lower in the study groups than the control group in liver but not in erythrocytes. MDA level was significantly higher in the study groups than the control group in liver but not in erythrocytes. Although an evident increase were observed both in liver and erythrocytes, it wasn't significant. Increase in MDA level and SOD enzyme activity and decrease in GSH content which is an important radical scavenger, indicate that inhalational carbosulfan exposure repressed antioxidant system and enhanced free radical generation. Farmers handling this pesticide must be adequately and efficiently protected.

Keywords: Carbosulfan, GSH, MDA, antioxidant system

İletişim Adresi ve Sorumlu Yazar:

Necmiye CANACANKATAN, PhD.,
Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye
Telefon: +90 324 341 28 15 (2607)
Fax: +90 324 3413022
Email: ncanacankatan@yahoo.com

Başvuru Tarihi: 2.7.2008

Kabul Tarihi:18.09.2008

ÖZET

Karbosulfan, dünyada yaygın kullanımı olan böceklere ve nematodlara karşı tarımda kullanılan karbamat pestisitidir. Çiftçiler tarımsal uygulamalarda karbosulfanın toksik etkisini azaltmak için özel maskeler kullansa da minimal dozda dahi karbosulfana maruz kalırlar. Bu çalışmada kronik karbosulfan inhalasyonunun toksik etkileri araştırılması planlanmıştır. Bu nedenle 1/20 ve 1/10 LC50 karbosulfan 45 gün süresince 30dk/gün uygulanarak sıçanların eritrositlerinde ve karaciğer dokularında antioksidan sistem araştırılmıştır. GSH ve MDA düzeyleri sırası ile Beutler ve tiyobarbitürik asit, SOD enzim aktivitesi ise Mc Cord ve ark. Yöntemi ile ölçülmüştür. Karbosulfan uygulaması sonucunda GSH düzeyinde karaciğer ve eritrositlerde azalma göstermiştir. Ancak bu azalma sadece karaciğerde istatistiksel olarak anlamlıdır. MDA düzeyinde ise karaciğer ve eritrositlerde artış gözlenmiştir. Benzer şekilde bu artış sadece karaciğerde anlamlıdır. SOD enzim aktivitesi hem eritrosit hem de karaciğerde artış göstermesine rağmen, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Lipit peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan MDA'nın atışı ve önemli bir detoksifikasyon ajanı olan GSH'ın tüketimi ile SOD enzim aktivitesinin artışı karbosulfanın antioksidan sistem üzerine olumsuz etkisi olduğu ve serbest radikal üretimini arttırdığını düşündürmektedir. Sonuç olarak karbosulfanın kullanımının sınırlı, dikkatli ve yetkili kişiler tarafından uygulanması önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: Karbosulfan, GSH, MDA, antioksidan sistem

Not: Bu araştırma makalesi daha önce hiçbir dergide sunulmamıştır. Çalışma etik kurallara uygun bir şekilde düzenlenmiştir. Bu çalışma 8-12 Mayıs 2002 tarihinde İstanbul'da düzenlenen "2nd International Meeting on Free Radicals in Health and Disease" 'de sözel bildiri olarak tarafımdan sunulmuştur. (<http://www.sfr-europe.org>)

GİRİŞ

Ülkemizde en sık görülen zehirlenme nedenleri; Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığına bağlı olarak çalışan Zehir Danışma Merkezi'ne 2003 yılında yapılan 13.385 başvuru incelendiğinde; ilaçlar, tüm zehirlenme başvuruları nedenlerinin dörtte üçünü oluşturmaktadır. İlaç zehirlenmelerini sırasıyla tarım ilaçları, kimyasal maddeler, evde kullanılan çeşitli maddeler, besin zehirlenmeleri ve hayvan sokmaları izlemektedir⁽¹⁾.

Tarımda, ürünleri korumak amaçlı kullanılan kimyasal ajanların ve zirai ilaçların üretiminde, tarımsal uygulama sürecinde solunum veya cilt yolu ile bu kimyasal maddelere maruziyet oluşabilir. Karbosulfan, dünyada yaygın kullanımı olan böceklere ve nematodlara karşı tarımda kullanılan karbomat pestisitidir⁽²⁾. Memelilere ve kuşlara karşı düşük toksisitede oluşu ve toprak bulunuşunun sınırlı olması yaygın kullanımı konusunda cesaret vericidir. Ancak insanlarda ve evcil hayvanlarda karbomat zehirlenmesi ilgili pek çok rapor bulunmaktadır^(3,4,5,6). Karbomatların toksisiteleri, asetilkolin esteraz enziminin inaktivasyonu ve sinir sisteminin muskarinik ve nikotinik reseptrelerinin aşırı uyarımı ile ortaya çıkmaktadır^(6,7,8,9). Birçok araştırmacı karbosulfan ve karbosulfanın hidrolizi ile oluşan karbofuran toksisitesinin sistemik etkilerini göstermek için çalışmalar yapmışlardır^(7,10,11,12,13). Ancak karbosulfanın uzun süren ve yoğun işlerdeki maruziyetinin antioksidan sistem üzerine etkisi bilinmemektedir. Serbest oksijen radikalleri (SOR) aerobik organizmalar tarafından normal hücre fonksiyonlarında üretilebilirler. Serbest oksijen radikallerinin fazla miktarda üretilmeleri ise oksidatif stres durumunu oluşturur. Karbomat insektisitlerinin oksidatif stres oluşturmak üzere serbest radikal oluşumunu uyardığı düşünülmektedir^(14,15). Karbomat toksisitesi serbest radikal oluşumunun dışında lipit peroksidasyonu ile de oluşur^(16,17). Hücresel antioksidanlardan redukte glutatyon (GSH) ve süper oksit dismutaz (SOD), bir grup kapsamlı defans mekanizması ile serbest radikal oluşumunu önleyici ve onların zararlı etkilerini sınırlayıcı etki gösterirler^(18,19). Serbest radikaller aracılı oluşan hücre zarı lipit oksidasyon ile malondialdehit (MDA) gibi pek çok istenmeyen lipit peroksidasyon ürünleri oluşur⁽²⁰⁾. Karbosulfan tarımda pamuk bitkisi ve meyve bahçelerinde soğuk aerosol şeklinde kullanılması ve tarım çalışanlarının karbosulfan kullanımında yeterince korunmamalarından dolayı, bu çalışmada karbosulfanın kronik toksik etkisini değerlendirmeyi planladık. Bu amaçla deneysel olarak inhalasyon yolu ile kronik karbosulfana maruz bırakılan sıçanların kan ve karaciğer dokularında toksik hasarın göstergesi olarak SOD, GSH ve MDA ölçümü yapılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Kimyasallar

Karbosulfan, [2,3-dihidro-2,2-dimetil-benzofuran-7-il (dibutilaminotiyo) metil-karbamat] asetil asetatta 60°C ta stabil kahverengi, viskoz bir sıvıdır. Çalışma için formülasyon hali (Marshal 25 EC, Hektas) yetkili tarım ilaçları satış temsilciliğinden temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan bütün kimyasallar analitik kalitededir.

2.2. Deneysel Hayvanları

2.2.1. Deneysel Hayvanlarının Diyet ve Barınması

Yetişkin 250 gr erkek sıçanlar Çukurova Üniversitesi TIBDAM'dan (Tıbbi Deneysel Araştırma Merkezi) temin edilmiştir. Deneysel hayvanları maksimum 5 sıçan/kafes olmak üzere çelik kafeslerde optimal ısı ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), nem ($50 \pm 10\%$) ve ışık (12 saat gündüz/12 saat gece döngüsü) kontrollü odalarda muhafaza edilmiştir. Hayvanlara standart yem ve çeşme suyu verilmiştir. Laboratuvar koşullarına adaptasyon sağlamak amacı ile sıçanlar deney başlamadan önce 7-10 gün kadar bu ortamda bulundurulmuştur.

2.2.2. Deneysel Çalışma ve İlaç Uygulanması

Karbosulfan uygulaması yapılacak odanın mikrobiyolojik temizliği, ısısı, nemi, havalandırması ve ışık kontrolü tam olarak düzenlendi. Karbosulfan solüsyonu 10cc dilüsyon serum fizyolojikte dilue edildi. Bu dilüsyon her uygulamadan önce taze olarak hazırlandı. Karbosulfan LC50'nin (1-53 ppm) 1/20 LC50 ve 1/10 LC50 olmak üzere iki ayrı konsantrasyonu inhalasyon yolu ile 45 gün 30dak/gün olarak püskürtme sistemi ile odada uygulandı. O₂ ve CO₂ saturasyonu analiz edildi ve O₂ saturasyonu %21 ve CO₂ saturasyonu %0.05 olmak üzere uygulama sırasında sabitlendi.

Kontrol grubuna serum fizyolojik (Grup A; n=4) ikinci gruba 1/20 LC50 karbosulfan (Grup B; n=9) üçüncü gruba ise 1/10 LC50 (grup C n=9) olmak üzere inhalasyon yolu ile 45 gün 30dak/gün uygulama yapıldı. 46. gün sıçanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edilerek tam kan ve karaciğer dokuları biyokimyasal incelemeler yapılmak üzere alındı.

2.3. Örneklemeler

2.3.1. Karaciğer Homojenatının Hazırlanması

0,5 g sıçan karaciğer dokuları 10 mm fosfat tamponuyla (pH: 7.0) buz ile çevrelendirilerek homojenize edildi. Daha sonra homojenat 14.000 g de + 4°C ta 30 dk santrifüj edildi. Süpernatant GSH, MDA düzeyleri ve SOD enzim aktivitesi ölçülmek üzere ayrıştırıldı.

2.3.2. Hemolizat Hazırlanması

Şıçanlardan intrakardiyak kan örnekleri alındı ve EDTA'lı tüplere konuldu. Tam kan örneklerinde GSH düzeyleri tayin edildi. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri santrifüj edildikten sonra, plazmada MDA miktarı, eritrositlerde ise SOD enzim aktiviteleri ölçüldü.

2.4. Biyokimyasal Analizler

2.4.1. Glutatyon (GSH) düzeyinin ölçümü

GSH düzeyi, deproteinize edilen eritrosit hemolizatındaki glutatyonun 5,5.-ditiobis-(2- nitrobenzoik asid) (DTNB) varlığında, 412 nm.de absorpsiyon yapan indirgenmiş sarı renkli kromojen oluşturmasına dayanır⁽²¹⁾.

2.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD enzimi, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit (H₂O₂) ve moleküler oksijene (O₂) dismutasyonunu hızlandırır. Yöntemde, ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) kullanılarak 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (INT) ile tepkimeye

giren ve kırmızı renkli formazon boyası oluşturan süperoksit radikalleri üretilmektedir. Enzim aktivitesi ölçümü ise reaksiyonun 505 nm'de ortamda bulunan SOD enzimi ile inhibisyonuna dayanır⁽²²⁾.

2.4.3. Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olarak oluşan MDA'nın ölçümü aerobik şartlarda pH 3,4'te 95°C'de tiyobarbitirik asit (TBA) ile inkubasyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm'de absorbans ölçümü esasına dayanır⁽²³⁾.

2.5. İstatistiksel Analizler

SOD, GSH ve MDA karaciğer ve eritrosit değerleri Kruskal-Wallis testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Çoklu karşılaştırmalarda, anlamlılık düzeyi Benferroni confidence bound kullanılarak saptandı. Her bir karşılaştırma için $\alpha = 0,5/3 = 0,169$ kullanıldı.

3. SONUÇLAR

3.1. Klinik İncelemeler:

1/20 ve 1/10 LC50 karbosulfan uygulaması ile seyirme, konvülziyon, salivasyon, çiğneme hareketleri ve titreme gibi toksik belirtiler gözlenmedi.

3.2. Biyokimyasal Parametreler

Karbosulfan 1/20 ve 1/10 LC50 dozları inhalasyon ile uygulandıktan sonra SOD enzim aktivitesi GSH ve MDA düzeyleri saptanmıştır.

3.2.1. Karbosulfanın SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi:

Eritrosit ve karaciğer SOD enzim aktiviteleri Tablo1 ve tablo 2 de verilmiştir. Karbosulfan uygulanması ile SOD enzim aktivitesinde hem karaciğer hem de eritrositlerde doza bağlı artış gözlenmiştir. Ancak bu her iki artış da istatistiksel olarak anlamlı değildir.

3.2.2. Karbosulfanın GSH Düzeyi Üzerine Etkisi

Karbosulfan uygulanması hem eritrosit hem de karaciğer GSH miktarında doza bağlı bir azalma gözlenmiştir. GSH düzeyindeki bu azalma karaciğerde [1/20 LC50 karbosulfan ($p = 0,011$); 1/10, LC50 karbosulfan ($p = 0,003$)] istatistiksel olarak anlamlı iken; eritrositlerde ise istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

3.2.3. Karbosulfanın MDA Düzeyi Üzerine Etkisi:

Hem plazma hem de karaciğer düzeyinde 1/20 ve 1/10 LC50 karbosulfan dozunda MDA düzeyinde ciddi bir artış gözlenmiştir. Ancak bu artış sadece karaciğer dokularında her iki dozda sırası ile $p = 0,011$ ve $p = 0,016$ olmak üzere istatistiksel olarak anlamlıdır.

4. TARTIŞMA

Karbosulfana maruziyet ile antioksidan kapasitesi arasındaki ilişkinin ölçümü ile ilgili deney hayvanları ile planlanan çalışmaların az olmasından dolayı bu çalışmada bulunan sonuçlar diğer karbamat türevleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. GSH ve SOD hücreleri serbest radikallerin olumsuz etkilerinden koruyan hücresel antioksidanlardır. Bu çalışmamızda SOD enzim aktivitesi sadece eritrositlerde yükselmiştir. SOD süperoksit radikallerini daha az toksik olan

Sonuçlar, ortalama \pm SD olarak verilmiştir. Gruplarda bulunan denek sayısı parantez içinde bildirilmiştir. MDA, malondialdehit; GSH, redükte glutatyon; SOD, süperoksit dismutaz; SD, Standart sapma; Hb, Hemoglobin. a İstatistiksel anlamlı farklılık bulunmaktadır, $p < .05$; b İstatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

Tablo 1. Eritrositlerde GSH ve SOD değerleri ile plazma MDA miktarı

Gruplar	GSH ($\mu\text{mol/g Hb}$)	SOD (U/ g Hb)	MDA (nmol/ml)
A (n=4)	3,95 \pm 0,33	1064,3 \pm 307,1	6,48 \pm 2,76
B (n=9)	3,80 \pm 0,30 ^b	1236,6 \pm 374,0 ^b	8,76 \pm 1,75 ^b
C (n=9)	3,50 \pm 0,10 ^b	1383,3 \pm 142,6 ^b	11,36 \pm 1,20 ^b

Sonuçlar, ortalama \pm SD olarak verilmiştir. Gruplarda bulunan denek sayısı parantez içinde bildirilmiştir. U, spesifik aktivite; a İstatistiksel anlamlı farklılık bulunmaktadır, $p < .05$, b İstatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

Tablo 2. Karaciğer dokularında GSH ve MDA düzeyleri ile SOD enzim aktivitesi

Gruplar	GSH ($\mu\text{mol/yaş ağırlık}$)	SOD (U/yaş ağırlık)	MDA (nmol/yaş ağırlık)
A (n=4)	0,002 \pm 0,0003	71,35 \pm 16,10	7,51 \pm 5,59
B (n=9)	0,0006 \pm 0,0004 ^a	92,43 \pm 39,20 ^b	10,12 \pm 1,42 ^a
C (n=9)	0,0005 \pm 0,0001 ^a	94,38 \pm 34,80 ^b	14,08 \pm 5,39 ^a

ve katalaz enzimi ile hidrolizlenebilen hidrojen peroksitine dönüştürülür⁽²⁴⁾.

SOD enzim aktivitesindeki doza bağlı artış karbamat toksisitesi ile indüklenen serbest radikal üretimine bağlı olabileceği Banerjee ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda da belirtilmiştir^(16,25). GSH değerleri; hem eritrosit hem de karaciğerde doza bağlı olarak azalmıştır. Karaciğerin ksenobiyotik metabolizmasındaki major organ olduğu bilinmektedir. Bundan dolayı; GSH tüketimi karbosulfanın detoksifikasyon işlemi ile ilişkili olarak değerlendirilebilir. Banerjee ve ark. yaptıkları çalışmada karbamat insektisitleri ile GSH miktarının azaldığını gözlemişlerdir^(16,25). Della ve ark. yedi farklı pestisit ile yaptıkları çalışmada GSH'ın tüketildiğini gözlemişlerdir⁽²⁶⁾. MDA; çoklu doymamış yağ asitlerinin nonlipofilik peroksidasyon ürünlerinden birisidir. MDA, oksidatif stres ile oluşan lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada; karbosulfana maruz bırakılan sıçanları kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında hem plazma hem de karaciğer MDA düzeylerinde artış saptanmıştır. Karbamat ile artan lipit peroksidasyonu diğer çalışmalarda da gözlenmiştir^(16,25). Lipit peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan MDA'nın atışı ve önemli bir antioksidan olan GSH'ın tüketimi ile SOD enzim aktivitesinin artışı karbosulfanın antioksidan sistem üzerine olumsuz etkisinin olduğunu ve serbest radikal üretimini arttırdığını düşündürmektedir. Sonuç olarak karbosulfanın kullanımının sınırlı, dikkatli ve yetkili kişiler tarafında uygulanması önerilmektedir.

5. KAYNAKLAR

1. <http://www.hm.saglik.gov.tr/>
2. WHO Environ Health Criteria 78. Dithiocarbamate Pesticides, Ethylenethiourea and Propylenethiourea: A general introduction, World Health Organization, Geneva, 1988, 15-65.
3. Coleman AM, Smith A, Watson L: Occupational carbamate pesticide intoxication in three farm workers. Implications and significance for occupational health in Jamaica. *West Indian Med J* 1990;39:109-113.
4. Colvin BM: Pesticide used and animal toxicoses. *Vet Hum Toxicol Suppl* 1987;2:15.
5. Schuh J, Bleakley B: Insecticide poisoning of cattle by ingestion of treated of canola seed. *Can Vet J* 1988;29:58-59.
6. Tsao TCY, Juang YC, Lan RS, Shieh WB, Lee CH: Respiratory failure of acute organophosphate and carbamate poisoning. *Chest* 1990; 98:631-639.
7. Gupta RC, Goad JT, Kadel WL: Protection and reversal by memantine and atropine of carbofuran-induced changes in biomarkers. *Drug Development Res* 1993; 28: 153-160.
8. Cambon C, Declume C, Derache R: Effect of the insecticidal carbamate derivates (carbofuran, primicarb, aldicarb) on the activity of acetylcholinesterase in tissues from pregnant rats and fetuses. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979; 49: 203-208.
9. Tobin JF: Carbofuran. A new carbamate insecticide. *J Occup Med* 1970;12: 16-19.
10. Gupta RC, Goad JT, Kadel WL: Invivo alterations in lactate dehydrogenase (LDH) and LDH isoenzymes patterns by acute carbofuran intoxication. *Arch Environ Contam Toxicol* 1991; 21: 263-269.
11. Gupta RC, Goad JT, Kadel WL: Carbofuran-induced alterations (invivo) in high-energy phosphates, creatinekinase (CK), and CK isoenzymes. *Arch Toxicol* 1991; 65: 304-310.
12. Gupta RC, Goad JT, Kadel WL: Invivo acute effects of carbofuran on protein, lipid, and lipoproteins in rat liver and serum. *J Toxicol Environ Health* 1994; 42: 451-462.
13. Gupta RC, Goad JT, Kadel WL: Cholinergic and noncholinergic changes in skeletal muscles by carbofuran and methyl paration. *J Toxicol Environ Health* 1994; 43: 291-304.
14. Seth V, Banerjee BD, Bhattachanya A, Chakraborty AK. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and glutathione redox system in blood of human poisoning with propoxur. *Clin. Biochem.* 2000; 33:683.
15. Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. Pesticide induced oxidative stress: Perspective and trends. *Rev. Environ. Health* 2001; 16:1-40.
16. Yarsan F, Tanyüksel M, Celik S, Aydin A. Effect of aldicarb and malathion on lipid peroxidation, *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 1999; 63: 575.
17. Banerjee BD, Seth V, Bhallacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. *Toxicol. Lett.* 1999; 33: 107.
18. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 176
19. Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999; 202-226.
20. Halliwell B. Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J med* 1991; 91 (suppl 3 C): 14S-22S.
21. Beutler E. Red cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods. Grune & Stratton, New York, 1975; 112.
22. McCord JM, Fridovich I Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.
23. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:352-358.
24. Warner HB. Superoxide dismutase, aging and degenerative disease. *Free radical biology and medicine* 1994 17(3) .249-258.
25. Seth V, Banerjee BD, Chakraborty AK. Lipid peroxidation, free radical scavenging enzymes, and glutathione redox system in blood of rats exposed to propoxur. *Pesticide Biochemistry and physiology* 2001; 71: 133-139.
26. Della MR, Villani GR, Martino FD, Squillacioti C, Marco LD, Vuotto P, Belisario MA, Staiano NDS. Glutathione depletion induced in rat liver fractions by seven pesticides. *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1994.70 185.