

**AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS DE
DITIOCARBAMATOS E ETILENOTIOURÉIA (ETU)
EM FRUTA E SUA IMPLICAÇÃO
NA SAÚDE PÚBLICA**

VERA REGINA ROSSI LEMES

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Departamento de
Saúde Ambiental da Faculdade de
Saúde Pública da Universidade
de São Paulo para obtenção do
Grau de Mestre.

Área de concentração:
Saúde Ambiental

**ORIENTADOR: PROF. DR.
SÉRGIO COLACIOPPO**

São Paulo
2003

44431/2003 cg

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data:

A Deus.

Ao meu pai Orlando Lemes (*in memorium*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Sérgio Colacioppo, pela orientação, ensinamentos e confiança.

Ao Diretor do Instituto Adolfo Lutz, Cristiano Correa de Azevedo Marques, ao Diretor da Divisão de Bromatologia e Química, Dr. Odair Zenebon e ao Diretor do Serviço de Química Aplicada, Paulo Tiglea, por autorizarem a minha participação no curso de pós-graduação e a realização da parte experimental no Instituto Adolfo Lutz, e pela amizade e incentivo.

À Heloísa Helena Barretto de Toledo, Chefe da Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz, pelos ensinamentos durante toda a minha vida profissional e pela amizade, confiança e apoio.

À Tereza Atsuko Kumumi e ao Felipe Senra do Valle, pela colaboração na realização das análises, pela amizade e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Resíduos de Pesticidas do Instituto Adolfo Lutz, pela compreensão.

À minha família e amigos, pelo carinho e paciência.

RESUMO

Lemes, V.R.R. **Avaliação de resíduos de ditiocarbamatos e etilenotiouréia (ETU) em fruta e sua implicação na saúde pública. São Paulo, 2003** [Dissertação de Mestrado Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].

Etilenotiouréia (ETU) é uma substância tóxica, formada pela degradação e/ou biotransformação dos fungicidas etilenobisditiocarbamatos (EBDC), razoavelmente estável, solúvel em água e pode representar um risco à população consumidora de frutas e outros alimentos. Apresenta evidência suficiente para carcinogenicidade em animais e evidência inadequada para carcinogenicidade em seres humanos. Os objetivos deste estudo foram: estudar e validar métodos analíticos para determinação de resíduos de ditiocarbamatos e de ETU em mamão; determinar os resíduos remanescentes de aplicação de EBDC (mancozebe) em culturas de mamão da espécie *Carica papaya L* e de seu metabólito ETU; determinar a dissipação desses resíduos, dias após a aplicação de mancozebe; avaliar os teores encontrados e o risco à saúde da população. A determinação de ditiocarbamatos foi feita por espectrofotometria e a de ETU, por cromatografia a líquido de alta eficiência. Foram analisadas amostras tratadas e não tratadas (testemunhas) com mancozebe, procedentes de três localidades representativas da cultura de mamão: Lins-SP, Linhares-ES, Extremo sul da Bahia. Os métodos analíticos avaliados apresentaram resultados satisfatórios. As recuperações variaram de 70 a 110 % para mancozebe e de 80 a 110 % para ETU, com coeficientes de variação de 4,8 a 13,2 % para mancozebe e de 3,7 a 13,3 % para ETU, dependendo do nível fortificado. O limite de quantificação do método foi de 0,5 mg/kg para mancozebe, e 0,01mg/kg para ETU. Todas as amostras tratadas com mancozebe apresentaram resíduos de ETU que variaram de 0,01mg/kg a 0,32 mg/kg. Os níveis de mancozebe variaram de 0,5 mg/kg a 2,1 mg/kg. No estudo de dissipação os valores de resíduos de mancozebe permaneceram praticamente inalterados enquanto que os níveis de ETU decaíram de 0,14 mg/kg para 0,04 mg/kg após 12 dias da aplicação. A estimativa da ingestão de resíduos de mancozebe e ETU pelo consumo de mamão foi de 1,0% e 0,7% da Ingestão Diária Aceitável (IDA), respectivamente. A presença de níveis de ETU em mamão alerta para a necessidade do conhecimento dos níveis presentes nos alimentos consumidos pela população.

Descritores: Etilenotiouréia, Etilenobisditiocarbamatos, Mancozebe, Ditiocarbamatos, Agrotóxicos, Alimentos, Mamão, Saúde Pública, Meio Ambiente.

SUMMARY

Lemes, V.R.R. Evaluation of dithiocarbamate and ethylenethiourea (ETU) residues in fruit and their implication for public health. São Paulo, 2003. [MSc Dissertation – Faculty of Public Health, University of São Paulo]

Ethylenethiourea (ETU) is a degradation and/or biotransformation toxic substance from ethylene-bisdithiocarbamate (EBDC) fungicides. It is reasonably stable, has high solubility in water and may represent a risk to populations consuming fruits and other foods. Sufficient evidence is available to indicate that it is carcinogenic in animals, but the evidence is inadequate for human beings. This study had the objective studying and validating analytical methods for determining dithiocarbamates and ETU levels in papaya; determining the levels of remaining residues of EBDC (mancozeb) from applications to papaya species *Carica papaya L.* cultivations and its metabolite ETU; determining the dissipation of these residues days after the application of mancozebe; and assessing the levels encountered and the risk to public health. The utilized method for determining the dithiocarbamates levels was spectrophotometry and determining ETU was high performance liquid chromatography. The samples were collected from three localities that are representative of papaya cultivation: Lins (São Paulo), Linhares (Espírito Santo) and the extreme south of Bahia. The analytical methods assessed presented satisfactory results. The range of the recovery studies was from 70 to 110% for mancozeb, and from 80 to 110% for ETU. Depending on the level fortified, the coefficients of variation ranged from 3.7 to 13,3% for ETU and from 4,8 to 13,2% for mancozeb. The quantification limit for the method was 0.5 mg/kg for mancozeb and 0.01 mg/kg for ETU. All samples treated with mancozeb presented ETU residues ranging from 0.01 mg/kg to 0.32 mg/kg. The mancozeb levels ranged from 0.5 mg/kg to 2.1 mg/kg. In the dissipation study, the amounts of mancozeb residue remained practically unaltered, while the ETU levels fell from 0.14 mg/kg on the day of treatment to 0.04 mg/kg 12 days later. The contribution of the estimated mancozeb and ETU ingestion to the Acceptable Daily Ingestion (ADI) was 1,0% and 0.7%, respectively. Knowing that ETU is present in papaya serves as a warning for the need for knowledge of the levels present in foods consumed by the public.

Descriptors: Ethylenethiourea, Ethylene-bisdithiocarbamate, Mancozeb, Dithiocarbamate, Pesticides, Foods, Papaya, Public health, Environment.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sucessão de gerações de inseticidas e/ou acaricidas e fungicidas.	02
Tabela 2	Distribuição por classe de agrotóxicos em número e percentagem (%) de ingrediente ativo em linha de comercialização, nos anos de 1992 e 2002, e aumento do número de ingredientes ativos em número e percentagem (%), no período.	03
Tabela 3	Características físico-químicas dos dimetilditiocarbamatos.	06
Tabela 4	Características físico-químicas dos etilenobisditiocarbamatos.	07
Tabela 5	Características físico-químicas do metam sódio e do propinebe.	08
Tabela 6	Distribuição da quantidade de formulações de agrotóxicos em linha de comercialização nos anos de 1992 e 2002 e as respectivas variações.	15
Tabela 7	Alguns estudos de toxicidade dos EBDC e ETU em mamíferos.	20
Tabela 8	Estudos de toxicidade de etilenobisditiocarbamatos (mancozebe, manebe e zinebe) e dos produtos de degração ETU e EU em peixe, crustáceo, algas e bactérias.	21
Tabela 9	Limites Máximos de Resíduos de ditiocarbamatos permitidos no Brasil e os estabelecidos pelo Codex Alimentarius, nas diferentes culturas de frutas.	28
Tabela 10	Limites Máximos de Resíduos de ditiocarbamatos permitidos no Brasil e os estabelecidos pelo Codex Alimentarius, nas diferentes culturas de vegetais, exceto frutas.	29
Tabela 11	Limites Máximos de Resíduos de ditiocarbamatos permitidos no Brasil e os estabelecidos pelo Codex Alimentarius, nas diferentes culturas de cereais e outras.	30

Tabela 12	Trabalhos publicados relativos à determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alimentos pelo método espectrofotométrico.	43
Tabela 13	Trabalhos publicados relativos à determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alimentos por métodos cromatográficos.	44
Tabela 14	Trabalhos publicados relativos à determinação de resíduos de ETU em alimentos por métodos por cromatografia a gás.	48
Tabela 15	Trabalhos publicados relativos à determinação de resíduos de etilenotiouréia (ETU) em alimentos por métodos por cromatografia a líquido de alta eficiência.	51
Tabela 16	Número de amostras para realização dos ensaios de conformidade de validação.	60
Tabela 17	Número de amostras de campo para determinação de resíduos etilenobisditiocarbamato (mancozebe) e etilenotiouréia de acordo com o tratamento e procedência.	61
Tabela 18	Número de amostras de campo para estudo de dissipação de etilenobisditiocarbamato (mancozebe) e etilenotiouréia, Lins-SP.	62
Tabela 19	Distribuição dos resultados das recuperações de ETU, desvio-padrão e coeficiente de variação de acordo com o nível de fortificação.	84
Tabela 20	Distribuição dos resultados das recuperações de mancozebe, desvio- padrão e coeficiente de variação de acordo com o nível de fortificação	85
Tabela 21	Risco de ingestão de mancozebe através do consumo de mamão, em % IDA.	89
Tabela 22	Estimativa da Ingestão Diária Máxima Teórica de EBDC (Portaria10)	91

Tabela 23	Estimativa da Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT) de ditiocarbamatos, pela estimativa de consumo de frutas e LMR estabelecidos pelo uso de EBDC de acordo com a Resolução nº 165, em vigor desde 02/09/03.	92
Tabela 24	Estimativa da Ingestão Diária Máxima Teórica de Ditiocarbamatos, pela estimativa de consumo de outros alimentos, exceto frutas, e LMR estabelecidos pelo uso de EBDC de acordo com a Resolução nº 165 em vigor desde 02/09/03.	93
Tabela 25	Estimativa da Ingestão Diária Máxima Teórica de ditiocarbamatos, pela estimativa de consumo de outros alimentos, exceto frutas, e LMR estabelecidos pelo uso de tiram e propinebe de acordo com a Resolução nº 165 em vigor desde 02/09/03.	94
Tabela 26	Ingestão Diária Máxima Teórica de EBDC para frutas e outros alimentos, calculadas pela Portaria 10 e Resolução 165 (atual).	94
Tabela 27	Comparação da Ingestão Diária Máxima Teórica de etilenobisditiocarbamato com a Ingestão Diária Aceitável.	96
Tabela 28	Comparação dos valores calculados de ETU, baseados na conversão de mancozebe e manebe para ETU, com a IDA.	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Decomposição de EBDC e ETU por via metabólica.	10
Figura 2	Produtos de reações de ETU em sistemas biológicos e não biológicos	14
Figura 3	Cultura de mamão.	34
Figura 4	Mamão <i>Carica Papaya L</i> , maduro.	35
Figura 5	Esquema da montagem da vidraria para decomposição de ditiocarbamatos e destilação do CS ₂ formado	76
Figura 6	Cromatograma da solução-padrão de ETU (190,4 ng) em HPLC/UV.	82
Figura 7	Cromatograma do branco da análise em HPLC/UV.	82
Figura 8	Cromatograma da amostra testemunha de mamão em HPLC/UV.	82
Figura 9	Cromatograma da amostra de mamão fortificada ETU (0,12mg/kg) em HPLC/UV.	82
Figura 10	Curva de calibração de ETU	83
Figura 11	Curva de calibração de CS ₂	83
Figura 12	Cromatograma de uma amostra de mamão tratado com mancozebe.	86
Figura 13	Resultado do estudo de resíduos de EBDC (mancozebe) e etilenotiouréia nas amostras de mamão tratado com mancozebe, tratamento 1 (160g ia/ha), de acordo com a procedência.	87
Figura 14	Resultado do estudo de resíduos de EBDC (mancozebe) e etilenotiouréia nas amostras de mamão tratado com mancozebe, tratamento 2 (320 g ia/ha), de acordo com a procedência.	87
Figura 15	Resultado do estudo de dissipação dos resíduos de EBDC (mancozebe) e etilenotiouréia nas amostras de mamão tratado com mancozebe, tratamento 1 (160 g i.a/ha), realizado em Lns-SP.	88

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Agrotóxicos	01
1.2	Ditiocarbamatos	05
1.2.1	Dimetilditiocarbamatos (DMDC)	06
1.2.2	Etilenobisditiocarbamatos (EBDC)	07
1.2.3	Outros ditiocarbamatos	08
1.3	Degradação dos etilenobisditiocarbamatos (EBDC)	09
1.4	Etilenotiouréia (ETU)	11
1.4.1	Absorção, distribuição e produtos de degração e/ou transformação de ETU em sistemas biológicos e não biológicos	11
1.5	Toxicidade dos ditiocarbamatos	15
1.5.1	Parâmetros relativos à classificação toxicológica	15
1.5.2	Efeitos tóxicos dos ditiocarbamatos sobre a saúde humana	16
1.5.3	Efeitos tóxicos dos ditiocarbamatos sobre o meio ambiente	17
1.6	Efeitos tóxicos dos EBDC e de etilenotiouréia sobre a saúde humana e o ambiente	18
1.6.1	Estudos relacionados à toxicidade de EBDC e etilenotiouréia	19
1.6.2	Estudos relacionados com a exposição humana a EBDC e/ou à ETU	22
1.6.3	Estudos de revisão sobre EBDC e ETU	23
1.7	Resíduos de agrotóxicos nos alimentos	24
1.7.1	Legislação e normas referentes ao registro e avaliação de agrotóxicos	25
1.7.2	Legislação e normas referentes aos Limites Máximos de Resíduos (LMR) de agrotóxicos nos alimentos	26

1.7.3	Limites Máximos de Resíduos (LMR) de ditiocarbamatos nos alimentos	31
1.7.4	Estudos sobre resíduos de agrotóxicos em alimentos	31
1.7.5	Estudos de métodos para minimizar ou remover os resíduos	32
1.8	A cultura de mamão	33
1.8.1	Características do mamoeiro	33
1.8.2	Mamão (<i>Carica Papaya L</i>)	35
1.8.3	Hábitos de consumo	36
1.8.4	Mercado	36
1.8.5	Principais doenças que afetam o mamoeiro	37
1.9	Prevenção de risco à saúde	38
1.9.1	A importância do controle dos níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos	38
1.9.2	Prováveis riscos ao meio ambiente	41
1.10	Métodos para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alimentos: levantamento bibliográfico e considerações	42
1.10.1	Métodos espectrofométricos	42
1.10.2	Métodos por cromatografia gasosa	43
1.10.3	Métodos por HPLC – cromatografia a líquido de alta eficiência	45
1.11	Métodos para determinação de resíduos de etilenotiouréia em alimentos: levantamento bibliográfico e considerações	46
1.11.1	Métodos por cromatografia gasosa	46
1.11.2	Métodos por HPLC - cromatografia a líquido de alta eficiência	49
2	OBJETIVOS	53
2.1	Objetivo Geral	53
2.2	Objetivos Específicos	53

3	MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1	Objeto ou matriz de estudo – Mamão espécie <i>Carica Papaya L.</i>	54
3.1.1	A escolha da matriz de estudo	54
3.1.2	Escolha e localização das áreas de estudo	55
3.1.3	Método para aplicação da substância teste (mancozebe)	56
3.1.4	Método de amostragem	56
3.1.5	Acondicionamento, identificação, transporte e armazenamento de amostras	57
3.1.6	Cuidados para evitar contaminação	58
3.1.7	Amostras	58
3.1.8	Número de amostras	59
3.2	Validação de método analítico para determinação de ditiocarbamatos (CS ₂) e de etilenotiouréia em mamão	63
3.2.1	Otimização das condições analíticas	63
3.2.2	Especificidade	63
3.2.3	Limite de Detecção (LD)	64
3.2.4	Limite de Quantificação (LQ)	64
3.2.5	Estudo da faixa de linearidade de resposta do detetor	65
3.2.6	Estudos de recuperação	65
3.2.7	Exatidão	66
3.2.8	Precisão	66
3.2.9	Repetibilidade	67
3.2.10	Reprodutibilidade externa	67
3.2.11	Reprodutibilidade interna	67
3.2.12	Robustez	67

3.3	Métodos analíticos	68
3.3.1	Método para determinação de resíduos de etilenotouréia (ETU)	68
3.3.2	Método para determinação de resíduos de ditiocarbamatos	73
3.4	Avaliação de risco de exposição a EBDC e à ETU através da ingestão de alimentos	78
3.4.1	Risco de ingestão de mancozebe através do consumo de mamão	78
3.4.2	Estimativa da Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT) de EBDC	79
3.4.3	Comparação da Ingestão Diária Máxima Teórica de EBDC com a IDA	80
3.4.4	Conversão da IDMT de EBDC para ETU e comparação com a IDA	80
4	RESULTADOS	81
4.1	Resultados dos ensaios de conformidade de validação dos métodos analíticos	81
4.2	Resultados dos estudos de resíduos de mancozebe e de seu metabólito ETU	86
4.3	Resultados dos estudos de dissipação de mancozebe e de seu metabólito ETU	88
4.4	Resultados da avaliação de risco de exposição a EBDC e à ETU através da ingestão de alimentos	89
4.4.1	Risco de ingestão de mancozebe através do consumo de mamão	89
4.4.2	Resultados da estimativa da Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT) de EBDC	90

4.4.3	Comparação da Ingestão Diária Máxima Teórica de EBDC com a IDA	95
4.4.4	Conversão da IDMT de EBDC para ETU e comparação com a IDA	97
5	DISCUSSÃO	99
5.1	Métodos analíticos	99
5.2	Estudo de resíduos de mancozebe e ETU	101
5.3	Avaliação de risco pela ingestão de resíduos de EBDC e de ETU	108
6	CONCLUSÕES	111
7	RECOMENDAÇÕES	112
8	REFERÊNCIAS	113
	ANEXOS	
Anexo 1	Resultados do estudo de resíduos de mancozebe e de seu metabólito ETU nas amostras de mamão de acordo com o tratamento e localidade	A1
Anexo 2	Resultados do estudo de dissipação de mancozebe e de seu metabólito ETU, nas amostras de mamão tratado, em Lins-SP	A2

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agrotóxicos

A legislação brasileira define agrotóxicos e afins como: “produtos e agentes de processos, físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL 2002).

A presença de pragas nas culturas pode comprometer significativamente a produção de alimentos e sua qualidade tanto no campo quanto durante o transporte e armazenamento.

Os agrotóxicos podem ser classificados quanto a sua ação e ao grupo químico a que pertencem. Assim sendo, podem ser inseticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas, acaricidas e outros. Alguns grupos químicos, porém, podem apresentar vários modos de ação. Os grupos químicos de agrotóxicos mais utilizados são os organoclorados, os organofosforados, os carbamatos, os ditiocarbamatos e os piretróides.

Cronologicamente, segundo seu aparecimento e desenvolvimento, os inseticidas e/ou acaricidas e os fungicidas podem ser distribuídos segundo uma sucessão de gerações, conforme Tabela 1.

Em todas as gerações existem exemplos de inseticidas/acaricidas e fungicidas que foram e são usados intensamente no controle de pragas e doenças.

Dentre os fungicidas mais utilizados tem-se como exemplo: o oxiclureto de cobre, da primeira geração; vários fungicidas sistêmicos, da terceira geração, e os ditiocarbamatos, da segunda geração.

Tabela 1 – Sucessão de gerações de inseticidas e/ou acaricidas e fungicidas.

Gerações*	Inseticidas/Acaricidas: exemplos	Fungicidas: exemplos
1ª	Inorgânicos: Enxofre, Arsênio, Fluoretos, Orgânicos: - Vegetais: Nicotina, Piretrinas naturais; - Minerais: óleos minerais.	Enxofre: enxofre, calda sulfocálcica; Cobre: calda bordaleza, compostos fixos de cobre (oxicloreto de cobre, óxido cuproso).
2ª	Orgânicos sintéticos: - Fumigantes: Brometo de Metila, Fosfina; - Organoclorados: HCH, DDT, Heptaclor; - Organofosforados: Malation, Paration, Diclorvos, Dissulfoton; - Carbamatos: Aldicarb, Carbaril, Carbofuram; - Piretróides: Deltametrina, Permetrina.	Ditiocarbamatos: Manebe, zinebe, mancozebe, propinebe; Quinonas: cloranil, diclone; Nitrogenados heterocíclicos: captan, folpet, captafol; Aromáticos: - Fenólicos: DNOC, DINOCA, pentaclorofenol; - Nitrobenzeno halogenados: HCB, PCNB, dicloran; - Nitrilas: Clorotalonil; Guanidinas: dodine; Estanho: Trifenil Acetato de Estanho.
3ª	Microbianos: fungos, bactérias e vírus; Feromônios sexuais: Grandlure.	Fungicidas sistêmicos: Acilaninas: Ridonil; Benzimidazoles: Benomil, carbendazim, tiabendazole; Carboxamidas: Vitavax; Imidazoles: Imazalil; Organofosforados: Pirazofós, kitazin; Triazóis: Tebuconazole, propiconazole.
4ª	Hormônios juvenis: Juvabiona.	
5ª	Anti-hormônios - Vegetais: Precocenos; - Microorganismos: Lactonas.	

*Gerações: sucessão cronológica de aparecimento dos agrotóxicos
 Fonte: (BAPTISTA 1999), com adaptações.

O Brasil ocupa a terceira posição mundial no consumo de agrotóxicos, depois dos Estados Unidos e do Japão, e o oitavo lugar em uso por área cultivada (SINDAG 2003).

Em 2002, 278 ingredientes ativos e 714 formulações de agrotóxicos estavam em linha de comercialização, conforme Tabela 2, distribuídos segundo a classificação em função do modo de ação.

Tabela 2 - Distribuição por classe de agrotóxicos em número e percentagem (%) de ingrediente ativo em linha de comercialização, nos anos de 1992 e 2002, e aumento do número de ingredientes ativos em número e percentagem (%), no período.

Classes	Ingredientes ativos		Aumento do número de ingredientes ativos no período	
	1992	2002	Número	%
Herbicidas	57 (29,4%)	81 (29,1%)	24	42,1
Inseticidas	59 (30,4%)	79 (28,4%)	20	33,9
Fungicidas	43 (22,2%)	72 (25,9%)	29	67,4
Acaricidas	14 (7,2%)	16 (5,8%)	02	14,3
Outros	21 (10,8%)	30 (10,8%)	09	42,8
Total	194 (100,0%)	278 (100,0%)	84	43,3

Fonte: (SINDAG 2003), com modificação.

Comparando a variação do número de ingredientes ativos em 10 anos, observou-se que em 2002 houve um aumento de 14,3 a 67,4 % em relação a 1992, sendo que os fungicidas foram os que sofreram a maior variação, como pode ser observado na Tabela 2.

O etilenobisditiocarbamato mancozebe está entre os 12 agrotóxicos mais vendidos no Brasil, incluindo os Estados de São Paulo, Bahia e Espírito Santo. O consumo nacional de mancozebe foi de mais de 5.000 toneladas em 2000. O tiram e o manebe estão entre os 40 produtos mais vendidos, cerca de 500 toneladas cada em 2000.

Os agrotóxicos podem causar efeitos tóxicos em humanos, nos animais domésticos e silvestres, nos organismos aquáticos e ao ambiente. Os trabalhadores que manipulam esses produtos nas indústrias, os aplicadores que manuseiam e aplicam formulações de agrotóxicos nas lavouras e a população rural vizinha de plantações onde esses produtos são utilizados são os principais grupos de risco de exposição aguda. Os consumidores de alimentos, se ingerirem resíduos acima dos limites máximos de resíduos (LMR) permitidos, podem ficar sob risco de exposição crônica a agrotóxicos.

A Organização Mundial da Saúde estima que mais de 500 milhões de pessoas expõem-se aos agrotóxicos e que ocorrem anualmente 3 milhões de intoxicações severas. Destas, 1 milhão são intoxicações agudas não intencionais com 20.000 mortes por ano, e destes 70 % são por exposição ocupacional. Os efeitos crônicos são mais difíceis de serem avaliados, mas estima-se a ocorrência, em âmbito mundial, de 25.000 casos de seqüelas neuro-comportamentais, 37.000 casos de câncer e 700.000 casos de dermatoses, por ano (WHO 1988).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América do Norte (EPA) estima que ocorrem de 10.000 a 20.000 diagnósticos de intoxicação por agrotóxico no país por ano, dentre trabalhadores rurais, fumigadores e outras ocupações (WHO 2002 citado por CONCEIÇÃO 2002).

No Brasil estima-se que em torno de 15 milhões de pessoas que trabalham na agricultura estejam potencialmente expostas aos agrotóxicos em quantidades bastante significativas, e que, entre elas, ocorram de 150.000 a 200.000 intoxicações agudas anualmente, com 3.000 a 4.000 óbitos (GARCIA 2001).

O uso de equipamentos de proteção individual, adequados ao agricultor, pode reduzir em até 100% a exposição (BONSAL 1985). Porém, o uso desses equipamentos, muitas vezes é precário ou inexistente, devido a questões econômicas, e/ou culturais, à desinformação quanto ao risco e também pelo desconforto causado aos trabalhadores.

MOREIRA e col. (2002) avaliaram o impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola da região da Microbacia do Córrego de São Lourenço, Nova Friburgo, Rio de Janeiro. Nessa região o consumo de agrotóxico foi estimado em 56kg/trabalhador/ano. Na região Sudeste do Brasil o consumo de

agrotóxico está estimado em 12 kg/trabalhador/ano. Elevados níveis de contaminação humana e ambiental foram encontrados nesta região, como decorrência do uso extensivo desses agentes químicos. Os autores propõem uma abordagem integrada para avaliação de toda a dimensão do problema.

O uso generalizado e intensivo de agrotóxicos poder ocasionar a resistência de espécies combatidas às substâncias empregadas e danos em espécies não visadas. O desequilíbrio ecológico pode agravar o surgimento e proliferação de pragas e doenças e, conseqüentemente, aumentar a necessidade de uso de agrotóxicos (GARCIA 2001).

As Boas Práticas Agrícolas devem ser seguidas na aplicação do agrotóxico no campo. Elas incluem a concentração do produto, o número de aplicações, o tempo de carência ou intervalo de segurança, isto é, o prazo entre a data da última aplicação do agrotóxico e a data da colheita, entre outras, ou seja, o uso do agrotóxico de acordo com as recomendações do fabricante do produto.

1.2. Ditiocarbamatos

Ditiocarbamatos são compostos derivados do ácido ditiocarbâmico. São caracterizados por monoaminas secundárias que reagem com dissulfeto de carbono, dando dialquil ditiocarbamatos. A reação com diaminas forma grupos ditiocarbamatos: os dimetilditiocarbamatos (DMDC), como ferbam, ziram e tiram, e os etilenobisditiocarbamatos (EBDC), como mancozebe, manebe, zinebe e metiram. Todos ditiocarbamatos citados, com exceção do tiram, são derivados organometálicos (WHO 1988). Ainda há o monometildimetilcarbamato: metam sódio, e o propilenobisditiocarbamato: propinebe.

Os ditiocarbamatos são produzidos através da reação de dissulfeto de carbono (CS_2) com uma amina em condições alcalinas, podendo ocorrer, em seguida, oxidação para formar dissulfetos (por exemplo: tiram) ou precipitação, como um sal de metal pesado de composição química definida (por exemplo: ziram) ou como sal de metal pesado de natureza polimérica e definição incompleta (por exemplo: mancozebe).

Os ditiocarbamatos são usados há décadas como fungicidas na agricultura e também no cultivo de plantas ornamentais, de grama e no tratamento do solo. Na

indústria são usados como antimicrobianos em sistemas de refrigeração de água (torres e lavadores de gases), em maquinário de perfuração de petróleo e em moinhos de polpa, papel e açúcar, como aceleradores da vulcanização e antioxidantes na produção da borracha, como quelantes de metais no tratamento de efluentes e na medicina humana, por exemplo, em caso de intoxicação por níquel (WHO 1988).

Os ditiocarbamatos podem ser absorvidos pelo organismo através da pele, das mucosas e do trato respiratório e gastrointestinal.

A absorção do ferbam pela via oral, em ratos, oscila de 40 a 70% da dose administrada. Após a absorção o composto é biotransformado com formação de CO₂, que é excretado pela via pulmonar, e dimetilamina e dimetilditiocarbamato que são excretados na urina sob a forma conjugada (LARINI 1999).

1.2.1. Dimetilditiocarbamatos (DMDC)

Na Tabela 3 encontram-se algumas características físico-químicas dos dimetilditiocarbamatos.

Tabela 3 - Características físico-químicas dos dimetilditiocarbamatos.

Ditiocarbamato	Nome químico	Fórmula estrutural	Massa molecular/ Solubilidade
Ziram	Dimetilditiocarbamato de zinco	$\left[(\text{CH}_2)_2 - \text{N} - \overset{\text{S}}{\parallel} \underset{\text{S}-}{\text{C}} \right]_2^{\text{Zn}}$	-Massa molecular: 305,81 -Solubilidade: em água a 25°C: 65mg/L; relativamente solúvel em benzeno e acetona; bastante solúvel em clorofórmio e sulfeto de carbono.
Ferbam	Dimetilditiocarbamato férrico	$\left[(\text{CH}_2)_2 - \text{N} - \overset{\text{S}}{\parallel} \underset{\text{S}-}{\text{C}} \right]_3^{\text{Fe}}$	-Massa molecular: 416,51 -Solubilidade: em água a 25°C: 130mg/L; solúvel em acetona e clorofórmio.
Tiram	Bissulfeto de tetrametiltiouram	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} \quad \quad \quad \text{CH}_3 \\ \quad \backslash \quad \quad \quad / \\ \quad \quad \text{N} - \text{C} - \text{S} - \text{C} - \text{N} \\ \quad / \quad \quad \quad \backslash \quad \quad \quad / \\ \text{H}_2\text{C} \quad \quad \quad \text{S} \quad \quad \quad \text{S} \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$	-Massa molecular: 240,44 -Solubilidade: em água a 25°C: 30mg/L; pouco solúvel em etanol, éter etílico e acetona.

Fonte: WHO 1988; LARINI 1999; TOMLIN 1995.

1.2.2. Etilenobisditiocarbamatos (EBDC)

Na Tabela 4 encontram-se algumas características físico-químicas dos etilenobisditiocarbamatos.

Tabela 4- Características físico-químicas dos etilenobisditiocarbamatos.

Nome comum	Nome químico	Fórmula estrutural	Massa molecular/ Solubilidade
Mancozebe	Etilenobis-ditiocarbamato de manganês e zinco (complexo polimérico)	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} - \text{S} \\ \qquad \qquad \qquad \backslash \\ \qquad \qquad \qquad \text{Mn}]_x \text{Zn}_y \\ / \\ \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} - \text{S} \\ \parallel \\ \text{S} \end{array}$	-Massa molecular: variável; -Solubilidade: em água: 6-20mg/L; insolúvel em solventes orgânicos
Manebe	Etilenobis-ditiocarbamato de manganês	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} - \text{S} \\ \qquad \qquad \qquad \backslash \\ \qquad \qquad \qquad \text{Mn} \\ / \\ \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} - \text{S} \\ \parallel \\ \text{S} \end{array}$	-Massa molecular: 265,29; -Solubilidade: em água: insolúvel; insolúvel em solventes orgânicos.
Metiram	Complexo de amônia com zinebe e polietileno tiouram dissulfeto	$\begin{array}{c} \text{S} \qquad \qquad \qquad \text{S} \\ \parallel \qquad \qquad \qquad \parallel \\ [(-\text{S.C.NH.CH}_2\text{CH}_2.\text{NH.C.S-})^2\text{-Zn}(\text{NH}_3)_2^{2+}]_3 \\ [(-\text{S.C.NH.CH}_2\text{CH}_2.\text{NH.C.S-})]_x \\ \parallel \qquad \qquad \qquad \parallel \\ \text{S} \qquad \qquad \qquad \text{S} \end{array}$	-Massa molecular: variável; -Solubilidade: em água: insolúvel.
Zinebe	Etilenobis-ditiocarbamato de zinco	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} - \text{S} \\ \qquad \qquad \qquad \backslash \\ \qquad \qquad \qquad \text{Zn} \\ / \\ \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} - \text{S} \\ \parallel \\ \text{S} \end{array}$	Massa molecular: 275,73; Solubilidade: em água: 10 mg/L; solúvel em clorofórmio.

Fonte: WHO, 1988; LARINI 1999; TOMLIN 1995.

Etilenobisditiocarbamatos EBDC são sais orgânicos de manganês, zinco, ou zinco e sódio. São insolúveis em água e em solventes orgânicos. (MESTRES e MESTRES 1991). Podem formar polímeros (por exemplo mancozebe), especialmente na presença de alguns ions metálicos. São fungicidas sistêmicos usados no mundo todo há várias décadas. Possuem um amplo espectro de ação no controle de moléstias que atacam diversos cultivos, tais como cereais, frutas e legumes.

Na América Latina, mais de 50% de todos os fungicidas utilizados são do grupo dos EBDC e, no Brasil, o volume de fungicidas EBDC supera os 40% do total utilizado no país, representando o principal produto contra fungos.

1.2.3. Outros ditiocarbamatos

Ainda há o metam sódio que é um monometildimetilcarbamato e o propinebe. O propinebe é insolúvel em água e em solventes não polares. É metabolizado para propilenotiouréia (PTU) e não para etilenotiouréia (ETU).

Na Tabela 5 encontram-se algumas características físico-químicas do metam sódio e do propinebe.

Tabela 5- Características físico-químicas do metam sódio e do propinebe.

Ditiocarbamato (grupo químico)	Fórmula estrutural	Massa molecular/ Solubilidade
Metam sódio (Monometildimetil carbamato)	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \backslash \\ \text{N} - \text{C} - \text{S}^- \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{S} \end{array} \text{] Na}^+$	-Massa molecular: 129,18; -Solubilidade: em água a 20°C: 722 mg/L.
Propinebe (Alquilenobisditio carbamato)	$\left[-\text{S} - \overset{\text{S}}{\parallel} \text{C} - \text{NHCH}_2\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{NH} - \overset{\text{S}}{\parallel} \text{C} - \text{S} - \text{Zn} - \right]_x$	-Massa molecular: 289,90; -Solubilidade: em água a 25°C: insolúvel.

Fonte: WHO, 1988; LARINI 1999; TOMLIN 1995.

1.3. Degradação dos etilenobisditiocarbamatos (EBDC)

Etilenobisditiocarbamatos geralmente são instáveis em meio alcalino ou ácido, na presença de oxigênio, bem como em sistemas biológicos, e decompõem-se rapidamente em água. O mancozebe tem uma meia vida inferior a 1 dia em água estéril. Em meio alcalino ou ácido, decompõem-se para dissulfeto de carbono ou sulfeto de hidrogênio. A decomposição para sulfeto de hidrogênio depende da presença do grupo N-H. A liberação do dissulfeto de carbono depende da natureza química do meio da hidrólise. A quantidade de CS₂ formado é pequena em ácido acético, e próxima de 100% em ácido sulfúrico. Produtos secundários são formados através da degradação oxidativa dos EBDC (WHO 1988).

A degradação dos EBDC pode ocorrer durante a manufatura ou o armazenamento do produto formulado, na cultura após o tratamento e, principalmente, durante o processamento do alimento. Durante estocagem, processamento e cozimento a quantidade do produto principal (EBDC) decresce enquanto que a quantidade de ETU aumenta. Menos de 0,1 % de ETU pode ser formado durante a manufatura de EBDC. Sua degradação durante a estocagem depende do tempo, da umidade e da temperatura (MESTRES e MESTRES 1991). Em amostras fortificadas com mancozebe e cozidas na temperatura 92-97° C por 25 minutos houve um aumento de ETU de 45,6% em beringela, 20% em espinafre e 34% em maçã (KUMAR e AGARWAL 1991).

A mobilidade de EBDC no solo varia consideravelmente, dependendo da solubilidade de cada EBDC em água e o tipo de solo. Segundo LYMAN e LANCASTE (1974) citado por ARAÚJO (1998 p. 9), a meia-vida em solo de mancozebe na concentração de 20 mg/kg foi de 50 dias, a de 10mg/kg foi de 90 dias.

CALUMPANG e col (1993), com o objetivo de avaliar o potencial de contaminação de lençóis freáticos, estudaram o deslocamento de mancozebe e de seus produtos de degradação no solo. Concluíram que o mancozebe, se aplicado dentro das Boas Práticas Agrícolas (BPA), não contamina águas subterrâneas com resíduos remanescentes de mancozebe ou de ETU. Porém, o comportamento observado, depende das condições do solo, que apresenta rápida degradação em condições tropicais.

Os EBDC podem ser absorvidos pelo organismo através da pele, das mucosas e do trato respiratório e gastrointestinal (WHO 1988).

A decomposição metabólica dos EBDC é complexa e resulta na formação de dissulfeto de carbono (CS_2), sulfeto de hidrogênio (H_2S), etileno diamina (EDA), etileno bistiouram dissulfeto (DIDT), etileno diisocianato (EDI), etilenotiouréia (ETU), etilenotiouréia (EU) e 2-imidazole (SEIDLER e col. 1970; LYMAN 1971 *apud* WHO 1988), conforme Figura 1 (WHO 1988).

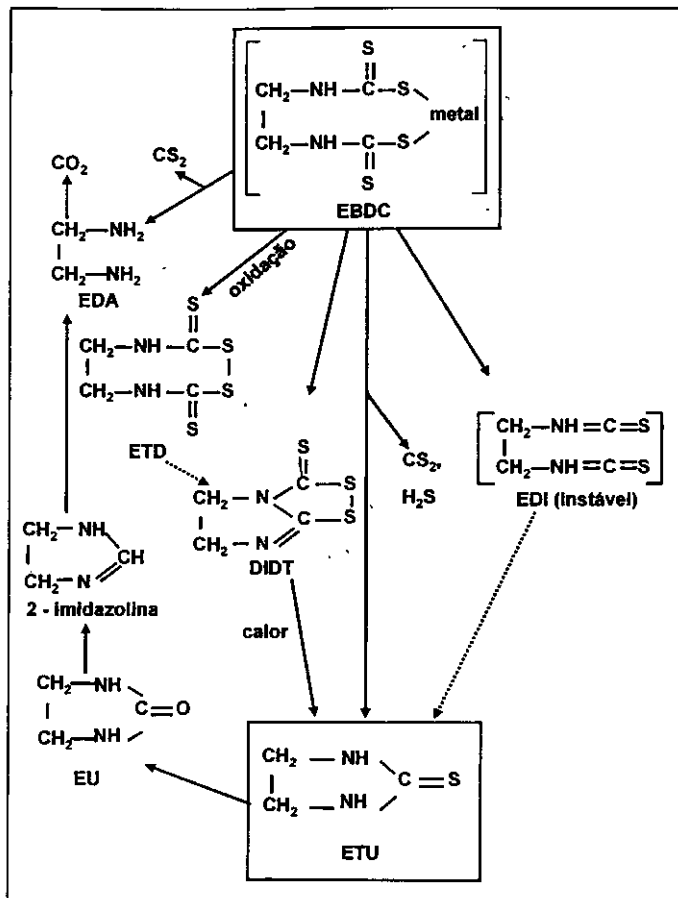


Figura 1 – Decomposição de EBDC e ETU por via metabólica.
Fonte: WHO 1988.

Os ditiocarbamatos e seus produtos de metabolização foram encontrados em certos órgãos, como fígado, rins, e, especialmente, na glândula tireóide.

Estudos em animais demonstram que o manebe, quando administrado no trato gastrointestinal, é em grande parte excretado pelas fezes (cerca de 93%) e em menor

proporção pela urina (cerca de 7%). Os seus principais produtos de biotransformação são: ETU, EBIS (5,6-didro 3 H-imidazol (2,1-C)- 1,2,4- ditiazol – 3 tiona) e DOT (4, 5 = didro – 1,3,6 – oxadiazepina – 2 – tiona) (LARINI 1999).

Em ratos, somente de 11% a 17% de uma dose oral de zinebe é absorvida pelo trato gastrointestinal. De 68% a 75% do composto, quando administrado através da dieta, é excretado nas fezes de ratos (LARINI, 1999).

Durante a exposição ocupacional, tanto os EBDC como a ETU podem ser absorvidos pelos pulmões, trato gastrointestinal e pele.

Em indivíduos expostos aos fungicidas EBDC, a excreção de ETU na urina é alta nas primeiras 60 horas, decrescendo progressivamente até três semanas (LARINI 1999).

1.4 Etilenotiouréia (ETU)

Etilenotiouréia ou 2-imidazoledinone (ETU) é uma substância formada pela degradação e/ou biotransformação dos EBDC, solúvel em água, em etanol e em metanol, razoavelmente estável em água. Resíduos de ETU são encontrados em plantas e no ambiente, seguido do uso na agricultura de EBDC, ou em animais e no ser humano quando expostos a esses produtos. Pode ser encontrada como contaminante ou metabólito em mamíferos, plantas e organismos inferiores.

1.4.1 Absorção, distribuição e produtos de degradação e/ou transformação de ETU em sistemas biológicos e não biológicos.

- **Solo, água, ar.**

ETU é fracamente adsorvida em solo, altamente móvel em solo úmido e imóvel em solo seco. Em solos biologicamente ativos é oxidada para dióxido de carbono e quatro outros produtos de degradação, dos quais foram identificados dois: a hidantoína e a “base de Jaffe”. Sua degradação para dióxido de carbono em solo não estéril foi relatada por LYMAN e LANCASTE (1974) citado por ARAÚJO (1998 p. 9).

Um estudo de laboratório sobre fotólise e hidrólise de ETU, realizado por CRUISKSHANK E JARROW (1973), demonstrou que a irradiação ultravioleta produz

etilenouréia como principal produto. ETU parece ser estável à hidrólise com variação de pH de 5,0 a 9,0 na temperatura de 90°C.

De acordo com ROSS e GROSBY (1973), a ETU parece ser estável à luz solar em solução aquosa (0,5-50ppm), mas é rapidamente fotooxidada em presença de oxigênio dissolvido e acetona ou riboflavina. Eles concluem que fotosensibilizadores naturais podem representar uma importante parcela na transformação de ETU no meio ambiente.

A ETU é razoavelmente persistente no meio ambiente, tendo sido encontrada em água de poço após seis meses da última aplicação de mancozebe (NEIL e WILLIAMS 1990).

Trabalhos de alguns países têm demonstrado uma preocupação com a possibilidade de ocorrência de ETU em água subterrânea, em rios, água de consumo humano, principalmente em áreas agrícolas onde os EBDC são utilizados, devido à relativa estabilidade e alta polaridade da ETU. (HOGENDOORN e col. 1991; VAN DER POLL e col. 1993).

JOHANNESSEN e col. (1996) estudaram a degradação de etilenotiouréia com C^{14} em superfície e subsuperfície de solo. A degradação de 0,07 mg/kg de ETU marcada com C^{14} foi determinada na superfície e subsuperfície de solo de areia grossa. A mineralização de ETU na superfície do solo foi rápida, mas houve lenta degradação de ETU na subsuperfície, o que implica em maior risco de contaminação das águas subterrâneas. A ETU pode também ser lixiviada da superfície para águas de rios e lagos.

- **Sistemas biológicos**

ETU é uma substância razoavelmente estável em relação a reações hidrolíticas, mas é facilmente oxidada para etilenouréia (EU). A oxidação para EU ocorre primordialmente em sistemas biológicos e através de reação fotolítica, especialmente na presença de fotosensibilizadores. Após irradiação ultravioleta de ETU em sílica gel, CRUICKSHANK e JARROW (1973) encontraram nove produtos de reações secundárias. 2-imidazolidinona foi identificado como o principal produto de degradação e, em menores quantidades, 3-(2-imidazolin-2-il)-2-imidazolidinona ("base de

Jaffe”). ROSS e CROSBY, 1973 relataram outros produtos de reação secundária de fotooxidação de ETU, como 2-imidazoline e glicina (WHO 1988).

Etilenouréia (EU) é considerada mais estável que ETU e pode ser considerada como o maior produto de degradação de ETU. Pode também ser oxidada fotoquimicamente, na presença de catalisador, resultando glicina e dióxido de carbono, ou microbiologicamente em solo.

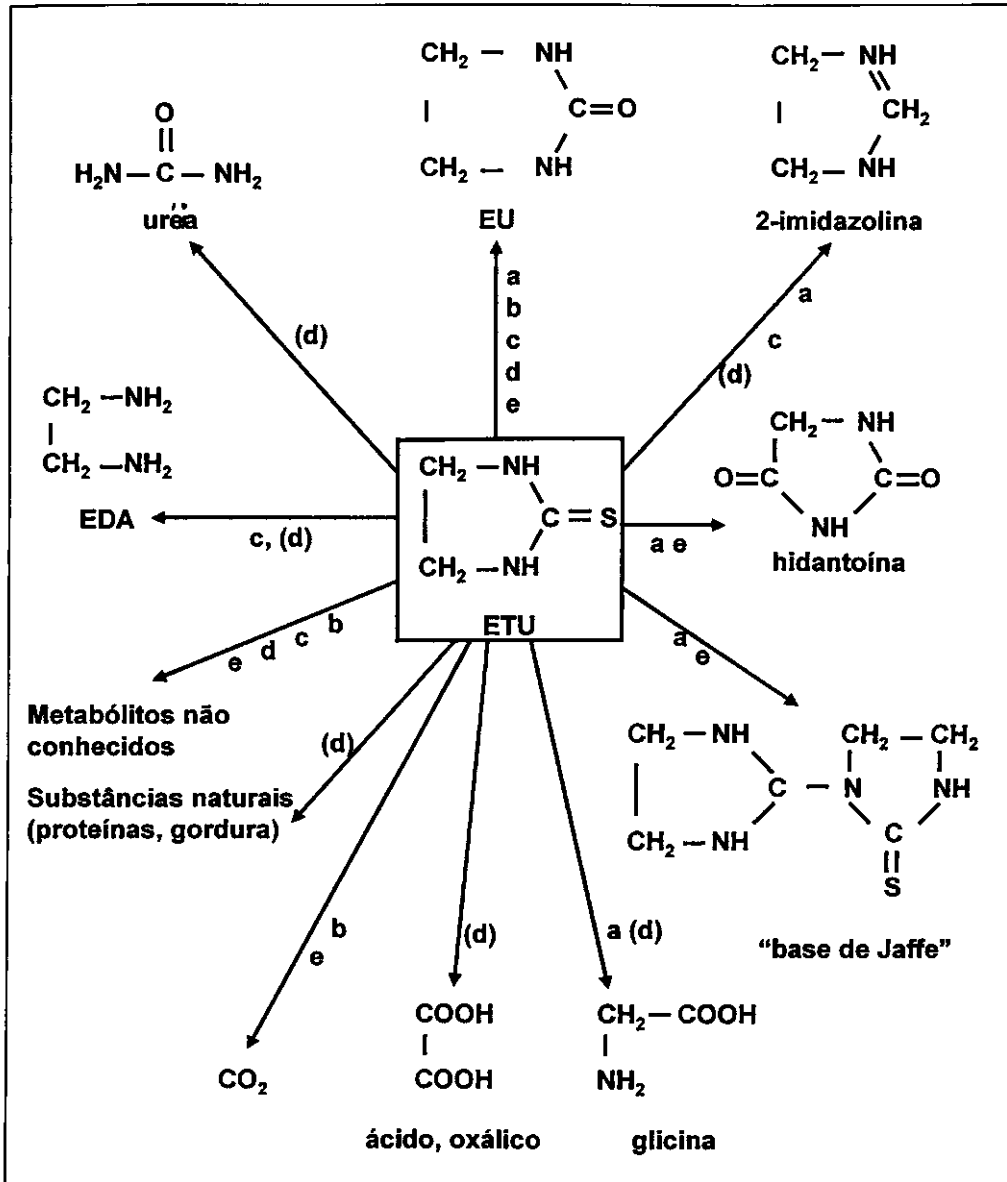
Em mamíferos, em plantas e no ambiente em geral os produtos de degradação de ETU são: etilenodiamina (EDA), uréia, dióxido de carbono, ácido oxálico, ou derivados imidazóis.

Estudos com administração de mancozebe em animais de experimentação revelaram que a maior parte da dose ingerida é eliminada inalterada pelas fezes e 15,5% é biotransformada e eliminada na urina na forma de ETU e N-acetilenodiamina. Em virtude da biotransformação dos EBDC no organismo, a ETU urinária tem sido mencionada como indicador da exposição de seres humanos a essa classe de fungicidas (KURTTIO e col. 1990; CANOSSA e col. 1993).

Em mamíferos, ETU é rapidamente absorvida, metabolizada e excretada, sendo que mais de 90% é eliminada via urina e somente uma pequena quantidade via fezes. Sua distribuição é bastante uniforme, com exceção da relativa acumulação na tireóide (WHO 1988). ETU é absorvida pelas raízes das plantas, é translocada e metabolizada, formando etilenouréia (EU), derivados: imadazole, diisocianatos, diaminas, dissulfetos e outros metabólitos ainda não conhecidos. ETU é rapidamente fotooxidada para EU na presença de fotosensibilizadores, como acetona, riboflavina.

O fígado e a tireóide são locais de acúmulo de ETU no organismo (NEBBIA e col. 1991). Microorganismos rapidamente formam ETU a partir de etileno bistiouram dissulfeto (DIDT), um produto de decomposição espontânea dos EBDC. Essa conversão também pode ser feita após adição de certos compostos de redução como cisteína, glutathiona ou ácido ascórbico. Consiste na redução da ligação S-S do DIDT, com a subsequente ligação com o dissulfeto de carbono para formar ETU (WHO 1988).

A Figura 2 apresenta produtos de produtos de reações de ETU em animais, nas plantas e no solo.



Obs: a= fotodecomposição; b= oxidação química; c= plantas; d= animais; e=solo

Fonte: WHO 1988, com modificação.

Figura 2 - Produtos de reações de ETU em sistemas biológicos e não biológicos.

1.5 Toxicidade dos ditiocarbamatos

1.5.1 Parâmetros relativos à classificação toxicológica

Do ponto de vista toxicológico os agrotóxicos podem ser mais ou menos tóxicos ao ser humano, existindo um estudo de avaliação de risco para cada princípio ativo, realizada no âmbito internacional pela FAO/OMS e por alguns países.

No Brasil, os agrotóxicos, produtos formulados ou substâncias, podem ser classificados nas classes toxicológicas de I a IV, respectivamente, para produtos extremamente, altamente, moderadamente e pouco tóxicos, definida principalmente pela Dose Letal-DL₅₀ dos produtos e outros indicadores relacionados a danos na córnea, lesões na pele e Concentração Letal Inalatória (CL₅₀) para ratos, sendo que o dado mais agravante é utilizado para classificar o produto (MINISTÉRIO DA SAÚDE 1992).

Observa-se que houve um aumento da quantidade de formulações de agrotóxicos das classes toxicológicas menos tóxicas, comparando os dados de produtos em linha de comercialização de 2002 com os de 1992, sendo que, de acordo com a Tabela 6, as formulações da classe toxicológica IV (pouco tóxicos) foram as que mais aumentaram (173,1%) no período.

Tabela 6 – Distribuição da quantidade de formulações de agrotóxicos em linha de comercialização nos anos de 1992 e 2002 e as respectivas variações.

Agrotóxicos	Quantidade de formulações comercializadas (percentual relativo ao total)		Variação no período	
	1992	2002	Quantidade	Percentagem
Classe I	101 (20,8)	121 (16,9%)	20	19,8
Classe II	175 (36%)	196 (27,5%)	21	12,0
Classe III	143 (29,4%)	214 (30,0%)	71	49,6
Classe IV	67 (13,8%)	183 (25,6%)	116	173,1
Total	486 (100%)	714 (100%)	228	46,9

Fonte: SINDAG (2003), com modificação.

O mancozebe e o manebe são classificados na classe toxicológica III como moderadamente tóxicos.

Através de estudos com animais de experimentação, informações obtidas com humanos e o peso das evidências de carcinogenicidade humana e animal, as substâncias são categorizadas em relação a carcinogenicidade como: de evidência suficiente, limitada, inadequada, sem informação e negativa.

Os resultados positivos nos testes de genotoxicidade *in vitro* são úteis como evidência de carcinogenicidade. Se uma substância induz câncer em animais, existe uma probabilidade grande de induzir câncer no ser humano, quando os processos básicos que regulam o crescimento e a diferenciação celular dos animais são similares aos dos humanos e os padrões toxicocinéticos são semelhantes.

Em relação a carcinogenicidade, ETU foi classificada pela IARC, em 1982, no grupo 2B, isto é, como de evidência suficiente para animais e evidência inadequada para seres humanos (WHO 1988).

A classificação dos agrotóxicos quanto ao potencial de periculosidade ambiental baseia-se em parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade em diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico, carcinogênico. Cada produto pode ser classificado de I a IV: altamente perigoso, muito perigoso, perigoso ou pouco perigoso, respectivamente. O mancozebe é da classe II, portanto, considerado como produto muito perigoso.

1.5.2 Efeitos tóxicos dos ditiocarbamatos sobre a saúde humana

O contato regular com os ditiocarbamatos pode causar alterações funcionais nos sistemas nervoso e hepático. A exposição dérmica pode induzir à dermatite de contato e alguns desses compostos podem causar sensibilização. As intoxicações ocorrem freqüentemente em casos de exposição desses compostos pelas vias oral e respiratória (WHO 1988).

Os ditiocarbamatos apresentam como formas de ação tóxica: geração de CS₂, quelação fisiológica de íons importantes como o cobre, sendo que apenas os etilenobisditiocarbamatos sofrem biotransformação para ETU.

A capacidade de gerar CS₂ é importante devido ao fato de CS₂ ter demonstrado causar neuropatias (SCHAUMBURG e BERGER 1992), podendo ser o agente responsável deste efeito em exposições a alguns ditiocarbamatos. Estudos *in vivo* demonstram que os dimetilcarbamatos (ziram, ferbam e tiram) podem gerar CS₂, além do EBDC (zinebe). Porém, estudos indicam que CS₂ não é o único agente responsável por produzir neuropatias. O Na-DMDC e o ferbam, embora metabolizados à CS₂ não produzem neuropatias (EPA 2001).

Alguns dos efeitos observados em estudos crônicos e subcrônicos em ratos e camundongos com ditiocarbamatos são: neuropatias (mancozebe, manebe, metiram, ziram, tiram e metam sódio), efeitos na tireóide (mancozebe, manebe, ziram e ferbam), efeitos sobre o sistema nervoso central (mancozebe, manebe, tiram e ferbam) e inibição da colinesterase (ziram e metam sódio) (EPA 2001).

1.5.3 Efeitos tóxicos dos ditiocarbamatos sobre o meio ambiente

Microorganismos do solo são capazes de metabolizar ditiocarbamatos. Os produtos formados podem afetar atividades enzimáticas e nitrificação em níveis da ordem de 10 mg/kg ou mais em solo seco (WHO 1988). Os ditiocarbamatos não são considerados fitotóxicos e em geral a sua toxicidade para mamíferos é relativamente baixa. As doses letais calculadas para animais são consideradas altas. As DL₅₀ para rato são 1.400, 4.600, > 5.200 e > 8.000 mg/kg, para ziram, manebe, zinebe e mancozebe, respectivamente (WHO 1988; MESTRES e MESTRES 1991).

Ensaio de toxicidade em animais de experimentação fornecem dados dos níveis onde são ou não observados efeitos críticos e fornecem subsídios para extrapolação de doses de referências para seres humanos.

A Ingestão Diária Aceitável (IDA) é a quantidade máxima que ingerida diariamente, durante toda a vida, parece não oferecer risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos atuais. E expressa em mg do agrotóxico por kg de peso corpóreo (mg/kg p.c.) (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003).

1.6 Efeitos tóxicos dos EBDC e de etilenotiouréia sobre a saúde humana e o ambiente

Existem diversos trabalhos na literatura sobre os possíveis efeitos tóxicos de ETU, porém ainda há polêmica em torno do assunto.

Comprovadamente, a ETU tem a capacidade de induzir tumor na tireóide de roedores e no fígado de camundongo (ELIA e col. 1995; TRIVERDI e col. 1993; YOSHIDA e col. 1993 1994).

A mudança dos níveis de hormônios da tireóide em roedores, induzida pela ETU é típica de agentes goitrogênicos, onde através da administração crônica, é interrompida a axis pituitária-tireóide, inibindo a peroxidase tireóidica, com conseqüente diminuição na circulação dos níveis de hormônio da tireóide e um aumento compensatório de secreção pela pituitária do hormônio estimulador da tireóide (TSH) (ELIA e col. 1995). Contudo, através de condições de deficiência crônica e falha no mecanismo para restabelecimento do balanço hormonal, as duas glândulas continuam a responder aos seus respectivos sinais e entram em estado de hipertrofia e hiperplasia. A pituitária continua a secretar TSH e a tireóide não pode enviar sinal de TSH interrompido por causa de sua incapacidade de secretar o TH. Eventualmente, dessa interação resulta o desequilíbrio hormonal que pode induzir à neoplasia de células foliculares na glândula tireóide e freqüentemente, neoplasia da glândula pituitária (VETORAZZI e col. 1995).

Em relação à carcinogenicidade, ETU apresenta evidência suficiente para carcinogenicidade em animais e evidência inadequada para carcinogenicidade em seres humanos (WHO 1988).

Segundo IARC (1987), JMPR-FAO/WHO (1994), a ETU é um agente não genotóxico para mamíferos. ELIA e col. (1995), ao estudarem os possíveis efeitos mutagênicos da ETU, não observaram efeito genotóxico em mamíferos, o que sugere que a ETU induz tumor hepático em camundongo por um mecanismo não-genotóxico. Porém, o papel da ETU na indução do tumor de fígado permanece não elucidado.

1.6.1 Estudos relacionados à toxicidade de EBDC e etilenotiouréia

- **Estudos de toxicidade dos EBDC e ETU em mamíferos.**

O zinebe é considerado como responsável pelo aparecimento de hiperplasia de tireóide em cães, de tumores pulmonares, sarcomas no retículo endotelial e anomalias congênitas em ratos e camundongos. Provoca leucopenia, danos no fígado e nas gônadas, em animais de laboratório. (LARINI 1999).

No ser humano, a exposição prolongada ao maneb, provoca um quadro de insuficiência renal aguda (LARINI 1999).

A Tabela 7 apresenta alguns estudos de toxicidade dos EBDC em mamíferos.

Tabela 7 – Alguns estudos de toxicidade dos EBDC e ETU em mamíferos.

Composto	Animal	Efeito Crítico	Dose (mg/kg/dia)	Autor, ano
Mancozebe	Rato (2 anos)	Alteração dos hormônios da tireóide, aumento de peso	NOAEL: 4,8	FAO/WHO 1993 <i>apud</i> VETORAZZI e col. 1995 p. 326
Manebe	Macaco (6 meses)	Aumento peso da tireóide	NOEL*: 5	ROHM AND HASS CO,1977;MANEB TASK FORCE, 1986 <i>apud</i> EPA 2003.
Zinebe	Rato (2anos)	Hiperplasia da tireóide	NOEL*: nenhum LOAEL*** 25	BLACKWELL-SMITH E COL., 1953 <i>apud</i> EPA 2003.
ETU	Rato (anos)	Hiperplasia da tireóide	NOAEL**: nenhum LOAEL***: 0,25	GRAHAN e col., 1975 <i>apud</i> MESTRES e MESTRES, 1991.
ETU	Camundongo (3 meses)	Aumento de peso da tireóide e fígado)	5 mg/kg/dia	O' HARA, 1985 <i>apud</i> MESTRES e MESTRES, 1991.
ETU	Rato(3meses)	Alteração dos hormônios da tireóide	NOAEL**: 6	GOLDMAN, 1986 <i>apud</i> MESTRES e MESTRES, 1991.

* NOEL- Nível no qual não se observa nenhum efeito - nível de exposição onde não existe estatisticamente ou biologicamente aumento significativo na frequência ou severidade de efeito entre a população exposta e seu controle apropriado ;**NOAEL – Maior nível no qual não se observa nenhum efeito adverso - o nível mais alto de exposição onde não existe estatisticamente ou biologicamente aumento significativo na frequência ou severidade do efeito adverso entre a população exposta e seu controle apropriado; alguns efeitos podem ser produzidos neste nível, mas não são considerados adversos nem precursores de efeitos adversos; ***LOAEL – Menor nível no qual não se observa nenhum efeito adverso - o nível mais baixo de exposição onde não existe estatisticamente ou biologicamente aumento significativo na frequência ou severidade do efeito adverso entre a população exposta e seu controle apropriado.

Fonte: EPA (2003)

AMARAL e col. (1985) estudaram os efeitos da ETU e da etilenouréia (EU) sobre os níveis de lipoperoxidação hepática em ratos e concluíram que a etilenotiouréia exerce um efeito protetor contra a peroxidação de lipídios hepáticos, medido pela produção de malonildialdeído, enquanto que a EU não altera a peroxidação de lipídios em fígado.

- **Estudos de toxicidade de EBDC e ETU e EU em organismos aquáticos**

Estudos de toxicidade de ditiocarbamatos e seus metabólitos, incluindo ETU, em peixe (*Poecilia reticulata*), crustáceo (*Daphnia magna*), algas (*Chlorella pyrenoidosa*, *Phytobacterium phosphoreum*), e duas bactérias nitrificantes (*Nitrosomonas* e *Nitrobacter*) foram realizados por VAN LEEUWEN (1985a, 1985b) *apud* WHO (1988). Os resultados para os compostos de interesse neste trabalho encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Estudos de toxicidade de etilenobisditiocarbamatos (mancozebe, manebe e zinebe) e dos produtos de degração ETU e EU em peixe, crustáceo, algas e bactérias.

Composto	Peixe	crustáceo	Algas		bactérias
			<i>Chorella pyremoidosa</i>	<i>Phytobacterium phosphoreum</i>	
	<i>Poecilia reticulata</i> CL ₅₀ - 96h (mg/L)	<i>Daphnia magna</i> CL ₅₀ - 48h (mg/L)	<i>Chorella pyremoidosa</i> CE ₅₀ - 96h (mg/L)	<i>Phytobacterium phosphoreum</i> CE ₅₀ - 15min. (mg/L)	<i>Nitrosomonas e Nitrobacter</i> CMI - 3h (mg/L)
Mancozebe	2,6	1,3	1,1	0,08	32
Manebe	3,7	1,0	3,2	1,2	56
Zinebe	7,2	0,97	1,8	6,2	18
ETU	7.500	26,4	6.600	2.100	1
EU	13.000	5.600	16.000	3.300	1.000

Fonte: VAN LEEUWEN (1985a , 1985b); WHO (1988), com modificação.

A toxicidade aguda de EBDC é alta para algumas espécies, conforme pode ser observado na Tabela 8. Etilenotiouréia e etilenouréia não são consideradas tóxicas para peixes.

Os resultados de estudos de toxicidade por via oral com mancozebe revelaram que patos selvagens e marrecos japoneses apresentaram DL_{50} superiores a 6.400 e 3.200 mg/kg, respectivamente. A concentração letal (CL_{50}) avaliada por 48 horas em peixes variou de 4,0 a 9,0 mg/L, dependendo da espécie estudada. Em abelhas, a CL_{50} (48h) foi de 0,193 mg/abelha (TOMLIN 1995).

1.6.2 Estudos relacionados com a exposição humana a EBDC e/ou à ETU

APREA e col. (1996) compararam os valores de referência de etilenotiouréia urinária da população geral (167 pessoas) de quatro regiões da Itália (Veneto, Lombardia, Piemonte e Trentino Alto Adige) com a população (97 pessoas) de Rovescala, cidade produtora de vinho a alguns quilômetros de Pavia, onde os EBDC são pulverizados por helicóptero. Foi encontrado ETU acima do limite de tolerância (1,0 $\mu\text{g/L}$) em 24% da população geral das quatro regiões da Itália e em 37% da população de Rovescala. Os valores de ETU encontrados variaram de 0,8 a 8,3 $\mu\text{g/L}$, para a população geral das 4 regiões, e de 0,9 a 61,4 $\mu\text{g/L}$ para a população de Rovescala. Houve uma variação estatisticamente significativa dos níveis de ETU urinária de fumantes e de consumidores de vinho.

APREA e col. (1997) monitoraram a excreção urinária de ETU durante oito dias em um grupo de cinco voluntários, do sexo masculino e não fumantes, submetidos a uma dieta com alimentos também analisados para determinação de ETU e ditiocarbamatos (como CS_2). Os resultados das concentrações de ETU nos alimentos ingeridos pelos voluntários foram geralmente inferiores ao limite de detecção enquanto que no vinho foi de 8,8 $\mu\text{g/L}$. Os níveis de CS_2 em amostras de consumo diário alimentar variaram de 0,03 a 0,17 mg/kg. A média de consumo diário de ETU no vinho foi $3,5 \pm 0,2$ $\mu\text{g/kg}$ e o aceitável (IDA) seria 0,070 $\mu\text{g/kg}$ peso corpóreo. Durante oito dias de estudo, uma média de 48,3% de ETU ingerida no vinho foi excretada inalterada pelos

rins. A correlação entre a excreção urinária de ETU em 24 horas e a ingestão diária de ETU foi ($r=0,768$) e com os níveis de CS_2 encontrados nos alimentos foi de ($r=0,414$).

São descritos alguns casos de alterações temporárias no sistema nervoso central, diarreia e dano agudo renal em trabalhadores expostos a ETU (KURTTIO e col. 1990).

1.6.3 Estudos de revisão sobre EBDC e ETU

Segundo revisão iniciada pela EPA em 1987, a exposição à ETU, pelo uso de EBDC como agrotóxico, incluía riscos oncogênicos para humanos, através da exposição pela dieta e, risco de efeitos na tireóide e efeitos teratogênicos para misturadores e aplicadores desses produtos (MAFF 1990).

DEARFIELD (1994), em trabalho de revisão sobre a genotoxicidade da ETU, concluiu, que é uma substância fracamente genotóxica, porém, sugeriu novos estudos para a elucidação deste seu potencial.

GRISOLIA (1995) fez uma revisão sobre os aspectos da genotoxicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade dos EBDC e da ETU. Os testes de carcinogênese experimental em roedores apresentaram resultados positivos para a tireóide e, epidemiologicamente, os dados ainda são inconclusivos. Tanto os fungicidas EBDC como a ETU apresentam resultados positivos de teratogênese em roedores. Quanto a mutagenicidade observou uma série de resultados positivos e alguns negativos em sistemas biológicos.

VETORAZZI e col. (1995) realizaram uma revisão e atualização dos ditiocarbamatos através de um histórico narrativo dos vários processos de avaliação de ferbam, mancozebe, manebe, metiram, nabam, propinebe, tiram, zinebe, ziram, e de etilenotiouréia e propilenotiouréia, realizados pelo Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). Relataram que desde 1977, as avaliações toxicológicas dos EBDC têm sido baseadas na toxicidade da etilenotiouréia. A evidência experimental e epidemiológica dos maiores efeitos causados pela ETU, seu potencial de teratogenicidade e carcinogenicidade, bem como sua possível hepatotoxicidade, desempenhou um importante papel nas avaliações de EBDC, porque os mesmos efeitos foram consistentemente observados em estudos com animais de experimentação,

conduzidos com estes componentes, particularmente em ratos. São referidos principalmente seus efeitos na tireóide. Na época, havia um sentimento difundido de que os efeitos, observados para cada composto individualmente, não eram devido ao potencial intrínseco de toxicidade dos EBDC, mas sim pela presença de ETU. Porém, o estabelecimento de IDA para a classe dos EBDC é difícil, porque os resíduos são, na maioria das vezes, medidos pela evolução de CS₂, não podendo distingui-la das demais classes de ditiocarbamatos que não se transformam em ETU. Os autores consideraram nas avaliações a IDA de 0,03 mg/kg de peso corpóreo (p.c)/dia para EBDC (mancozebe, manebe e metiram), para cada composto individualmente ou em conjunto, e de 0,007 mg/kg pc/dia para propinebe. Finalmente, foi, então, estabelecida uma IDA individual para ETU baseada nos efeitos causados na tireóide (0,004 mg PC /dia) com previsão de alteração para (0,002 mg/kg p.c./dia), conforme proposto na reunião do JMPR em Geneva, em setembro de 1993 (VETORAZZI e col. 1995).

1.7 Resíduos de agrotóxicos nos alimentos

Os produtores brasileiros muitas vezes utilizam indevidamente os pesticidas nas culturas, não respeitam os parâmetros de dosagens, número de aplicações e intervalos de carência que seriam agronomicamente eficazes e que poderiam resultar em níveis residuais aceitáveis. A não obediência às instruções do rótulo do produto ocorre muitas vezes por receio de perda da cultura ou por total falta de informação, já que grande parte da população rural tem baixa ou nenhuma escolaridade e a assistência técnica é ineficiente ou inexistente na maioria das regiões. Estes problemas podem ser minimizados com a conscientização dos produtores em aplicarem os produtos de acordo com a Boa Prática Agrícola, que é definida pela Organização Mundial da Saúde como “o emprego eficaz de um agrotóxico, considerados os riscos toxicológicos envolvidos em sua aplicação, de modo que os resíduos sejam os menores possíveis e toxicologicamente aceitáveis”.

Fatores como: clima, densidade de pragas nas diferentes culturas, técnicas de aplicação e ou utilização, características físico-químicas de cada princípio ativo:

persistência, metabolismo, polaridade, sistemicidade, e condições ambientais podem influenciar na ocorrência e nos teores de resíduos.

1.7.1 Legislação e normas referentes ao registro e avaliação de agrotóxicos

No Brasil, o Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, publicado no D.O.U. em 08 de janeiro de 2002, regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, atribuindo competência ao Ministério da Agricultura para conceder o registro de agrotóxicos com finalidade fitossanitária, após serem atendidas as diretrizes e exigências dos Ministérios da Saúde e do Meio Ambiente, e dispõe também sobre pesquisa, experimentação, produção, embalagem e rotulagem, transporte, armazenamento, comercialização, propaganda comercial, utilização, importação, exportação, destino final dos resíduos e embalagens, classificação, controle, inspeção e fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins (BRASIL 2002).

A Resolução RDC nº 5, de 14/10/99 da ANVISA suspende a aprovação e a avaliação toxicológica para registro de novas formulações de produtos agrotóxicos com a mistura de princípios ativos considerados potencialmente carcinogênicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2000)

Em relação aos parâmetros ambientais brasileiros, a Portaria Normativa IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996, estabelece os procedimentos para registro e institui o Sistema Permanente da Avaliação e Controle dos Agrotóxicos. Esse Sistema inclui a classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental, o estudo de conformidade (aferição de informações apresentadas para fins de registro), a avaliação de risco ambiental, a divulgação de informações, o monitoramento ambiental e a fiscalização (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, DOS RECURSOS HÍDRICOS E DA AMAZÔNIA 1996).

Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) é a responsável pela regulamentação, avaliação e registro dos agrotóxicos. Trabalha com o conceito de risco-benefício, ou seja, avalia os riscos à saúde e ao ambiente pela exposição ao produto e os benefícios do seu uso para a sociedade e a economia. Por outro lado, alguns países da União Européia, na perspectiva de harmonizar exigências e procedimentos

relacionados ao registro, têm discutido diretrizes para a questão. A base do sistema de registro é uma lista onde constam ingredientes ativos permitidos para registro pelos países membros, com sistemática revisão dos agrotóxicos comercializados.

1.7.2 Legislação e normas referentes aos Limites Máximos de Resíduos (LMR) de agrotóxicos nos alimentos

A presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos preocupa o consumidor e as autoridades de saúde já que são substâncias tóxicas e podem oferecer riscos para a saúde humana e ambiental.

De maneira a controlar o uso adequado de agrotóxicos no campo e o nível de resíduos desses compostos nos alimentos, órgãos internacionais e nacionais estabelecem o Limite Máximo de Resíduo (LMR) para cada binômio agrotóxico/cultura, tomando por base os estudos de campo. Nestes estudos, os produtos formulados são aplicados numa determinada cultura de acordo com as Boas Práticas Agrícolas, e são determinados os níveis de resíduos remanescentes nos alimentos.

Entende-se por LMR a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em partes (em peso) do agrotóxico, afim ou seus resíduos por milhão de partes de alimento (em peso) (ppm ou mg/kg) (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003).

No Brasil, até 01/09/2003, a Portaria nº 10 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, de 08/03/1985, e suas atualizações, apresentavam as monografias dos agrotóxicos registrados no país e seus respectivos LMR para cada agrotóxico/cultura. Para a classe dos EBDC estavam registrados: o mancozebe, o manebe e o metiram os quais se encontravam em reavaliação técnica pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (MINISTÉRIO DA SAÚDE 1985; ANVISA 2003). A partir de 02 de setembro de 2003 foi publicada no Diário Oficial da União, a Resolução RE nº 165, de 29 de agosto de 2003, da ANVISA/MS. Pela nova resolução, os LMR dos ditiocarbamatos são estabelecidos para CS₂ (mg/kg) em função do uso dos ingredientes

ativos da classe dos EBDC: mancozebe, manebe, metiram, além de outros ditiocarbamatos como o propinebe e tiram (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003).

Também, no âmbito internacional, cada país estabelece seus LMR durante o processo de registro do produto.

A fim de facilitar o comércio comum de produtos agrícolas, organizações como a União Européia, o Mercosul, a Comissão do Codex Alimentarius para Resíduos de Pesticidas (CCPR) da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação da Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO), entre outras, têm buscado harmonizações de alguns LMR.

A CCPR, seguindo recomendações do Grupo de Peritos em Resíduos de Pesticidas (JMPR) da FAO/OMS, estabelece os LMR de acordo com as Boas Práticas Agrícolas, visa preservar a saúde humana e garantir o comércio internacional de alimentos. Para a classe de ditiocarbamatos são estabelecidos LMR para: mancozebe, manebe, metiram, zinebe, propinebe, tiram, ziram, ferbam, e os valores são expressos em CS₂ total (Tabelas 9,10,11).

Tabela 9 Limites Máximos de Resíduos de ditiocarbamatos permitidos no Brasil e os estabelecidos pelo Codex Alimentarius, nas diferentes culturas de frutas.

Portaria 10 da SNVS de 08/03/85 e atualizações pela ANVISA/MS* Em vigor até 01/09/03						RE nº 165 29/08/03** D.O.U. de 02/09/93 ANVISA/MS atual		Codex Alimentarius*** FAO/WHO	
	Mancozebe	Manebe	Propinebe	Tiram	Ziram	Ditiocarbamatos CS ₂		Ditiocarbamatos CS ₂	
Cultura (frutas)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	Ingrediente ativo	LMR (mg/kg)	Ingrediente ativo
Banana		1,0		1,0		1,0	Mancozebe	2,0	Mancozebe
Citros	0,5	1,0				2,0	Mancozebe		
Goiaba						3,0			
Maçã		3,0	1,0			2,0	Metiram e Mancozebe		
Mamão	5,0	7,0				3,0	Mancozebe		
Manga	2,0					1,0	Mancozebe	2,0	Mancozebe
Melancia		1,0				0,3	Mancozebe	1,0	Mancozebe e Manebe
Melão	0,5	1,0				1,0	Mancozebe		
Morango ^a		1,0				0,2	Metam		
Pêra		3,0				3,0	Mancozebe		
Pêssego		3,0				2,0	Mancozebe		
Uva		3,0	2,0		5,0	3,0	Mancozebe	5,0	Manebe

a=0,1 mg/kg de Metam sodium pela ANVISA 2003

Fonte: *ANVISA (2003) e ** MINISTÉRIO DA SAÚDE (2003) ***FAO/WHO (1998).

Tabela 10 Limites Máximos de Resíduos de ditiocarbamatos permitidos no Brasil e os estabelecidos pelo Codex Alimentarius, nas diferentes culturas de vegetais, exceto frutas.

Portaria 10 da SNVS de 08/03/85 e atualizações pela ANVISA/MS* Em vigor até 01/09/03						RE nº 165 29/08/03** ANVISA/MS D.O.U. 02/09/93 - atual		Codex Alimentarius*** FAO/WHO	
	Mancozebe	Manebe	Propinebe	Tiram	Ziram	Ditiocarbamatos CS ₂		Ditiocarbamatos CS ₂	
Cultura (vegetais)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	Ingrediente ativo	LMR (mg/kg)	Ingrediente ativo
Alface		10,0				6,0	Manebe	10,0	Mancozebe
Batata ^b		0,1		0,5	0,1	0,3	Propinebe	0,2	Mancozebe e Manebe
Berinjela						0,5	Mancozebe		
Beterraba		0,1				0,3	Mancozebe		
Brócolis	0,5					0,5	Mancozebe		
Cenoura ^b		1,0				0,3	Mancozebe	1,0	Mancozebe
Chicória		10,0							
Couve	0,5					1,0	Mancozebe		Mancozebe
Couve-flor	0,5					0,5	Mancozebe		Mancozebe e Manebe
Espinafre		10,0					Mancozebe		
Milho ^c				0,5		0,3	Tiram		
Pepino		0,5				0,3	Mancozebe	2,0	Mancozebe e Manebe
Pimentão	1,0		1,0			1,0	Mancozebe		
Repolho	0,5	10,0				1,0	Mancozebe	5,0	Manebe
Tomate ^b		1,0			3,0	2,0	Mancozebe	5,0	Manebe

b= 0,1 mg/kg de metam sodio e c=0,03 mg/kg de Furathiocarb, limites permitidos pela ANVISA 2003**

Fonte: *ANVISA (2003) e ** MINISTÉRIO DA SAÚDE (2003) ***FAO/WHO (1998).

Tabela 11 Limites Máximos de Resíduos de ditiocarbamatos permitidos no Brasil e os estabelecidos pelo Codex Alimentarius, nas diferentes culturas de cereais e outras.

Portaria 10 da SNVS de 08/03/85 e atualizações pela ANVISA/MS* Em vigor até 01/09/03						RE n° 165 29/08/03** ANVISA/MS D.O.U. 02/09/93 - atual		Codex Alimentarius*** FAO/WHO	
	Mancozebe	Manebe	Propinebe	Tiram	Ziram	Ditiocarbamatos CS ₂		Ditiocarbamatos CS ₂	
Cultura (cereais e outras)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)	Ingrediente ativo	LMR (mg/kg)	Ingrediente ativo
Abóbora		1,0				1,0	Mancozebe	0,2	Mancozebe
Aipo		1,0				0,5	Manebe		
Algodão ^c	0,2			0,5		0,3	Tiram		
Alho				0,5		0,1	Mancozebe		
Amendoim	0,2	0,2		0,5	7,0	0,3	Tiram	0,1	Mancozebe
Arroz ^c		1,0		0,5	0,2	3,0	Mancozebe		
Aveia				0,5		0,3	Tiram		
Café		1,0			3,0	0,3	Mancozebe		
Cebola		3,0	1,0	0,5		0,5	Propinebe	0,5	Furathiocarb
Cevada		0,2		0,5		1,0	Mancozebe	1,0	Mancozebe
Ervilha				0,5		0,3	Mancozebe e Tiram		
Feijão ^c	0,5	0,05	0,2	0,5		0,3	Mancozebe e Tiram		
Feijão-vagem						0,3	Mancozebe		
Soja	1,0			0,5		0,3	Tiram		
Trigo	0,5	2,0		0,5	0,2	1,0	Mancozebe	1,0	Manebe

c=0,03 mg/kg de Furathiocarb, limites permitidos pela ANVISA 2003**

Fonte: *ANVISA (2003) e ** BRASIL (2003) ***FAO/WHO (1998).

1.7.3. Limites Máximos de Resíduos (LMR) de ditiocarbamatos nos alimentos

Os Limites Máximos de Resíduos (LMR) permitidos pela legislação brasileira para cada ditiocarbamato/cultura, exceto frutas, e os limites estabelecidos para a classe dos ditiocarbamatos pelo Codex Alimentarius encontram-se explicitados nas Tabelas 9, 10 e 11.

A legislação brasileira (Resolução nº165 de 29/08/03) não estabelece LMR de resíduos de ETU (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003).

A Ingestão Diária Aceitável (IDA) estabelecida pelo JMPR, grupo assessor do Codex Alimentarius, é de 0,002mg/kg de ETU por peso corpóreo (FAO/WHO 1994).

Os alimentos que apresentam níveis de resíduos acima dos LMR estabelecidos podem indicar que a aplicação do agrotóxico não foi realizada de acordo com as Boas Práticas Agrícolas.

1.7.4 Estudos sobre resíduos de agrotóxicos em alimentos

O monitoramento de agrotóxicos em alimentos possibilita a avaliação da qualidade da produção agrícola, das tendências de aumento de uso desses produtos e da fonte de contaminação, além de fornecer dados que permitem estabelecer medidas preventivas e de controle, antes que a contaminação se torne um risco para a saúde pública ou cause grandes perdas econômicas (BARRETTO e col. 1996).

Vários países realizam programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Estes estudos permitem avaliar a qualidade dos alimentos comercializados em relação a esses resíduos, e fornecem dados para que medidas corretivas ou preventivas de risco sejam tomadas.

No ano de 1993 a União Européia analisou 752 amostras de frutas e vegetais, sendo que 7 % das amostras produzidas internamente e 14,4 % das amostras importadas estavam impróprias para o consumo (DE KOK 1994 citado por CONCEIÇÃO 2002 p.11).

O Programa Nacional de Resíduos da Austrália conduzido, no primeiro semestre de 1999, analisou 11.959 amostras de 31 alimentos de origem animal e vegetal. Das 221

amostras analisadas que incluíam cebola, nozes e frutas, os agrotóxicos foram detectados apenas em amostras de maçã e pêra, sendo que três amostras apresentaram resíduos acima do LMR estabelecido (AUSTRÁLIA 2000).

Nos Estados Unidos o responsável por monitorar os níveis de resíduos nos alimentos é o Food and Drug Administration (FDA). Das 9.438 amostras analisadas, 35% apresentaram resíduos abaixo do LMR estabelecido, sendo que apenas 2% das amostras estavam em desacordo com os parâmetros estabelecidos, seja por conter níveis de resíduos acima do LMR ou por uso indevido (FDA 2002).

No Brasil está sendo realizado um Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, coordenado pela ANVISA, com parceria do INCQS/Fiocruz, do LACEN do Paraná, de Minas Gerais-FUNED, de São Paulo-Instituto Adolfo Lutz, do Instituto Tecnológico do Estado de Pernambuco e das Vigilâncias Sanitárias dos respectivos Estados. No período de junho de 2001 a junho de 2002 foram analisadas 1.295 amostras coletadas em supermercados das capitais dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, sendo que em 1.051 (81%) das amostras analisadas foram encontrados resíduos de agrotóxicos (ANVISA 2003).

Detalhes destes ou resultados de outras pesquisas relacionados a resíduos de ditiocarbamatos e ETU encontram-se no Capítulo 5.

1.7.5 Estudos de métodos para minimizar ou remover os resíduos

O preparo, o cozimento de alimentos e processos de industrialização podem favorecer a decomposição dos EBDC à ETU. NEWSOME E LAVER (1973) demonstraram que o cozimento de alimentos produz decomposição dos EBDC a ETU. ANKUMAH e MARSHALL (1984) demonstraram que a adição de ETU é bastante estável em molho de tomate, de 76 a 91% foram encontrados após 12 semanas, ressaltando que o tempo de espera para comercialização não garante a inexistência desse resíduo.

Alguns procedimentos para remoção de resíduos de EBDC e ETU foram estudados por alguns pesquisadores. ONLEY e col. (1977) descrevem que uma simples lavagem com sabão e água reduz o resíduo em 70%. LESAGE (1980) observou que a

adição de sulfato cúprico que reduz o CS₂ do ditiocarbamato também reduz a conversão à ETU durante aquecimento e propõe o uso de compostos contendo cobre para aplicar junto com EBDC nas culturas. MARSHALL e SINGH (1977), depois de uma investigação com hipoclorito, para oxidação de ETU para EU, forneceram um procedimento para remover resíduos de EBDC e de ETU de tomates, antes do processo de industrialização. Este procedimento consiste em um banho de quatro minutos com hipoclorito de sódio à temperatura ambiente, seguido de um banho com sulfeto de sódio diluído. MARSHALL (1982) apresentou uma técnica similar para remover EBDC e ETU de tomates e ervilhas, anterior ao processo de industrialização. GREVE e HERBOLD (1983) advertem para a necessidade de um procedimento de remoção de resíduos remanescentes da aplicação de EBDC no campo, e propõem limites mais baixos de EBDC, associados com LMR de 0,01 ppm para ETU.

1.8 A cultura de mamão

Presume-se que o mamão tenha nascido na América tropical, onde se encontram ainda todas as espécies descritas para o gênero *Carica*, estando a maioria delas espalhada ao pé dos Andes, na Colômbia, Equador e Peru. Dali, das encostas ensolaradas dos Andes, a fruta teria rapidamente se espalhado por todo o continente, devido à velocidade de seu ciclo vital, à facilidade com que a planta se propaga e se multiplica e à rapidez com que nascem seus frutos (SILVA 1999).

1.8.1 Características do mamoeiro

O mamoeiro cresce rápido e produz bastante, florescendo e frutificando muitas vezes ao mesmo tempo e durante o ano todo, de preferência em regiões de clima quente e úmido. Alcança de três a seis metros de altura. O caule herbáceo lenhoso, oco, cilíndrico e simples, as vezes ramificado com ápice, coroado por um topo de folhas grandes digitilobadas, com grandes pecíolas. As flores são esbranquiçadas ou amareladas fragrantas e unissexuais.

Distinguem-se duas plantas: o mamoeiro fêmea e o macho, com diferença apenas nas inflorescências e conseqüentemente nos frutos. No mamoeiro fêmea, as flores são

exclusivamente femininas, grandes companuladas, subsésseis, solitárias ou em inflorescência axilares pouco numerosas e os frutos são bagas arredondadas. No mamoeiro macho, as flores são agrupadas em longos pedúnculos paniculados, a corda é tubulosa. Na extremidade, os frutos pequenos surgem com flores hermafroditas que dão origem a frutos pequenos, compridos ou ovais. Os frutos provenientes de flores hermafroditas são alongados, com polpa mais espessa e, conseqüentemente, com cavidade central menor, por isso preferidas comercialmente. A cor da polpa é outra característica importante, sendo preferidos os frutos que apresentam coloração vermelha ou vermelho-rosado.



Figura 3 – Cultura de mamão.

Até o final da década de 70, no Brasil, predominavam plantios de mamoeiro dióico ou comum, com produção destinada exclusivamente ao mercado interno, destacando-se o Estado de São Paulo como principal produtor. Porém a ocorrência do vírus do mosaico provocou uma redução dos pomares e migração dessa caricacea para outros Estados (RUGGIERO 1980).

Na década de 70 foi introduzida no mercado uma nova variedade de mamão (*Carica Papaya L.*), menor e mais doce do que o mamão comum.

1.8.2 Mamão (*Carica Papaya L.*)

- **Nome científico:** *Carica Papaya L.*; **família:** Caricáceas
- **Nome popular:** mamão-papaia, mamão-do-amazonas ou mamãozinho.

A espécie *Carica Papaya L.* é o mamoeiro mais cultivado do mundo, com origem provável na Bacia Amazônica Superior, noroeste da América do Sul. Produzida inicialmente no Pará, e conhecida no sul do país como mamão-papaia, mamão-do-amazonas ou mamãozinho, seu cultivo foi difundido para várias regiões tropicais. No Brasil, segundo dados do IBGE, as maiores produções são oriundas do Nordeste, especialmente das regiões irrigadas do Vale do Rio São Francisco, nos Estados da Bahia e de Pernambuco; do Espírito Santo; do Pará, no norte do país ((TRINDADE 1999; SILVA 1999).

A fruta tomou conta do mercado rapidamente em virtude de seu sabor, sempre doce, e seu tamanho, ideal para o consumo individual (SILVA 1999).

Os frutos são pequenos, ovais, têm casca lisa, fina e resistente, verde-escura que se tornam amareladas ou alaranjadas com o amadurecimento. A polpa é doce, alaranjada ou avermelhada, succulenta e aromática. O fruto é oco com numerosas sementes pretas revestidas por um excrecência mucilaginosa de sabor levemente picante.

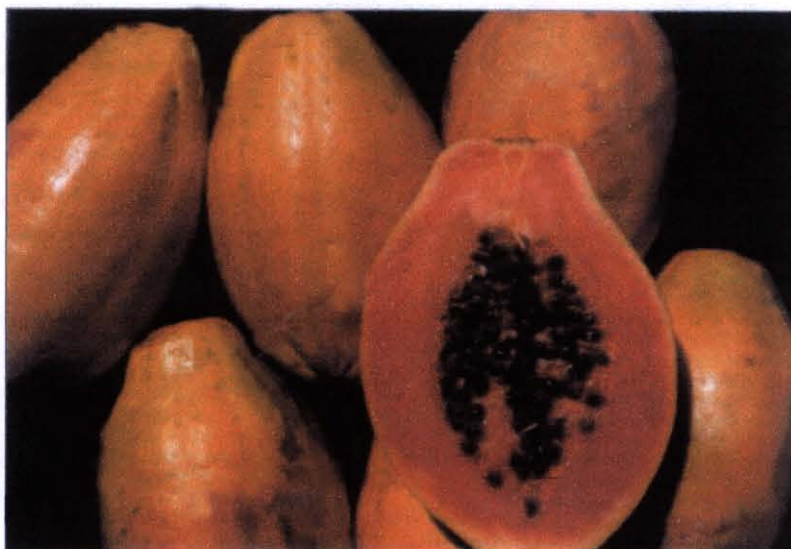


Figura 4 - Mamão *Carica Papaya L.*, maduro.

1.8.3. Hábitos de consumo

Consumido *in natura* ou na forma de doces.

Apesar de serem geralmente desprezadas, as sementes são comestíveis e consta que teriam muitas utilidades medicinais, tais como vermífugos ou auxiliar no funcionamento da digestão (SILVA 1999).

Receitas que utilizam o mamão verde, como o doce em calda, podem incluir a casca para consumo.

No Brasil, uma infinidade de receitas utiliza o mamão como ingrediente: pode-se usar o fruto maduro para fabricar mamão desidratado, o doce em calda, mas o doce de mamão verde em calda, cortado em forma de fita, é o mais apreciado. Pode-se ainda utilizar o mamão verde como legume, cortado em pedaços pequenos e refogado, ou ainda em sopas e ensopados de carne (SILVA 1999).

Consome-se ainda outros produtos industrializados com mamão como iogurtes, sorvetes.

A papaína que se encontra espalhada por toda a planta, especialmente na fruta verde, e que vai sumindo à medida que a mesma amadurece, é uma substância de muitos usos medicinais e industriais. Por muito tempo essa substância foi utilizada na medicina caseira como, por exemplo, para extirpar verrugas, e também na culinária com a finalidade de amaciar carnes (SILVA 1999).

1.8.4 Mercado

O consumo mundial de “papaya” chega a cinco milhões de toneladas, sendo que mais da metade desse volume é consumido e produzido nas Américas. Na década de 90, a taxa de crescimento mundial das importações subiu 12,1 % ao ano. Países da União Européia têm pequena participação nas importações, mas mostram razoável taxa de crescimento de curto prazo (4,7 % anuais na década de 90). Os Estados Unidos da América do Norte são os maiores importadores e apresenta taxas de crescimento de longo prazo das importações de “papaya” de 17% ao ano (SILVA 1999).

A produção mundial de “papaya” é de mais de cinco milhões de toneladas ao ano e a exportação mundial chega a mais de cento e cinquenta mil toneladas ao ano (SILVA 1999).

A produção de “papaya” no Brasil chega a mais de um milhão e oitocentas mil toneladas ao ano. A participação do país no mercado mundial de “papaya” é ainda pequena se comparada com a produção mundial, mais de oito mil toneladas ao ano, porém, as previsões apontam para um crescimento expressivo das exportações (SILVA 1999).

A industrialização de produtos como purê pode ser o grande suporte ao desenvolvimento da cultura do mamoeiro no Brasil, o qual vem sendo exportado em vários países no mundo, principalmente congelado. No Brasil, destaca-se uma empresa no Estado do Espírito Santo, onde de 5 a 10% da produção de nove mil toneladas de “papaya”, é destinada à industrialização, transformado em polpa que tem por finalidade compor iogurtes e sorvetes (SILVA 1999).

1.8.5 Principais doenças que afetam o mamoeiro

O mamoeiro é muito sensível às variações climáticas e ambientais principalmente quando ainda jovem. Pode ser afetado por um grande número de viroses e doenças fúngicas.

As viroses mais importantes são a mancha anelar, o amarelo letal e a meleira. As principais doenças fúngicas são estiolamento ou tombamento das mudas, podridões de *Phytophthora*, antracnose, varíola ou pinta preta e podridão de *Phoma*. Está sujeito também ao ataque de ácaros e insetos. O ácaro branco ou do ponteiro e o ácaro rajado merecem destaque pela maior ocorrência nas regiões produtoras. Vários gêneros de nematóides já foram encontrados em rizosfera de mamoeiro. Porém, os formadores dos galhos e o nematóide reniforme são considerados os de maior importância econômica (TRINDADE 1999).

A antracnose é considerada a principal doença dos frutos do mamoeiro podendo atacar o fruto em qualquer estágio de desenvolvimento e ocorrendo com maior intensidade nos frutos maduros, tornando-os imprestáveis para a comercialização e consumo. Ainda que os frutos colhidos não apresentem sinais da doença, ela pode se

manifestar na fase de embalagem, de transporte, de amadurecimento e de comercialização, causando grandes percentagens de perdas (TRINDADE 2000).

Para controle da antracnose são utilizadas pulverizações quinzenais, com produtos à base de cobre, benzimidazol associado a clorotalonil ou EBDC.

Uma outra doença muito comum no mamoeiro é a variola, pintas pretas ou bexigas, manchas que se limitam às superfícies dos frutos, ainda que não ocasionam sérios prejuízos como em outras podridões, resultam numa grande desvalorização comercial.

O controle da variola é feito com os mesmos fungicidas recomendados para o controle da antracnose, com pulverizações quando a lesão é ainda inicial. Outras doenças fúngicas provocam a podridão terminal do caule do mamoeiro bem como as podridões do pedúnculo e dos frutos durante o período de armazenamento e maturação. O controle de podridões externas é realizado ainda no campo na mesma época em que se controla a antracnose, com a aplicação dos fungicidas já citados. Os tratamentos pós-colheita, realizados antes da embalagem, visam evitar a podridão interna dos frutos. (TRINDADE 2000).

1.9 Prevenção de risco à saúde

1.9.1 A importância do controle dos níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos

A saúde é um direito humano fundamental e essencial para o desenvolvimento social e econômico.

O alimento é a principal fonte de exposição da população a produtos químicos e a vigilância dos resíduos de agrotóxicos nos alimentos constitui um dos métodos mais importantes para reduzir os perigos conseqüentes para a saúde humana. Quando o nível observado é inaceitável, medidas apropriadas devem ser tomadas para identificar a causa e evitar que a situação se repita.

As políticas públicas devem garantir acesso universal a quantidades de alimentos de boa qualidade e que respeitem as peculiaridades culturais. Políticas de alimentação e nutrição que integrem harmonicamente a agricultura, a economia e o meio ambiente deveriam ser prioridades de todos os governos para obter maior impacto na saúde nacional e internacional. Desde 1986, a Carta de Ottawa tem servido como fonte orientadora e de inspiração para a promoção de saúde. Conferências e reuniões internacionais subseqüentes têm deixado clara a relevância e o significado das principais estratégias em promoção da saúde, incluindo políticas públicas positivas, e meio ambiente favoráveis à saúde (DECLARAÇÃO DE ADELAIDE 1988; DECLARAÇÃO DE SUNDSVALL 1991 *apud* MINISTÉRIO DA SAÚDE 2001).

A falta de dados sobre resíduos não permite que sejam feitas sistematizações das informações sobre quais agrotóxicos oferecem risco de ocorrência indesejável e sobre a qualidade de produtos que são distribuídos aos consumidores.

Existem poucos trabalhos relacionados ao monitoramento de ETU em frutas no Brasil. É importante o conhecimento dos níveis de EBDC e de ETU presentes nas frutas, para fornecer subsídios sobre a qualidade das frutas consumidas pela população e dados para avaliação de risco à saúde e ao meio ambiente.

- **Índices de consumo alimentar**

Para concluir a respeito da aceitabilidade de um LMR do ponto de vista de saúde pública é necessário estimar a ingestão de resíduos de um agrotóxico e compará-lo com a Ingestão Diária Aceitável (IDA) estabelecida.

- **Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT)**

A IDMT é calculada assumindo o LMR como o nível de resíduo no alimento e utilizando uma dieta padrão para o consumo de alimentos segundo a equação:

$$IDMT = \sum C_i \times LMR_i$$

Onde:

C_i = consumo médio de alimentos derivado de uma dieta hipotética mundial ou nacional, em kg de alimento por pessoa por dia;

LMR_i = LMR correspondente ao alimento, em mg do agrotóxico por kg de alimento.

A IDMT é uma superestimativa da ingestão real de resíduos de agrotóxicos, principalmente porque o LMR se aplica ao vegetal inteiro e *in natura*, que quase sempre inclui uma porção não comestível, como por ex. a casca. Estudos de resíduos em mamão devem ser realizados na fruta toda (TOLEDO e col. 2002). No presente estudo a análise foi feita na fruta inteira (casca + polpa + semente). Porém, se a IDMT não exceder a IDA, é altamente improvável que seja excedida na prática, desde que os LMR sejam estabelecidos para os principais usos do agrotóxico e de que sejam utilizadas as Boas Práticas Agrícolas. Neste caso, não são necessárias estimativas mais precisas para a ingestão de resíduos.

- **A Ingestão Diária Máxima Estimada (IDME)**

É uma estimativa mais realista da ingestão de resíduos. É calculada usando dados da porção comestível do vegetal e leva em consideração os efeitos na preparação, no processamento, e no cozimento do alimento, conforme a equação:

$$IDME = \sum C_i \times LMR_i \times P_i \times C_i$$

Onde:

C_i = consumo médio de alimentos derivado de uma dieta hipotética mundial ou nacional, em kg de alimento por pessoa por dia;

LMR_i = LMR correspondente ao alimento, em mg do agrotóxico por kg de alimento;

P_i = fator de correção que considera a redução ou o aumento de resíduo como resultado do processamento comercial;

C_i = fator de correção que considera a redução ou o aumento de resíduo como resultado da preparação ou cozimento do alimento.

Quando a IDME exceder a IDA é necessário refinar o cálculo para estimar a verdadeira ingestão.

- **Ingestão Diária Estimada (IDE)**

O cálculo da IDE leva em consideração fatores como: os dados de consumo alimentar, inclusive os correspondentes a subgrupos da população; os usos conhecidos

do agrotóxico em questão; os níveis de resíduos conhecidos; a porcentagem da cultura que foi tratada; a relação entre a quantidade do produto de origem nacional e a quantidade importada; a redução ou aumento do nível de resíduo durante o armazenamento, o processamento e o cozimento. As estimativas da IDE só podem ser feitas no âmbito nacional, quando essas informações estiverem disponíveis.

1.9.2 Prováveis riscos ao meio ambiente

O mancozebe, em relação ao risco de periculosidade ambiental, é considerado produto muito perigoso, com classificação ambiental II.

Em relação aos efeitos ao meio ambiente, pesquisas demonstram que os microorganismos do solo são capazes de metabolizar ditiocarbamatos. Os produtos formados podem afetar atividades enzimáticas, respiração e nitrificação em níveis de dose da ordem de 10 mg/kg ou mais em solo seco.

A toxicidade aguda de EBDC é alta para algumas espécies. Por exemplo, para mancozebe a CE_{50} foi de 2; 6; 1,3; 1,1; 0,08 e 32 mg/L, respectivamente para peixe (*Poecilia reticulata*), crustáceo (*Daphnia magna*), alga (*Chlorella pyrenoidosa*), alga (*Phytobacterium phosphoreum*) e bactérias nitrificantes (*Nitrosomonas* e *Nitrobacter*). Conforme pode ser observado na Tabela 8, ETU e EU são considerados não tóxicos para peixes (VAN LEEUWEN 1985a, 1985b; WHO 1988).

A erosão do solo e as águas de enxurradas transferem resíduos de agrotóxicos de áreas tratadas para áreas não tratadas e para rios e lagos. Entre outras causas, concorre para isso, o descarte de embalagens vazias próximas às lavouras, a aplicação de agrotóxicos a menos de 30 m dos cursos de água, além da lavagem de equipamentos junto à lavoura. Do total dos agricultores e trabalhadores investigados por FREITAS e col. (1994), em Teresópolis-RJ, 36,6% aplicam agrotóxicos a menos de 30 m das residências e 34,2% aplicam esses produtos a menos de 30m de corpos de água, 62,2% lavam os equipamentos na lavoura e 79,3% descartam as águas de lavagens na lavoura, 56,1% enterram as embalagens vazias e 36,6% as queimam.

Os EBDC não devem ser aplicados na presença de ventos fortes ou nas horas quentes do dia, ou próximos a cursos de água e em lugares com muito declive, por causa

do possível arraste para rios e lagos, sendo importante o controle da contaminação ambiental, além da avaliação e controle da saúde dos aplicadores e da população local.

1.10 Métodos para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alimentos: levantamento bibliográfico e considerações

1.10.1 Métodos espectrofométricos

CULLEN (1964) e KEPPEL (1971) propuseram um método espectrofotométrico o qual foi aprimorado por VUIK (1992), eliminando o uso de benzeno pela sua toxicidade. Os ditiocarbamatos são determinados pela produção do CS_2 que é purificado e borbulhado numa solução alcoólica, contendo um agente complexante. O complexo formado é quantificado espectrofotometricamente na região do visível e o resultado, expresso em CS_2 , reflete o nível de ditiocarbamato total presente na amostra.

No Brasil, CARVALHO e YOKOMIZO (1989) avaliaram o método de Keppel, adicionando propinebe em diversas matrizes, com recuperações que variaram de 70 a 100% e LQ igual a 0,5 mg/kg.

VERMA e col. (1984) determinaram resíduos de tiram em grãos, usando o perclorato de tetraacetoneitrila de cobre I ($CuClO_4 \cdot 4CH_3CN$) para determinação espectrofotométrica.

MALIK (2000) determinou ferbam em grãos de trigo através de método espectrofotométrico com o uso do complexo batofenantrolina tetrafeniborato de ferro II.

A Tabela 13 apresenta os trabalhos publicados, relativos à determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alimentos pelo método espectrofotométrico.

Tabela 12 Trabalhos publicados relativos à determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alimentos pelo método espectrofotométrico.

Autor/ano	Método	Contribuição
CULLEN (1964)	Espectrofotométrico	Primeiro a propor método de determinação de ditiocarbamatos por espectrofotometria.
KEPPEL (1969 1971)	Espectrofotométrico	Determinação através do complexo [cúprico-N,N, bis (2-hidroxi etil)]
VAN HAVER e GORDTS (1977) citado por HILL (1992 p.222)	CG-FPD e espectrofotométrico (Keppel)	Comparou método modificado por MACLEOD e MACCULLY (1969) com o método de Keppel (1969) com $r=0,9903$
OTT e GUNTHER (1982)	Colorimétrico ("Head space")	Primeira técnica descrita com uso de "head space" para determinação colorimétrica.
VERMA e col. (1984)	Espectrofotométrico	Determinação através de perclorato de tetra acetonitrila de cobre I
CARVALHO e YOKOMIZO (1989)	Espectrofotométrico (Keppel)	Avaliou o método em várias matrizes para determinação de propinebe, com recuperações que variaram de 70-100%, LQ=0,5 mg/kg.
VUIK (1992)	Espectrofotométrico (Keppel) com modificação)	Eliminou o uso do benzeno no procedimento descrito por Keppel.
MALIK (2000)	Espectrofotométrico	Determinação através do complexo batofenantrolina tetrafeniborato de ferro II

1.10.2 Métodos por cromatografia gasosa

O princípio da técnica de "head space" é simples: a decomposição dos ditiocarbamatos para CS_2 é geralmente realizada por aquecimento em banho-maria em frascos vedados com septos. Aliquotas dos vapores são usadas para análise. A determinação geralmente é por cromatografia a gás com detector de captura de elétrons (ECD) ou detector fotométrico de chama- enxofre (FPD-S).

Os trabalhos publicados relativos à determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alimentos por métodos cromatográficos encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 – Trabalhos publicados relativos à determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alimentos por métodos cromatográficos.

Autor/ano	Método	Decomposição	Contribuição
MACLEOD e MACCULLY (1969)	CG-FPD		Primeiro trabalho proposto.
NAWAR (1971) citado por HILL (1992 p.223)	CG		Propôs uso de tiofeno como padrão interno
MACLEOD e RITCEY (1973)	CG-FPD	60°C - 30min	Propuseram condições para decomposição 60° - 30 min.
VAN HAVER e GORDTS (1977) citado por HILL (1992 p.222)	CG-FPD e Keppel*	80°- 1 noite	Compararam o método modificado por MACLEOD e MACCULLY (1969) com o método de Keppel*(1969) com r=0,9903
SPIGELENBERG e col. (1979) citado por HILL (1992 p.223)	CG-FPD	85-90°C-4h	Estudaram o método em maçã, alface e outros. LD 0,05mg/kg; recuperações de 89 a 102%.
HILL e EDMUNDS (1982) citado por HILL (1992 p.223)	Revisão		Realizaram a calibração com amostras não tratadas
DELVENTHAL (1984) citado por HILL (1992 p.223)	CG-ECD	90°C - 2 horas	Estudou o método em alface, pimentão e maçã, com recuperações entre 83 e%.
STEIWANDTER (1985)	CG-ECD	40-80°C - seco	Diferenciou os ditiocarbamatos solúveis dos insolúveis em água
MAINI e BONI (1986) citado por HILL (1992 p.216)	CG-FPD		Introduziram uma fase com isoctano para remoção e injeção
MINISTRY OF WELFARE, HEALTH AND CULTURAL AFFAIRS (1988)	CG-FPD CG-ECD	70° - 2 horas	Limite de determinação de acordo com a origem natural do produto
DOROSHENKO e POKHILL' SHENKO (1989) citado por HILL (1992 p.222)	CG-ECD	80°C - 60min	Compararam o presente método com o método colorimétrico, apresentando boa correlação entre eles.
YAO e col.(1989) citado por HILL (1992 p.222)	CG-FPD	70°-32h	Utilizou ácido ascórbico para digestão.
HARRINGTON e col. (1998)	CG		Determinou CS ₂ em isoctano.

Existem métodos onde o CS₂ formado em um sistema fechado é analisado por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (ECD) ou detector fotométrico de chama (FPD-S), diretamente através da técnica de “head space” ou após dissolução em solvente orgânico (HARRINGTON e col. 1998).

A técnica cromatográfica tem a vantagem de ser mais sensível, cerca de 10 vezes mais do que a técnica espectrofotométrica. Porém, os vapores ácidos do “head space” diminuem o tempo de vida útil da coluna cromatográfica, além de requerer, às vezes, muito tempo para a realização da hidrólise ácida (HILL 1992; STEIWANDTER 1985). A Central Science Laboratory tem proposto a dissolução do CS₂ em solventes orgânicos, (por exemplo: o isooctano) para minimizar este problema. (HARRINGTON e col. 1998). É aconselhável que o laboratório mantenha um cromatógrafo a gás apenas para determinação do CS₂.

1.10.3 Métodos por HPLC - cromatografia a líquido de alta eficiência

Para análise de resíduos de ditiocarbamatos em frutas e vegetais tem sido usado o método por HPLC com detectores de UV ou eletroquímico. Esta técnica, no entanto, não é seletiva para distinguir os ditiocarbamatos nas subclasses dos etilenobisditiocarbamatos (nabam, manebe, zinebe e mancozebe) e a subclasse dos N-N-dimetilditiocarbamatos (ziram e ferbam) (SILVA e col. 1999; VAN LISHAUT e SCHWACK 2000).

Vários autores usaram a técnica de HPLC para determinação de resíduos de tiram em amostras de vegetais (GUSTAFSSON e THOMPSON 1981; LO e col. 1996).

Métodos específicos são impróprios para as análises de monitoramento dos resíduos de ditiocarbamatos em alimentos, pois não se sabe quais os compostos que foram aplicados nas culturas e tem-se que analisar todos os possíveis ditiocarbamatos. Desta maneira, a determinação dos ditiocarbamatos por CS₂, tem sido utilizada em vários países nos estudos de monitoramento, uma vez que os LMR do Codex Alimentarius também são expressos em CS₂, como na legislação brasileira atual.

O método analítico utilizado neste estudo para determinação de resíduos de mancozebe foi o proposto por Keppel (KEPPEL 1969, 1971; THIER e ZEUMER 1987).

1.11 Métodos para determinação de resíduos de etilenotiouréia em alimentos: levantamento bibliográfico e considerações

1.11.1 Métodos por cromatografia gasosa

A determinação de resíduos de ETU tem sido feita através de análise direta ou por derivatização através da cromatografia a gás ou cromatografia a líquido de alta eficiência.

- **Análise direta**

OTTO e col. (1977) desenvolveram um método para análise de resíduos de ETU em vários grãos, com limite de sensibilidade de 0,01 ppm, usando detector fotométrico de chama (FPD) com filtro para determinação de substâncias com enxofre (S).

HIRVI e col. (1979) usaram GLC com detector de captura de elétrons (DCE) e detector seletivo de nitrogênio e fósforo (AFID), apresentando algumas recuperações menores que 70 %.

Devido à alta polaridade, à adsorção e à baixa volatilidade de ETU, a análise de resíduos de ETU sem derivatização pode apresentar picos assimétricos. Dessa forma, a derivatização, antes da análise por CG, parece ser a mais recomendada (BOTTOMLEY e col. 1985; DOERGE e YEE 1991; MESTRES e MESTRES 1991).

- **Análise por derivatização:**

Uma revisão extensiva foi feita por BOTTOMLEY e col (1985) com várias técnicas por derivatização.

NEWSOME (1972) desenvolveu um método simples para GLC - ECD com determinação de S-benzil ETU. NASH (1974) usou técnica similar à de Newsome, substituindo alguns solventes.

KING (1977) introduziu um novo produto de derivatização o S-(m-trifluorometilbenzil) ETU para determinação por cromatografia a gás - FPD (S), que foi utilizado por RIPLEY e COX (1978) para análise de uvas.

Em 1979, SING e col. apresentaram um interessante método por derivatização para determinação de resíduos de ETU em água e em grãos por GLC – ECD.

BOTTOMLEY e col. (1985) analisaram resíduos de ETU como S-butil ETU através de cromatografia a gás com AFID sensível a nitrogênio e enxofre.

Resíduos de ETU em alimentos foram determinados por derivatização em benzil ETU e trifluoroacetilado S-benzil ETU através da cromatografia a gás com detector de captura de elétrons e de nitrogênio e fósforo. As recuperações em maçã, pera, tomate e alimentos industrializados para bebês variaram de 82 a 92%, com limite de detecção de 1 ppb. O método mostrou ser sensível para amostras de alimento (DUBEY e col. 1997).

Na Tabela 14 encontram-se trabalhos relativos à determinação de resíduos de ETU em alimentos por cromatografia a gás.

Tabela 14 - Trabalhos publicados relativos à determinação de resíduos de ETU em alimentos por cromatografia a gás.

Autor/ano	Método	Determinação	Contribuição
NEWSOME (1972)	CG-ECD	Derivatização (S-benzil-ETU)	Determinou ETU por derivatização.
NASH (1974)	CG-ECD e AFID	Derivatização (S-benzil-ETU)	Utilizou a técnica de Newsome, substituindo alguns solventes.
OTTO e col. (1977)	CG-FPD	Direta (ETU)	Desenvolveram um método para análise direta com LQ de 0,01 mg/kg.
KING (1977)	CG-FPD	Derivatização [S-(m-trifluorometilbenzil-ETU)]	Introduziram um novo produto de derivatização.
RIPLEY e COX (1978)	CG-FPD	Derivatização [S-(m-trifluorometilbenzil-ETU)]	Utilizaram a técnica de King (1977) para análise de ETU em uvas.
BOTTOMLEY e col. (1985)	CG-AFID	Derivatização (S-butil-ETU)	Usaram um diferente produto de derivatização.
BOLZONI e col. (1993)	CG/FPD	Direta (ETU)	Apresentou método de confirmação por HPLC/ detector eletroquímico.
DUBEY e col. (1997)	CG-ECD e NPD	Derivatização (S-benzil-ETU) e (trifluoroacetilato de S-benzil ETU)	Apresentaram um método sensível para alimentos, com LQ=1 µg/kg e recuperações entre 82 e 92%.

CG - Cromatografia a gás; ECD – Detector de Captura de Elétrons; FPD – Detector fotométrico de chama; NPD – Detector de Nitrogênio e Fósforo.

As técnicas por derivatização apresentam alguns inconvenientes, como, por exemplo, exigem muito cuidado no manuseio e concentração, pois os derivados utilizados são voláteis.

As técnicas por cromatografia a gás utilizam temperaturas elevadas e pode ocorrer decomposição da ETU.

1.11.2 Métodos por HPLC - cromatografia a líquido de alta eficiência:

ONLEY e col. (1977) foram os primeiros pesquisadores a descrever o uso da cromatografia líquida de alta eficiência para análise de resíduos de ETU, sem derivatização, onde compostos interferentes naturais são removidos com purificação através de carvão ou alumina. O detector espectrofotométrico (UV) com comprimento de onda de 240 nm foi o primeiro sistema testado e posteriormente indicado por vários autores KURTTIO (1992), KOBAYASHI e col. (1992) e LEHOTAY e col. (1992).

ROSSI e col. (1980) descreveram técnica para determinação de resíduos de ETU em vinho e farinha por HPLC, apresentando recuperações que variaram de 62 a 80% para vinho e 55% para farinha, com limite de detecção de 0,025 ppm.

CACCIALANZA e col. (1980) usaram a técnica de OTTO e col. (1977) em alimentos e vinho, substituindo diclorometano por acetato de etila na extração final, apresentando recuperações que variaram de 92 a 97% .

GREVE e HERBOLD (1983) apresentaram uma técnica para vegetais cozidos, utilizando água como solvente de extração, seguida de partição com diclorometano e purificação em coluna de alumina. A determinação foi por HPLC com detector de UV ($\lambda = 254$ nm). A média das recuperações foi de 90% e os limites de determinação foram 0,01 e 0,02 ppm.

O uso de detector eletroquímico tem sido indicado, principalmente em amostras ambientais, devido a sua boa seletividade e precisão (BOLZONI e col. 1993; DOERGE e YEE 1991; KRAUSE 1989).

O detector seletivo de massa tem sido utilizado para confirmação de resultados em amostras menores que 1 ppb (LISKA e col. 1992).

BOLZONI e col. (1993) utilizaram CG/DFC (Detector Fotométrico de Chama) para a confirmação de resultados obtidos por HPLC com detector eletroquímico. Das 100 amostras analisadas, apenas um caso de resíduo de ETU não foi confirmado pela CG/DFC.

KRAUSE (1989) avaliou resultados obtidos pelo método oficial da AOAC e concluiu que a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) elimina a etapa de derivatização, aumenta a recuperação da ETU, reduz o tempo de análise, elimina a necessidade de reagentes adicionais e resulta em um método mais seletivo.

A análise direta por CG, apesar de, aparentemente ser de fácil utilização, pode apresentar erros nos resultados. A determinação por derivatização requer mais tempo e muitas vezes usa reagentes mais tóxicos. Na análise por HPLC pode-se trabalhar com temperatura ambiente, permite o controle do pH e a determinação é feita diretamente sem necessidade de derivatização.

Na Tabela 15 encontram-se os trabalhos relativos à determinação de etilenotiouréia (ETU) em alimentos por cromatografia a líquido de alta eficiência.

Tabela 15 - Trabalhos publicados relativos à determinação de resíduos de etilenotiouréia (ETU) em alimentos por cromatografia a líquido de alta eficiência.

Autor/ano	Método	Determinação	Contribuição
ONLEY e col. (1977)	HPLC-detector UV	Direta (ETU)	Primeiro método por HPLC com elaborado processo de purificação.
ROSSI e col. (1980)	HPLC	Direta (ETU)	Obtiveram recuperações entre 62 e 80% em vinho, com LQ = 0,025 mg/kg.
CACCIALANZA e col. (1980)	HPLC	Direta (ETU)	Usaram o método de Otto (1997) descrito na tabela anterior, substituindo o diclorometano da extração final por acetato de etila, com recuperações de 92 a 97% em alimentos e vinho.
GREVE e HERBOLD (1983)	HPLC-detector UV	Direta (ETU)	Estudaram método para vegetais cozidos, com média de 90% para recuperações e LQ de 0,01 e 0,02 mg/kg.
KOBAYASHI e col. (1986) citado por DISERENS (1991)	HPLC-detector UV	Direta (ETU)	Introduziram um novo método de purificação, substituindo a clássica purificação por partição.
KRAUSE (1989)	Revisão de métodos		Concluiu que HPLC resulta em um método mais seletivo
BOLZONI e col. (1993)	HPLC-detector eletroquímico	Direta (ETU)	Apresentaram um método com detector eletroquímico e confirmação por CG-FPD
DISERENS (1991)	HPLC-detector UV	Direta (ETU)	Introduziu a purificação com coluna de Extrelut. Usou o método de Kobayashi e col.(1986) com modificação em frutas, vegetais e cereais.
DUBEY e col. (1997)	CG-ECD e NPD	Derivatização (s-benzil-ETU) e (trifluoroacetilato de s-benzil ETU)	Método sensível para determinação de ETU em alimentos, com LQ = 1µg/kg e recuperações entre 82 a 92%.

HPLC – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência; UV – Ultravioleta; LQ – Limite de Quantificação.

A metodologia escolhida para análise das amostras do presente projeto foi a descrita por DISERENS (1991) para determinação de etilenotiourea em vários alimentos por cromatografia a líquido de alta eficiência, descrita com detalhes no item 3.3.1.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os níveis de resíduos de ditiocarbamatos e etilenotiouréia em fruta (mamão) e sua implicação na saúde pública.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar e validar método analítico para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em mamão;
- Estudar e validar método analítico para determinação de resíduos de etilenotiouréia em mamão;
- Determinar os resíduos remanescentes da aplicação de etilenobisditiocarbamato (mancozebe) e de etilenotiouréia (ETU) na cultura de mamão e correlacionar os resultados;
- Determinar os níveis de resíduos de mancozebe e de ETU, após 0, 3, 6, 9 e 12 dias da última aplicação.
- Avaliar os resultados encontrados e o risco à saúde da população.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Metodologia científica: estudo de caso controle analítico, onde a hipótese é a presença de resíduos de etilenotiouréia em mamão tratado com etilenobisditiocarbamato (mancozebe).

Todas a parte experimental analítica foi realizada no Laboratório de Resíduos de Pesticidas da Diretoria do Serviço de Química Aplicada da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz – Central.

3.1. Objeto ou matriz de estudo – Mamão espécie *Carica Papaya L.*

3.1.1 A escolha da matriz de estudo

As frutas são, na maioria das vezes, ingeridas *in natura* e o seu consumo é expressivo na dieta do brasileiro. A dieta do paulistano é constituída de 40,8% de produtos de origem animal e 59,2% de produtos de origem vegetal. Dos produtos de origem agrícola, 11,5% são frutas, 10,8% hortaliças, 9,4% farináceos, 9,0% arroz, 5,2% feijão, 4,3% açúcar, 4,3% óleos, 3,8% café e 0,9% outros produtos (GARP 1999).

Em 1996 o consumo alimentar domiciliar *per capita* anual de frutas, segundo Pesquisa de Orçamentos Familiares, foi de 44,581 kg para o município de São Paulo, com variação de 16,075 a 116,658 kg, dependendo da classe de rendimento mensal familiar de ≤ 2 a ≥ 30 salários mínimos, além do consumo de 28,067 kg de hortaliças, 33,607 kg de cereais e leguminosas, 0,246 kg de cocos, castanhas e nozes, 8,966 kg de farinhas, féculas e massas, 26,609 kg de panificados, 30,713 kg de carnes, 0,817 kg de vísceras, 2,486 kg de pescados, 20,805 kg de aves e ovos, 77,363 kg de laticínios, 16,777 kg de açúcares e produtos de confeitaria, 4,949 kg de sais e condimentos, 7,968 kg de óleos e gorduras, 36,849 kg de bebidas e infusões, 5,500 kg de outros produtos (IBGE 2003).

Além disso, o Brasil é hoje um dos três maiores produtores de frutas do mundo, perdendo apenas da China e da Índia, produzindo 42 milhões de toneladas em 2,2 milhões de hectares. O Brasil é o maior produtor mundial de mamão. No período de outubro de 2001 a setembro de 2002, o Brasil teve um crescimento de 20% na

exportação de frutas, em relação ao período anterior, conforme informação prestada pelo Ministério da Agricultura. O Brasil pretende exportar US\$ 1 bilhão em frutas nos próximos cinco anos (ANDEF 2003).

A escolha por trabalhar com frutas deve-se ao fato delas serem ingeridas *in natura*, por existir a possibilidade de conter resíduos de ditiocarbamatos e de etilenotiouréia, pois os etilenobisditiocarbamatos são muito utilizados, e por ser o consumo expressivo na dieta do brasileiro. O mamão apresenta uma produção expressiva no Brasil, pode ser consumido por crianças desde os primeiros meses de vida, e ainda pode ser consumido diariamente por pessoas que apresentam distúrbios intestinais. Em função desses aspectos, selecionou-se o mamão *Carica Papaya L*, para verificar a presença de resíduos de etilenobisditiocarbamato (mancozebe) e etilenotiouréia após tratamento.

3.1.2 Escolha e localização das áreas de estudo

As aplicações de EBDC (Mancozebe) foram realizadas nas seguintes localidades: Lins-SP, Linhares-ES e no sul da Bahia. selecionadas dentre áreas representativas da cultura de mamão.

- **Áreas de estudo**

Cada área de estudo continha no mínimo 6 mamoeiros. A área de estudo testemunha estava localizada longe o suficiente das áreas a serem tratadas, para evitar risco de contaminação por deriva, evaporação, lixiviação ou outro. Foi avaliada previamente o histórico de utilização de agrotóxicos na área.

- **Demarcação e identificação das áreas de estudo**

A demarcação foi feita com estacas internas, para delimitar as áreas de estudo e com estacas externas para delimitar a parte de fora do experimento e facilitar a visualização, com a devida identificação do tratamento.

3.1.3 Método para aplicação da substância teste (mancozebe)

- **Produto utilizado em todos os tratamentos**

Formulação de mancozebe na forma de pó molhável, de marca comercializada, para preparação da calda de aplicação.

- **Dosificação e preparação da substância teste**

Antes da aplicação, as quantidades necessárias da substância teste, foram pesadas (substância teste sólida) e embaladas em frascos de boca larga ou sacos de polietileno, em duas doses:

Dose normal: 160 g de mancozebe por hectare e

Dose dupla: 320 g de mancozebe por hectare.

- **Número de aplicações**

Seis aplicações de 15 em 15 dias antes da colheita.

- **Época de colheita**

Verão.

- **Método de aplicação**

Pulverização.

A aplicação de mancozebe foi realizada por profissional experiente (aplicador de agrotóxicos).

- **Precauções para aplicação**

Foram seguidos os procedimentos preconizados nas Boas Práticas Agrícolas (TOLEDO e col. 2002), a saber: o equipamento estava limpo antes de ser utilizado; as quantidades propostas da substância teste foram aplicadas uniformemente e foi evitada a contaminação de parcelas vizinhas, durante e após a aplicação (deriva).

3.1.4 Método de amostragem

A amostragem deve ser representativa. Deve ser selecionada de modo a assegurar que cada unidade a ser retirada para compor a amostra tenha a mesma

probabilidade de ser escolhida. Cada amostra deve possuir um tamanho e uma composição de modo a assegurar que, se várias subamostras forem tomadas para a análise, as variações sejam insignificantes (ABARKELI 1991; KRATOCHVIL 1985, 1987).

Uma amostragem adequada para análise de resíduos de agrotóxicos representa um problema complexo, em virtude, principalmente, da possibilidade de as concentrações serem baixas e não uniformemente distribuídas (LARA 1988). A distribuição de resíduos de agrotóxicos em um campo tratado depende de vários fatores como: o tipo de aplicação e de formulação, o número de tratamentos, a dosagem (litro/hectare), o tamanho e a posição dos bicos de pulverização, o modo de cultivo, a variedade e o tipo de cultura, a degradação química, as características do solo e as condições climáticas durante a aplicação. (ABARKELI 1991).

O método de amostragem utilizado foi ao acaso. Os frutos foram coletados aleatoriamente, de diversas partes de mamoeiros individuais, simulando o procedimento normal de colheita, de uma forma representativa.

Segundo o estabelecido pelos Codex Alimentarius o mamão está classificado no Grupo de frutas diversas - tipo 1, de origem tropical ou subtropical com a casca não comestível, e cada amostra, geralmente entre 50 e 100g, deve conter no mínimo 12 unidades, sendo que deve pesar no mínimo 2kg (TOLEDO e col. 2002 p. 70).

No presente estudo, as amostras foram coletadas por profissional experiente em realizar estudos de resíduos no campo, de acordo com as Boas Práticas Agrícolas.

Foram coletadas 5kg de mamão *Carica papaya L* de cada ensaio de campo. com aproximadamente 50 frutos cada.

3.1.5 Acondicionamento, identificação, transporte e armazenamento de amostras

As amostras foram embaladas em saco de polietileno e devidamente identificadas, foram armazenadas refrigeradas, sendo enviadas ao laboratório, pelo correio, dentro de uma caixa de isopor de primeiro uso com gelo reciclável.

3.1.6 Cuidados para evitar contaminação

Segundo determinado pela FAO/WHO (1993), foram tomados diversos cuidados, conforme segue, a fim de conservar as amostras e evitar contaminação:

- Não se coletaram os frutos de mamão utilizando roupas, mãos ou instrumentos de coleta sujos (contendo terra, substâncias químicas, óleos, agrotóxicos ou outros);
- Manusearam-se cuidadosamente as amostras para evitar a remoção de resíduos de agrotóxicos;
- Não se conduziram as amostras em veículos que transportam produtos químicos em geral;

3.1.7 Amostras

- **Amostra controle**

Matriz da mesma espécie, previamente analisada, e que não apresente os analitos de interesse, para validação de métodos analíticos.

- **Amostra testemunha**

Matriz da mesma espécie submetida às mesmas condições de campo, sem aplicação de dtiocarbamatos, utilizada para verificar a existência de outras substâncias que possam interferir na análise e pode também ser utilizada nos ensaios de conformidade de validação dos métodos. Condições para escolha de áreas de estudo testemunha estão descritas no item 3.1.2.

As amostras testemunhas foram coletadas três dias após o tratamento e antes das coletas das amostras tratadas nos três locais de estudo: Lins-SP, Linhares-ES e no extremo sul da Bahia. E no caso do estudo de dissipação de resíduos de mancozebe e etilenotiouréia, em Lins-SP, foi coletada uma outra amostra testemunha 12 dias após o tratamento.

- **Amostra tratada**

Amostra de mamão, submetida à aplicação da formulação de mancozebe na dose normal e dose dupla de acordo com as Boas Práticas Agrícolas.

Após a coleta das amostras testemunhas, foram coletadas as amostras tratadas com dose normal e, após, as com a dose dupla.

Para realizar o estudo de dissipação dos resíduos de mancozebe e ETU em Lins-SP, a primeira coleta foi realizada no dia da última aplicação, imediatamente após a secagem do produto pulverizado e as demais foram feitas em 3, 6, 9 e 12 dias após o tratamento (DAT).

- **Amostra de laboratório**

Uma amostra coletada é muito maior do que uma amostra necessária para análise. Os frutos de cada amostra foram quarteados e rejeitados os quartos opostos até redução para aproximadamente 1kg, cortados em pequenos pedaços, misturados e colocados em recipientes de vidro com tampa, devidamente limpos e descontaminados. As amostras foram estocadas congeladas em freezer. temperatura de -20° C, até o momento das análises.

- **Amostra fortificada**

Amostra controle, na qual é adicionada determinada concentração do analito a ser determinado.

3.1.8 Número de amostras

Foram analisadas 41 amostras, sendo 27 para a realização dos ensaios de conformidade de validação (Tabela 16), 9 amostras para os estudos de resíduos remanescentes da aplicação de EBDC (mancozebe) (Tabela 17), e mais 5 amostras para os estudos de dissipação de EBDC e de ETU, totalizando 55 determinações. (Tabela 18).

Tabela 16 - Número de amostras para realização dos ensaios de conformidade de validação

AMOSTRA <i>Mamão <i>Carica Papaya L.</i></i>	TOTAL
Controle*	6
Fortificada** 1 (LQ)	6
Fortificada** 2 (2x LQ)	6
Fortificada** 3 (>5 x LQ)	6
Fortificada** 4 (0,2 mg/kg de mancozebe)	3
Total	27

* Amostra controle: matriz da mesma espécie, previamente analisada, e que não apresente os analitos de interesse, para validação de métodos analíticos;

** Amostra fortificada: amostra controle, na qual é adicionada determinada concentração do analito a ser determinada para realização dos estudos de recuperação;

LQ: Limite de Quantificação do método (os níveis adicionados encontram-se descritos nos itens 3.2.6.)

Utilizaram-se as amostras controle e amostras fortificadas descritas na Tabela 16, para realização dos ensaios de conformidade de validação para determinação de resíduos de EBDC (mancozebe) e de Etilenotiouréia, conforme métodos descritos nos 3.3.1 e 3.3.2.

Tabela 17 - Número de amostras tratadas para determinação de resíduos etilenobisditiocarbamato (mancozebe) e etilenotiouréia de acordo com o tratamento e procedência.

PROCEDÊNCIA	AMOSTRA Mamão <i>Carica Papaya L.</i>	Nº de Aplicações	COLETA (verão)	DAT	NÚMERO DE AMOSTRAS
Lins-SP	Testemunha	0	Novembro	3	1
Linhares- ES	Testemunha	0	Dezembro	3	1
Sul –BA	Testemunha	0	Janeiro	3	1
Lins-SP	Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Novembro	3	1
Linhares- ES	Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Dezembro	3	1
Sul –BA	Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Janeiro	3	1
Lins-SP	Tratada 2 PM (320g ia/ha)	6	Novembro	3	1
Linhares- ES	Tratada 2 PM (320g ia/ha)	6	Dezembro	3	1
Sul –BA	Tratada 2 PM (320g ia/ha)	6	Janeiro	3	1
TOTAL					9

DAT – Dias após o tratamento; PM: pó molhável (forma de uso).

Tabela 18 - Número de amostras tratadas para estudo de dissipação de etilenobisditiocarbamato (mancozebe) e etilenotiouréia, Lins-SP.

AMOSTRA <i>Mamão</i> <i>Carica Papaya L.</i>	Nº DE APLICAÇÕES	COLETA (verão)	DAT	NÚMERO DE AMOSTRAS
Testemunha	0	Novembro	12	1
Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Novembro	0	1
Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Novembro	3	1*
Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Novembro	6	1
Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Dezembro	9	1
Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Dezembro	12	1
TOTAL				6

DAT: Dias após o tratamento; PM: Pó molhável (forma de uso da formulação); ia/ha: ingrediente ativo por hectare.

* Mesma amostra da Tabela 17.

Foram analisadas amostra testemunhas, e amostras de mamão tratado, tratamento 1 e 2 de cada localidade estudada, para estudo de resíduos de EBDC (mancozebe) e ETU, remanescentes da aplicação de mancozebe (Tabela 17), além de mais 1 amostra-testemunha e 4 amostras de mamão tratado, tratamento 1, coletadas em Lins-SP, para realização dos estudos de dissipação (Tabela 18), totalizando 14 amostras para realização de 28 determinações analíticas.

3.2 Validação de método analítico para determinação de ditiocarbamatos (CS₂) e de etilenotiouréia em mamão

O uso de um determinado método analítico deve ser precedido da verificação de sua aplicabilidade ao propósito específico. A validação dos métodos propostos consiste na avaliação dos parâmetros: otimização das condições analíticas, efeito da matriz ou especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, recuperação, precisão, exatidão. A avaliação desses parâmetros em uma determinada matriz permite verificar a aceitabilidade e aplicabilidade de um método (FAO/WHO 1993).

3.2.1 Otimização das condições analíticas

As condições cromatográficas e espectrofotométricas foram otimizadas de modo a se obter um cromatograma com boa resolução para o pico de interesse (ETU) e uma boa leitura no comprimento de onda estudado (ditiocarbamatos) e estão descritas nos itens 3.3.1 e 3.3.2.

- **Repetibilidade do tempo de retenção**

Uma solução padrão de ETU foi injetada cinco vezes para determinar o tempo de retenção. Foi calculado o coeficiente de variação (%CV) para verificar se a variação estava dentro do limite aceitável, ou seja, inferior a 5% (GARP 1999).

- **Repetibilidade da resposta do detector**

Foi determinada a precisão da resposta do detector, injetando cinco vezes, uma solução padrão do analito, sendo que o limite aceitável para o coeficiente de variação (%CV) calculado é de até 5% (GARP 1999).

3.2.2 Especificidade

Os métodos devem ser capazes de determinar os analitos na presença da matriz.

- **Análise em branco do método**

Análise em branco é a realização de todo o procedimento analítico sem a presença da amostra e do analito estudado para verificar a ausência de interferentes na região de estudo provenientes de solventes, vidraria, reagentes e outros.

Foram analisados os brancos dos métodos de acordo com os procedimentos descritos em 3.3.1 e 3.3.2, na ausência de mamão e de ditiocarbamato e etilenotiouréia, para verificar a existência ou não de interferentes na análise, possivelmente provenientes de solventes, vidraria, reagentes e outros.

- **Análise da amostra testemunha**

Amostras testemunha de mamão, não submetido a qualquer tratamento com ditiocarbamatos, foram analisadas em triplicata, segundo os procedimentos descritos em 3.3.1 e 3.3.2, para verificar a existência ou não de interferentes na análise.

3.2.3 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção (LD), definido como a concentração mínima do analito em uma amostra que pode ser detectada com certa confiabilidade, porém, não quantificável com precisão aceitável, sob uma condição analítica pré-determinada. Quantidade do analito com resposta, de no mínimo, três vezes maior que o nível de ruído do sistema de detecção (EUROPEAN COMMISSION 2000a)

3.2.4 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação do método é definido como a menor concentração do analito em uma amostra que se pode determinar com precisão aceitável. (EUROPEAN COMMISSION 2000a). O intervalo de aceitabilidade para os valores individuais de recuperação para cada nível de fortificação é de 70 a 110% e o coeficiente de variação percentual (CV%) em relação à média para cada nível estudado deve ser igual ou menor que 15%. (EUROPEAN COMMISSION 2000b; FAO/WHO 1993). A EPA (1996) considera valores de recuperações entre 70 e 120 % para aceitabilidade de métodos.

O limite de quantificação foi obtido por adição de mancozebe e de ETU à amostra de mamão controle, nas concentrações de 0,01 mg/kg e 0,5 mg/kg, respectivamente. As análises foram realizadas em triplicatas, segundo os procedimentos descritos em 3.3.1 e 3.3.2. Foram calculadas as recuperações em percentagem, médias, desvios padrão e coeficientes de variação para verificar aceitabilidade dos resultados.

3.2.5 Estudo da faixa de linearidade de resposta do detector

O intervalo da faixa de linearidade da resposta do detector, ou seja, as concentrações nas quais a intensidade de resposta do detector é diretamente proporcional às concentrações de CS₂ e de ETU, respectivamente, foi obtido através da determinação da resposta do detector com soluções-padrão de CS₂ e de ETU em diferentes concentrações, conforme descrito em 3.3.1 e 3.3.2, respectivamente.

Considera-se aceitável para análise de resíduos de agrotóxicos curvas com coeficiente de correlação $\geq 0,995$. De acordo com a ABNT (1998), uma curva de regressão aceitável deve apresentar um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99.

- **Curva de calibração**

Para o preparo das curvas de calibração foram utilizadas soluções-padrão de trabalho de CS₂ e ETU em diferentes concentrações, dentro da faixa de linearidade do detector, descritas em 3.3.1 e 3.3.2.

3.2.6 Estudos de recuperação

Para os estudos de recuperação de ETU, foram preparadas, em triplicata, amostras controle de mamão com adição de 1 mL de cada solução-padrão nas concentrações de 0,2 ng/mL, 0,4 ng/mL, 2 ng/mL, respectivamente, a 20 g de amostra controle, para obter concentrações de 0,01 mg/kg e 0,02 mg/kg e 0,12 mg/kg, respectivamente, e, analisadas em seguida, segundo o procedimento descrito em 3.3.1.

Para os estudos de recuperação de mancozebe, foram preparadas, em triplicata, amostras controle de mamão com adição de 0,0060 g, 0,0150 g, 0,0300 g e 0,0900 g de

lactose com 1% de mancozebe, respectivamente, a 300g de amostra controle, para obter concentrações de mancozebe no mamão de 0,2 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg e 3,0 mg/kg, respectivamente, e, analisadas em seguida, segundo o procedimento descrito em 3.3.2.

Foi calculada a relação entre a concentração encontrada e a concentração adicionada para cada amostra fortificada, em porcentagem, ou seja, as respectivas recuperações, a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação para cada nível estudado.

3.2.7 Exatidão

Exatidão é quão próxima uma medida está de seu valor verdadeiro. Em análise de resíduos, é determinada com base nos resultados de recuperação em todos os níveis analisados.

O intervalo de aceitabilidade para os valores individuais de recuperação é de 70 a 110% (FAO/WHO 1993; EUROPEAN COMMISSION 2000b). A EPA (1996) considera valores de variabilidade para determinação da aceitabilidade de métodos recuperações entre 70 e 120%.

Recuperações não demonstram por si exatidão ou tendências de resultados. O laboratório deve participar em testes interlaboratoriais de proficiência quando disponíveis e acessíveis.

3.2.8 Precisão

Precisão é quão dispersa uma medida está em relação à média. Em análise de resíduos, é determinada com base nos experimentos de recuperação em cada nível estudado.

O coeficiente de variação percentual (CV%) em relação à média deve ser 15% (EUROPEAN COMMISSION 2000b). Ele será calculado como:

$$CV = \frac{S}{X} \times 100,$$

Onde:

S= desvio-padrão;

X= média.

3.2.9 Repetibilidade

Repetibilidade é a dispersão dos resultados de recuperação, usando o mesmo método, a mesma matriz, em um único laboratório, dentro de um curto período, onde não ocorram diferenças em materiais e equipamentos usados e/ou analistas envolvidos.

O coeficiente de variação percentual (CV%) em relação à média para cada nível de fortificação deve ser 15% (EUROPEAN COMMISSION 2000b).

3.2.10 Reprodutibilidade externa

É a dispersão dos resultados de recuperação, usando o mesmo método em diferentes laboratórios, por diferentes analistas ou dentro de um período, onde podem ocorrer diferenças em materiais e equipamentos usados. Para verificar a confiabilidade analítica, a equipe do laboratório de Resíduos de Pesticidas do Instituto Adolfo Lutz, onde as análises foram realizadas, participou do “Programa Interlaboratorial de Análise de Etilenobisdicarbamatos” a nível nacional, organizado pela Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (BARRETTO 2001) e participa do Estudo Interlaboratorial de ditiocarbamatos em polpa de banana, coordenado pela Fiocruz – INCQS (INCQS 2003). Em relação à ETU, não se sabe sobre a existência de programas de controle de qualidade analítica. Foi enviada uma amostra de mamão, previamente analisada e que continha ETU, para um laboratório de controle de qualidade de indústria para confirmação do resultado.

3.2.11 Reprodutibilidade interna

É aquela produzida em um único laboratório sob determinadas condições analíticas (EUROPEAN COMMISSION 2000a). Estudo de recuperações de ditio carbamatos em mamão foi realizado em período distinto e por outro analista no Laboratório de Resíduos de Pesticidas do Instituto Adolfo Lutz (VIEIRA E TOLEDO 1999).

3.2.12 Robustez

Robustez de um procedimento analítico é a medida de sua capacidade de produzir resultados equivalentes mesmo com pequenas variações deliberadas em parâmetros do método e indica sua confiabilidade durante o uso normal. Pode ser avaliada após implantação, quando parâmetros são intencionalmente modificados, tais como: analistas, variedades de matrizes, dias de análise, marcas de reagentes/solventes, equipamentos, laboratórios. Estudo de recuperações de ditio carbamatos em mamão foi realizado em período distinto por outro analista.

3.3 Métodos analíticos

3.3.1 Método para determinação de resíduos de etilenotiouréia (ETU)

O método utilizado para determinação de resíduos de ETU foi o preconizado por DISERENS (1991) que introduziu uma etapa de purificação no método descrito por KOYABASHI e col. (1986) citado por DISERENS (1991 p. 70).

A escolha por trabalhar com HPLC deveu-se ao fato de poder determinar ETU diretamente, sem necessidade de derivatização, trabalhar em temperatura ambiente, ser possível o controle do pH, requerendo ainda menos tempo de análise e utilizando menos reagentes.

- **Especificidade**

Neste estudo o método foi testado em amostra de mamão *Carica Papaya L.*. Porém, ele pode ser aplicável em outras amostras de frutas e vegetais, desde que seja feita a validação para cada matriz de interesse.

- **Princípio do método**

A ETU é extraída da amostra de fruta devidamente homogeneizada com metanol. O extrato orgânico é concentrado e após ajuste do pH é feita uma purificação em coluna de Extrelut. O eluato é concentrado e filtrado. A determinação é feita por cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de ultravioleta (UV) (DISERENS 1991).

- **Material**

- a) **Equipamentos**

- Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência (HPLC) com detector de UV, bomba quaternária, amostrador automático, microcomputador com Chemstation;

- Sistema de purificação de água para HPLC;

- Balança analítica;

- Balança semi-analítica;

- Homogêinizador;

- Rotavapor;

- Bomba de vácuo;

- Estufa.

- b) **Padrão, solventes, reagentes.**

- ETU - padrão analítico certificado;

- Diclorometano grau resíduo;

- Álcool metílico grau HPLC;

- Acetonitrila grau HPLC;

- Hidróxido de Sódio p.a.;

- Solução a 10 % de NaOH.

c) Vidrarias e outros materiais

- Funil com diâmetro de 9 cm;
- Papel de filtro;
- Filtro de 0,45 μm ;
- Papel indicador de pH universal;
- Coluna de Extrelut;
- Sistema de filtração com filtro de placa porosa;
- Kitassato de 1000 mL;
- Tubos graduados com tampa de 10 mL;
- Microseringas de vidro de 10 mL;
- Pipetas volumétricas de diferentes capacidades;
- Pipetas Pasteur;
- Balões volumétricos de diferentes capacidades;
- Balões de 200 mL para rotavapor;
- Frasco de vidro de 3 mL, com tampa de teflon, para amostrador automático;
- Béqueres;
- Provetas graduadas de diferentes capacidades;
- Filtros de membranas de celulose de 0,45 μm .

• Solução-padrão e sua preparação**a) Preparo da solução estoque**

Foi pesado, em balança analítica, 0,0952 g do padrão de ETU em bequer de 10 mL e dissolvido em metanol. A solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume. Após, foi realizada a transferência para um frasco de vidro com tampa e batoque de teflon, devidamente identificado e armazenada em freezer. A partir dessa solução na concentração de 952 $\mu\text{g/mL}$ foram preparadas as soluções intermediárias.

b) Preparo das soluções intermediárias

A partir da solução estoque, foi pipetado 0,1 mL para um balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com a fase móvel. A partir desta solução de 9,52 $\text{ng}/\mu\text{L}$ foram preparadas as soluções de trabalho.

c) Preparo das soluções de trabalho

A partir da solução intermediária, foram pipetados diferentes volumes para os respectivos balões volumétricos de 10 mL, completando o volume com a fase móvel. As soluções foram transferidas para os respectivos frascos de vidro com tampa e batoque de teflon, e, posteriormente, para os frascos do injetor automático, e foram devidamente identificadas.

As soluções de trabalho foram preparadas em pelo menos cinco níveis de concentração (1/2LQ, 1LQ, 2LQ, 5LQ ou 10LQ) para construção da curva-padrão.

- **Reagentes**

-Solução de Hidróxido de Sódio a 10 %: Pesou-se 10,0 g de NaOH em balança semi-analítica, dissolvidas e avolumada em 100 mL de água;

-Solução de Hidróxido de Sódio a 1 %: Pesou-se 1,0 g de NaOH em balança semi-analítica, dissolvidas e avolumada em 100 mL de água.

- **Preparação da Amostra**

As amostras (casca + semente + polpa) foram quarteadas, cortadas em pequenos pedaços, homogeneizadas, transferidas para frascos de vidro com tampa, identificadas, e armazenadas congeladas.

- **Extração e purificação**

Uma alíquota de 20,0 g da amostra homogeneizada foi pesada em um béquer. A extração foi feita 100 mL de álcool etílico sob agitação por 30 minutos e, após, foi filtrada a vácuo. A etilenotiouréia foi reextraída com mais 50 mL de álcool metílico. Os filtrados foram transferidos para um balão de fundo chato e boca esmerilhada e concentrados em rotavapor, sob temperatura de 50° C em aproximadamente 10 mL. Foi resfriado para a temperatura ambiente e ajustou-se o pH a aproximadamente 8,5, com uma solução de Hidróxido de Sódio a 10%. Transferiu-se o extrato para uma coluna de Extrelut seca, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, lavando o balão para transferência quantitativa com água em pH 8,5. Após 20 minutos, foi eluída com 220 mL de diclorometano, recolhendo o eluato em balão de fundo chato contendo 5 mL de água purificada para HPLC. O eluato foi concentrado em rotavapor a 50°C até a visualização de uma única fase. Após resfriamento à temperatura ambiente, foi transferido

quantitativamente para um balão de 10 mL e avolumado com água. Após a filtração em membrana de celulose de 0,45 µm, com o auxílio de uma seringa de vidro de 10 mL, realizou-se a transferência do filtrado para um frasco de vidro com tampa e batoque de teflon e, posteriormente, para o frasco do amostrador automático.

- **Condições cromatográficas**

- Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência HPLC 1100, com detector de UV, bomba quaternária, amostrador automático, microcomputador com *Chemstation*;

- Detector de UV(comprimento de onda: $\lambda = 240$ nm);

- Coluna: aço inox, 125 mm x 4 mm, fase estacionária: Spherisorb ODS 2 - 5 µm;

- Fase móvel: 2% de acetonitrila em 98% de água purificada para HPLC;

- Fluxo da fase móvel: 0,75 mL;

- Temperatura: 30° C.

- **Construção da curva-padrão**

Foram injetadas as soluções de trabalho do padrão de ETU para construção da curva de calibração, dentro da faixa de linearidade do detector.

- **Determinação**

A análise qualitativa foi feita por padronização externa, através da comparação do tempo de retenção da ETU.

- **Cálculos**

A análise quantitativa foi feita através da curva de calibração, por comparação de área. A concentração de ETU foi determinada, levando em consideração o fator de diluição e a quantidade de amostra, pela equação:

$$R_{\text{ETU}} = \frac{C \times V \times f}{P}$$

Onde:

R_{ETU} = resíduo de ETU na amostra (mg/kg); C = concentração de ETU na solução final extraída do mamão (µg/mL); V = volume da solução extraída (mL); P = peso equivalente da amostra extraída (g); f = fator de diluição.

O resultado deve ser expresso em miligrama de etilenotiouréia por quilograma da amostra (mg/kg).

3.3.2 Método para determinação de resíduos de ditiocarbamatos

O método analítico utilizado para determinação de resíduos de mancozebe foi o proposto por Keppel, apropriado para as análises de monitoramento dos resíduos dos ditiocarbamatos em alimentos (KEPPEL 1969, 1971; THIER e ZEUMER 1987).

- **Especificidade**

O método foi validado para amostra de mamão *Carica Papaya L.* É aplicável em outras amostras de frutas e vegetais, desde que seja feita a validação do método para a matriz de interesse.

- **Princípio do método**

Os ditiocarbamatos, incluindo os EBDC, são determinados pelo método de evolução de CS₂. Consiste na decomposição de ditiocarbamatos em meio de solução de cloreto estanoso e ácido clorídrico, gerando dissulfeto de carbono, que, após purificação é coletado em uma solução etanólica de acetato de cobre e diálcool etílicoamina. Dois complexos cúpricos de ditiocarbamatos [cúprico-N,N-bis(2-hidroxi etil)] são formados e medidos em conjunto por espectrofotometria na região do visível em comprimento de onda de 435 nm contra um reagente de cor em solução etanólica.

- **Material**

- a) **Equipamentos e Acessórios**

- Espectrofotômetro B 382 Micronal, com celas de quartzo de 10 mm;
 - Manta de aquecimento;
 - Balança analítica Metler Toledo AB 204;
 - Balança semi-analítica Metler B4000;
 - Estufa Fanen.

b) Vidraria

Aparelho de destilação e decomposição (1 balão de 1 litro com 3 bocas, 1 destilador, 1 funil de separação, condensador, tubos lavadores e gases, conexões apropriadas), conforme Figura 5.

- Balão de 3 bocas de 1000 mL;
- Pipetas volumétricas de diferentes capacidades;
- Balões volumétricos de diferentes capacidades;
- Béqueres de diferentes capacidades;
- Pipetas Pasteur;
- Provetas graduadas de diferentes capacidades;
- Balão de fundo redondo de 1000 mL com 3 bocas;
- Condensador;
- Fracos em U de 100 mL com conexão esférica (figura 3);
- Funil de separação de 300 mL;
- Espátulas.

c) Padrões, Reagentes

- Álcool etílico p.a.;
- Mancozebe - padrão analítico certificado;
- Dissulfeto de Carbono (CS_2) de alto grau de pureza
- Hidróxido de sódio p.a.;
- Ácido clorídrico p.a.;
- Acetato de chumbo p.a.;
- Acetato de cobre p.a.;
- Dietanolamina p.a.;
- Cloreto estanoso p.a.;
- Lactose p.a.;
- Nitrogênio comum;
- Água destilada e desmineralizada.

- **Preparo das soluções-padrão**

Solução S₁: Em um balão volumétrico de 50 mL contendo 40 mL de etanol, pesou-se 1 mL de dissulfeto de carbono ($\delta = 1,266\text{g/mL}$), completando o volume com etanol.

Solução S₂: Foi tomada uma alíquota de 5 mL da solução S₁ para um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com etanol.

Solução S₃: Uma alíquota de 5 mL da solução S₂ foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL, completando o volume com etanol.

Soluções de trabalho: Em um balão volumétrico de 25 mL que já continha 15,0 mL da solução R₄ (reagente de cor) foram pipetados: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 mL da Solução S₃ e os volumes foram ajustados com etanol, resultando nas concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0 μg de CS₂ por mL, respectivamente.

- **Reagentes e suas preparações**

Branco de reagentes: Foi preparado com 15 mL da Solução R₄, completando o volume em um balão volumétrico de 25 mL com etanol.

Solução R₁: Acetato de chumbo: foram dissolvidas 30,0 g de acetato de chumbo em água com aquecimento, completando o volume em um balão volumétrico de 100 mL.

Solução R₂: Acetato de cobre: 0,4 g de acetato de cobre monohidratado [Cu(CH₃COO)2H₂O] foi dissolvido em 200 mL de etanol com aquecimento leve, completando o volume com etanol, em um balão volumétrico de 250 mL.

Solução R₃: 25 mL da solução R₂ foram diluídas com etanol em um balão volumétrico de 100 mL.

Solução R₄: Reagente de cor: Foram adicionados 100 mL de etanol, 30 mL da Solução R₃ e 25,0 g de dietanolamina em um balão volumétrico de 250 mL, completando o volume com etanol.

Solução R₅: Cloreto estanoso: Foram dissolvidas 40,0 g de cloreto estanoso dihidratado (SnCl₂ 2H₂O) em ácido clorídrico (HCl) e a solução foi avolumada em um balão volumétrico de 100 mL.

Solução R₆: Foram adicionados 20 mL da solução R₅ e 20 mL de ácido clorídrico em água, completando o volume a 200 mL.

Solução R₇: Hidróxido de sódio: Pesou-se 10,0 g de hidróxido de sódio, dissolvidos em água e avolumados a 100 mL em balão volumétrico.

- **Preparação da amostra**

As amostras foram quarteadas, cortadas em pequenos pedaços, homogeneizadas, transferidas para frascos de vidro com tampa, identificadas, e armazenadas congeladas.

- **Decomposição e destilação:**

Utilizou-se a vidraria para decomposição de ditiocarbamatos e destilação de CS₂ formado, conforme montagem representada na Figura 5.

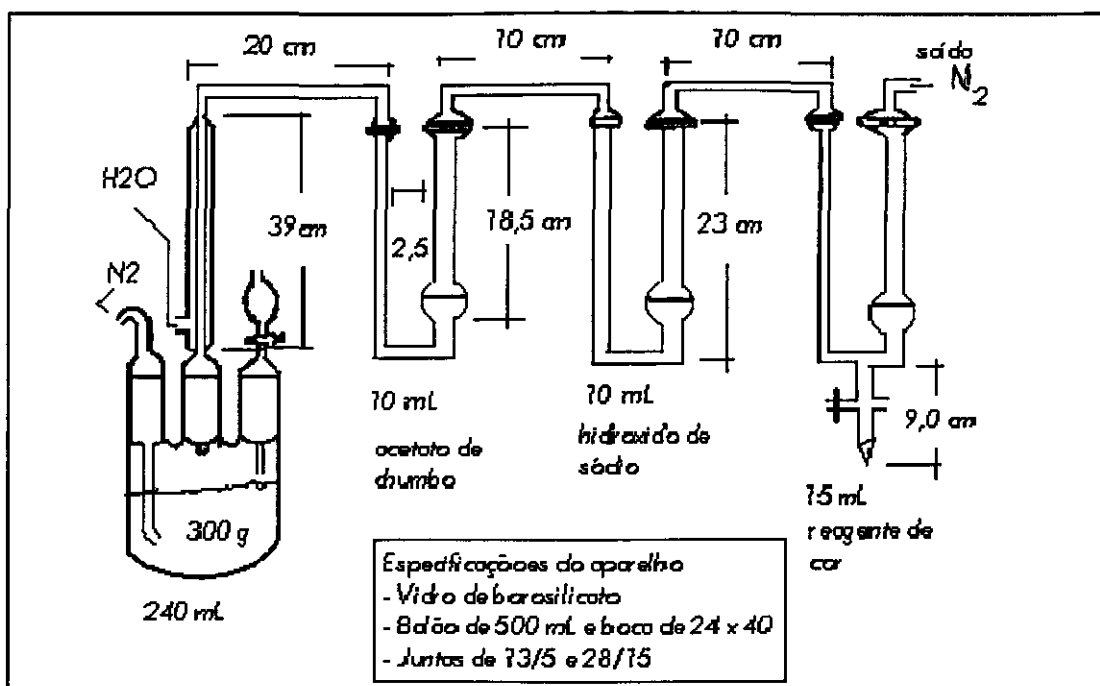


Figura 5 – Esquema da montagem da vidraria para decomposição de ditiocarbamatos e destilação do CS₂ formado.

- **Procedimento**

Foram pesados e transferidos 300,0 g de cada amostra para um balão de fundo redondo de 1000 mL e com 3 bocas. O condensador foi conectado na boca central e a conexão de entrada do nitrogênio e o funil de separação contendo 240 mL da Solução

R₆ nas bocas laterais. Foram conectados ao condensador, em seqüência, três frascos lavadores de gases, adicionando-se a cada um respectivamente: 10 mL da Solução R₁, 10 mL da Solução R₇, 15 mL da Solução R₃. Aquece-se o balão contendo a amostra e a solução R₆ até a ebulição por 60 minutos, sob corrente de fluxo brando de nitrogênio. Após, o fluxo de nitrogênio foi interrompido e o terceiro frasco lavador é desconectado. O conteúdo do terceiro frasco lavador foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com etanol. Foi feita a leitura da absorbância dos complexos cúpricos de ditiocarbamatos formados em espectrofotômetro na região do visível em comprimento de onda $\lambda = 435$ nm contra o branco de reagentes.

- **Condições espectrofotométricas**

Espectrofotômetro UV visível, com celas de quartzo de 10 mm, comprimento de onda ($\lambda = 435$ nm).

- **Preparação da curva-padrão**

Foi feita a leitura das absorbâncias de todas as soluções de trabalho em espectrofotômetro, a 435 nm contra o branco de reagentes. A curva-padrão foi traçada pelos valores das absorbâncias *versus* concentração de CS₂, usando uma regressão linear, e a escolha do intervalo de trabalho através do valor de correlação da reta.

- **Determinação**

A absorbância de cada amostra (espectrofotômetro com $\lambda = 435$ nm) foi lida e comparada com a curva massa x absorbância.

- **Cálculos**

O resíduo em mg/kg de CS₂ foi calculado por padronização externa através da curva de calibração, levando em consideração o fator de diluição e a quantidade de amostra.

Para o cálculo da concentração de dissulfeto de carbono na amostra utilizou-se a fórmula:

$$R = \frac{W}{G} \times V;$$

Onde: R = resíduo de CS₂ na amostra (mg/kg); W = quantidade de CS₂ lido na curva de calibração (µg/mL); G = peso da amostra (g); V = volume final: 25 mL.

Fatores de conversão do CS₂ para alguns etilenobisditiocarbamatos:

-Mancozebe = 1,776;

-Manebe = 1,742;

-Zinebe = 1,810.

O resultado é expresso em miligrama do princípio ativo ou de CS₂ por quilograma de amostra (mg/kg).

Devido à toxicidade dos compostos utilizados nas determinações analíticas citadas neste item, foram utilizados equipamentos de proteção em todo o procedimento, tais como: capela apropriada, avental, luvas impermeáveis, pêras de borracha. O descarte do material utilizado foi feito em frasco apropriado, identificado, após descontaminação prévia.

Todas as amostras foram analisadas pelos métodos descritos neste item. A avaliação de conformidade dos métodos propostos foi feita conforme parâmetros descritos no item 3.2.

3.4 Avaliação de risco de exposição a EBDC e à ETU através da ingestão de alimentos

3.4.1 Risco de ingestão de mancozebe através do consumo de mamão

Com os valores de resíduos de mancozebe e ETU, encontrados nas amostras de mamão tratadas 1, dose normal de uso, considerando o maior valor encontrado de 1,8 mg/kg e 0,09 mg/kg, respectivamente (Figura 13), foi verificada a contribuição do risco, pelo consumo de mamão em comparação com a Ingestão Diária Aceitável.

3.4.2 Estimativa da Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT) de EBDC

Para avaliar o risco de consumo de mancozebe e de ETU são necessários dados de resíduos e de consumo para todos alimentos onde é permitido o uso de EBDC. Como não existem dados de resíduos para todas as culturas, foi feita uma estimativa de ingestão pelo cálculo da Ingestão Diária Máxima Teórica.

A estimativa da Ingestão Diária Máxima Teórica foi calculada assumindo-se o LMR (ANVISA 2003 e MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003) como o nível de resíduo em cada alimento e utilizando-se, como dieta padrão para o consumo de alimentos, maior consumo médio *per capita* do total das regiões metropolitanas pesquisadas no Brasil, para cada alimento, conforme Pesquisa de Orçamentos Familiares dos anos de 1995 e 1996 (IBGE 1998), segundo a equação:

$$IDMT = \sum C_i \times LMR_i$$

Onde:

C_i = maior consumo médio *per capita* do total das regiões metropolitanas pesquisadas no Brasil, para cada alimento, conforme Pesquisa de Orçamentos Familiares dos anos de 1995 e 1996 (IBGE 1998), em kg de alimento por pessoa por dia;

LMR_i = LMR correspondente ao alimento, em mg do agrotóxico por kg de alimento.

Os valores das IDMT foram calculados pelos LMR estabelecidos pela Portaria 10 de 08/03/85 e atualizações, em vigor até 01/09/03, e pela legislação atual, Resolução nº 165, publicada em 02/09/03.

Porém IDMT é uma superestimativa da ingestão real de resíduos de agrotóxicos, principalmente porque o LMR se aplica ao vegetal inteiro e "*in natura*", que quase sempre inclui uma porção não comestível, como por exemplo: a casca. No presente estudo a análise foi feita no fruto todo (casca + polpa + semente), pois de acordo com o Codex Alimentarius estudos de resíduos em mamão devem ser realizados na fruta inteira.(CODEX ALIMENTARIUS citado por TOLEDO e col. 2002 p. 70), além de que alguns hábitos de consumo incluem a semente, e também a casca (doce de mamão verde). Porém, se a IDMT não exceder a IDA, é altamente improvável que seja excedida

na prática, desde que os LMR sejam estabelecidos para os principais usos do agrotóxico e desde que sejam utilizadas as Boas Práticas Agrícolas. Neste caso, não são necessárias estimativas mais precisas para a ingestão de resíduos.

3.4.3 Comparação da Ingestão Diária Máxima Teórica de EBDC com a Ingestão Diária Aceitável

Com os dados obtidos no item 3.4.2, foi estimada a IDMT de resíduos de EBDC para o total das culturas onde é autorizado o uso de EBDC, e foi comparada com a Ingestão Diária Aceitável (IDA). Os resultados foram expressos em percentagem (%) da IDA.

3.4.4 Conversão da IDMT de EBDC para ETU e comparação com a IDA

Como não foram estabelecidos LMR para ETU na legislação, foi estimado um valor da IDMT para ETU, através da conversão da IDMT de EBDC para IDMT de ETU. Os fatores de conversão foram baseados nos estudos de metabolização e excreção de ETU.

Estudos realizados por NELSON, em 1986, demonstram que 23 % de 100 mg/kg de mancozebe podem ser convertidos a ETU em ratos. DIDONATO, em 1986, concluiu que 6,4 % de 100 mg/kg de mancozebe, 13,6 % de 25 mg/kg de manebe, 9,5 % de 5 mg/kg de metiram, 22 % de 50 mg/kg de zinebe, são transformados a ETU em plasma de rato. Porém, estes dados foram todos baseados no C¹⁴ total, sem conversão para o respectivo peso molecular (NELSON 1986 e DIDONATO 1986 *apud* MAFF 1990 p. 74).

Aplicando o fator de conversão para o peso molecular, considerando a máxima conversão *in vivo*, nos estudos citados, a porcentagem de mancozebe que se transforma em ETU é de 8,7% ($102 \times 23 : 270$), e de manebe é de 13,6% ($102 \times 13,6 : 265,29$). Com estes fatores de conversão foram calculados os valores de ETU a partir das IDMT de mancozebe e manebe, e foram comparados com a IDA.

4 RESULTADOS

A hipótese da presença de resíduos de etilenotiouréia em mamão tratado com etilenobisditiocarbamato (mancozebe) foi confirmada pelo presente estudo analítico.

Abaixo seguem os resultados obtidos em cada etapa do estudo.

4.1 Resultados dos estudos de conformidade de validação dos métodos analíticos

As condições cromatográficas foram otimizadas e obteve-se uma boa resolução para o pico de ETU, com tempo de retenção médio de aproximadamente 2,6 minutos nas condições descritas no 3.3.1, conforme pode ser observado na Figura 6.

O branco da análise não apresentou interferentes no tempo de retenção do ETU, conforme pode ser observado no cromatograma da Figura 7.

Não foram encontrados resíduos de ETU nas amostras testemunhas no limite de quantificação do método, que foi de 0,01 mg/kg. A amostra testemunha de mamão não apresentou interferentes no tempo de retenção de interesse. Ela apresentou um pico no tempo de retenção de 2,372 e o tempo de retenção de ETU foi 2,561 conforme pode ser observado nas Figuras 8 e 6, respectivamente.

Foi feita a verificação da aplicabilidade dos métodos propostos em amostra de mamão *Carica Papaya L.*, através da determinação da porcentagem de recuperação em múltiplas amostras controle fortificadas e foram determinados os níveis de exatidão e precisão, bem como os limites de quantificação (LQ) do método. A Figura 9 ilustra um de cromatograma de amostra de mamão fortificada no nível de 10LQ.

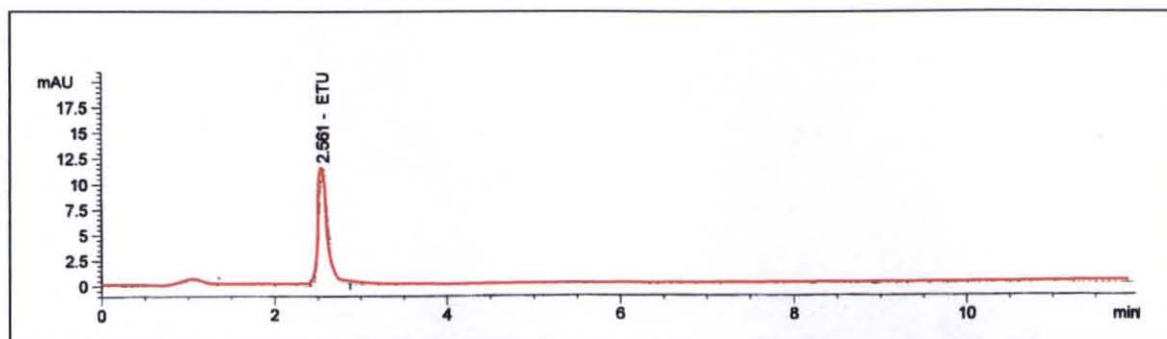


Figura 6 - Cromatograma da solução-padrão de ETU (190,4 ng) em HPLC/UV.

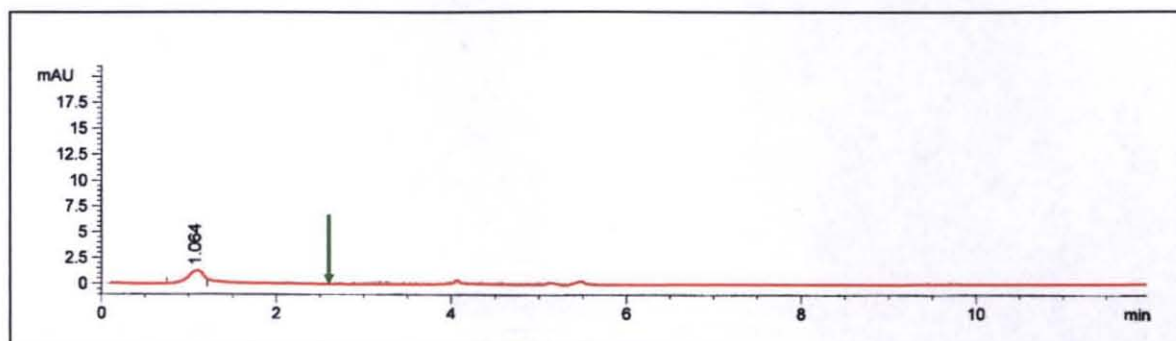


Figura 7 - Cromatograma do branco da análise em HPLC/UV.

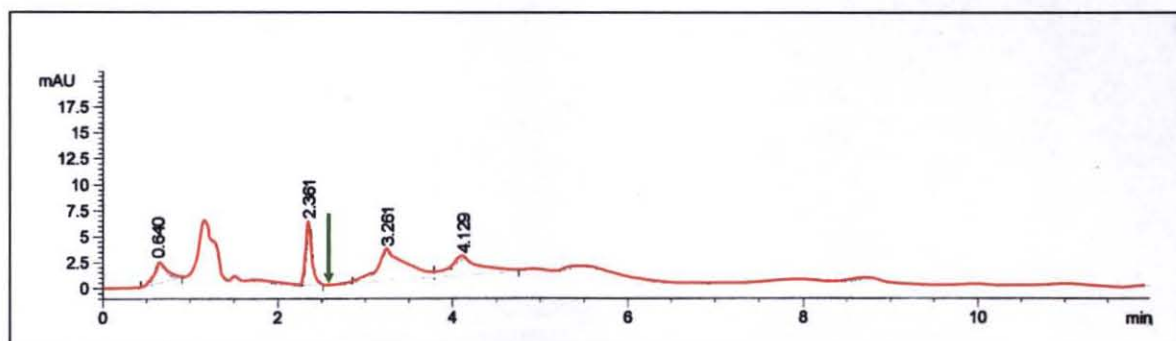


Figura 8 - Cromatograma da amostra-testemunha de mamão em HPLC/UV.

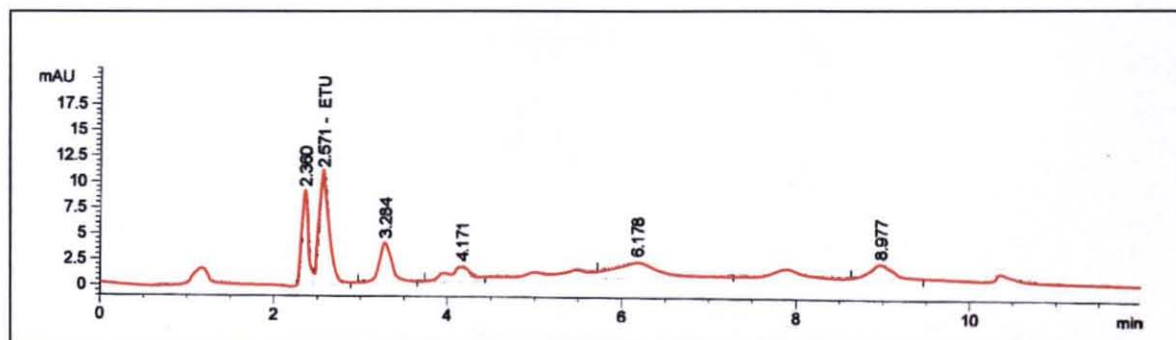


Figura 9 - Cromatograma da amostra-fortificada (ETU 0,12 mg/kg) em HPLC/UV.

Todas as curvas-padrão utilizadas para o cálculo de resíduos de ETU e de ditiocarbamatos (CS_2) apresentaram coeficientes de correlação $> 0,996$. Na Figura 10 temos uma curva de calibração de ETU que apresentou um coeficiente de correlação igual a 0,999, e na Figura 11, uma curva de calibração de CS_2 com coeficiente de correlação igual a 0,998.

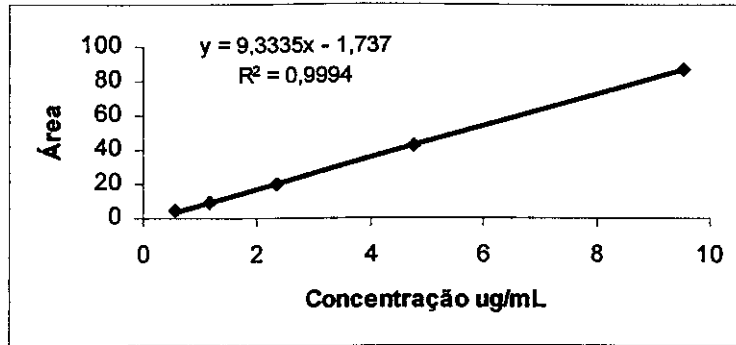


Figura 10 – Curva de calibração de ETU

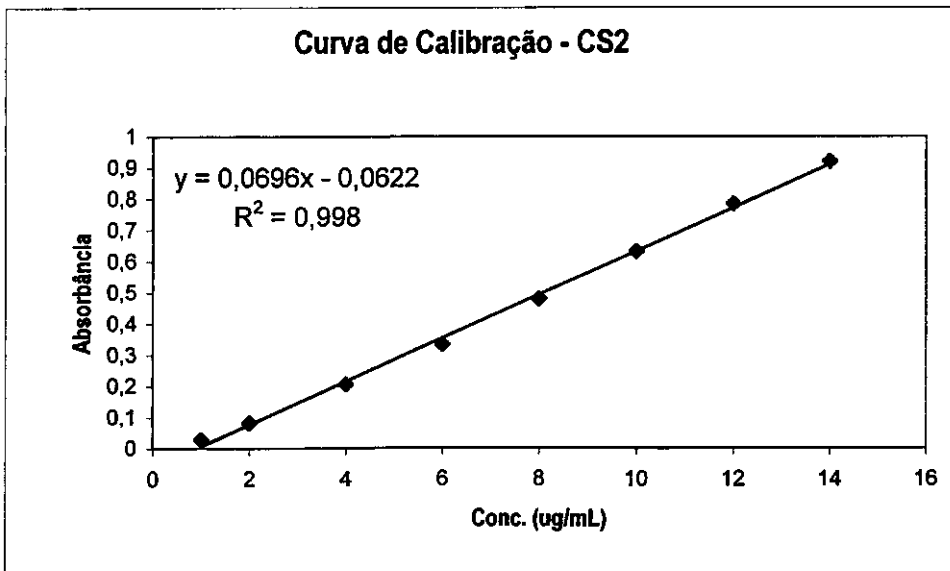


Figura 11 – Curva de calibração de CS_2 .

O método para determinação de resíduos de ETU em amostras de mamão apresentou uma boa precisão com coeficiente de variação de 3,7 à 13,3%, dependendo do nível fortificado, conforme pode ser observado na Tabela 19, apresentando recuperações de 80-110% e o coeficiente de variação global de 10,4%, conforme Tabela 19.

O limite de quantificação para ETU foi de 0,01 mg/kg e o limite de detecção foi de 0,005mg/kg.

Tabela 19 - Distribuição dos resultados das recuperações de ETU, desvio-padrão e coeficiente de variação de acordo com o nível de fortificação.

Nível de Fortificação (mg/kg)	Recuperação (%)	Média Recuperação (%)	Desvio Padrão	CV (%)
0,01 (LQ)	103	90	11,9	13,3
	86			
	80			
0,02 (2 x LQ)	109	107	5,8	5,4
	100			
	110			
0,12 (10 x LQ)	105	102	3,8	3,7
	98			
	104			
Σ recuperações	Varição 80-110	99	10,3	10,4

Amostra fortificada: amostra controle com adição de concentração conhecida de padrão; Recuperação: relação entre a concentração encontrada e a concentração adicionada para cada amostra fortificada (em porcentagem); LQ: limite de quantificação do método.

Os resultados do estudo de recuperações de mancozebe, a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação para cada nível de fortificação encontram-se na Tabela 20.

O método para determinação de resíduos de mancozebe em amostras de mamão apresentou uma boa precisão, com coeficiente de variação de 4,8 a 13,2%, dependendo do nível fortificado, conforme pode ser observado na Tabela 20, apresentando recuperações de 70 a 110% e coeficiente de variação global de 12,6 %.

Tabela 20 - Distribuição dos resultados das recuperações de mancozebe, desvio-padrão e coeficiente de variação de acordo com o nível de fortificação.

Nível de fortificação (mg/Kg)	Recuperação (%)	Média recuperação (%)	Desvio-padrão	Coeficiente de variação (%)
0,2 (1/2 LQ)	110	102	8,7	8,5
	95			
	95			
0,5 (LQ)	84	83	5,0	6,0
	78			
	88			
1,0 (2 x LQ)	82	83	4,0	4,8
	79			
	87			
3,0 (6 x LQ)	70	77	10,2	13,2
	89			
	73			
∑ recuperações	Variação 70-110	86	10,9	12,6

Amostra - fortificada: amostra controle com adição de concentração conhecida de padrão; Recuperação: relação entre a concentração encontrada e a concentração adicionada para cada amostra fortificada (em porcentagem); LQ: limite de quantificação do método.

O limite de detecção foi de 0,1 mg/kg de mancozebe.

O limite de quantificação do método foi de 0,3 mg/kg de CS₂, correspondente a 0,5 mg/kg de mancozebe.

Em relação à reprodutibilidade externa, os resultados obtidos no Programa “Interlaboratorial de Análise de Etilenobisdicarbamatos” a nível nacional, organizado pela Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas pelo método espectrofotométrico utilizado neste estudo, foram satisfatórios (BARRETTO 2001). O resultado da amostra de mamão, previamente analisada e que continha ETU, enviada para um laboratório de controle de qualidade de indústria, foi confirmado.

Em relação à reprodutibilidade interna, foi realizado estudo de recuperações de ditiocarbamatos em mamão, em período distinto e por outro analista, apresentando recuperações de 73 a 113 %, com coeficientes de variação dentro dos limites aceitáveis (VIEIRA E TOLEDO 1999).

Em relação à robustez, estudos de recuperações de ditiocarbamatos foram realizados em diferentes matrizes de frutas e legumes por outro analista e apresentaram recuperações dentro dos limites aceitáveis.

4.2 Resultados dos estudos de resíduos de mancozebe e de seu metabólito ETU

Todas as amostras tratadas com mancozebe apresentaram resíduos de ETU em níveis que variaram de 0,01 mg/kg a 0,32 mg/kg, dependendo do tratamento e da procedência, conforme Figuras 13 e 14. Na Figura 12 encontra-se um cromatograma da amostra de mamão tratado com mancozebe, tratamento 1 (160g i.a/ha), da localidade de Lins-SP, como exemplo.

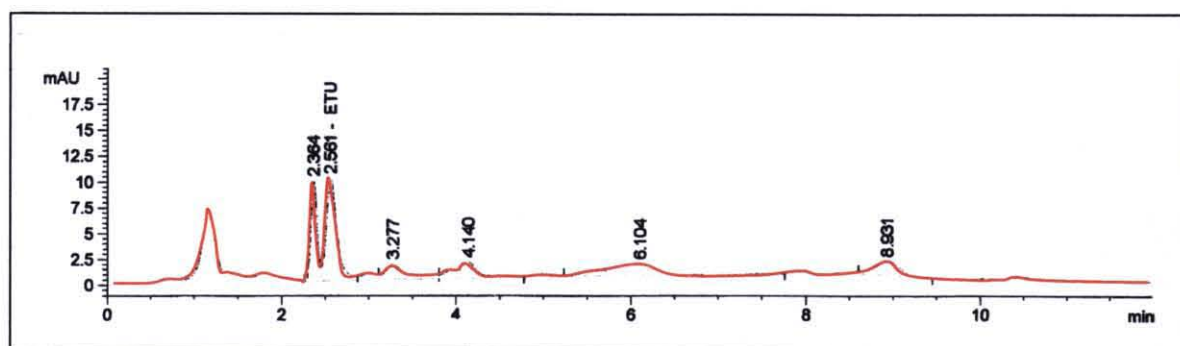


Figura 12 – Cromatograma de uma amostra de mamão tratado com mancozebe.

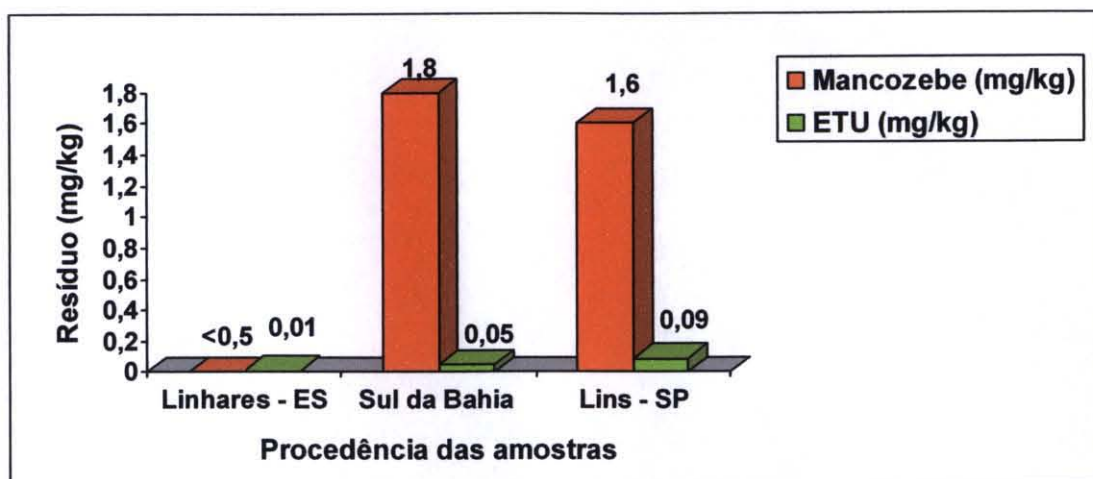


Figura 13 – Resultado do estudo de resíduos de EBDC (mancozebe) e etilenotiouréia nas amostras de mamão tratado com mancozebe, tratamento 1 (160g ia/ha), de acordo com a procedência.

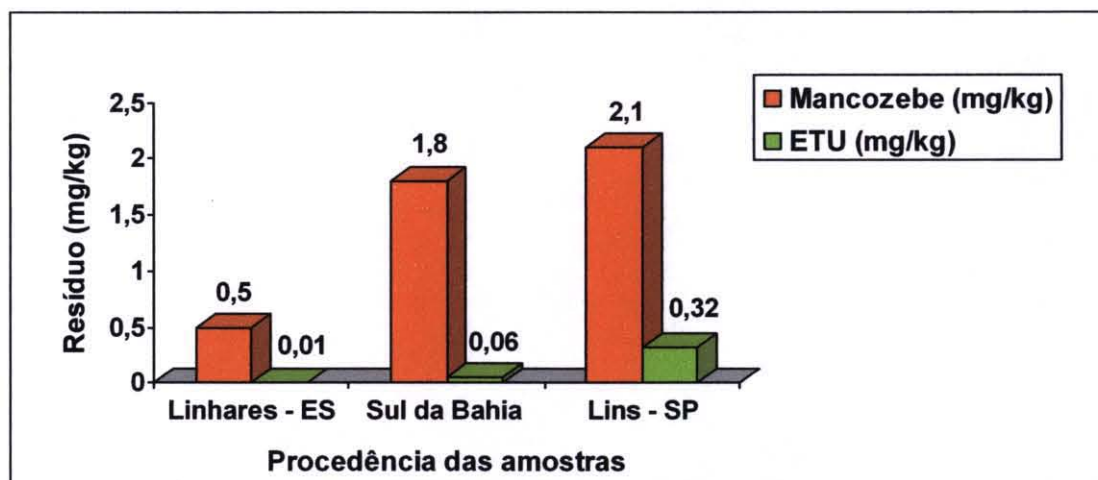


Figura 14 – Resultado do estudo de resíduos de EBDC (mancozebe) e etilenotiouréia nas amostras de mamão tratado com mancozebe, tratamento 2 (320 g ia/ha), de acordo com a procedência.

Foram encontrados resíduos de CS₂ em todas as amostras tratadas de mamão em níveis que variaram de 0,5 mg/kg a 2,1 mg/kg calculados em mancozebe, conforme pode ser observado nas Figuras 13 e 14.

Todas as amostras-testemunhas apresentaram resíduos de CS₂ em níveis menores do que o limite de quantificação do método que foi de 0,3 mg/kg de CS₂.

4.3 Resultados dos estudos de dissipação de mancozebe e de seu metabólito ETU

Os resultados do estudo de dissipação de mancozebe e ETU, realizado na cidade de Lins-SP, encontram-se na Figura 15.

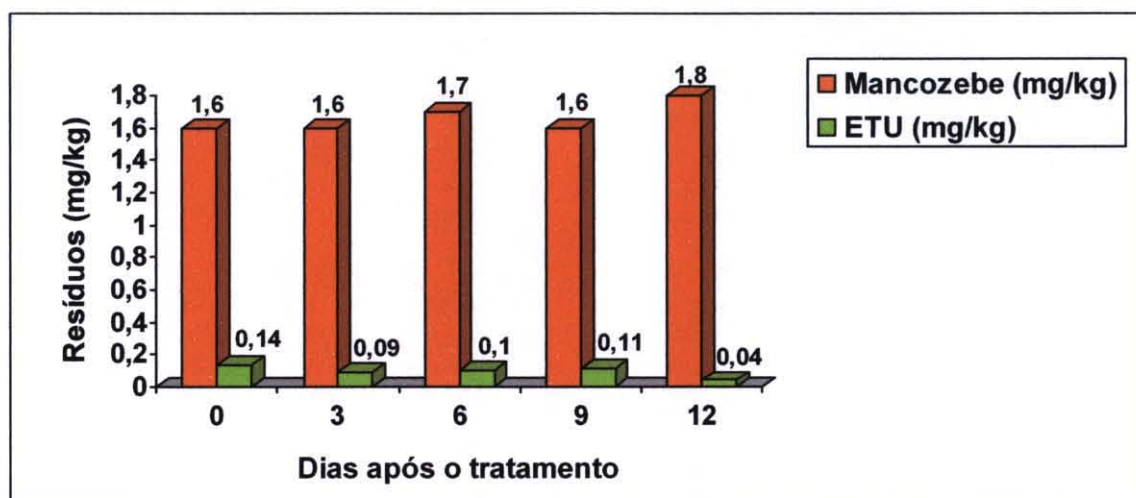


Figura 15 – Resultado do estudo de dissipação dos resíduos de EBDC (mancozebe) e etilenotiouréia nas amostras de mamão tratado com mancozebe, tratamento 1 (160 g i.a/ha), realizado em Lins-SP.

Foram encontrados resíduos de mancozebe e ETU em todas as amostras de mamão tratado. Verifica-se que os valores de resíduos de mancozebe permaneceram praticamente inalterados, enquanto que os níveis de ETU decaíram de 0,14 mg/kg (0 DAT) para 0,04 mg/kg, após 12 dias do tratamento.

4.4 Resultados da avaliação de risco de exposição a EBDC e à ETU através da ingestão de alimentos

4.4.1 Risco de ingestão de mancozebe através do consumo de mamão

Com os valores de resíduos de mancozebe e ETU, encontrados nas amostras de mamão tratadas 1, dose normal de uso, considerando o maior valor encontrado de 1,8 mg/kg e 0,09 mg/kg, respectivamente (Figura 13), foi verificada a contribuição do risco, pelo consumo de mamão em comparação com a Ingestão Diária Aceitável, e os resultados encontram-se na Tabela 21.

Tabela 21 - Risco de ingestão de mancozebe através do consumo de mamão, em % IDA.

Substância	Valor encontrado (mg/kg)	Consumo de mamão^a kg/dia	Ingestão mg/pessoa/dia	IDA (mg/kg pc/dia)	IDA^a (mg/pessoa/dia)	% IDA
Mancozebe	1,8*	0,01015	0,01827	0,03^b	1,8	1,0
ETU	0,09*	0,01015	0,00091	0,002^c	0,12	0,7

* considerando o maior valor encontrado no tratamento 1 (uso normal); a = considerando o peso médio de uma pessoa igual a 60 kg; b= valor estabelecido pelo CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO1998); c = valor estabelecido pelo CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO 1994); EBDC= etilenobis-ditiocarbamatos (mancozebe, manebe, metiram e zinebe); IDMT= Ingestão Diária Máxima Teórica; IDA= Ingestão Diária Aceitável.

O risco de ingestão de mancozebe e de ETU através do consumo de mamão, foi de 1,0% da IDA e 0,7% da IDA, respectivamente (Tabela 21).

4.4.2 Resultados da estimativa da Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT) de EBDC

A IDMT foi calculada pelos LMR da Portaria 10 de 08/03/85 e atualizações (Tabela 22) e pela Resolução 165 da ANVISA/MS em vigor a partir de 02/09/03 (Tabelas 23, 24 e 25), como o nível de resíduo no alimento, e utilizando-se, como dieta padrão de alimentos, o maior consumo médio *per capita* dentre as regiões metropolitanas pesquisadas no Brasil (IBGE 1998).

A Tabela 22 apresenta o cálculo da IDMT para diferentes culturas, segundo LMR estabelecidos pela Portaria 10 e suas atualizações (BRASIL 1985; ANVISA 2003).

Os resultados da estimativa da Ingestão Diária Máxima Teórica de EBDC pelo consumo de frutas e de outros alimentos, encontram-se nas Tabelas 23 e 24, respectivamente. A Tabela 25 apresenta o cálculo da IDMT para outros ditiocarbamatos.

Tabela 22 -Estimativa da Ingestão Diária Máxima Teórica de EBDC (Portaria10)**

Alimento	Consumo*		Mancozebe		Manebe	
	kg/ano	Cj(kg/dia)	LMR	(Cj x LMRj)	LMR	(Cj x LMRj)
Banana	20,965	0,05743			1,0	0,05743
Citros	36,325	0,09952	0,5	0,04976	1,0	
Maçã	4,509	0,01235			3,0	
Mamão	3,705	0,01015	5,0	0,50750	7,0	0,07105
Manga	2,493	0,00683	2,0	0,01366		
Melancia	6,285	0,01721			1,0	0,01721
Melão	1,648	0,00451	0,5	0,00225	1,0	0,00451
Morango	1,796 ^a	0,00492			1,0	0,00492
Pêra	1,519	0,00416			3,0	0,00124
Pêssego	2,246 ^b	0,00615			3,0	0,01845
Uva	2,171	0,00594			3,0	0,01784
Alface	1,126	0,00308			10,0	0,03080
Brócolis	0,051 ^c	0,00013	0,5	0,00006		
Chicória	0,051 ^c	0,00013			10,0	0,00130
Couve	1,693	0,00463	0,5	0,00231		
Couve flor	1,124	0,00307	0,5	0,00153		
Espinafre	0,051 ^c	0,00013			10,0	0,00130
Repolho	1,468	0,00402	0,5	0,00201	10,0	0,04020
Abóbora	2,247	0,00615			1,0	0,00615
Aipo	1,819 ^d	0,00514			1,0	0,00514
Algodão	0,888 ^e	0,00243	0,2	0,00048		
Amendoim	0,940 ^f	0,00257	0,2	0,00051	0,2	0,00051
Arroz	45,050	0,12342			1,0	0,12342
Batata	13,669	0,03744			0,1	0,00374
Beterraba	1,431	0,00392			0,1	0,00039
Café	3,720	0,01019			1,0	0,01019
Cebola	6,181	0,01693			3,0	0,05079
Cenoura	4,279	0,01172			1,0	0,01172
Cevada	0,860 ^c	0,00235			0,2	0,00047
Feijão	14,916	0,04086	0,5	0,02043	0,05	0,00204
Pepino	1,299	0,00355			0,5	0,00177
Pimentão	2,280	0,00624	1,0			0,00624
Soja	0,860 ^c	0,00241	1,0			0,00241
Tomate	7,164	0,01962			1,0	0,01962
Trigo	0,860 ^c	0,00241	0,5	0,001205	2,0	0,00482
IDMT				0,601705		0,51567
IDMT EBDC				1,117375		

Fonte: * IBGE (1998), **Portaria 10 e atualizações em vigor até 01/09/03 (ANVISA 2003).

Tabela 23 - Estimativa da Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT) de ditiocarbamatos, pela estimativa de consumo* de frutas e LMR estabelecidos pelo uso de EBDC de acordo com a Resolução nº 165, em vigor desde 02/09/03.**

Alimento Frutas	Consumo por pessoa		Ditiocarbamatos- CS ₂		IDMT (Cj x LMRj)
	Estimativa de consumo* (kg/ano)	Cj (kg/dia)	LMR (mg/kg)	Princípio ativo	
Abacate	0,745	0,00204	1,0	Mancozebe	0,00204
Banana	20,965	0,05743	1,0	Mancozebe	0,05743
Citros	36,325	0,09952	2,0	Mancozebe	0,19904
Maçã	4,509	0,01235	2,0	Metiram e Mancozebe	0,02470
Mamão	3,705	0,010150	3,0	Mancozebe	0,03035
Manga	2,493	0,006830	1,0	Mancozebe	0,00683
Melancia	6,285	0,017219	0,3	Mancozebe	0,00516
Melão	1,648	0,004515	1,0	Mancozebe	0,00451
Morango	1,796 ^a	0,004920	0,2	Metam	0,00098
Pêra	1,519	0,004161	3,0	Mancozebe	0,01248
Pêssego	2,246 ^b	0,006153	2,0	Mancozebe	0,01230
Uva	2,171	0,005947	3,0	Mancozebe	0,01784
IDMT mancozebe					0,37268
IDMT metam					0,00098
IDMT EBDC					0,37366

a= outras frutas de clima tropical ; b= outras frutas de clima temperado

Fonte: *IBGE (1998) e ** (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003)

Tabela 24 - Estimativa da Ingestão Diária Máxima Teórica de Ditiocarbamatos, pela estimativa de consumo* de outros alimentos, exceto frutas, e LMR estabelecidos pelo uso de EBDC de acordo com a Resolução nº 165 em vigor desde 02/09/03.**

Alimento	Consumo por pessoa		Consumo por pessoa		IDMT (Cj x LMRj)
	Estimativa de consumo* (kg/ano)	Cj (kg/dia)	LMR (mg/kg)	EBDC Princípio ativo	
Abóbora	2,247	0,00615	1,0	Mancozebe	0,00615
Aipo	1,879 ^d	0,00514	0,5	Manebe	0,00257
Alface	1,126	0,00308	6,0	Manebe	0,01850
Alho	0,569	0,00155	0,1	Mancozebe	0,00015
Arroz	45,050	0,12342	3,0	Mancozebe	0,37027
Beterraba	1,431	0,00392	0,3	Mancozebe	0,00117
Berinjela	0,276	0,00075	0,5	Mancozebe	0,00037
Brócolis	0,051 ^c	0,00013	0,5	Mancozebe	0,00006
Café	3,720	0,01019	0,3	Mancozebe	0,00305
Cenoura	4,279	0,01172	0,3	Mancozebe	0,00351
Cevada	0,860 ^e	0,00235	1,0	Mancozebe	0,00235
Chicória	0,051 ^c				
Couve	1,693	0,00463	1,0	Mancozebe	0,00463
Couve flor	1,124	0,00307	0,5	Mancozebe	0,00153
Espinafre	0,051 ^c				
Ervilha	0,940 ^f	0,00257	0,3	Mancozebe e Tiram	0,00077
Feijão	14,916	0,04086	0,3	Mancozebe e Tiram	0,01225
Feijão-vagem	0,940	0,00257	0,3	Mancozebe	0,00077
Pepino	1,299	0,00355	0,3	Mancozebe	0,00106
Pimentão	2,280	0,00624	1,0	Mancozebe	0,00624
Repolho	1,468	0,00402	1,0	Mancozebe	0,00402
Tomate	7,164	0,01962	2,0	Mancozebe	0,03925
Trigo	0,860 ^e	0,00235	1,0	Mancozebe	0,00235
IDMT_{mancozebe}					0,46072
IDMT_{manebe}					0,02107
IDMT_{EBDC}					0,48179

c= outras hortaliças folhosas e florais; d=outras hortaliças tuberosas e outras; e= outros cereais; f= outras leguminosas a= outras frutas de clima tropical ; b= outras frutas de clima temperado
Fonte:*IBGE (1998) e ** (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003)

Tabela 25 -Estimativa da Ingestão Diária Máxima Teórica de ditiocarbamatos, pela estimativa de consumo* de outros alimentos, exceto frutas, e LMR estabelecidos pelo uso de tiram e propinebe de acordo com a Resolução nº 165 em vigor desde 02/09/03.**

Alimento	Consumo por pessoa		Ditiocarbamatos- CS ₂		IDMT (Cj x LMRj)
	Estimativa de consumo* Kg/ano	Cj (kg/dia)	LMR (mg/kg)	EBDC Princípio ativo	
Algodão	0,888 ^b	0,00243	0,3	Tiram	0,000729
Amendoim	0,940 ^l	0,00257	0,3	Tiram	0,000772
Aveia	0,880 ^e	0,00243	0,3	Tiram	0,000729
Batata	13,669	0,03744	0,3	Propinebe	0,011234
Cebola	6,181	0,01693	0,3	Propinebe	0,005080
Milho	1,726	0,00472	0,3	Tiram	0,001418
Soja	0,880 ^e	0,00241	0,3	Tiram	0,000723
Sorgo	0,880 ^e	0,00241	0,3	Tiram	0,000723
IDMT_{propinebe}					0,016314
IDMT_{Tiram}					0,005095
IDMT subtotal					0,021409

e= outros cereais; f= outras leguminosas; g=outras

Fonte:*IBGE (1998) e ** (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003)

A Tabela 26 apresenta os resultados obtidos pelos cálculos das tabelas 22, 23 e 24.

Tabela 26 – Ingestão Diária Máxima Teórica de EBDC para frutas e outros alimentos, calculadas pela Portaria 10 e Resolução 165 (atual).

EBDC	Ingestão Diária Máxima Teórica					
	Frutas		Outros alimentos		Total	
	Portaria 10	RE 165	Portaria 10	RE 165	Portaria 10	RE 165
Mancozebe	0,57317		0,02853		0,60170	
CS ₂	0,32273	0,37268		0,46072	0,33879	0,83340
Manebe	0,19265		0,32302		0,51567	
CS ₂	0,11059	0,00098		0,02107	0,29602	0,02205
EBDC	0,76582		0,35155		1,11737	
CS ₂	0,43322	0,37366		0,48179	0,63481	0,85545

4.4.3 Comparação da Ingestão Diária Máxima Teórica de EBDC com a IDA

A Tabela 27 apresenta a comparação da Ingestão Diária Máxima Teórica de etilenobisditiocarbamato com a Ingestão Diária Aceitável.

Tabela 27 - Comparação da Ingestão Diária Máxima Teórica de etilenobisditiocarbamato com a Ingestão Diária Aceitável.

	IDA*	IDA**	LMR	Ingestão Diária Máxima Teórica	
Ditiocarbamatos	(mg/kg pc/dia)	(mg/pessoa/dia)		(mg/pessoa/dia)	% IDA
Mancozebe	0,03 ^b	1,80	Portaria 10 ^c	0,60 mancozebe	33
				0,57 frutas- mancozebe	32
			RE 165 ^d	1,47 mancozebe	87
				0,66 frutas-mancozebe	37
Manebe	0,03 ^b	1,80	Portaria 10 ^c	0,51 manebe	28
				0,19 manebe	10
			RE 165 ^d	0,04 manebe	2
Etilenobisditiocar- bamatos EBDC - CS ₂	0,03 ^b	1,80	Portaria 10 ^c	0,63 CS ₂	35
				RE 165 ^d	0,85 CS ₂
			0,37 CS ₂ - frutas		20

** Considerando o peso médio de uma pessoa igual a 60 kg; b= valor estabelecido pelo CODEX ALIMENTARIUS (1998) para o grupo dos EBDC; c= calculo pelo LMR da Portaria 10 de 08/03/85 e atualizações (ANVISA 2003); d= cálculo pela RE 165 de 02/09/03 (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003); EBDC= etilenobisditiocarbamatos (mancozebe, manebe, metiram e zinebe); IDMT= Ingestão Diária Máxima Teórica; IDA= Ingestão Diária Aceitável

Conforme pode ser observado na tabela 26, a IDMT de EBDC, pelo consumo de todos os alimentos, representa 47 % da IDA, e pelo consumo de frutas representa 20% da IDA.

4.4.4 Conversão da IDMT de EBDC para ETU e comparação com a IDA

Como não foram estabelecidos LMR para ETU, os cálculos da IDMTT de ETU foram estimados, calculados a partir dos valores das IDMT dos EBDC, e, considerando dados de estudos da metabolização e excreção de ETU, realizados por NESON (1986) e DIDONATO (1986) conforme descrito no item 3.4.4.

Com fatores de conversão de 8,7% para mancozebe e de 13,6% para manebe foram calculados os valores de ETU a partir das IDMT de mancozebe e manebe e os dados encontram-se na Tabela 28.

Tabela 28 – Comparação dos valores calculados de ETU, baseados na conversão de mancozebe e manebe para ETU, com a IDA

EBDC	IDMT (mg/pessoa/ dia)	IDMT ETU calculada (mg/pessoa/ dia)	IDA* ETU (mg/kg pc/dia)	IDA ETU (mg/pessoa/ dia)	% IDA ETU
Mancozebe	0,60 ^a	0,0522 ^c	0,002	0,12	43,5
	1,47 ^b	0,1278 ^c	0,002	0,12	106,5
Manebe	0,51 ^a	0,0693 ^d	0,002	0,12	57,8
	0,04 ^b	0,0050 ^d	0,002	0,12	4,1
EBDC	1,11 ^a	0,1215	0,002	0,12	101,2
	1,51 ^b	0,1328	0,002	0,12	110,7

* valor estabelecido pelo Codex Alimentarius (1994); a= calculo pelo LMR da Portaria 10 de 08/03/85 e atualizações (ANVISA 2003); b= cálculo pela RE 165, de 02/09/03, (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003);

A Ingestão Diária Máxima Teórica calculada para ETU representa 106,5% da IDA, pela conversão da IDMT de mancozebe e 4,1% da IDA, pela conversão de manebe. Para o EBDC total a IDMT calculada para ETU representa 110,7% da IDA, conforme Tabela 28.

5 DISCUSSÃO

5.1 Métodos analíticos

A determinação de resíduos de ETU pode ser feita através de análise direta ou por derivatização através da cromatografia a gás ou cromatografia a líquido de alta eficiência. Apesar da análise direta por cromatografia a gás ser de fácil realização, apresenta alguns inconvenientes como a decomposição da ETU que pode ocorrer devido ao uso de altas temperaturas. Em relação à determinação de ETU em cromatografia a gás por derivatização, devido ao fato dos produtos formados serem voláteis, exige-se muito cuidado durante o procedimento analítico, principalmente na etapa de concentração do extrato, requerendo um maior tempo de análise e uso de reagentes muito tóxicos.

A determinação de ditiocarbamatos como CS₂ pode ser feita por técnicas espectrofotométricas ou cromatográficas. Apesar da técnica cromatográfica ser mais sensível, apresenta algumas desvantagens como, por exemplo, os vapores ácidos do “head space” diminuem o tempo de vida útil da coluna cromatográfica e requerem muito tempo para a realização da hidrólise ácida (STEIWANDTER 1985; HILL 1992). Para minimizar este problema, HARRINGTON e col. (1998) sugeriram a dissolução do CS₂ em solventes orgânicos (ex. o isoctano). Porém, é aconselhável que o laboratório mantenha um cromatógrafo a gás apenas para determinação do CS₂, o que na maioria das vezes não é viável.

A análise de ditiocarbamatos nos fornece a medida do total de CS₂ presente na amostra. Os valores de resíduos de CS₂, encontrados nas amostras testemunhas de mamão, em níveis abaixo de 0,3 mg/kg, alerta para a presença de outras fontes de enxofre. Certos compostos de origem vegetal podem produzir pequenas quantidades de CS₂ naturalmente ou pela condição de reação usada na digestão. Vários autores relatam a presença de interferentes em vários alimentos, como por ex. limão e couve. Um estudo realizado por LINDSAY (1990) *apud* HILL (1992 p. 219), demonstrou que couve-flor tem a capacidade de produzir CS₂, identificado e confirmado por cromatografia a gás acoplada a detector seletivo de massa (CG/MS) para amostras não tratadas com ditiocarbamatos, OTT e GÜNTHER (1982) afirmaram que interferências podem ser

esperadas na análise de casca de frutas, especialmente de banana. REYNOLDS (1990) citado por HILL (1992 p. 219) relatou níveis de CS₂ menores que 0,5 mg/kg em amostras de melão, determinados pela técnica de “head space”, e atribuiu a contaminação ao manuseio das amostras com luvas de látex que podem ser formuladas com ditiocarbamatos como agente acelerador de vulcanização, na concentração de aproximadamente 1% do peso.

A presença de resíduos de CS₂ nas amostras testemunhas pode ser decorrente de substâncias naturais na matriz, do manuseio com luvas de borracha ou pelo contato com objetos de borracha ou, ainda, pelo uso ou contato com outros produtos à base de enxofre, precursores de CS₂. Entretanto, a presença de possíveis interferentes tem sido prevista na avaliação de métodos analíticos para análise de resíduos de agrotóxicos. Estabele-se que o limite de quantificação deve ser 60% maior que o valor médio encontrado nas amostras-testemunha (GARP 1999). Desta maneira, não foi possível estabelecer limite de quantificação menor do que 0,3 mg/kg de CS₂ ou 0,5mg/kg expressos em mancozebe para mamão. Entretanto, este valor é suficiente para estabelecer comparações com os LMR da legislação brasileira vigente, que para mamão é de 3,0 mg/kg (Tabela 9), com os níveis encontrados.

Os métodos analíticos avaliados apresentaram exatidão e precisão satisfatórias e foram utilizados para determinação dos resíduos de mancozebe e de etilenotiouréia nesta pesquisa. Tanto as recuperações de mancozebe quanto às de ETU estavam dentro dos limites aceitáveis para resíduos, de 70% a 110%, com coeficiente de variação menor de 15% por nível de fortificação (precisão do método), conforme pode ser observado nas Tabelas 19 e 20.

Em relação à reprodutibilidade externa, avaliou-se o resultado obtido no Programa Interlaboratorial de Análise de Etilenobisditiocarbamato e verificou-se que foram satisfatórios e comparáveis com os resultados de outros laboratórios, onde foi utilizado o mesmo método. O resultado obtido em uma amostra tratada, previamente analisada, com resíduos de etilenotiouréia, foi confirmado por analista diferente em outro laboratório.

O método para determinação de ditiocarbamatos apresentou-se com uma boa reprodutibilidade interna, verificada através de estudos de recuperação de ditiocarbamatos realizados em período distinto e por outro analista do mesmo laboratório.

O método para determinação de ditiocarbamatos foi, ainda, validado para outras matrizes vegetais, no Laboratório de Resíduos de Pesticidas do Instituto Adolfo Lutz, por analista diferente e em período diverso, tendo demonstrado uma boa robustez.

5.2 Estudo de resíduos de mancozebe e ETU

Os produtores nacionais, muitas vezes, utilizam indevidamente os agrotóxicos nas culturas e, portanto os alimentos podem níveis residuais acima dos limites aceitáveis, e ainda, a presença de princípios ativos não autorizados para determinada cultura. No Brasil, (1051) 81,2 % das amostras analisadas no Programa Nacional de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, no período de junho de 2001 a junho de 2002, continham resíduos de agrotóxicos. Desse total, 233 (22 %) ultrapassaram os LMR permitidos pela legislação. Dentre estas, 74 (7%) continham resíduos de agrotóxicos não autorizados para as respectivas culturas, incluindo os ditiocarbamatos (ANVISA 2003).

O uso indevido de agrotóxicos pelo agricultor ocorre muitas vezes por receio de perda da cultura, por ineficiência ou por inexistência de assistência técnica, e, principalmente por falta de conscientização dos riscos. Em um estudo de caso realizado por FREITAS e col. (1994), em Teresópolis-RJ, município grande produtor de hortaliças, onde os agrotóxicos são largamente empregados nas culturas, principalmente o mancozebe, foi constatado que 55,7% dos aplicadores possuíam o primeiro grau incompleto e 14,1% não eram alfabetizados. 41 % dos entrevistados afirmaram que não receberam orientação para a preparação e aplicação dos agrotóxicos, 90,2% dos entrevistados não conheciam o receituário agrônomo e 92,6% não o utilizavam. Em relação aos equipamentos de proteção individual, 71,8% dos entrevistados não utilizavam esses equipamentos e os motivos alegados foram principalmente por serem desconfortáveis. Houve relato de 9% de casos de intoxicação.

A população que trabalha ou reside próxima à área agrícola, corre risco de exposição aguda aos agrotóxicos utilizados e o consumidor de alimentos pode estar sob risco da exposição crônica, se ingerir alimentos contendo resíduos dos princípios ativos utilizados e de seus produtos de transformação acima dos LMR permitidos. Estes problemas podem ser minimizados com a conscientização dos produtores em utilizarem as Boas Práticas Agrícolas.

O Brasil está entre os três maiores produtores de frutas do mundo, seguido da China e da Índia, produzindo 42 milhões de toneladas em 2,2 milhões de hectares. A produção mundial de “papaya” é de mais de cinco milhões de toneladas ao ano, e no Brasil, um milhão e oitocentas mil toneladas ao ano. A produção de “papaya” no extremo sul da Bahia representa 60% da produção brasileira, com escoamento diário em torno de 1.560 toneladas. Porém, a participação do país no mercado mundial de “papaya” é ainda pequena se comparada com a produção mundial, porém, as previsões apontam para um crescimento expressivo das exportações (SEAGRI 2003; SILVA 1999).

O consumo de frutas é expressivo na dieta alimentar brasileira, e estas são, na maioria das vezes, ingeridas *in natura*. A média de consumo alimentar domiciliar *per capita* anual de frutas foi de 40,397 kg, em 1996, para o total das regiões metropolitanas, de acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares (IBGE 2003).

O hábito mais usual de consumo é ingerir a polpa de mamão, porém, suas sementes, apesar de serem geralmente desprezadas, são comestíveis. Além de que, no Brasil, uma infinidade de receitas utiliza o mamão como ingrediente, e algumas delas incluem a casca, como o doce de mamão verde, cortado em forma de fita e que muito apreciado para consumo. Consomem-se ainda, outros produtos industrializados com mamão como iogurtes, sorvetes (SILVA 1999). As análises foram feitas no mamão inteiro, incluindo a polpa, semente e casca.

A hipótese de encontrar resíduos de etilenotiouréia em amostras de mamão tratado com o etilenobisditiocarbamato (mancozebe) foi confirmada, pois todas apresentaram resíduos de ETU em níveis que variaram de 0,01 a 0,32 mg/kg, conforme pode ser observado nas Figuras 13, 14 e 15.

Observa-se na Figura 13, que os resíduos de ETU presentes nas amostras de mamão tratado 1 (160g i.a.ha), diferem bastante de local para local. Os valores encontrados foram, em ordem decrescente: Lins-SP (0,09 mg/kg), Sul da Bahia (0,05 mg/kg) e Linhares-ES (0,01mg/kg).

Aparentemente, Linhares-ES apresenta condições mais favoráveis para a degradação tanto de mancozebe como de ETU, o que pode ser devido ao fato de apresentar temperaturas mais altas do que em São Paulo. Porém, os valores encontrados não se explicam apenas por esta diferença de temperatura, pois nos tratamentos realizados no Sul da Bahia, também com temperaturas mais elevadas do que em São Paulo, encontram-se valores mais elevados do que em Linhares-ES. Outros fatores devem ter interferido nos níveis de resíduos encontrados. Seria necessário um estudo mais aprofundado para verificar o porque dessa diferença.

Observa-se que apesar dos níveis de mancozebe nas amostras de mamão serem praticamente iguais, dentro do coeficiente de variação do método, no tratamento 1, os níveis de ETU apresentaram uma diferença significativa. Considerando o nível de precisão do método (coeficiente de variação de 15%), tem-se o mesmo resultado para mancozebe, em Lins e no Sul da Bahia. Porém, para ETU difere consideravelmente (55%) (Figura 13).

Os níveis de mancozebe e ETU nas amostras de mamão tratado (tratamento 2) foram iguais ou mais altos do que nas amostras (tratamento 1). Nas amostras provenientes de Linhares e do Sul da Bahia têm-se praticamente os mesmos resultados, quando se compara o tratamento 1 e 2. (Figuras 13 e 14).

Em relação aos resíduos de ETU, encontra-se um aumento considerável do nível no tratamento 2 em Lins-SP, cerca de 3,5 vezes o valor encontrado na dose de (160g i.a.ha), enquanto que os valores encontrados em Linhares e no Sul da Bahia são praticamente os mesmos, conforme Figura 14.

Para avaliar a dissipação de EBDC e ETU nas condições de campo, foi calculada a porcentagem de mancozebe que se transformou em ETU na amostra coletada no dia do tratamento (0 DAT), através da relação entre os pesos moleculares, e, a partir daí, qual foi a porcentagem de redução de ETU após 3, 6, 9 e 12 dias. Assim sendo, no dia do

tratamento (0 DAT), tem-se 81% de mancozebe e 19 % relativo, que se transformou em ETU. Após 3, 6, 9 dias a quantidade de ETU reduziu em média 28,5 %. E em 12 dias após a última aplicação, a quantidade de ETU reduziu em 71 %, enquanto que o nível de mancozebe permaneceu praticamente inalterado (média de 1,7 mg/kg, desvio-padrão de 0,1 e coeficiente de variação de 6 %), ou seja, dentro do nível de precisão do método utilizado. Para ETU a média foi de 0,10 mg/kg, com desvio-padrão de 0,04 e coeficiente de variação de 36,5 %. Portanto houve uma diminuição significativa dos níveis de ETU após 3 dias da aplicação, permanecendo praticamente inalterado após 6 e 9 dias, e uma diminuição mais acentuada ocorreu após 12 DAT (Figura 14).

No Codex Alimentarius os LMR são estabelecidos para a classe de ditiocarbamatos: mancozebe, manebe, metiram, zinebe, propinebe, tiram, ziram, ferbam, e os valores são expressos em CS₂ total. Como apenas a partir de EBDC pode-se formar a ETU, limites totais de ditiocarbamatos em CS₂ não permitem uma avaliação em relação aos níveis de ETU, pois o uso de qualquer ditiocarbamato gera CS₂ pelo método analítico.

No Brasil, até 01/09/2003, os limites máximos de resíduos eram estabelecidos para mancozebe, manebe, propinebe, tiram, ziram (ANVISA 2003). Desde 02 de setembro de 2003, data da publicação no Diário Oficial da União, está em vigor a Resolução RE nº 165, de 29 de agosto de 2003, da ANVISA/MS, na qual os LMR dos ditiocarbamatos são estabelecidos para CS₂ (mg/kg) em função do uso dos ingredientes ativos da classe dos EBDC: mancozebe, manebe, metiram e de outros como propinebe e tiram (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003). Esta mudança permite concluir sobre resultados analíticos obtidos pela determinação de CS₂.

Pela legislação revogada, Portaria 10, de 08/03/85, e atualizações (ANVISA 2003), o LMR para mancozebe em mamão era de 5,0 mg/kg e IDA de 0,03 mg/kg p.c./dia. e de 7,0 mg/kg para manebe e IDA de 0,03 mg/kg p.c./dia (ANVISA 2003). Na Resolução em vigor o LMR é de 3,0 mg/kg de CS₂ para mamão pelo uso de mancozebe (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003).

Somando-se os LMR permitidos para os EBDC pela legislação anterior, houve uma redução de 6,8 mg/kg, calculados em CS₂, para 3,0 mg/kg para a cultura de

mamão. Porém, para o total de EBDC permitido nas culturas aumentou, conforme pode ser observado nas Tabelas 9, 10 e 11.

Os EBDC (mancozebe, manebe e metiram) vem sendo revisados por alguns países da União Européia, pois atualmente os LMR são estabelecidos para mancozebe, manebe, metiram e propinebe e expressos como CS₂ equivalente, sendo que propinebe não é um EBDC e, portanto, não pode formar ETU (OLLINGER 2001).

A EPA tem listas de LMR para mancozebe, manebe e metiram. Não há tolerâncias específicas para ETU, que é incluído com a tolerância do produto principal. O monitoramento é feito para o ditiocarbamato precursor. Em 2001, a EPA concordou que os EBDC fossem regulamentados como classe, não incluindo outros ditiocarbamatos que também têm LMR separados (OLLINGER 2001).

A Ingestão Diária Aceitável para a classe dos EBDC (mancozebe, manebe, metiram e zinebe), para cada princípio ou em qualquer combinação, estabelecida pelo Codex Alimentarius é de 0,03 mg/kg/dia de CS₂ (FAO/WHO 1998).

LMR específicos para ETU não são estabelecidos no Brasil, na Europa, nos Estados Unidos e no Codex Alimentarius.

Vários países no mundo, incluindo o Brasil, têm monitorado os resíduos de ditiocarbamatos como CS₂ total.

VEGA e col. (1997) estudaram os níveis de resíduos de agrotóxicos em Cuba e encontraram níveis de EBDC acima dos limites máximos recomendados. Alertaram sobre a necessidade limitações de uso de EBDC, principalmente por motivos relacionados à saúde humana.

Resíduos de ditiocarbamatos em frutas e vegetais, originários do mercado interno e importados, foram analisados na Suécia. Em 69 (11 %) das 615 amostras analisadas, no período de 1972 a 1974, foram encontrados resíduos de ditiocarbamatos, sendo que em 23 amostras os níveis excederam os LMR de 1,0 mg/kg para frutas e vegetais, exceto para cenoura e batata (que é de 0,3 mg/kg). Resíduos de ditiocarbamatos foram encontrados em 13 (15%) das 89 amostras de alface importadas no período de janeiro a junho de 1976, com resíduos maiores que 0,5 mg/kg, sendo que 5 amostras com níveis maiores que 1,0 mg/kg. No período de março a dezembro de 1977, foram analisadas 810

amostras, sendo 385 de origem doméstica e 425 importadas. Nessas amostras foram encontrados resíduos em 43 (5 %), sendo 5 amostras domésticas e 38 importadas, incluindo maçã, uva, pêsego e pêra, sendo que em 6 amostras (1 %) os níveis de resíduos excederam os LMR. Apenas 3 (2 %) das 132 amostras de batatas importadas apresentaram resíduos e nenhum resíduo foi encontrado nas 72 amostras de batatas domésticas (GUSTAFSSON 1979).

De 196 amostras de morango analisadas na Holanda, em 1998, 179 (91 %) apresentaram resíduos de ditiocarbamatos em níveis que variaram de 0,1 a 0,6 mg/kg, porém, todas dentro do LMR permitido que é de 3 mg/kg; 9 amostras de laranja não apresentaram resíduos de ditiocarbamatos no LD de 0,05 mg/kg e de 22 amostras de uva, 15 (68%) tinham resíduos em concentrações que variaram de 0,2 a 0,4 mg/kg, porém, abaixo do LMR que é de 3 mg/kg (DE KOK 1999).

Segundo dados obtidos por um laboratório na Holanda, foram encontrados ditiocarbamatos acima do LMR em 5 (100 %) amostras de mamão “papaya” originário do Brasil em níveis que variaram de 0,3 a 0,6 mg/kg, em 1 amostra de uva na concentração de 0,6 mg/kg e em 1 amostra de “kumquat” (pequena laranja) na concentração de 0,4 mg/kg, no período de 1995 a 1998. Em amostras originárias do Chile foram encontrados ditiocarbamatos em 3 amostras de framboesa e em 1 amostra de amora na concentração de 0,1 mg/kg cada. Nas amostras originárias da Argentina não foram encontrados ditiocarbamatos (DE KOK 1999).

No Brasil, um trabalho realizado no Estado de Minas Gerais, mostra que 19,3% das hortaliças e 17,1% das frutas analisadas apresentaram resíduos de ditiocarbamatos em níveis de até 1,7 mg/kg (SOARES e col. 1987).

Em Belo Horizonte-MG, resíduos de ditiocarbamatos foram pesquisados em 87 amostras de frutas e 11 de hortaliças. Constatou-se a presença de ditiocarbamatos em CS₂ em 24 (48%) das 98 amostras, tendo sido mais freqüentes em frutas como pêsego (100%), ameixa (60%), nectarina (50%) e morango (37,5%) (PEREIRA 1988).

REIS e CALDAS (1991) estudaram resíduos de ditiocarbamatos em 466 amostras de vegetais e frutas comercializadas na cidade do Rio de Janeiro. Observou-se que 63% das amostras apresentaram resíduos de ditiocarbamatos, sendo que 24% com

concentrações superiores ao limite máximo permitido por lei. Alface, cenoura e tomate foram os produtos que apresentaram os maiores níveis de resíduos, com 50%, 47,4% e 38,2% das amostras acima do LMR, respectivamente.

CONCEIÇÃO (2002) analisou resíduos de ditiocarbamatos em 80 amostras de tomate do Distrito Federal e 59% apresentaram resíduos em níveis que variaram de 0,2 a 1,2 mg/kg de CS₂.

Têm-se também alguns trabalhos de análise de resíduos de ETU em alimento *in natura*. Em várias amostras de maçã foram encontrados níveis de ETU que variaram de 0,018 a 0,044 ppm (NEWSOME 1972). ONLEY e col. (1977) reportaram que de 6 maçãs comerciais, somente uma apresentou resíduos de EBDC, contendo 0,01 ppm de ETU. RIPLEY e COX (1978) detectaram ETU em níveis abaixo de 0,05 ppm em tomates e acima de 0,17 ppm em suco de tomates.

ARAUJO, em 1998, analisou amostras de tomate e o ETU foi detectado em 25 (78,1%) das 32 amostras de tomate de mesa e em 15 (55,5%) das 27 amostras de tomate industrial. Porém, 3 (11,1%) amostras de tomate industrial e apenas 1 (3,1%) apresentaram resultados acima do limite de quantificação do método proposto, que foi de 0,025mg/kg.

Tem-se uma preocupação maior com alimentos consumidos cozidos e industrializados, pois os processos de preparo e de manufatura dos mesmos podem favorecer a decomposição dos EBDC a ETU, levando a um aumento dos níveis de ETU nestes produtos. BOLZONI e col. (1993) analisaram 100 amostras de produtos industrializados de tomate e encontraram etilenotiouréia em apenas 7 amostras em níveis que variaram de 3 a 26 µg/kg (ppb). Pesquisadores encontraram resíduos de ETU em amostras de alimentos infantis, sendo que em 38 (12 %) das 310 amostras à base de frutas ou suco de frutas; em 11 (6%) das 167 amostras originárias de vegetais, em 6 (9%) de 65 amostras de cereais e 9 (13%) das 70 amostras de sobremesas (YESS e col 1993 citado por RICHARDSON 1998 p. 21).

Na tentativa de minimizar o problema acima descrito, alguns procedimentos para remoção de resíduos de EBDC e ETU foram estudados por pesquisadores, conforme descrito no item 1.7.5.

No Brasil, amostras de frutas e de outros vegetais, têm sido analisadas pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Nos resultados obtidos, de junho de 2001 a junho de 2002, foram encontrados resíduos de ditiocarbamatos (resultados expressos mg de CS₂ por Kg de amostra), em 68 (69 %) das 99 amostras de maçã, em níveis que variaram de 0,04 a 2,10 mg/kg; em 58 (40 %) das 144 amostras de mamão, de 0,10 a 2,14 mg/kg; em 85 (60 %) das 141 amostras de morango, de 0,10 a 1,03 mg/kg; em 1 (1 %) das 92 amostras de banana (0,01) e em 1 (1%) das 141 amostras de laranja. Foram também encontrados resíduos de ditiocarbamatos em 100 (0,5 %) das 189 amostras de tomate em níveis que variaram de 0,07 a 1,50 mg/kg; em 57 (35 %) das 162 amostras de alface em níveis que variaram de 0,10 a 3,50 mg/kg; e em nenhuma das 176 amostras de batata e em nenhuma das 134 amostras de cenoura (ANVISA 2003). Como foi utilizado neste estudo método que determina o CS₂ total foi impossível averiguar se os alimentos estavam ou não de acordo de acordo com a legislação vigente na época (ANVISA 2003), onde os (LMR) eram estabelecidos para cada composto individualmente.

5.3 Avaliação de risco pela ingestão de resíduos de EBDC e de ETU

O mancozebe apresenta classificação toxicológica III, segundo a legislação brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE 1992), ou seja, é considerado medianamente tóxico. Encontra-se entre os 12 agrotóxicos mais vendidos no Brasil, com um consumo de mais de 5.000 toneladas em 2000, incluindo os Estados de São Paulo, Bahia e Espírito Santo.

Os EBDC (mancozebe, manebe e metiram) podem ser transformados em ETU, substância toxicologicamente importante devido a sua carcinogenicidade, teratogenicidade e efeitos sobre a tireóide. Há evidência suficiente que estes três EBDC podem produzir um efeito comum: induzir o câncer de tireóide pela formação do metabólito ETU (EPA 2001).

O ziram e metam sódio também apresentam um mecanismo comum de toxicidade, a inibição da colinesterase. *In vivo* a liberação de CS₂ é importante, porque sua presença é associada a neuropatias (SCHAUMBURG e BERGER 1992) e pode ser o agente de efeitos neuropáticos causados por alguns ditiocarbamatos. Dados demonstram

que os dimetilcarbamatos ziram, ferbam e tiram e o EBDC zinebe liberam CS_2 (EPA 2001).

A exposição da população à ETU pelo consumo de alimentos apresenta vários componentes: os resíduos de ETU já formados antes de serem ingeridos, nas condições de industrialização ou no campo, os remanescentes da aplicação de EBDC nas culturas, os formados pelo processamento ou preparo e cozimento de alimentos com resíduos de EBDC, e/ou os metabolizados no organismo, após ingestão.

Comparando a IDMT de EBDC, calculada pelos LMR da Portaria nº 10 e atualizações (revogada) e da Resolução nº 165 (atual), observa-se que a IDMT de EBDC diminuiu para as frutas de 0,43 para 0,37 mg/pessoa/dia, porém aumentou para o total de alimentos de 0,63 para 0,85 mg/pessoa/dia, conforme pode ser observado na Tabela 27.

A IDMT para EBDC (Tabela 26) representa 47% da IDA, e se os resíduos presentes nos alimentos não excederem os LMR, aparentemente não representa um risco à saúde da população pelo consumo dos mesmos. Portanto, é improvável que a ingestão diária seja excedida na prática, desde que os LMR sejam estabelecidos para os principais usos do agrotóxico e utilizadas as Boas Práticas Agrícolas.

A contribuição da estimativa da ingestão de resíduos de mancozebe e de ETU pelos valores encontrados e o consumo de mamão (IBGE, 1998) foi de 1,0 % da IDA e 0,7% da IDA, respectivamente (Tabela 21).

Os níveis encontrados no Programa Nacional de Análise de Resíduos de Agrotóxicos-PARA (ANVISA 2003) foram expressos em CS_2 . Porém, considerando o nível mais alto encontrado em amostra de mamão (2,14 mg/kg de CS_2) corresponderia a 3,80 mg/kg de mancozebe, o que estaria abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira na época que era de 5,0 mg/kg para mancozebe, e também abaixo do LMR atual, que é de 3,0 mg/kg de CS_2 .

Considerando que o mamão muitas vezes é indicado para consumo diário para pessoas com distúrbios intestinais, e que crianças podem consumir mamão desde os primeiros meses de vida, com a média dos resultados obtidos nas três localidades estudadas (Figura 13), foram calculados os riscos de consumo para esses subgrupos, supondo-se que uma pessoa consumisse mamão diariamente com valor igual à média

dos níveis encontrados (0,04 mg/kg de ETU), uma pessoa com 60 kg de peso corpóreo que consumisse um mamão “papaya” por dia com aproximadamente 50 g, estaria ingerindo 0,002 mg de ETU por dia, ou 0,00003 mg/kg de peso corpóreo (p.c.) /dia e uma criança de 20 kg estaria ingerindo 0,0001 mg/kg p.c./dia. Considerando que a IDA estabelecida pelo JMPR, grupo assessor do Codex Alimentarius que é de 0,002mg/kg de ETU por peso corpóreo.(Codex Alimentarius, 1994), a ingestão de mamão representaria 1,5% da IDA para o adulto e 5% para a criança. Devemos também considerar que as pessoas que consomem apenas vegetais e em quantidades maiores, os vegetarianos, também formam um subgrupo especial, e, portanto merece uma maior atenção.

Se a população estivesse ingerindo todos os alimentos com níveis iguais aos LMR permitidos, e considerando a conversão de 8,7% de mancozebe e de 13,6% de manebe, poderia estar correndo risco de efeito adverso à saúde pela ingestão de ETU, uma vez que o valor da IDMT de EBDC ultrapassou a IDA (110,7%), conforme pode ser observado na Tabela 28. Deve-se considerar que crianças consomem frutas *in natura* e legumes cozidos e industrializados desde os primeiros meses de vida, e por apresentarem menor peso corpóreo, o risco de ingestão de ETU pelo consumo de alimentos é maior do que no adulto. Porém, a IDMT é uma superestimativa, pois os níveis de LMR estabelecidos na legislação são baseados na análise do mamão total incluindo casca, polpa e semente, e o hábito de consumo, da maioria das pessoas, é ingerir apenas a polpa, onde espera-se encontrar níveis mais baixos de resíduos. Neste caso, são necessárias estimativas mais precisas para a ingestão de resíduos de ETU como a Ingestão Diária Máxima Estimada (IDME), que é calculada usando dados da porção comestível do vegetal e leva em consideração os efeitos na preparação, no processamento, e no cozimento do alimento que, no caso de ETU, pode levar a um aumento dos níveis encontrados no alimento *in natura*. Porém, estas estimativas só podem ser feitas quando essas informações estiverem disponíveis. Portanto, destaca-se que é importante o conhecimento dos níveis de resíduos de EBDC e ETU em alimentos consumidos pela população para que se possa fazer uma avaliação de risco mais condizente com a realidade.

6 CONCLUSÕES

Os métodos para determinação de resíduos de ditiocarbamatos por espectrofotometria e de ETU por cromatografia a líquido de alta eficiência, estudados em amostra de mamão, apresentaram resultados dentro dos níveis aceitáveis, com boa exatidão e precisão e foram utilizados neste estudo. Este estudo propiciou, ainda, a implantação da metodologia para análise de ETU em mamão no laboratório do Instituto Adolfo Lutz, ampliando e melhorando os resultados de resíduos de agrotóxicos e conseqüentemente, aumentando a qualidade dos serviços prestados e propiciando ao Instituto a possibilidade de realizar novas pesquisas em prol da saúde pública.

Todas as amostras tratadas com mancozebe apresentaram resíduos de mancozebe e ETU. É importante o conhecimento dos níveis de resíduos de ETU nos alimentos para que medidas corretivas e preventivas possam ser tomadas.

O estudo de dissipação de resíduos demonstrou que resíduos de ETU, apesar de que os níveis decaíram com o tempo, ainda estavam presentes 12 dias após o tratamento. Esses dados fornecem subsídios para estabelecimento de períodos de carência na legislação, ou seja, dias que se deve aguardar, após a colheita, para consumo.

O conhecimento dos níveis do metabólito ETU, presentes em mamão tratado com EBDC, alerta para a necessidade de conhecimento dos níveis presentes nos alimentos consumidos pela população.

O risco de ingerir resíduos de mancozebe e ETU pelo consumo de mamão foi de 1,0 % e 0,7 % da Ingestão Diária Aceitável (IDA), respectivamente.

A IDMT de EBDC e de ETU calculado para as culturas nas quais é permitido o uso de EBDC, representam respectivamente 47 % e 110,7 % da IDA. Entretanto, a IDMT é uma superestimativa, e deve-se realizar monitoramento de resíduos de EBDC e ETU, nos alimentos consumidos pela população, para cálculo da exposição real e avaliação de risco.

7 RECOMENDAÇÕES

Realizar estudos de monitoramento de resíduos de ETU em produtos *in natura* que compõem a dieta do brasileiro e avaliar o potencial de risco à saúde da população e ao meio ambiente. Deve-se também pesquisar produtos de origem vegetal industrializados, pois o preparo de alimentos e processos de fabricação podem favorecer a decomposição dos EBDC a ETU.

As empresas que fabricam produtos à base de vegetais, principalmente os de consumo infantil, devem tomar medidas de minimização desses resíduos antes do processamento e preparo dos alimentos, para evitar formação de maiores níveis de ETU no produto final. Uma possibilidade é a utilização apenas das polpas dos produtos, sem as cascas, que podem conter a maior parte dos resíduos de EBDC.

Devido ao fato da toxicidade aguda de EBDC ser alta para algumas espécies, estas substâncias não devem ser aplicadas próximas a cursos de água e em lugares com muito declive, por causa do possível arraste para rios e lagos e conseqüente contaminação do meio ambiente. Devem ser seguidas as Boas Práticas Agrícolas, incluindo as normas de descarte de embalagens vazias e lavagem de equipamentos, além do uso de equipamentos de proteção e também cuidados com a população residente no campo.

8 REFERÊNCIAS

Abarkeli, R. Amostragem e sua influência nos resultados de resíduos. In: **Resumos do 15º Encontro Nacional de Analistas de Resíduos de Pesticidas**; 1991 ago 21-23; São Paulo, (BR). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 1991. p.30-43.

[ABNT] Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Norma NBR 14029**. Rio de Janeiro; 1998.

Amaral JD dos, Simizu K, Moraes Barros SB de, Junqueira VBC. Efeitos da etilenotiouréia (ETU) e da etileno-uréia (EU) sobre os níveis de lipoperoxidação hepática em ratos. **Rev Farm Bioquim Univ São Paulo** 1985; 21(2):183-7, jul.-dez., 1985.

[ANDEF] Associação Nacional de Defesa Vegetal. **Vendas 1988 a 1998** [online]. Disponível em <URL:<http://www.undef.com.br/dentro/bmercado.htm>> [2003 fev 12].

Ankumah RO, Marshall WD. Persistence and fate of ethylene thiourea in tomato sauce and paste. **J Agric Food Chem** 1984; 32:1194-8.

[ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – **PARA. Resultados analíticos de 2002**. Brasília; 2003. Disponível em URL:http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/resl_anual_2002_an2.pdf [2003 nov 15]

[ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Toxicologia**. Disponível em <URL:<http://www.anvisa.gov.br>> [2003 jun 13]

Aprèa C, Betta A, Catenacci G, Lotti A, Minoia C, Passini V et al. Reference values of urinary ethylenethiourea in four regions of Italy (multicentric study). **Sci Total Environ** 1996; 192(1):83-93.

Aprèa C, Betta A, Catenacci G, Colli A, Lotti A, Minoia C et al. Urinary excretion of ethylenethiourea in five volunteers on a controlled diet (multicentric study). **Sci Total Environ** 1997; 203(2):167-79.

Araújo ACP. **Importância da análise de resíduos de praguicidas para ações de saúde pública: estudo da cultura do tomate no Estado de Pernambuco**. São Paulo; 1998. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].

Austrália. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. **Report on the Australian National Residue Survey 1 January to 30 June 1999: results**. Canberra; 2000.

Baptista GC. Desenvolvimento do uso de pesticidas. In: **Manual de resíduos de pesticidas em alimentos**. São Paulo: GARP; 1999. p. 6-11.

Barretto HHC, Inomata ONK, Lemes VRR, Kussumi TA, Scorsafava MA, Rocha SOB. Monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos comercializados no Estado de São Paulo em 1994. **Pestic Rev Téc Cient** 1996; 6:1-12.

Barretto HHC. Programa interlaboratorial de análise de resíduos de etilenobisditiocarbamato [Apresentado ao Simpósio GARP 2001; 2001 dez 13; São Paulo, (BR)].

Bolzoni L, Sanino A, Bandini M. Determination of ethylenethiourea and propylenethiourea in tomato products and in fruit purees. In: **Food Chemistry**. England: Elsevier Science; 1993. p.299-302.

Bonsall JL. Measurement of occupational exposure to pesticide. In: Turnbull GJ, editor. **Occupational hazards of pesticides use**. London: Francis and Taylor; 1985. p.13-33.

Bottomley P, Hiidkess RA, Smartn A. Review of methods for the determination of ethylenethiourea (imidazolidine-2-thione) residues. **Res Rev** 1985; 95:45-89.

Brasil. Decreto nº 4074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre pesquisa, experimentação, produção, embalagem e rotulagem, transporte, armazenamento, comercialização, propaganda comercial, utilização, importação, exportação, destino final dos resíduos e embalagens, registro, classificação, controle, inspeção e fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 jan. 2002. p. 1-12. Disponível em <URL: http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/4074_02.htm> [2003 abr 25]

Caccialanza G, Gandini C, Zacca E. Determinazione diretta di 2 imidazolidintinoen (ETU) in matrici alimentari mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). **Farmaco Ed Pract** 1980; 35:449.

Calumpang SMF, Medina MJB, Roxas NP, Magallonas ED. Movement and degradation of mancozeb fungicide and its metabolites, ethylenethiourea in sitty clay loam soil. **Int J Pestic Manag** 1993; 39:161-6.

Canossa E, Angiuli G, Garasto G, Buzzoni A, De Rosa E. Indicatori di dose in agricoltori esposti a mancozeb. **Med Lav** 1993; 84:42-50.

Carvalho PRN, Yokomizo Y. Estudo da recuperação dos resíduos de propilenobisditiocarbamatos em produtos agrícolas pelo método colorimétrico. **Colet ITAL** 1989; 18(2):171-6.

Conceição MH. **Resíduos de pesticidas em tomates: metodologia analítica e avaliação da exposição humana**. Brasília; 2002. [Tese de Doutorado – Instituto de Química da Universidade de Brasília].

Cruiskshank PA, Jarrow HC. Ethylenethiourea degradation. **J Agric Food Chem** 1973; 21:33-4.

Cullen T. Spectrophotometric determination of dithiocarbamate residues on food crops. **Anal Chem** 1964; 36(1):221.

Dearfield KL. Ethylenethiourea (ETU): a review of the genetic toxicity studies. **Mutat Res** 1994; 317:111-32.

De Kok A. Control of pesticide residues in food European model. In: **Proceedings of Workshop Control of Pesticide Residues in Food European Model**; 1999 out 4-6; Araraquara, (BR). São Paulo: GARP; 1999.

Diserens H. Determination of ethylenethiourea in various foods. **Lab News** 1991; 62:69-80.

Doerge D, Yee ABK. Liquid chromatographic determination of ethylenethiourea using pulsed amperometric detection. **J Chromatogr** 1991; 586:158-60.

Dubey JK, Heberer T, Stan HJ. Determination of ethylenethiourea in food commodities by a two-step derivatization method and gas chromatography with electron- capture and nitrogen-phosphorus detection. **J Chromatogr A** 1997; 765 (1):31-38.

Elia MC, Arce G, Hurt SS, Neill PJ, Scribner HE. The genetic toxicology of ethylenethiourea: a case study concerning the evaluation of a chemical's genotoxic potential. **Mut Res** 1995; 341:141-9.

[EPA] Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticide and Toxic Substances. **Residue chemistry test guidelines**. Washington; 1996.

[EPA] Environmental Protection Agency. Office of Pesticide Programs. **The determination of whether dithiocarbamate pesticides share a common mechanism of toxicity**. Washington; 2001.

[EPA] Environmental Protection Agency. **IRIS - Integrated Risk Information System**. Disponível em <URL:<http://www.epa.gov/IRIS/subst/0239.htm>> [2003 fev 21]

European Commission. Quality control procedures for pesticide residues analysis. In: **Guidelines for residues monitoring in the European Union**. 2nd edition. 2000a. p.1-30.

European Commission. Directorate General health and Consumer Protection. **Guidance document on residual analytical methods: SANCO/825/00 rev. 6**. 2000b.

[FAO/WHO] Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. **Good laboratory practice on pesticide residue in food**. Rome; 1993. Suppl 1. v. 2. Section 4.2, 164.

[FAO/WHO] Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. **Pesticide residues in food**. Rome; 1994. v.2.

[FAO/WHO] Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. **Pesticide residues in food: maximum residue limits**. Rome; 1998 v. 2B.

[FDA] Food and Drug Administration. **Program residue monitoring, 1998**. Disponível em <URL:<http://www.fda.gov/>> [2002 jan 12].

Freitas EAV, Coutinho JAG, Santos JA, Lins LCG, Cavalcanti MSD, Ferry RV. Uso de agrotóxicos no município de Pati do Alferes: um estudo de caso. **Cad Geoc** 1994; (10):23-31.

Garcia E. **Avaliação das conseqüências da “lei dos agrotóxicos” nas intoxicações e nas classificações toxicológica e de potencial de periculosidade ambiental no período de 1990 a 2000; 2001** [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo]

[GARP] Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas. **Manual de resíduos de pesticidas em alimentos**. São Paulo; 1999.

Greve PA, Herbold HAA. A simple HPLC-procedure for the determination of ethylene thiourea (ETU) in cooked vegetables. **Med Fac Landbouww Rijkuniv Gent** 1983; 48:933-35.

Grisolia CK. Fungicidas etileno-bisditiocarbamatos: aspectos de genotoxicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade. **Pesticidas** 1995; 5:19-32.

Gustafsson KH. Residues of dithiocarbamates in fruit and vegetables on the Swedish Market, March-December 1977. **Vör Föda** 1979; Suppl 5:431-3.

Gustafsson KH, Thompson RA. High pressure liquid chromatographic determination of fungicidal dithiocarbamates. **J Agric Food Chem** 1981; 29:729.

Harrington P, Horner J, Griffiths T, Reynolds SL, Hird S. **Modification of the method for measurement of dithiocarbamate residues as carbon disulfide in fruit & vegetables**. Sand Hutton: Central Science Laboratory; 1998.

Hill ARC. Headspace methods for dithiocarbamates. In: **Emerging strategies for pesticide analysis, modern methods for pesticide analysis**. Boca Raton: CRC Press; 1992. p. 213-31.

Hirvi T, Pyysalo H, Savolainen K. A glass capillary gas liquid chromatography method for determining ethylenethiourea without derivatization. **J Agric Food Chem** 1979; 27:194-7.

Hogendoorn EA, van Zoonen P, Brinkman U. A column-switching RPLC for the trace-level determination of ethylenethiourea in aqueous samples. **Chromatographia** 1991; 31:285-92.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. Genetic and related effects. **IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum Suppl** 1987; 6:304-7.

[IBGE] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de orçamentos familiares 1995-1996**. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento e Orçamento; 1998. v.2.

[IBGE] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA**. Disponível em <URL:<http://www.sidra.ibge.gov.br>> [2003 maio 7]

[INCQS] Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde. **Estudo interlaboratorial INCQS/I.A63: ditiocarbamatos em polpa de banana**. Rio de Janeiro; 2003.

[JMPR] Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues; 1993 Sept 20-29; Geneva. **Report**. Geneva: FAO; 1994. (FAO Plant Production and Protection, 122)

Johannesen H, Nielsen AB, Helweg A, Fomsgaard IS. Degradation of [¹⁴C] ethylenethiourea in surface and subfurface soil. **Sci Total Environ** 1996; 191(3):271-6.

Keppel GE. Modification of the carbon disulfide evolution method for dithiocarbamate residues. **J Assoc Off Anal Chem** 1969; 52:162-9.

Keppel GE. Collaborative study of the determination of dithiocarbamate residues by a modified carbon disulfide evolution method. **J Assoc Off Anal Chem** 1971; 54:528-32.

King RR. Derivatization of ethylene thiourea with m-trifluoromethylbenzyl chloride for analysis by electroncapture gas chromatography. **J Agric Food Chem** 1977; 25:73-5.

Kobayashi H, Nishida M, Matano O, Gotto S. Effect of cysteine on the stability of ethylenethiourea and ethylenedithiocarbamate in crops during storage and/or analysis. **J Agric Food Chem** 1992; 40:76-80.

Kratochvil B. Sampling for chemical analysis of the environment: statistical considerations. In: Kurtz DA, editor. **Trace residue analysis: chemometric estimations of amount uncertainty and error**. Philadelphia: American Chemistry Society; 1985 (ACS Symposium Series, 284)

Kratochvil B. General principles of sampling. In: **Sampling and calibrations for atmospheric measurements - ASTM STP957**. Philadelphia: J.K. Taylor; 1987. p.5-13.

Krause RT. Liquid chromatographic-electrochemical technique for determination of ethylenethiourea residues. **J Liq Chromatogr** 1988; 11:349-62.

Krause RT. Liquid chromatographic-electrochemical determination of ethylenethiourea in foods by revised official method. **J Assoc Off Anal Chem** 1989; 72:975-9.

Kumar U, Agarwal HC. Degradation of dithane M-45 residues in brinjals during cooking. **Bull Environ Contm Toxicol** 1991; 47:725-31.

Kurtio P, Vartianinen T, Savolainen K. Environmental and biological monitoring of exposure to ethylenebisdithiocarbamate fungicides and ethylenethiourea. **Br J Ind Med** 1990; 47:203-6.

Lara WA. Laboratório de análise de resíduos de pesticidas no Brasil. In: **Resumos do 13º Encontro Nacional de Analistas de Resíduos de Pesticida**; 1988 set 20-22; São Paulo. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 1988. p.42-53.

Larini L. **Toxicologia**. Barueri: Manole, 1999.

Lehotay J, Brandsteterova E, Oktavec D. High-performance liquid chromatographic determination of ethylenethiourea in food. **J Liq Chromatogr** 1992; 15:525-34.

Lesage S. Reduction of the formation of ethylenethiourea from ethylenebis (dithiocarbamate) by cupric ion in aqueous media. **J Agric Food Chem** 1980; 28:787-90.

Liska ER, Brouwer AG, Ostheimer H, Lingeman H, Brinkaman UA. Rapid screening of a large group of polar pesticides in river water by on-line trace enrichment and column liquid chromatography. **Int J Environ Anal Chem** 1992; 47:267-91.

Lo CC, Ho MH, Hung MD. Use of high performance liquid chromatographic and atomic absorption methods to distinguish propineb, zineb, maneb e mancozeb fungicides. **J Agric Food Chem** 1996; 44:2720-3.

MacLeod HA, MacCully KA. Head space gas procedure for screening food samples for dithiocarbamate pesticide residues. **J Assoc Off Anal Chem** 1969; 52:1225-30.

MacLeod HA, Ritcey WR, editors. **Analytical methods for pesticide residues in foods**. Ottawa: Department of National Health and Welfare; 1973.

[MAFF] Ministry of Agriculture, Fisheries & Food. Advisory Committee on Pesticides. **Position document on consumer risk arising from the use of ethylene bisdithiocarbamates**. London: 1990.

Malik AK. Determination of the fungicide ferbam in wheat grains after adsorption onto microcrystalline naphthalene. **J Assoc Off Anal Chem** 2000; 83:971-5.

Marshall WD, Singh AJ. Oxidative inactivation of ethylenethiourea by hypochlorite in alkaline medium. **J Agric Food Chem** 1977; 25:1316-20.

Marshall WD. Preprocessing oxidative washes with alkaline hypochlorite to remove ethylenebis (dithiocarbamate) fungicide residues from tomatoes and greenbeans. **J Agric Food Chem** 1982; 30:649-52.

Mestres R, Mestres G. Ethylenebisdithiocarbamate and ethylenethiourea residues in food. **Rev Bras Toxicol** 1991; 4(1/2):11-8.

Ministério da Saúde. Portaria SNVS n. 10, de 08 de março de 1985. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 mar. 1985. Seção I, p. 4591-641.

Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das “Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins nº de 09 de dezembro de 1991”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 04 fev. 1992 p.1356.

Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 5, de 14/10/99. Suspende a aprovação e a avaliação toxicológica para registro de novas formulações de produtos agrotóxicos com a mistura de princípios ativos considerados potencialmente carcinogênicos [online]. Brasília; 1999. Disponível em <URL:<http://anvisa.saude.gov.br/toxicologia/leis>> [2000 mar 28] .

Ministério da Saúde. **Promoção da saúde: Declaração de Alma-Ata, Carta de Ottawa, Declaração de Adelaide, Declaração de Sundsvall, Declaração de Santa Fé de Bogotá, Declaração de Jacarta, Rede de Megapaíses e Declaração do México.** Brasília; 2001.

Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE nº 165, de 29 de agosto de 2003. Determina a publicação do “Índice das monografias dos ingredientes ativos de agrotóxicos, domissanitários e preservantes de madeira”, cujo emprego encontra-se autorizado conforme descrito no Anexo I, disponibilizadas no endereço eletrônico: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/index.htm>. Revoga a Portaria nº 10, de 08 de março de 1985 e todas aquelas que a complementaram ou suplementaram. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de set. 2003. p.48-50.

Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia. Portaria Normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996: estabelece procedimentos a serem adotados junto ao IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental (ppa) de agrotóxicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 out. 1996. p. 21358-66.

Ministry of Welfare, Health and Cultural Affairs. **Analytical methods for residues of pesticides**. 5th ed. Pt 2. Rjswijk; 1988. p. 81.

Moreira JC, Jacob SC, Peres F. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxico sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciênc Saúde Colet** 2002; 7(2):299-311.

Nash RG. Improved gas liquid chromatographic method for determining ethylenethiourea in plants. **J AOAC** 1974; 57:1015-21.

Nebbia C, Ferrero E, Valenza F, Castagnaro M, Re G, Soffietti MG. Pathologic changes, tissue distribution and extent of conversion to ethylenethiourea after subacute administration of zinc ethylene-bis-dithiocarbamate (zineb) to calves with immature rumen function. **Am J Vet Res** 1991; 52:1717-22.

Neil GD, Williams JS. **Ethylenethiourea in Maine ground water: report**. Maine: Department of Conservation; 1990.

Newsome WH. Determination of ethylenethiourea residues in apples. **J Agric Food Chem** 1972; 20:967-9.

Newsome WH, Laver GW. Effect of boiling on the formation of ethylenethiourea in zineb treated food. **Bull Environ Contam Toxicol** 1973; 10:151-4.

Ollinger J. EBDC registration-global overview [Apresentado ao Simpósio GARP 2001; 2001 dez 13; São Paulo (BR)].

Onley JH, Giuffrida LH, Ives NF, Watts RR, Storherr RW. Gas liquid chromatography and liquid chromatography of ethylenethiourea in fresh vegetable crops, fruits, milk and cooked foods. **J AOAC** 1977; 60:1105-10.

Ott DE, Gunther FA. Field screenig method for above-tolerance residues of dithiocarbamate fungicides. **J Assoc Off Anal Chem** 1982; 65:909-12.

Otto S, Keller W, Drescher N. A new gas chromatographic determination of ethylenethiourea residues without derivatization. **J Environ Sci Health** 1977; B12(3):1979-91.

Pereira EC. Resíduos de fungicidas orgânicos do grupo dos ditiocarbamatos em frutas e outros produtos de origem vegetal. **Rev Soc Bras Toxicol** 1988; 1(1/2):41-3.

Reis MRCS, Caldas LQA. Dithiocarbamate residues found on vegetables and fruit marketed in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Ciênc Cult** 1991; 43 (3):212-8.

Richardson M. **Pesticides - friend or foe?** *Wat Sci Technol* 1998; 37(8):19-25.

Ripley BD, Cox DF. Residues of ethylenebis(dithiocarbamate) and ethylenethiourea in treated tomatoes and commercial tomato products. **J Agric Food Chem** 1978; 26:1137-43.

Ross DG, Grosby G. Phytolysis of ethylenethiourea. **J Agric Food Chem** 1973; 21:335-7.

Rossi E, Lazzarini C, Bocceli R, Del RE. A determinazione di residui di etilentiourea in farine di frutamento mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). **Difesa Pianta** 1980; 4:235-40.

Ruggiero C. **Colheita de mamão.** 1980. Disponível em <URL:<http://www.todafruta.com.br>> [2003 abr 6]

Schaumburg HH, Berger AR. Human toxic neuropathy due to industrial agents. In: Dyck PJ, Thomas PK, editors. **Peripheral neuropathy**. 3th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p. 1533-48.

[SEAGRI] Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária da Bahia. **Cultura mamão**. Disponível em <URL:<http://www.seagri.ba.gov.br>> [2003 abr 6]

Silva EMF da, coordenador. **Estudo sobre o mercado de frutas**. Brasília: FIPE, 1999.

Silva MP, Procópio JR, Hernández L. Electrochemical detection in the determination of several dithiocarbamates by reverse-phase liquid chromatography. **J Liq Chrom Rel Technol** 1999; 22:463-75.

[SINDAG] Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. **Número e percentagem de ingrediente ativo em linha de comercialização**. Disponível em <URL:<http://www.sindag.com.br>> [2003 jan 11]

Soares IAA, Goulart MCP, Queiroz RL, Mello SMM, Ávila JT, Azevedo SF. **Resíduos de fungicidas orgânicos do grupo dos ditiocarbamatos em frutas e hortaliças**. Minas Gerais: Secretaria de Estado da Agricultura e Pecuária; 1987. p. 99-100.

Steiwandter H. Contributions to the gas-chromatographic head space analysis. **Fresenius J Anal Chem** 1985; 321:375.

Thier H, Zeumer H, editors. Multiresidue method S15 - dithiocarbamate and thiuram disulfide fungicides photometric determination. In: **Manual of pesticide residues analysis**. Deutsche. Forschungsgemeinschaft, Pesticides Comm. Weinheim: Verlag; 1987. v. I. p. 353-60.

Toledo HHB, Steling CM, Gojtan Jr E, Baptitsta GC, Aleluia I, Lange Jr L et al. **Manual: critérios mínimos para a condução de estudos de resíduos**. São Paulo: GARP; 2002. 2 Pt.

Tomlin C. **The pesticide manual United Kingdom**. 10th ed. Cambridge: British Crop. Protection Council; 1995.

Trindade AV. **O cultivo do mamão**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura; 1999. (Circular Técnica, 34)

Trindade AV, organizador. **Mamão produção: aspectos técnicos**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura; 2000. (Serie Frutas do Brasil, 3)

Triverdi N, Kakkar R, Srivastava MK, Mithal A, Rauzadam RB. Effect of oral administration of fungicide-mancozeb on thyroid gland of rat. **Indian J Exp Biol** 1993; 31: 564-6.

Van Der Poll JM, Versluis-de Haan GG, De Wilde O. Determination of ethylthiourea in water samples by gas chromatography with alkali flame ionization detection and mass spectrometric confirmation. **J Chromatogr** 1993; 643:163-8.

Van Leeuwen CJ, Maas-Diepeveen JL, Niebeek G, Vergouw WHA, Griffioen PS, Luijken MW. Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. I. Short-term toxicity tests. **Aquat Toxicol** 1985a; 7:145-64.

Van Leeuwen CJ, Moberts F, Niebeek G. Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. II. Effects on survival, reproduction and growth of Daphnia Magna. **Aquat Toxicol** 1985b; 7:165-75.

Van Lishaut H, Schwack W. Selective trace determination of dithiocarbamate fungicides in fruit and vegetables by reverse-phase ion pair liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection. **J Assoc Off Anal Chem** 2000; 83:720-7.

Vega Bolaños LO, Arias Verdés JA, Conill Diaz T, González Valiente ML. Uso de plaguicidas en Cuba, su repercusión en el ambiente y la salud. **Rev Cuba Aliment Nutr** 1997; 11(2):111-6.

Verma BC, Sood RK, Sharma DK, Sidhu HS, Chauhan S. Improved spectrophotometric method for the determination of thiram residues in grains. **Analyst** 1984; 109:649-50.

Vieira, E e Toledo, HHB. Determinação de resíduos de etilenobisditiocarbamatos (EBDC) em mamão. In: **Manual de resíduos de pesticidas em alimentos**. São Paulo: GARP; 1999. p.104-112).

Vetorazzi G, Almeida WF, Burin GJ, Jaeger RB, Puga FR, Rahde AF et al. International safety assessment of pesticidas: dithiocarbamate pesticides, ETU, and PTU – a review and update. **Teratog Carcinog Mutagen** 1995; 15:313-37.

Vuik J, Van Dinter R, De Vos RH. Improved simple pretreatment of the carbon disulfide evolution method for the determination of dithiocarbamate residues in lettuce. **J Agric Food Chem** 1992; 40:604.

[WHO] World Health Organization. **Environmental Health Criteria 78 - Dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea, and propylenethiourea: a general introduction**. Geneva; 1988.

Yoshida A, Harada T, Maita K. Tumor induction by concurrent oral administration of ethylenethiourea and sodium nitrite in mice. **Toxicol Pathol** 1993; 21:303-1.

Yoshida A, Harada T, Hayashi S, Mori I, Miyajima H, Maita K. Endometrial carcinogenesis induced by concurrent oral administration of ethylenethiourea and sodium nitrite in mice. **Carcinogenesis** 1994; 15:2311-8.

ANEXO 1 – Resultados do estudo de resíduos de mancozebe e de seu metabólito ETU nas amostras de mamão de acordo com o tratamento e localidade

PROCE- DÊNCIA	AMOSTRA <i>Mamão Carica</i> <i>Papaya L.</i>	Nº de aplicações	COLETA (verão)	DAT	CS ₂ (mg/kg)	Mancozebe (mg/kg)	ETU (mg/kg)
Lins- SP	Testemunha	0	Novembro	3	<0,3	<0,5	<0,01
Linhares- ES	Testemunha	0	Dezembro	3	<0,3	<0,5	<0,01
Sul – BA	Testemunha	0	Janeiro	3	<0,3	<0,5	<0,01
Lins- SP	Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Novembro	3	0,9	1,6	0,09
Linhares- ES	Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Dezembro	3	<0,3	<0,5	0,01
Sul – BA	Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Janeiro	3	1,0	1,8	0,05
Lins- SP	Tratada 2 PM (320g ia/ha)	6	Novembro	3	1,2	2,1	0,32
Linhares- ES	Tratada 2 PM (320g ia/ha)	6	Dezembro	3	0,3	0,5	0,01
Sul – BA	Tratada 2 PM (320g ia/ha)	6	Janeiro	3	1,0	1,8	0,06

DAT – Dias após o tratamento; PM: pó molhável (forma de uso).

A2

ANEXO 2 – Resultados do estudo de dissipação de mancozebe e de seu metabólito ETU, nas amostras de mamão tratado, em Lins-SP.

AMOSTRA <i>Mamão</i> <i>Carica Papaya</i> <i>L.</i>	Nº de Aplicações	COLETA (verão)	DAT	CS ₂ (mg/kg)	MANCOZEBE (mg/kg)	ETU (mg/kg)
Testemunha	0	Novembro	12	<0,3	<0,5	<0,01
Tratada 1 PM (160g a/ha)	6	Novembro	0	0,9	1,6	0,14
Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Novembro	3	0,9	1,6	0,09
Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Novembro	6	1,0	1,7	0,10
Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Dezembro	9	0,9	1,6	0,11
Tratada 1 PM (160g ia/ha)	6	Dezembro	12	1,0	1,8	0,04

DAT: Dias após o tratamento; PM: Pó molhável (forma de uso da formulação); ia/ha: ingrediente ativo por hectare.