UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Avaliação do praguicida aldicarbe e seus produtos de
transformação em matriz ambiental – desenvolvimento e
comparação de técnicas analíticas**

Erica Rodrigues de Souza

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Gisela Aragão Umbuzeiro

São Paulo
2009

ERICA RODRIGUES DE SOUZA

**Avaliação do praguicida aldicarbe e seus produtos de
transformação em matriz ambiental – desenvolvimento e
comparação de técnicas analíticas**

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Gisela Aragão Umbuzeiro

São Paulo
2009
19.557

DEDALUS - Acervo - CQ

30100015282

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S729a Souza, Erica Rodrigues de
Avaliação do praguicida aldicarbe e seus produtos de
transformação em matriz ambiental – desenvolvimento e
comparação de técnicas analíticas / Erica Rodrigues de Souza
-- São Paulo, 2009.
120p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Umbuzeiro, Gisela Aragão

1. Toxicologia ambiental 2. Análise toxicológica 1. T.
II. Umbuzeiro, Gisela Aragão, orientador.

615.9 CDD

ERICA RODRIGUES DE SOUZA

**Avaliação do praguicida aldicarbe e seus produtos de
transformação em matriz ambiental – desenvolvimento e
comparação de técnicas analíticas**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Gisela Aragão Umbuzeiro
Orientadora/Presidente

Prof. Dr.

1º. Examinador

Prof. Dr.

2º. Examinador

São Paulo, 02 de abril de 2003

Agradecimentos

Agradeço a minha mãe Dilma e avó Joana pela paciência e apoio em todos os momentos;

Aos amigos da CETESB, Gilson, Wálace, Daniela, Adauto, Carlos e Viana por toda a colaboração e bom humor;

Aos amigos do LACE, Luiz, Rafael, Fernando e Gustavo, pelas dicas e valiosas sugestões;

As professoras Doutoradas Alice Chasin, Regina Lúcia e Marina Tavares; por sempre apoiarem o trabalho e contribuírem efetivamente para que ele começasse e/ou fosse concluído;

Agradeço a minha orientadora, pelos ensinamentos e pelo esforço para que o nosso trabalho chegasse ao fim;

Agradeço especialmente ao Zé Luiz pelo companherismo, pelo apoio e também pelas "brincas" nesses três anos de mestrado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. GENERALIDADES	3
2.1. <i>Praguicidas Carbamatos</i>	4
2.2. <i>Toxicocinética e toxicodinâmica</i>	7
2.3. <i>Toxicidade</i>	12
2.4. <i>Contaminação ambiental por praguicidas</i>	22
2.5. <i>Legislação</i>	26
2.6. <i>Teste de toxicidade aguda</i>	28
2.7. <i>Técnicas analíticas e preparo de amostras</i>	31
2.7.1. <i>Cromatografia gasosa</i>	31
2.7.2. <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	32
2.7.3. <i>Eletroforese capilar</i>	36
2.7.4. <i>Espectrometria de massas</i>	42
2.7.5. <i>Preparo de amostras - extração em fase sólida</i>	45
3. OBJETIVO	52
4. MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1. Material	53
4.1.1. Equipamentos	53
4.1.2. Reagentes e materiais	54
4.1.3. Soluções-Padrão	55
4.1.4. Amostras de Referência Negativa	56
4.2 Métodos	57
4.2.1. <i>Determinação de aldicarbe e aldicarbe sulfona por HPLC-DAD</i>	57
4.2.2. <i>Determinação de aldicarbe por CE-DAD</i>	60
4.2.3. <i>Determinação de aldicarbe e aldicarbe sulfona por LC-MS</i>	60
4.2.4. <i>Bioensaio com bactéria luminescente <i>Vibrio fischeri</i></i>	62
4.3. Validação analítica	63
4.4. Teste de toxicidade aguda	66
5. RESULTADOS	67
5.1. Resultados cromatografia líquida	67
5.2. Otimização do procedimento de extração	70
5.3. Resultados - eletroforese capilar	77
5.4. Resultados cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas	80
5.5. Teste de toxicidade aguda	84
6. DISCUSSÃO	86
7. CONCLUSÕES	93
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
APÊNDICE	109

RESUMO

SOUZA, E. R. **Avaliação do praguicida aldicarbe e seus produtos de transformação em matriz ambiental – desenvolvimento e comparação de técnicas analíticas**. São Paulo, 2008. 120p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

Os praguicidas carbamatos surgiram na década de 70. Este grupo de substâncias possui atividade anticolinesterásica, com variado grau de toxicidade. São solúveis em água e termicamente instáveis. O praguicida aldicarbe faz parte do grupo dos carbamatos, sendo um metil carbamato de oxima. Contaminações de águas subterrâneas e superficiais pelo aldicarbe já foram demonstradas, devido a alta solubilidade deste composto em água e sua alta capacidade de lixiviação em solo. Este trabalho visa o desenvolvimento de métodos analíticos para separação e quantificação de aldicarbe, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona, por cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e eletroforese capilar. O trabalho objetiva ainda avaliar a toxicidade aguda das três substâncias utilizando a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri*. Amostras de água ultrapura, superficial e subterrânea foram submetidas a etapas de extração em diferentes cartuchos de fase sólida para avaliação da recuperação dos analitos e a realização da pré concentração dos mesmos. No método proposto por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, obteve-se limite de quantificação de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, sendo que o alcançado no método proposto por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos foi de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$. Já o método desenvolvido por eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos teve um limite de quantificação de 10 mg.L^{-1} . Os resultados de CE50 obtida para o aldicarbe, aldicarbe sulfona e aldicarbe sulfóxido, no teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* foram respectivamente: $56,0 \text{ mg.L}^{-1}$, $47,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $7,8 \text{ mg.L}^{-1}$. O método desenvolvido por cromatografia líquida se mostrou com sensibilidade satisfatória para análise de aldicarbe e seus produtos de transformação em água com níveis de quantificação dos compostos abaixo do limite determinado pela OMS ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$). O método por eletroforese capilar não se mostrou com sensibilidade ideal para detecção dos analitos em níveis de traços. No teste de toxicidade aguda, observou-se que o aldicarbe sulfóxido é cerca de 7 vezes mais tóxico para a bactéria que o próprio aldicarbe, o que já é descrito na literatura para outras espécies.

ABSTRACT

SOUZA, E. R. **Evaluation of aldicarb pesticide and its transformation products in environmental matrix - development and comparison of analytical techniques.** São Paulo, 2008. 120p. Master Dissertation – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

Carbamates pesticides first appeared in the 1970s. This group of substances possesses anticholinesterasic activity, with varied toxicity degree. They are soluble in water and thermally unstable. The aldicarb pesticide belongs to the carbamates group, being an oxime methyl carbamate. Contaminations of underground and superficial waters by aldicarb have been demonstrated, due to the high solubility of this compound in water and its high capacity of lixiviation in soil. This dissertation aims to develop analytical methods for separation and quantification of aldicarb, aldicarb sulfoxide, and aldicarb sulfona, by high efficiency liquid chromatography, liquid chromatography-tandem mass spectrometry and capillary electrophoresis. The dissertation also focuses on evaluating the acute toxicity of the three substances using the luminescent marine bacterium *Vibrio fischeri*. Samples of ultrapure water, superficial and underground, were submitted to extraction stages in different cartridges of solid phase for evaluating the recovery of analytes and conducting their pre-concentration. In the method proposed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, a quantification limit of $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ was obtained, in comparison with the $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ achieved in the method proposed by liquid chromatography with diode-array detection. The method developed by capillary electrophoresis with diode-array detection had a quantification limit of 10 mg L^{-1} . The results of CE50 obtained for the aldicarb, aldicarb sulfone and aldicarb sulfoxide, in the toxicity test with the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* were respectively: 56.0 mg.L^{-1} , 47.0 mg.L^{-1} e 7.8 mg.L^{-1} . The method developed by liquid chromatography showed satisfactory sensitivity for analysis of aldicarb and its transformation products in water with quantification levels of the compounds below the limit determined by OMS ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$). The method by capillary electrophoresis did not show ideal sensitivity for trace level detection of analytes. In the acute toxicity test, it was observed that the aldicarb sulfoxide is nearly 7 times more toxic for the bacterium than the aldicarb itself, which is already described in the literature for other species.

1. INTRODUÇÃO

Antes da Segunda Guerra Mundial, a maioria dos produtos utilizados na agricultura para o controle de pragas eram baseados em compostos inorgânicos e/ou extratos vegetais. O marco inicial do surgimento de novas substâncias para este fim ocorreu com a redescoberta da molécula do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) em 1939 e sua aplicação com finalidade inseticida (Larini, 1999).

Os praguicidas carbamatos surgiram na década de 70, quando a busca por compostos menos persistentes e mais eficazes aumentou, trazendo aos agricultores novas opções de produtos. Este grupo de substâncias possui atividade anticolinesterásica, com variado grau de toxicidade. Os principais representantes desta classe são: carbaril, carbofurano, aldicarbe, propoxur e metomil. Estes compostos possuem caráter polar, são solúveis em água e termicamente instáveis (Moraes, 1999; Martínez et al, 2005).

Em contraposição aos resultados satisfatórios da utilização destas substâncias como inseticidas, acaricidas e nematicidas, está o fato de que estão cada vez mais envolvidas em situações de intoxicações humanas, animais e contaminações ambientais. Os produtos de transformação gerados por reações de hidrólise e oxidação também possuem elevado caráter tóxico (Molina et al., 2001; Anvisa, 2007).

O praguicida aldicarbe faz parte do grupo dos carbamatos, sendo um metil carbamato de oxima. É comercializado com o nome comercial de Temik®, possui apresentação exclusivamente granular, sendo indicado para as culturas de batata, café, citros e cana-de-açúcar. A venda no Brasil é autorizada apenas nos Estados da Bahia, Minas Gerais e São Paulo. Apesar da sua baixa persistência no ambiente

e rápida biodegradação, possui uso bastante controlado, pois tem alta toxicidade aguda para organismos alvo e não-alvo (Román et al, 2004)

No Brasil, o aldicarbe é considerado um grande problema de saúde pública, devido a sua venda ilegal para aplicação como raticida (Anvisa, 2006). O produto não tem indicação de uso para esse tipo de praga, entretanto, devido a sua alta toxicidade acaba sendo desviado para o controle de roedores nas grandes cidades (Moraes, 1999).

Contaminações de águas subterrâneas e superficiais pelo aldicarbe já foram demonstradas desde a década de 1980, isso devido a alta solubilidade deste composto em água e sua alta capacidade de lixiviação em solo (Jones e Marquardt, 1987).

Este trabalho tem por objetivo otimizar métodos analíticos para detecção e quantificação de aldicarbe e seus produtos de degradação em matrizes ambientais.

2. GENERALIDADES

A definição de *praguicida* segundo a Organização para Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO) é de que são produtos químicos ou uma mistura de substâncias destinadas à prevenção, a destruição ou controle de qualquer praga, incluindo vetores de doenças humanas e animais, que causam prejuízo, que interferem na produção, elaboração, armazenagem, transporte e comercialização de alimentos, produtos agrícolas, de madeira e seus derivados, ou que podem ser administrados aos animais para combater insetos, aracnídeos e outras pragas dentro ou sobre seus corpos. Este termo também se aplica às substâncias reguladoras do crescimento das plantas, desfolhantes, dessecantes, agentes para reduzir densidade ou evitar a queda prematura dos frutos (FAO, 2007).

A utilização do termo *pesticida* é inadequada por haver significado literal de algo com poder de destruir peste, ou seja, qualquer doença epidêmica grave, por vezes endêmica, de grande mobilidade e mortalidade. Outra terminologia, utilizada de maneira pouco específica é *agrotóxico*, que inclui todos os compostos químicos usados na agricultura, excluindo os de uso domissanitário, pecuário, utilizados no combate de parasitas de animais domésticos, aqueles aplicados à limpeza e manutenção das áreas com linha de transmissão elétrica, no controle de plantas aquáticas e outros.

A classificação destes compostos é baseada nos padrões de uso e no tipo de praga a ser controlada ou destruída. A natureza dos grupos funcionais também é muito importante, pois a reatividade e a utilidade dos compostos orgânicos estão diretamente ligadas a eles (Martínez et al, 2005).

O uso intensivo de praguicidas na produção agrícola pode levar a contaminação do meio ambiente, principalmente das águas (Mattos e Silva, 1999).

2.1. Praguicidas Carbamatos

Os carbamatos são compostos anticolinesterásicos com variado grau de toxicidade para seres humanos. Estas substâncias são largamente utilizadas no controle e no combate a pragas, principalmente como inseticidas (agrícola, saúde pública, uso doméstico e veterinário), como acaricidas e nematicidas (Larini, 1999). Os trabalhadores expostos são os manipuladores destas substâncias nas fábricas e os que aplicam estes praguicidas na atividade agropecuária, principalmente quando não fazem uso dos equipamentos de proteção individual. Outras possibilidades de intoxicação se dão por falta de higiene, por contaminação direta de alimentos e por ingestão proposital, como tentativa de suicídio.

O inseticida e nematicida aldicarbe, em formulação granulada (Temik 150[®]) para aplicação no solo, tem sido muito utilizado no Brasil. Possui autorização apenas para comercialização, não sendo produzido no país, e sua venda somente é permitida nos estados da Bahia, Minas Gerais e São Paulo. O sucesso comercial desse produto é decorrente, ao menos em parte, de sua eficiente ação praguicida. O aldicarbe é utilizado em culturas de batata, café, cana-de-açúcar e citros (Anvisa, 2007). O intervalo de segurança entre aplicação e colheita é em média de 50 dias. Para batata, recomenda-se uma aplicação única, no momento da semeadura ou plantio da cultura e quando necessário, uma aplicação de emergência nas plantas. Para café e citros a aplicação indicada é na estação chuvosa no início da infestação por pragas. Na cultura de cana a aplicação deve ser feita no momento do plantio e

após a colheita (Bayer, 2008). É obrigatório o emprego de equipamento adequado para aplicação do produto, como também cobrir os grânulos imediatamente com terra de modo a evitar contato com aplicadores e outras pessoas que penetrem posteriormente na cultura (Anvisa, 2007).

O aldicarbe é o 2-metil-propionaldeído O-(metilcarbamoil) oxima. Sua fórmula estrutural é $C_7H_{14}N_2O_2S$, e seu peso molecular é 190.25 daltons (Spectrum Laboratories, 1999). Sua estrutura química está apresentada na Figura 1. Possui alta solubilidade em água, é estável em meio levemente ácido e neutro, mas degrada-se rapidamente em soluções alcalinas. Sua degradação no meio ambiente é rápida, não sendo um composto persistente, entretanto, o aldicarbe e seus produtos de transformação são altamente tóxicos para aves, peixes e mamíferos.

Figura 1 – Estrutura molecular do aldicarbe.

O aldicarbe possui dois isômeros como apresentado na figura 2. O produto comercial é composto por uma mistura desses dois isômeros e não há evidências de maior atividade de um deles (Inchem, 1991).

Figura 2 – Estrutura molecular dos isômeros geométricos de aldicarbe.

O Temik 150[®] é um produto granular de coloração cinza-chumbo, com concentração de aldicarbe de 15%. Ele é conhecido popularmente como “chumbinho” e utilizado, clandestinamente, como rodenticida. Sua comercialização clandestina está ainda diretamente relacionada com inúmeros casos de suicídios, homicídios e intoxicações acidentais por esse produto (Anvisa, 2006). Somente no Estado do Rio de Janeiro são estimados 900 a 1500 casos de intoxicação anual por “chumbinho”, com cerca de 100 mortes (Moraes, 1999; Anvisa, 2006).

Estudos *in vitro* demonstraram que o aldicarbe sulfóxido, principal produto de transformação do aldicarbe por reações de oxidação, é um inibidor da acetilcolinesterase 23 vezes mais potente que o aldicarbe e 60 vezes mais potente que o aldicarbe sulfona (proveniente da oxidação do aldicarbe sulfóxido) (Mink et al, 1989; Martínez et al, 2005).

Os produtos resultantes da hidrólise do aldicarbe sob condições de pH alcalino (pH 12.9 e 13.4) são o aldicarbe oxima, metilamina e carbonato (Lemley e Zhong, 1983; Given e Dierberg, 1985). A meia vida de hidrólise nesses dois pH são

de 4,0 e 1,3 min, respectivamente. Outra hidrólise determinada em pH 8.5 e 8.2, indicaram meia-vida de 43 e 69 dias, respectivamente (Lemley e Zhong, 1983).

2.2. Toxicocinética e toxicodinâmica

Toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias pela qual é administrada. Desta forma é necessário o conhecimento das condições de uso seguro de substâncias químicas para a saúde humana e ambiental. Da mesma maneira que todas as substâncias podem ser potencialmente tóxicas, elas também podem ser usadas de forma segura, desde que as condições de exposição sejam mantidas abaixo dos níveis de tolerância (concentração ou intensidade máxima e mínima, relacionada com a natureza e o tempo de exposição ao agente, que não causará dano à saúde do indivíduo durante toda sua vida). Quando não for possível definir um limite de tolerância, deve-se então evitar a exposição (Barros e Davino, 2008).

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico ésteres que tem sua estrutura comum e dois radicais, R e R' onde R é um álcool, oxima, ou fenol e R' um hidrogênio ou um grupo metil (Baron, 1991). Os compostos deste grupo apresentam as seguintes características:

- 1) alta atividade inseticida;
- 2) baixa ação residual, devido à instabilidade química das moléculas;

3) baixa toxicidade a longo prazo, quando comparada com derivados fosforados (Mídio e Silva, 1995).

A absorção do aldicarbe pelo homem pode ocorrer pelas vias dérmica, respiratória e oral, sendo essa última a mais importante. (Inchem, 1991; Melito, 2006; Alonzo e Corrêa, 2008).

A absorção por via oral ocorre nas intoxicações agudas acidentais, nas tentativas de suicídio e intoxicações por contaminação alimentar e ocupacional, tendo relevância também em trabalhadores que fumam durante o trabalho (Alves e col, 1997). Após a absorção, o aldicarbe e seus produtos de biotransformação são rapidamente distribuídos por todos os tecidos (Baron, 1991). A concentração tende a ser maior nos órgãos e tecidos envolvidos no metabolismo do xenobiótico (Baron, 1991).

Na biotransformação do aldicarbe, as reações de maior importância são:

1 - Oxidação, levando a formação de aldicarbe sulfóxido, que mais lentamente se oxida em aldicarbe sulfona.

2 - Hidrólise, com a formação do ácido N-metilcarbâmico e o fenol correspondente.

A biotransformação e a eliminação do aldicarbe são relativamente rápidos, sem evidências de que ocorra bioacumulação (Baron, 1991). A biotransformação ocorre no fígado através de enzimas microssomais (Oonnithan e Casida, 1967). A eliminação ocorre principalmente pela urina e fezes. No caso da eliminação pela via biliar, ocorre circulação entero-hepática, prolongando a sintomatologia (cerca de 30% é excretado conjugado pela bile) (Larini, 1993).

No fígado, o aldicarbe é rapidamente oxidado a aldicarbe sulfóxido. Posteriormente e mais lentamente, uma pequena porção do aldicarbe sulfóxido é oxidado a aldicarbe sulfona. O aldicarbe, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona são convertidos aos correspondentes oximas e nitrilas, as quais são lentamente degradadas aos correspondentes aldeídos, ácidos e alcoóis (figura 3).

Knaak e colaboradores (1966), administraram doses orais de aldicarbe marcado em ratos e observaram que a maior parte do aldicarbe e seus metabólitos foram excretados nas primeiras 24 horas. Após quatro dias, mais de 95% das doses administradas foram excretadas e não se detectou resíduos nos tecidos corporais. Em outro estudo em ratos, realizado por Andrawes e colaboradores (1967), 80% da dose de aldicarbe radioativamente marcado foi eliminado na urina e 4% nas fezes, nas primeiras 24 horas após a exposição. Embora resíduos tenham sido encontrados em níveis baixos em vários tecidos, nos primeiros dias após a administração, não há indicações de que o aldicarbe acumule-se no organismo. Marshall e Dorough (1979) verificaram que após administração de aldicarbe marcado em fêmeas de ratos, foi detectado nos ductos biliares dos animais 26% da dose na bile nas primeiras 24 horas, demonstrando que os metabólitos biliares são amplamente reabsorvidos e excretados na urina (Andrawes et al., 1967; Marshall e Dorough, 1979).

Figura 3 – Biotransformação de aldicarbe em ratos (Inchem, 1991).

A ação tóxica do aldicarbe ocorre através da inibição da enzima acetilcolinesterase, que promove a hidrólise da acetilcolina. A acetilcolina é o mediador químico que realiza a transmissão do impulso nervoso em todas as fibras pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo, em todas as fibras parassimpáticas pós-ganglionares e em algumas fibras simpáticas pós-ganglionares. Além disso, a acetilcolina é o transmissor neuro-humoral do nervo motor do músculo estriado (placa mioneural) e de algumas sinapses interneuronais no sistema nervoso central. A transmissão do impulso nervoso requer que a acetilcolina seja liberada no espaço intersináptico ou entre a fibra nervosa e a célula efetora. Depois, a acetilcolina se liga a um receptor colinérgico gerando desta forma um potencial pós-sináptico e a propagação do impulso nervoso. A acetilcolina é imediatamente liberada e

hidrolisada pela acetilcolinesterase. Cambon e col. (1979) demonstraram que logo após a administração de aldicarbe à ratos, houve uma diminuição significativa nos níveis de acetilcolinesterase do cérebro e do fígado desses animais. Weil e Carpenter (1975) determinaram a DL50 dos produtos de transformação de aldicarbe em ratos, para o aldicarbe sulfóxido obtiveram 0,88 mg.Kg⁻¹ de peso corpóreo, e 25,0 mg.Kg⁻¹ de peso corpóreo para aldicarbe sulfona.

O aldicarbe e a acetilcolina possuem estruturas muito semelhantes como demonstrado na Figura 4. Desta forma o praguicida se liga facilmente ao sítio da enzima acetilcolinesterase impedindo a ligação desta com o neurotransmissor acetilcolina.

Figura 4 – Estrutura molecular do aldicarbe e do neurotransmissor acetilcolina

O quadro clínico da intoxicação é caracterizado essencialmente por manifestações nicotínicas e muscarínicas que podem iniciar em até 12 horas após a exposição. As manifestações iniciais de intoxicação incluem cefaléia, tonturas, agitação, tremores, miose, lacrimejamento, visão turva, fotofobia e salivação

excessiva. Nos casos de intoxicação moderada e grave pode-se observar quadros de bradicardia e hipotensão, seguida por taquicardia e arritmias (Larini, 1999; Alonzo e Corrêa, 2008).

2.3. Toxicidade

O aldicarbe é o carbamato de maior toxicidade aguda, inclusive para organismos não-alvos, como mamíferos, aves e peixes, de maneira que a contaminação de produtos agrícolas e do ambiente com resíduos desse composto pode causar efeitos adversos a esses organismos. Sua DL50 oral em camundongos é da ordem de 0,5 a 1,0 mg.kg⁻¹. A toxicidade desta substância para alguns organismos é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Comparação da toxicidade do praguicida Aldicarbe frente a organismos não-alvo.

Organismo	Concentração/Dose Letal 50
Dafnias	40 – 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$
<i>Skeletonema costatum</i>	> 50.00 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Misidáceo	13 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Camarão branco	72 $\mu\text{g.L}^{-1}$
“Pinfish”	80 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Truta arco-íris	780 $\mu\text{g.L}^{-1}$
“Catfish”	1,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Coelhos	5,3 mg.kg^{-1}
Ratos	283 mg.kg^{-1}

(Fonte: Who, 2004)

Estudos em camundongos, ratos e cobaias mostraram que a inalação do aldicarbe por cinco minutos é extremamente tóxica para estas três espécies (Grendon et al, 1994). O aldicarbe e seu produto de degradação aldicarbe sulfóxido possuem toxicidade aguda semelhante para mamíferos, embora este último seja um inibidor mais potente da acetilcolinesterase, o aldicarbe sulfona é menos ativo que o

aldicarbe (Burgess et al, 1994). Estes compostos têm sido apontados como indicadores da exposição ao aldicarbe, embora sejam estáveis por, no máximo, dois dias em animais vivos ou mortos (Harper et al, 1998; Cobb et al, 2001).

A mutagenicidade do aldicarbe foi avaliada pelo teste de Ames usando 5 linhagens de *Salmonella typhimurium*, o composto não demonstrou ter atividade mutagênica (Ercegovich e Rashid, 1973). Dunkel et al (1985) confirmaram esses resultados, pois estudo realizados em 4 diferentes laboratórios que testaram a mutagenicidade do aldicarbe em *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537, e TA1538) e *E. coli* (WP2 *uvrA*), com e sem ativação metabólica, apresentaram respostas negativas para mutagenicidade.

Weil e Carpenter (1965) avaliaram os efeitos crônicos e subcrônicos de aldicarbe em ratos através da introdução deste composto na dieta de animais pelo período de dois anos. As doses testadas foram: 0,005; 0,025; 0,05 e 0,1 mg.Kg⁻¹ de peso corpóreo. O grupo era composto por 40 animais, 50% machos e 50% fêmeas. Foram avaliadas as medidas de consumo alimentar, peso corpóreo, mortalidade, incidência de infecção, peso de órgãos como rins e fígado em relação a porcentagem de peso corpóreo, incidência de lesões e tumores, e atividade da colinesterase eritrocitária, cerebral e plasmática. Não foram observadas alterações significativas nos parâmetros avaliados no grupo experimental quando comparado ao grupo controle.

Não há dados que indiquem potencial carcinogênico no praguicida aldicarbe. Weil (1968) realizou um experimento em ratos machos aplicando uma solução de aldicarbe (0,125%) nas costas dos animais duas vezes por semana durante 28 meses. Não foi observada nenhuma alteração significativa na incidência de tumores.

Testes de toxicidade aguda oral foram realizados em 5 espécies de aves e teste agudo dietário foi realizado em uma espécie. A palatabilidade de grânulos de aldicarbe foi estudada em experimentos com gaiola em cinco espécies sob condições laboratoriais e de campo. Relatórios de estudos detalhados de monitoramento da vida selvagem também foram realizados. Nos resultados obtidos observou-se que o aldicarbe é altamente a extremamente tóxico para aves de forma aguda, com a maioria das DL50 abaixo de 5mg.kg^{-1} . Estudos em gaiola com 6 espécies mostram que aves podem consumir quantidades letais de grânulos de aldicarbe, especialmente quando há pouco suprimento de alimento, mas que pelo menos alguns indivíduos parecem rejeitar totalmente os grânulos. A supervisão em campo tanto no Reino Unido quanto nos EUA confirmou que um número limitado de aves pode morrer pelo uso de aldicarbe, mas sem afetar populações. Um baixo número de carcaças foi recuperado (normalmente menos de dez espécimes) em locais de estudo de campo individuais. A análise de resíduo do praguicida confirmou exposição ao aldicarbe em cerca de metade dos espécimes examinados. Grânulos que permaneceram expostos na superfície aparentaram ser a principal fonte de exposição, mas outras fontes como minhocas contaminadas com aldicarbe também foram identificadas (Inchem, 1991; NRA, 2001).

Para peixes o aldicarbe também se apresentou altamente tóxico em testes estáticos com a truta arco-íris e o peixe-lua de guelra azul. O primeiro teste com a truta arco-íris foi feito a 12°C utilizando uma formação granular 10% adicionada diretamente a jarros contendo 15 L de água e cinco peixes por jarro (peso médio de 1,5 g). Um único indivíduo morreu na concentração de $0,32\text{ mg.L}^{-1}$, mas todos morreram dentro de 48 horas com concentrações de $1,8\text{ mg.L}^{-1}$ (NRA, 2001). Perda de equilíbrio foi percebida no período de 6 horas com concentrações acima de 1

mg.L⁻¹. Outro teste realizado com a truta arco-íris seguiu um protocolo similar, mas introduziu o toxicante em solução de acetona. A mortalidade só ocorreu nas duas maiores concentrações do teste. A concentração de efeito não observado nominal foi de 0,18 mg.L⁻¹; os peixes demonstraram sinais de irritabilidade depois de 24 horas expostos a concentração de 0,32 mg.L⁻¹ (Handley et al, 1991).

Peixes guelra azuis foram testados a 22°C no mesmo laboratório do primeiro teste com a truta arco-íris e de acordo com o mesmo protocolo. A resposta à dose foi abrupta, com uma única mortalidade perto do fim do período de exposição a 0,1 mg.L⁻¹, mas com mortalidade total, precedida por perda de equilíbrio, dentro de 24 horas a 0,32 mg.L⁻¹. A 0,18 mg.L⁻¹, a mortalidade aumentou ao longo do período de exposição até atingir 70%.

O segundo teste com o guelra azul utilizou aldicarbe purificado em solução aquosa de acetona em jarros contendo 2 L de água de cultivo e 5 peixes (peso médio 5 g)/jarro. A mortalidade aumentou de 5% a 0,06 mg.L⁻¹ para 100% dentro de 24 horas a 0,25 mg.L⁻¹. Testes com aldicarbe sulfóxido e sulfona provaram que estes metabólitos são menos tóxicos do que o composto original (CL50 de 4 e 64 mg.L⁻¹, respectivamente).

Para o teste realizado com o peixe guelra azul, a mortalidade alcançou 20% a 0,056 mg.L⁻¹ e 100% dentro de 48 horas a 0,100 mg.L⁻¹. A concentração de efeito não observado foi de 0,032 mg.L⁻¹.

A base de dados EPA ajuda a compreender as sensibilidades discrepantes das duas espécies para as quais os relatórios dos testes foram fornecidos. Os peixes pele-de-marta partilham da mesma insensibilidade relativa da truta arco-íris, com uma CL50 de 96 horas de 1,37 mg.L⁻¹. Espécies marinhas partilham da

sensibilidade do peixe-lua guelra azul, como indicado pelos resultados para o *Sheepshead minnow* ($170 \mu\text{g.L}^{-1}$), o *pinfish* ($80 \mu\text{g.L}^{-1}$) e o *spot* ($200 \mu\text{g.L}^{-1}$).

A exposição crônica da truta arco-íris ao aldicarbe não revelou nenhuma sensibilidade adicional comparada à exposição aguda. As trutas arco-íris (peso médio 1,15 g) foram expostas a aldicarbe em concentrações entre 0,0056 e 0,056 mg.L^{-1} por 21 dias. Efeitos sub-letais (nadar na superfície ou no fundo, pigmentação aumentada, perda de equilíbrio) foram observados somente na maior concentração do teste ($0,56 \text{ mg.L}^{-1}$), que foi também a concentração limiar letal. Nessa concentração a mortalidade aumentou pelo período de exposição até atingir 60% depois de 21 dias (Handley et al, 1995).

Um teste similar foi realizado sob condições de renovação estática com uma solução estoque de aldicarbe (10 mg.L^{-1}) preparada a partir de uma formulação granular de 5%. A mortalidade só foi observada na maior concentração do teste ($1,73 \text{ mg.L}^{-1}$) e somente nos 2 primeiros dias de exposição, atingindo 40%. Efeitos sub-letais (curvatura anormal do corpo) foram vistos a partir de $0,175 \text{ mg.L}^{-1}$ (Thun, 1991).

Foram realizados testes de toxicidade aguda com dáfnias e misidáceos, testes de reprodução com dáfnias, e testes de inibição do crescimento algal com a alga verde. Alguns dados para os metabólitos sulfóxido e sulfona também foram obtidos. Resultados laboratoriais foram corroborados por dados de campo. Os resultados dos testes indicam que o aldicarbe é altamente tóxico para a maior parte dos organismos sob condições de exposição aguda. Os crustáceos partilham de sensibilidade aguda similar a dos , mas são afetados por concentrações mais baixas quando expostos cronicamente. A mortalidade materna ao invés do impedimento

reprodutivo é o principal indicador de efeitos crônicos em dáfnias (Young Song et al, 1997).

O aldicarbe sulfóxido e o aldicarbe sulfona têm toxicidade similar ao aldicarbe quando testados com dáfnias e algas verdes, porém são menos tóxicos para as algas (Hillman, 1990).

O teste com o mosquito-pólvora envolveu exposição de *Chironomus riparius* por 24 horas ao aldicarbe, introduzido ao meio do teste em uma solução de acetona. Certa atenuação da toxicidade foi notada quando o toxicante foi aplicado pela primeira vez ao sedimento, com uma CL50 de 26,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Concentrações de exposição não foram confirmadas analiticamente, e não fica claro se a atenuação na toxicidade reflete retenção pelo sedimento ou degradação do aldicarbe.

A toxicidade materna parece ter sido a resposta dominante em testes reprodutivos com dáfnias e ocorreu em concentrações mais baixas que em exposição aguda. Os efeitos da exposição ao aldicarbe na capacidade reprodutiva foram estudados em um teste semi-estático de 21 dias com *Daphnia magna*. Análises dos meios de teste mostraram que as concentrações médias obtidas foram 106% das concentrações nominais, que foram utilizadas para relatar resultados. A CE50 foi 0,09 mg.L^{-1} , e sobreviventes em 0,18 mg.L^{-1} eram notadamente menores em tamanho e mais pálidos em cor do que os controles. A toxicidade em adultos reduziu o número total de jovens produzido por este grupo para 13% de níveis de controle, mas não afetou significativamente o número de jovens produzidos por cada fêmea. A CE50 para reprodução não pôde ser determinada, mas está em torno de 0,56 mg.L^{-1} , uma concentração que matou toda a geração de pais (Handley et al, 1995; Inchem, 1991).

Um segundo teste semi-estático examinou os efeitos de uma formulação Temik® com concentrações de aldicarbe entre 0,018 a 1,45 mg.L⁻¹ com um fator de diluição serial de 2,4. Concentrações analíticas permaneceram em pelo menos 80% do nominal. Todas as dáfnias morreram em 4 dias na dose mais alta, mas os índices de imobilização não diferiram significativamente entre os organismos de teste e de controle em concentrações mais baixas. O número de descendentes por adulto sobrevivente permaneceu inalterado exceto por uma redução no dia 9 em 0,6 mg.L⁻¹. Os descendentes mortos foram um indicador mais sensível de efeitos, sendo significativamente maior no dia 21 em 0,25 mg.L⁻¹ e nos dias 11, 16, 18 e 21 em 0,6 mg.L⁻¹. Os dados não permitiram estimativa de valores de CE50 para imobilização ou reprodução (Thun, 1991).

Mexilhões de água doce e mariscos asiáticos sobreviveram 96 horas em exposição estática a 21°C a concentrações de aldicarbe variando até 320 mg.L⁻¹. No entanto, a atividade de colinesterase no músculo adutor do mexilhão foi diminuída em concentrações de até 0,1 mg.L⁻¹. A toxicidade aumentou drasticamente com o aumento da temperatura, com mortalidade ocorrendo em concentrações de até 5 mg.L⁻¹ a 30°C (Moulton et al, 1996).

A baixa toxicidade de aldicarbe em moluscos pode ser observada também na base de dados da EPA, que lista uma CE50 de 48 horas de 8,8 mg.L⁻¹ para ostras do leste (US EPA,).

Para algas, testes em dois laboratórios diferentes demonstraram que o aldicarbe é levemente a moderadamente tóxico para a alga verde *Scenedesmus subspicatus*. A toxicidade dos produtos sulfóxido e sulfona se mostrou na mesma faixa (NRA, 2001).

O primeiro de dois resultados foi obtido usando aldicarbe de padrão analítico. As algas foram cultivadas sob iluminação contínua em um misturador orbital a 24°C. Concentrações analíticas permaneceram em 93% do nominal. Acúmulo e deformação de células foi visto em concentrações de 0,8 e 1,6 mg.L⁻¹. As CE50 foram as mesmas com respeito à taxa de crescimento (24 - 48 horas) e biomassa (Hillman, 1990).

Bioensaios similares foram realizados com sulfóxido e sulfona. A CE50 de 96 horas para aldicarbe sulfóxido foi de 12 mg.L⁻¹ baseada na biomassa e 22 mg.L⁻¹ com relação à taxa de crescimento (0-24 horas). Nenhuma anormalidade foi observada em culturas de controle ou de teste, mesmo na maior concentração de 50 mg.L⁻¹. Concentrações declinaram tanto durante a fase de exposição que as CE50 baseadas nas concentrações medidas finais foram por volta de 70% (Handley et al, 1994b). Para sulfona, as CE50 baseadas em biomassa e taxa de crescimento nas primeiras 24 horas foram de 4,1 e 3,9 mg.L⁻¹, respectivamente. Supostas perdas por sorção reduziram concentrações finais analíticas para 19 - 58% da nominal, com os maiores decréscimos em concentrações mais baixas (Handley et al, 1994b).

Já para organismos terrestres estudos indicam que o aldicarbe é moderadamente tóxico para minhocas. Besouros também demonstraram ser suscetíveis ao aldicarbe, sofrendo mortalidade total logo após exposição a areia tratada com o composto (Edwards e Coulson, 1992).

Estudos de campo não indicam nenhum dano a longo prazo em populações de inseto não-alvo pelo uso de aldicarbe. Testes de laboratório com bactérias e fungos indicam que efeitos em populações microbiais no campo são improváveis.

Uma revisão dos testes de toxicidade em minhocas cita os seguintes dados de CL50 (mg.kg⁻¹ solo de peso seco) a partir da exposição de várias espécies a diferentes concentrações de aldicarbe por 14 dias: *Eisenia fétida* 20; *Apporectodea calignosa* 4; *A chlorotica* 4; *Lumbricus rubellus* 8; *L terrestris* 26 (Edward, 1992). Estes resultados indicam que o aldicarbe é moderadamente tóxico para minhocas. A toxicidade do aldicarbe (CL50 de 3,1 - 50 mg.L⁻¹) também foi aparente em um teste não-padrão envolvendo breve imersão em solução contendo aldicarbe antes de colocação em solo limpo. Edwards (1992), demonstrou que o aldicarbe é absorvido pelo tecido da minhoca em solos encharcados.

Para microorganismos, Spurr e Sousa (1966, 1974) testaram os efeitos de aldicarbe e seus produtos de transformação em fungos saprofíticos e patogênicos e observaram que alguns desses microorganismos utilizam o aldicarbe como fonte de carbono.

Alguns autores verificaram que concentrações entre 5 e 500 ppm da formulação comercial de aldicarbe (100 g.Kg⁻¹) causa diminuição da população de *Actinomycetes*, *Nitrosomonas europaea*, e *Nitrobacter agilis* nos primeiros 16 dias de exposição (Kuseske et al, 1974).

Para abelhas o aldicarbe é muito tóxico, e a via de intoxicação é por contato direto. No entanto, não há menção de problemas significativos pelo uso comercial do produto devido à baixa probabilidade das abelhas encontrarem resíduos de superfície pela aplicação de grânulos no solo. A mortalidade das abelhas ocorre através da exposição ao néctar de frutas cítricas tratadas com aldicarbe (NRA, 2001).

O Temik® 15G foi aplicado pouco antes da florescência em pomares de laranja-baía e laranja valência com o intuito de determinar se resíduos tóxicos ocorreriam na flor ou no pólen. Culturas de valências foram tratadas com 22.4 kg/ha espalhados por 54% da área plantada. Pés de laranjas-baía foram tratados separadamente com o equivalente a 22,4, 11,2, 5,6 e 2,8 kg/ha. Os grânulos foram incorporados a 5 cm e irrigados. As concentrações mais elevadas na cultura de laranjas-baía levou a 20% de mortalidade de abelhas em 20 dias após o tratamento, aumentando para 52% em 23 dias antes de cair para níveis não-tóxicos em 25 dias. O tratamento das laranjas valências, causou baixo nível de toxicidade para abelhas após 20 dias de aplicação (Atkins et al, 1975).

2.4. Contaminação ambiental por praguicidas

O emprego de praguicidas tornou-se essencial nos sistemas de produção agrícola, porém a contrapartida do aumento de produtividade proporcionado pelo seu uso, pode ser observada nos impactos ambientais. Esses impactos ambientais são decorrentes da toxicidade dos praguicidas aos organismos não-alvo e da contaminação do solo e dos recursos hídricos. Esse impacto das atividades agrícolas sobre a qualidade das águas tornou-se conhecido em alguns países industrializados há algumas décadas. Demonstrou-se altas taxas de lixiviação de nitrato e outros íons em muitos solos submetidos ao plantio contínuo, sustentado por aplicações de grandes quantidades de fertilizantes e praguicidas (Filizola et al, 2002).

Em alguns casos, menos de 0,1% do volume de praguicidas aplicados alcançam o alvo, sendo que o restante tem potencial para se mover para outros

compartimentos ambientais como as águas superficiais e subterrâneas. Sendo assim, a contaminação de águas subterrâneas por praguicidas pode acontecer por um processo de percolação da água no solo e através das fraturas dos solos e rochas (Lourencetti et al, 2005).

Estudos de monitoramento ambiental podem ser planejados e realizados analisando-se diretamente água ou solo, já que o potencial de contaminação de uma substância depende diretamente da sua mobilidade no solo. A presença de praguicidas no solo depende diretamente de propriedades como a meia-vida da substância no solo, coeficiente de adsorção a matéria orgânica (Koc) e solubilidade, além da interação com certos parâmetros tais como teor de matéria orgânica e propriedades hidráulicas (Filizola et al, 2002).

O Estado de São Paulo, apesar de ter um programa de monitoramento da qualidade das águas superficiais e subterrâneas implantado, não avalia praguicidas do grupo dos carbamatos de forma sistemática (Cetesb, 2001).

Estudos sobre o destino do aldicarbe e seus produtos de degradação em solo demonstraram que eles são intensamente lixiviados podendo alcançar lençóis freáticos contaminando águas subterrâneas e superficiais (Inchem, 1991).

O aldicarbe é transformado no ambiente por reações oxidativas e hidrolíticas, predominando uma ou outra de acordo com as condições do meio. A hidrólise leva a formação de compostos menos tóxicos, enquanto que as reações oxidativas transformam aldicarbe em sulfóxido e sulfona, e ambos mantêm atividade biológica (Inchem, 1991).

A atividade microbiana ou catálise química pode intervir em ambas as vias de transformação do aldicarbe, mas a hidrólise tende a ser a principal via de transformação. A taxa de transformação é influenciada por numerosos fatores onde os principais são: temperatura, pH, textura do solo, potencial redox, umidade e atividade microbiana (Read, 1987).

O aldicarbe é usado diretamente no solo e, após a aplicação, é absorvido pela raiz e distribuído por todo vegetal, de forma que a simples lavagem da planta não é suficiente para eliminar o praguicida. Sendo assim, o consumo de certos produtos inadequadamente tratados pode resultar em exposição ao aldicarbe (Farley e MCFarland, 1999).

Há duas formas de contaminação, a contaminação direta, que resulta, em sua maioria, da aplicação do praguicida para o controle de pragas agrícolas, e a contaminação indireta, que resulta de outras fontes não relacionadas com a aplicação direta para o controle de pragas. Citam-se como exemplos para este caso, os resíduos industriais contendo praguicidas ou compostos relacionados que são freqüentemente lançados aos rios, as partículas de agrotóxicos suspensas no ar após pulverizações e polvilhamentos que podem ser depositadas a grandes distâncias, sendo que, somente de 10 a 20% dos agrotóxicos aplicados em polvilhamento e de 25 a 50% em pulverizações, são depositados sobre a superfície da planta. A erosão do solo também pode transferir restos de praguicidas para áreas não tratadas. Assim como as enxurradas que transportam um grande volume de resíduos tóxicos de áreas agrícolas para os oceanos, mares e rios, o descarte de sobras de praguicidas e lavagem dos aplicadores na água, o lançamento de

produtos em esgoto doméstico e ainda o descarte de animais mortos por intoxicação e de alimentos contaminados (Ferracini et al, 2001).

O aldicarbe é muito persistente em águas subterrâneas, particularmente naquelas que possuem características ácidas, a meia-vida de transformação em produtos não-tóxicos varia de uma a algumas semanas, podendo estas substâncias ficarem presentes por até alguns anos (US EPA, 1984).

Aldicarbe foi detectado em 111 de 1017 amostras de levantamentos de entidades privadas e municipais de reservatórios de abastecimento no Canadá (limites de detecção entre 0.01–3.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$); a concentração máxima encontrada foi 28 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Hiebsch, 1988). Aldicarbe foi detectado em água de torneira nos EUA em concentrações de 10 a 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (EPA, 1984). O aldicarbe e seus produtos de transformação não foram detectados em amostras de água de abastecimento de origem subterrânea oriundas de 700 comunidades da Flórida, EUA (limite de detecção entre 2 e 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para cada composto) (Miller et al, 1989). Concentrações iguais ou superiores a 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foram detectadas em águas subterrâneas próximas de plantações de batata em 31,3% das amostras testadas em Long Island, Nova York, EUA; sendo que 0,9% das amostras continham aldicarbe em concentrações acima de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Jones e Marquardt, 1987).

Águas subterrâneas canadenses foram monitoradas em Prince Edward Island, New Brunswick, Nova Scotia, Quebec e Ontario. Regiões produtoras de batata em províncias marítimas foram consideradas regiões de risco para contaminação das águas subterrâneas após a descoberta de grandes concentrações de aldicarbe nessas amostras (superior a 515 $\mu\text{g.L}^{-1}$). A contaminação de águas superficiais também foi relatada em cerca de 10% das

amostras colhidas de Prince Edward Island em 1983 e 1984. Posteriormente o uso de aldicarbe em culturas de batata foi proibido no Canadá (CCREM, 1993).

No Brasil apenas um trabalho foi encontrado onde o aldicarbe foi avaliado em águas superficiais, porém o mesmo não foi detectado em nenhuma das amostras (Marques et al, 2007).

2.5. Legislação

No Brasil a Resolução 518/04 do Ministério da Saúde normatiza a qualidade de água para consumo humano dando os valores máximos permitidos para um grupo de 23 praguicidas onde não está contemplado o aldicarbe e nenhuma outra substância do grupo dos carbamatos.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente dispõe sobre os padrões de qualidade de águas superficiais através da Resolução 357/05 onde estão definidos os limites para cada grupo de substâncias dentro de cada tipo de corpo d'água e sua classe.

As águas doces (salinidade igual ou inferior a 0,5%), salobras (salinidade superior a 0,5% e inferior a 30%) e salinas (salinidade igual ou superior a 30%) são classificadas de acordo com a qualidade necessária para seu uso.

Tabela 2 – Valores máximos permitidos para aldicarbe e seus produtos de transformação em água.

Origem	Limite Máximo Permitido ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
	Água potável	Proteção da vida aquática
US EPA	3, 2 e 4*	-
OMS	10	-
Austrália	1	-
Argentina	3	-
Canadá	-	1

* aldicarbe, aldicarbe sulfona e aldicarbe sulfóxido, respectivamente.

No grupo das substâncias orgânicas estão incluídos alguns praguicidas mas não há limites máximos estabelecidos para aldicarbe ou seus produtos de transformação. Entretanto há um representante do grupo dos carbamatos, o praguicida carbaril de menor toxicidade que o aldicarbe, cujo valor máximo permitido é de: $0,02 \mu\text{g.L}^{-1}$ para água doce classe 1, $70 \mu\text{g.L}^{-1}$ para água doce classe 3, $0,32 \mu\text{g.L}^{-1}$ para água salina classe 1 e $0,32 \mu\text{g.L}^{-1}$ para água salobra classe 1.

A legislação vigente para controle de qualidade de águas subterrâneas é a Resolução 396/08, onde estão descritos os valores máximos permitidos para aldicarbe e seus produtos de transformação, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona, sendo que, de acordo com o uso da água é que se tem o valor máximo permitido. Os dados estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 3 – Valores máximos permitidos de aldicarbe, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona em águas subterrâneas.

Substâncias	Usos da água			
	Consumo Humano	Dessedentação de Animais	Irrigação	Recreação
Aldicarbe, Sulfóxido e Sulfona	10 µg.L ⁻¹	11 µg.L ⁻¹	55 µg.L ⁻¹	NC

NC: não consta

(Fonte: CONAMA 396/08)

2.6. Teste de toxicidade aguda com V. fischeri

Diferentes ensaios ecotoxicológicos foram desenvolvidos a partir da década de 1970 para avaliação da toxicidade de substâncias químicas. Embora tradicionalmente algas, crustáceos e peixes sejam usados para medidas de toxicidade aquática, esses testes requerem maiores tempos de exposição e volume de amostra do que testes de toxicidade que utilizam bactérias. Dentre esses, o teste que utiliza a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* e recebe o nome de Microtox[®] é, sem dúvida, o mais utilizado. Nesse teste é medida a redução da luminescência emitida naturalmente pela bactéria quando ela é posta em contato com um agente tóxico, o qual inibe a atividade da enzima luciferase (Olivi, 2008).

Os testes com a bactéria *Vibrio fischeri* e com o microcrustáceo *Daphnia magna* são considerados de padrão internacional para testes de toxicidade aguda (Knie e Lopes, 2004); sendo que o ensaio com a bactéria marinha é normalizado pela ISO 11348-1 e DIN 38412-34 (Rodrigues e Pawlowsky, 2007)

O método para avaliação de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* foi desenvolvido por Bulich em 1979. Essa bactéria é encontrada nos oceanos, em vida livre ou associada a outros organismos marinhos como algumas espécies de lula.

O teste de toxicidade com *Vibrio fischeri* baseia-se na medida da luminescência registrada em um aparelho denominado luminômetro, que é capaz de medir baixas quantidades de luz emitida por uma cultura de aproximadamente um milhão de células bacterianas (Bulich, 1979). Durante seu metabolismo o *Vibrio fischeri* utiliza parte da energia obtida no ciclo de Krebs para emitir luz. Desta forma, ao entrar em contato com substâncias tóxicas, capazes de causar toxicidade a bactéria, ocorre a inibição da produção de energia, as bactérias podem cessar ou diminuir a emissão de luz. Essa diminuição da capacidade de produção de luz é medida em porcentagem de inibição de luminescência. A principal vantagem deste teste é a rapidez de resposta. Enquanto testes de toxicidade com microcrustáceos como *Daphnia* e peixes levam de 24 a 96 horas para gerar um resultado, em apenas 15 minutos se obtém o resultado quando se utiliza o *Vibrio fischeri* (Umbuzeiro e Rodrigues, 2004).

Os resultados dos testes de toxicidade podem ser expressos de modo qualitativo (tóxico e não tóxico) ou quantitativo. Quanto menor a concentração de uma substância capaz de causar efeito, maior sua toxicidade. Os resultados são

expressos em concentração letal 50 (CL50) ou concentração efetiva 50 (CE50). A CL50 é a concentração de uma substância que causa mortalidade de 50% dos organismos expostos. A CE50 é a concentração capaz de imobilizar 50% dos organismos ou causar inibição de 50% da produção de luz do *Vibrio fischeri*. Tanto a CL50 como CE50 são usualmente expressas em mg.L⁻¹ ou em % de amostra.

No Estado de São Paulo, é padronizado pela Norma Técnica CETESB L5227, elaborada em 1987 e revisada em 2001. A CETESB foi pioneira na implantação desse ensaio no Brasil e, atualmente, esse ensaio está credenciado junto ao INMETRO de acordo com a norma NBR/ISO/17025 (Umbuzeiro e Rodrigues, 2004).

O teste com a bactéria *Vibrio fischeri* é capaz de detectar toxicidade em diferentes amostras ambientais, sendo uma alternativa especialmente importante no monitoramento da qualidade de efluentes industriais, domésticos, corpos d'água entre outros. O ensaio também é uma importante ferramenta quando se tem um grande número de amostras e a necessidade de respostas em curto espaço de tempo.

Os mecanismos bioquímicos pelos quais compostos tóxicos exercem o efeito de redução da bioluminescência sobre a bactéria, são apenas parcialmente compreendidos. Sabe-se que, a enzima luciferase catalisa a reação de óxido-redução da riboflavina fosfato, que é o mecanismo responsável pela emissão de luz. Este processo está relacionado com o metabolismo microbiano e, portanto, está diretamente ligado ao efeito tóxico de uma substância sobre a bactéria. Isenberg (1993), descreve que a concentração efetiva média (CE50) para uma variedade de gases anestésicos são muito semelhantes para bactérias, ratos, cães, gatos, e humanos, sendo desta forma possível avaliar a toxicidade de uma substância com

os testes de toxicidade *in vitro*, entretanto é de grande importante a comparação dos resultados com outras espécies (Isenberg, 1993; Kaiser, 1998).

2.7. Técnicas analíticas e preparo de amostras

Devido ao grande número de princípios ativos utilizados na agricultura, as análises exigem métodos eficientes, capazes de detectar limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação (LMR) e concentrações consideradas de alerta para a saúde humana (Lourencetti et al, 2005).

2.7.1. Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (CG) é aplicável para separação e análise de misturas cujos constituintes tenham pontos de ebulição de até 300°C e que sejam termicamente estáveis (Dawling, 2003; Collins et al, 2006).

Quando se trata de compostos termicamente sensíveis, como os carbamatos, é necessário que se avalie alguns parâmetros como concentração, temperatura do injetor e comprimento da agulha de injeção, no intuito de otimizar a análise permitindo a detecção destes compostos (Martínez et al, 2005).

O sistema de cromatografia gasosa baseia sua separação na diferença da distribuição de substâncias contidas em uma amostra entre uma fase estacionária e uma fase móvel. A fase móvel é sempre um gás inerte que arrasta a amostra pela coluna. Através de um sistema de injeção que pode ser manual ou automatizado, a amostra é introduzida na coluna contendo a fase estacionária. O uso da temperatura

no local de injeção possibilita a vaporização das substâncias contidas na amostra e de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são mais ou menos retidas e chegam em tempos diferentes na saída da coluna. O uso de um detector na saída da coluna permite a detecção e quantificação das substâncias de interesse (Collins et al, 2006).

Diferentes tipos de detectores podem ser utilizados em cromatografia gasosa, os principais são: detector por condutividade térmica, detector por ionização em chama, captura de elétrons, detector de nitrogênio fósforo e por espectrometria de massas. O acoplamento da cromatografia gasosa com o espectrômetro de massas traz uma contribuição significativa para melhorar a eficiência na análise de misturas complexas. Desta forma é possível detectar substâncias que coeluem e também obter a identificação de substâncias desconhecidas (Aquino-Neto e Nunes, 2003; Collins et al, 2006).

2.7.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *high-performance liquid chromatography*) é uma importante técnica analítica, uma vez que permite a separação de misturas que contêm um grande número de compostos orgânicos. Seu emprego é indispensável em vários laboratórios, de diferentes áreas de atuação. Os principais detectores utilizados nesta técnica são: ultravioleta, arranjo de diodos, detectores eletroquímicos e por fluorescência, bem como o acoplamento com o espectrômetro de massas. Com essa variedade de detectores, com diferentes níveis de sensibilidade e seletividade, tornou-se possível a detecção de uma faixa mais ampla de compostos e a determinação de substâncias em baixas concentrações

presentes em matrizes complexas como sangue, alimentos e matrizes ambientais (Collins et al, 2006).

Na análise de praguicidas, a cromatografia líquida é bastante utilizada, principalmente em métodos de triagem ou *screening* onde em uma mesma corrida cromatográfica a separação é feita para vários compostos de interesse (Mourkidou e Patsias, 1996).

Compostos não-voláteis, polares ou termolábeis, difíceis de serem determinados por cromatografia gasosa, podem ser determinados por HPLC ajustando-se parâmetros como tipo de fase estacionária (coluna cromatográfica) e composição da fase móvel (Kupiec et al, 2003).

Um sistema de cromatografia líquida é composto basicamente por bomba de alta pressão (que pode trabalhar até 10.000 psi), sistema de injeção por válvulas, coluna de separação e de detecção.

A cromatografia líquida pode ser dividida, de acordo com os modos de separação (interação analito-fase móvel-fase estacionária), em cinco grupos:

- Fase normal: também conhecida como cromatografia líquida de adsorção. Neste modo, a FE (fase estacionária) é um sólido, geralmente sílica ou alumina, que irá reter os solutos por adsorção. A FM (fase móvel) geralmente é um solvente orgânico apolar (como hexano, clorofórmio, diclorometano). Pode-se afirmar que as separações cromatográficas nasceram neste formato, mas atualmente este modo está em desuso, sendo utilizada quase que exclusivamente para caracterização de extratos de plantas.

- Fase reversa: a fase estacionária neste caso é composta por partículas de material adsorvente (geralmente sílica) que são quimicamente ligadas a radicais orgânicos variados sendo as mais comuns cadeias com oito (octilsilano ou C-8) ou dezoito (octadecilsilano, C-18) átomos de carbono. Nestas situações, a FE apresenta características apolares e a FM é composta por misturas de água ultra pura (ou soluções tampão aquosas) e solventes orgânicos polares como metanol, acetonitrila ou tetraidrofurano. Este é o modo de separação mais utilizado atualmente.
- Troca iônica: neste caso, a FE deve possuir carga iônica oposta à apresentada pela substância que se quer determinar. A FM geralmente é composta por soluções tampão que devem ter o pH e a força iônica ajustadas cuidadosamente.
- Cromatografia por exclusão de tamanho: a FE agora é composta por polímeros que possuem poros de diâmetro muito bem definidos. Quanto maior o tamanho da substância, menos ela entrará nos poros da coluna, e mais rápida será a eluição. O inverso ocorre para substância de pequeno tamanho. É um modo de separação de grande aplicação em biotecnologia, principalmente para isolamento ou determinação quantitativa de peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos.
- Cromatografia quiral: utiliza colunas preenchidas por compostos capazes de separar enantiômeros (compostos quirais), como ciclodextrinas, éteres coroa ou antibióticos macrolídeos. É utilizada sempre que for necessária a avaliação da pureza ótica de uma substância. As colunas cromatográficas utilizadas para separações quirais possuem custo elevado e vida útil. São muito utilizadas, por exemplo, na indústria farmacêutica, pois em alguns casos um das formas quirais possui atividade biológica e a outra é inativa, ou ainda podem ter ação antagônica.

Dentre os sistemas de detecção utilizados em HPLC, merecem destaque por suas aplicações:

- Detecção por ultravioleta (UV): este tipo de detector pode ser utilizado para detectar substâncias que absorvam a luz UV-VIS, é o tipo de detector mais comum, pois apresenta boa sensibilidade e ampla faixa linear.

- Detecção por arranjo de diodos (DAD): comparado a detectores UV tradicionais, o DAD é construído com sistema ótico invertido, pois toda a luz proveniente da fonte luminosa incide sobre a cela de detecção (onde estará a amostra) e subseqüentemente é decomposta por um prisma ou policromador, incidindo finalmente em uma rede de fotodiodos, um chip contendo grande número de estruturas eletrônicas sensíveis a luz dispostas lado a lado, cada um captando a luz proveniente de um comprimento de onda distinto. Esta estrutura permite a aquisição do espectro de UV-VIS *on-line* de cada pico eluído da coluna cromatográfica. Utilizando este detector, não é necessário conhecimento prévio sobre as características absorptivas (como o comprimento de onda de máxima absorção) das substâncias presentes na amostra, uma vez que é possível gerar cromatogramas no comprimento de onda mais adequado (onde se tenha menor número de interferentes, por exemplo) após a aquisição dos dados.

- Detecção por fluorescência: é o detector mais sensível disponível comercialmente para HPLC na análise de compostos orgânicos, podendo ser até 1000 vezes mais sensível que o detector por UV; sendo muito útil para análise de substâncias fluorescentes ou que se tornem fluorescentes após reações de derivatização. Neste sistema, um comprimento de onda escolhido incide sobre a cela de detecção, onde estará a substância após ser eluída da coluna. A substância então é excitada e

emite luz em comprimentos de onda maiores que o utilizado para excitação. Esta luz emitida é então captada pelo fotodetector, que está em ângulo reto com a fonte de luz de excitação para evitar aumento no ruído do aparelho. Além de ser o mais sensível, este detector é também um dos mais seletivos pois só são detectadas aquelas substâncias que forem excitadas e que emitirem luz nos comprimentos de onda selecionados.

A cromatografia líquida por ser uma técnica analítica não destrutiva (exceto quanto acoplada a espectrometria de massas), permite que vários sistemas de detecção sejam acoplados em linha, proporcionando um maior número de informações qualitativas sobre a amostra analisada (Kupiec et al, 2003).

O método padrão para determinação de aldicarbe e outros praguicidas carbamatos, preconizado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*Environmental Protection Agency, EPA*), baseia-se na cromatografia líquida com detecção por fluorescência através de derivação pós-coluna (Morrica et al, 2005). As substâncias são separadas na coluna cromatográfica e quando eluídas são hidrolisadas em meio alcalino, e a amina primária resultante da hidrólise reage com orto-ftalaldeído ($o\text{-C}_6\text{H}_4(\text{CHO})_2$ – OPA) resultando em compostos fluorescentes podendo então ser detectados (US EPA, 1989).

2.7.3. Eletroforese capilar

Os anos 80 foram marcados pelo aparecimento da terceira grande técnica instrumental de separação, a eletroforese capilar. O rápido avanço da eletroforese capilar deve-se principalmente à variedade dos modos de separação que podem ser

efetuados em uma única coluna capilar e da diversidade dos compostos que podem ser determinados em cada um destes modos. Também se destaca pelo baixo consumo de reagentes e solventes e rapidez da análise.

Na eletroforese capilar a separação é conduzida em tubos com dimensões de 15 a 100 μm de diâmetro interno, e 50 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito condutor e submetidos à ação de um campo elétrico. O uso do capilar possibilita a dissipação eficiente do calor, gerado pela passagem da corrente elétrica, fenômeno conhecido como *efeito Joule* (Tavares, 1996). Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite a aplicação de campos elétricos elevados, o que promove a diminuição do tempo de análise. Uma fonte de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar. Estas fontes podem operar à tensão constante ou corrente constante, com valores que variam de 0-30 kV e de 0-300 μA respectivamente.

Em eletroforese capilar, as amostras podem ser introduzidas no capilar por métodos hidrodinâmicos ou eletrocinéticos. Na injeção hidrodinâmica, uma alíquota representativa da composição do soluto na amostra é introduzida no capilar. Na prática, é aplicada uma pressão determinada, por um breve período no recipiente da amostra, havendo uma transferência de volume para o interior do capilar. Em seguida, os recipientes do eletrólito são inseridos nas duas extremidades do capilar, uma tensão é então aplicada e a separação iniciada. A injeção eletrocinética é realizada pela aplicação de um determinado potencial no recipiente da amostra por um dado período de tempo. Analitos iônicos são injetados como resultado da combinação entre as velocidades eletroforética e eletrosmótica, enquanto analitos neutros são injetados somente devido ao fluxo eletrosmótico. Um problema inerente

à injeção eletrocinética, é que a quantidade injetada de um determinado soluto, depende da condutividade da amostra. Desse modo, quando soluções de padrão apresentam diferenças de condutividade em relação à amostra, ou as amostras diferem entre si, a quantidade de analito injetada será diferente. Geralmente, quando curvas de calibração são construídas para analitos em baixas concentrações, a concentração do mesmo influenciará na condutividade, com isso, não é possível atingir uma boa correlação entre a área do pico do soluto e a concentração do mesmo. Uma maneira de se contornar o problema é adicionar tanto à amostra quanto ao padrão, uma elevada concentração de um eletrólito condutor, de modo a minimizar diferenças de condutividade entre a amostra e o padrão. O eletrólito adicionado preferencialmente não deve ser detectado.

Outras vantagens da eletroforese capilar são: pequenas quantidades de amostra, completa automação da análise e compatibilidade com vários sistemas de detecção disponíveis para cromatografia líquida. Tais detectores podem ser: de absorção no UV-vis, fluorescência, fluorescência induzida por laser, espectrometria de massas, condutividade, amperometria, radioatividade, índice de refração, dicroísmo circular e Raman (Tavares, 1996). Cabe ao analista escolher o tipo de detector a ser utilizado de acordo com as propriedades do soluto em análise e da faixa de concentração contemplada. O acoplamento da eletroforese capilar ao espectrômetro de massas, pode levar a um aumento da sensibilidade e seletividade da técnica de eletroforese e ainda minimizar possíveis interferências da matriz (Molina et al, 2001)

Um aspecto bastante importante da eletroforese capilar é a simplicidade da instrumentação. Na Figura 5 um equipamento de eletroforese capilar é representado esquematicamente, o qual consiste de uma fonte de alta tensão, capilares

(normalmente de sílica fundida), eletrodos (geralmente de platina), um detector apropriado e um computador para o tratamento dos dados.

Vários modos de separação, com mecanismos singulares e seletividade característica são possíveis em eletroforese capilar, os principais são: eletroforese capilar em zona ou em solução livre (*free solution capillary electrophoresis*, FSCE ou *capillary zone electrophoresis*, CZE), cromatografia eletrocinética micelar (*electrokinetic chromatography*, MEKC), eletroforese capilar em gel (*capillary electrochromatography*, CEC), isotacoforese (*capillary isotachopheresis*, CITP) e focalização isoeétrica (*capillary isoelectric focusing*, CIEF) (Tavares, 1996; Silva et al., 2007).

Figura 5 - Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar.

A análise de compostos neutros (como os carbamatos) por eletroforese capilar deve ser realizada em meio micelar (cromatografia eletrocinética micelar,

MEKC), onde a separação dos analitos se dá por diferença de interação com as micelas, que são arrastadas pelo fluxo eletrosmótico (Tavares, 1996).

As principais variáveis a serem alteradas em MEKC normalmente são a adição de diferentes tipos de solventes, e em diferentes faixas de concentração, a variação do pH do eletrólito, a concentração de eletrólito, a adição de diferentes tipos de tensoativos entre outras (Tavares, 1997).

A CE apresenta-se como técnica analítica complementar à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e à cromatografia gasosa (GC). A Tabela 2 apresenta uma comparação racional entre estas três técnicas de separação. Deve-se ressaltar que a CE pode oferecer vantagens significativas sobre as técnicas cromatográficas: requer pequeno volume de amostra (apenas alguns μL), pode utilizar detecção por absorção da luz ultravioleta em comprimentos menores do que 200 nm, sem que haja aumento de ruído ou *drift* de linha de base (problema comum em HPLC), além de permitir a determinação de uma vasta gama de compostos desde íons até macromoléculas utilizando a mesma coluna capilar. Os instrumentos de CE e HPLC convencionais (utilizando detectores ópticos) possuem custo equivalente, mas o custo operacional é significativamente menor na CE, principalmente pelo baixo consumo de solventes e com o baixo custo das colunas capilares (Perrett, 2003; Picó et al, 2003; Anastos et al, 2005).

Tabela 4 - Estudo comparativo de diferentes técnicas analíticas para determinação de resíduos de praguicidas.

Técnica	Vantagens	Desvantagens	Soluções
GC	<ul style="list-style-type: none"> - Alta capacidade de separação; - Alta sensibilidade e seletividade. 	<ul style="list-style-type: none"> - Inadequada para análise de compostos polares, termolábeis e de baixa volatilidade; - Consumo de gases de alta pureza. 	<ul style="list-style-type: none"> - Uso de reações de derivatização.
HPLC	<ul style="list-style-type: none"> - Permite a análise de compostos orgânicos, mesmo os termoinstáveis; - Maior flexibilidade para otimização das separações, por permitir a variação tanto da fase móvel quanto da fase estacionária; - Facilidade de automação e acoplamento a sistemas de preparo de amostras "online". 	<ul style="list-style-type: none"> - Menor capacidade de separação e seletividade; - Grande consumo de solventes orgânicos; - Elevado custo operacional (exige o uso de colunas e solventes de alto custo). 	<ul style="list-style-type: none"> - Desenvolvimento de colunas analíticas mais eficientes e de menor tamanho, permitindo melhores separações e menor consumo de solventes.
CE	<ul style="list-style-type: none"> - Alta capacidade de separação; - Baixo consumo de solventes; - Menor necessidade de preparo de amostras. 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa sensibilidade. 	<ul style="list-style-type: none"> - Preparo de amostras com etapa de pré-concentração; - Uso de procedimentos eletroforéticos de pré-concentração "online"; - Utilização de detectores altamente seletivos (como os detectores de fluorescência induzida a laser).

Legenda: CG= cromatografia gasosa; HPLC= cromatografia líquida; CE= eletroforese capilar

(Fonte: adaptado de Pico et al, 2003)

2.7.4. Espectrometria de massas

A massa atômica ou molecular é uma das informações mais características de um átomo ou molécula. Estas massas são infinitamente pequenas, impossíveis de serem medidas mesmo com as micro-balanças mais sofisticadas. Contudo, estas massas podem ser determinadas indiretamente, utilizando-se a espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*).

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica poderosa muito utilizada na identificação de compostos desconhecidos, quantificação de materiais conhecidos e elucidação de propriedades químicas e estruturais de moléculas. Basicamente um espectrômetro de massas é dividido em uma fonte de íons, um analisador da relação carga/massa deste íon e um detector (Cole, 1997). Um espectro de massas é um gráfico onde no eixo das abscissas é mostrada a relação massa-carga (m/z) dos íons formados e no eixo das ordenadas é mostrada a abundância (intensidade) de cada fragmento.

A espectrometria de massas apresenta a mesma desvantagem das demais técnicas espectroscópicas citadas anteriormente, não pode ser aplicada diretamente na análise de misturas de substâncias, pois o espectro obtido será a soma dos espectros das diversas substâncias presentes na amostra. Este problema pode ser resolvido utilizando-se a MS acoplada a técnicas de separação. (Kirkbride, 2000; Watson, 2003).

A MS é baseada na geração de moléculas dotadas de carga ou fragmentos moleculares em um sistema submetido a alto vácuo. Inicialmente as moléculas analisadas são levadas a um estado excitado ionizado. O modo clássico como isso pode ser feito é através do bombardeamento da molécula por um feixe de elétrons

(ionização por impacto de elétrons). Como o feixe de elétrons possui energia potencial (geralmente 70 eV) muito maior que as energias de ligação existentes entre os átomos que compõem a molécula, esta se rompe, originando fragmentos característicos. O processo de fragmentação não é randômico, ocorrem principalmente onde as ligações químicas forem mais fracas, ou em locais onde os fragmentos formados sejam mais estáveis (Cody e Foltz, 1995).

O perfil de fragmentação de uma molécula, ou seja, seu espectro de massas é reprodutível se a energia utilizada na ionização for constante. Isso possibilitou o desenvolvimento de bibliotecas de espectros de massas, que representam uma das ferramentas de investigação mais importantes. Espectros de massas obtidos durante a análise de amostras de conteúdo desconhecido podem ser confrontados contra centenas de milhares de espectros de massas referência de modo automático (via software), permitindo identificação rápida e precisa dos componentes da amostra (Cody e Foltz, 1995).

Com o objetivo de se adquirir resultados sensíveis e seletivos a espectrometria de massas pode ser utilizada em combinação com técnicas cromatográficas (GC e HPLC) e eletroforese capilar (CE). Os maiores avanços tecnológicos obtidos atualmente em espectrometria de massas estão relacionados ao desenvolvimento de novas técnicas de ionização e no acoplamento desta técnica às técnicas cromatográficas, em especial à cromatografia líquida e à eletroforese capilar. O acoplamento entre a cromatografia gasosa e a MS é relativamente simples, pois as moléculas a serem analisadas já deixam o cromatógrafo em fase gasosa, não sendo necessário “separá-las” da fase móvel (Cole, 1997).

No caso de técnicas que operam em meio líquido como a cromatografia líquida e a eletroforese capilar, é necessária a utilização de uma fonte de ionização que possa transmitir moléculas da fase líquida para a fase gasosa e ao mesmo tempo transferir carga a estas moléculas. A técnica de ionização por electrospray (ESI) é a mais utilizada (Watson, 2003). Basicamente três características fazem com que o electrospray seja considerado uma técnica distinta das outras técnicas de ionização (Grossman e Colburn, 1992a):

- i) capacidade para produzir íons multiplamente carregados, com número de cargas elevado, reduzindo assim, a razão massa/carga (m/z), de tal modo que seja possível analisar compostos de elevada massa molecular;
- ii) as amostras a serem analisadas devem ser introduzidas em solução, o que permite o acoplamento com diversas técnicas de separação;
- iii) o fato de ser o *electrospray* uma técnica de ionização suave que permite que as interações não covalentes entre moléculas que existem em solução sejam preservadas na fase gasosa.

A produção de íons em *electrospray* requer essencialmente dois passos, dispersão de gotas altamente carregadas quase à pressão atmosférica seguida de condições que permitam a evaporação da gota. A ionização por *electrospray* não é um método de ionização propriamente dita, mas um método de transferência de um íon da fase líquida para a fase gasosa, e a ionização de moléculas neutras em fase líquida é um processo secundário.

A técnica de ionização por *electrospray* é assim chamada devido à formação de um spray eletrostático, este processo ocorre devido à passagem de uma solução

contendo íons por um capilar onde uma alta tensão é aplicada (1000 a 5000 V); com isso a solução é nebulizada eletrostaticamente com formação de pequenas gotas altamente carregadas. A nebulização da solução é em alguns casos facilitada pela ajuda de um gás nebulizador (normalmente nitrogênio). Posteriormente as moléculas são direcionadas a uma região de alto vácuo onde ocorre a separação dos íons e conseqüentemente a sua detecção em um analisador de massas.

2.7.5. Preparo de amostras - extração em fase sólida

As análises de substâncias presentes em diferentes matrizes são realizadas pela utilização de técnicas cromatográficas que requerem etapas de pré-tratamento da amostra, cujo objetivo é separar os analitos de interesse de demais compostos presentes na amostra e que possam ser incompatíveis com a coluna cromatográfica, ou interferentes diretos da análise. Outro objetivo claro do preparo de amostras é servir como etapa de pré-concentração das substâncias que possam estar presentes em concentrações tão baixas quanto nanogramas ou picogramas (Queiroz et al, 2001; Aquino-Neto e Nunes, 2003).

A introdução da extração em fase sólida (EFS) foi uma grande inovação dentre os processos a extração e/ou pré-concentração. O uso de colunas de extração como processo alternativo à tradicional extração líquido-líquido aparece com grande freqüência em publicações científicas destinadas às análises de praguicidas (Herrera et al, 2002; Román et al, 2004; Neto e Siqueira, 2005; Alwis et al, 2006; Menezes-Filho et al, 2006; Sundberg et al, 2006).

As vantagens da EFS residem na grande seletividade que pode ser obtida

através da escolha da fase extratora adequada, o menor consumo de solventes orgânicos (quando comparado à extração líquido-líquido), não formação de emulsões (que diminuem o rendimento da extração líquido-líquido) e a possibilidade de automação principalmente através do acoplamento à cromatografia líquida de alta eficiência (Aquino-Neto e Nunes, 2003; Lanças, 2004).

O procedimento de extração por EFS pode ser resumido em quatro etapas:

1 – Condicionamento ou ativação da fase extratora, pela passagem de solvente orgânico polar (frequentemente utiliza-se metanol), seguido por água ou solução tampão. Esta etapa é necessária para permitir que os sítios extratores responsáveis pela ligação com os analitos estejam disponíveis.

2 – Aplicação da amostra, que deve passar através da fase sólida numa velocidade adequada que permita o contato entre os analitos e a fase extratora. A amostra pode ainda ser tamponada em um pH que favoreça a interação entre os analitos e a fase extratora. A adição de padrão interno à amostra deve ser feita antes desta ser aplicada na coluna.

3 – Lavagem da coluna com solventes para remoção de interferentes. Uma vez aplicada a amostra, ficarão retidos na fase extratora não apenas os analitos desejados, mas também alguns interferentes, que serão eliminados nesta etapa do processo, onde normalmente utiliza-se água ou soluções tampão, por vezes com adição de pequena porcentagem de solvente orgânico polar (como metanol ou acetonitrila) para lavar a coluna extratora. É fundamental que a solução utilizada na lavagem da coluna tenha força suficiente apenas para eluir os interferentes, mantendo os analitos retidos na fase sólida. Após a lavagem, a fase extratora deve

ser seca pela passagem de ar através da fase extratora (de 2 a 5 minutos de vácuo), para que todo resíduo água ou tampão seja retirado.

4 – Eluição e coleta dos analitos, etapa que geralmente utiliza pequeno volume de solventes orgânicos para arrastar as substâncias até então retidas na fase extratora. O solvente utilizado na eluição depende das características da fase extratora e do analito que está sendo extraído. Os solventes orgânicos utilizados na eluição são então evaporados e o resíduo desta evaporação é reconstituído com pequeno volume de solvente adequado para o método de análise empregado.

O tipo de fase sólida que será utilizada na extração depende de características do analito a ser extraído, sendo as mais comuns:

Fase normal: empregada quando se deseja extrair compostos polares presentes em matrizes orgânicas. Este tipo de fase pode ser de sílica gel ou sílica quimicamente ligada a radicais que contenham grupamentos funcionais ciano, diol ou amino. O principal mecanismo de interação neste tipo de EFS é a formação de ligações de hidrogênio entre o analito e a fase extratora. A eluição dos analitos é feita utilizando-se soluções tampão de alta força iônica.

Fase reversa: é baseada na interação entre analitos orgânicos presentes em meio aquoso e uma fase extratora apolar, como por exemplo sílica quimicamente ligada a radicais octadecil (C-18). A interação entre o analito não ionizado (apolares) e a fase sólida é baseada em ligações de Van der Waals, sendo utilizados solventes orgânicos apolares para eluição dos analitos.

Troca iônica: é baseada na interação dipolar entre íons de cargas opostas presentes na amostra e na fase sólida. Utiliza como fase extratora sílica quimicamente ligada a

radicais que contenham grupamentos funcionais sulfonil, carboxílico ou trimetilamino. A eluição dos analitos normalmente é feita pela mudança do pH (passagem de soluções tampão, que podem ser preparados em água ou metanol).

Fase extratora mista: a fase sólida neste caso apresenta dois ou mais tipos de materiais, combinando fase extratora apolar (como sílica quimicamente ligada a radicais octadecil) com uma fase de troca iônica (como sílica quimicamente ligada a radicais sulfonil). Este aumento no tipo de interações que podem ocorrer entre os analitos e a fase estacionária permite que substâncias de características químicas diferentes sejam extraídas utilizando-se apenas uma coluna extratora. Por esta versatilidade, este tipo de fase extratora tem sido muito utilizada, a eluição neste tipo de EFS ocorrerá por mudanças do pH e uso de solventes orgânicos.

Na literatura internacional existem muitos trabalhos sobre a determinação de aldicarbe em matrizes ambientais. A tabela 3 apresenta trabalhos de detecção de aldicarbe em água por diversas técnicas analíticas publicados a partir de 2000.

Tabela 5 – Principais técnicas analíticas para detecção de aldicarbe em água com base em revisão da literatura entre 2000 e 2008

Técnica Analítica	Análitos	Matriz	Extração	Limite de Detecção	Referência
LC-MS	aldicarbe	água potável, água subterrânea e de rio	EFS	0,6 ng.L ⁻¹	Corcia et al, 2000
CE-LIF	aldicarbe	água ultrapura	-	0,5 µg.L ⁻¹ mg. L ⁻¹	Wu, Lee e Li, 2000
GC-MS	aldicarbe	água superficial	EFS	de 9 a 50 µg.L ⁻¹	El-Kabbany et al, 2000
HPLC-DAD HPLC-FD	aldicarbe e aldicarbe sulfóxido	água subterrânea e água superficial	EFS online	na ordem de mg.L ⁻¹ na ordem de µg.L ⁻¹	Llasera e Gonzalez, 2000
CE-MS	aldicarbe	-	-	0,5 mg. L ⁻¹	Molina et al, 2001
CE-UV	aldicarbe	-	EFS	-	Fung e Mak, 2001
HPLC-UV LC-MS	aldicarbe	água superficial	EFS	-	Curini ET al, 2001

Continuação da Tabela 5

LC-MS	aldicarbe, sulfóxido e sulfona	água de lago, água de poço, água de cisterna e água de torneira	EFS online	160; 60 e 90 ng.L ⁻¹	Wang, 2001
GC-MS	aldicarbe, sulfóxido e sulfona	-	-	< 100 µg.L ⁻¹	Song e McNair, 2002
LC-MS	aldicarbe, sulfóxido e sulfona	água potável e água de esgoto	-	2,8; 3,7 e 0,7 µg.L ⁻¹	Yu et al, 2003
LC-MS	aldicarbe	água de torneira	EFS	3 µg.L ⁻¹	Makihata et al, 2003
LC-MS	aldicarbe	água potável	EFS	0,1 µg. L ⁻¹	Nogueira et al, 2003
HPLC-UV	aldicarbe, sulfóxido e sulfona	água potável	EFS	3,0 – 15,0 ng.L ⁻¹	Morrica et al, 2005
CE-DAD	aldicarbe, sulfóxido e sulfona	água subterrânea	EFS	7 µg.L ⁻¹	Arráez-Román et al, 2004
GC-MS	aldicarbe	água ultrapura	MEFS	15 µg.L ⁻¹	Martínez et al, 2005

Continuação da Tabela 5

CE-MS	aldicarbe e sulfona	água potável	EFS	0,2 mg.L ⁻¹	Biesen e Bottaro, 2006
HPLC	aldicarbe, sulfoxido sulfona	água de rio	ELL	-	Fytianos et al, 2006
HPLC-DAD	aldicarbe	água subterrânea	EFS	0,04 µg.L ⁻¹	D'archivio et al, 2007
LC-TOF-MS	aldicarbe, sulfoxido e sulfona	água potável	EFS	5 µg.L ⁻¹	Ferrer e Thurman, 2007

ELL= extração líquido líquido;
EFS= extração em fase sólida;
MEFS= micro extração em fase sólida;
GC-MS= cromatografia gasosa, acoplada a espectrometria de massas;
HPLC= cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-UV= cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra violeta;
HPLC-DAD= cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos;
HPLC-FD= cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência;
CE-UV= eletroforese capilar com detector ultra violeta;
CE-LIF= eletroforese capilar com detector de fluorescência;
CE-DAD= eletroforese capilar com detector de arranjo de diodos;
CE-MS= eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas por ionização por electrospray;
LC-MS= cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas;
LC-TOF-MS= cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com analisador de massas por tempo de voo.

3. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivos:

- ✓ desenvolvimento de métodos analíticos para separação e quantificação de aldicarbe, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos;
- ✓ avaliação da toxicidade aguda do aldicarbe, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona através do teste com a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Equipamentos

- sistema de eletroforese capilar Hewlett Packard® modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies, composto por sistema de refrigeração do capilar por ar forçado, detector de arranjo de diodos (DAD), controlado através do software HP ChemStation, ver 08.03;
- cromatógrafo líquido de alta eficiência Thermo-Finnigan®, modelo Surveyor Plus, composto por bomba quaternária, sistema de injeção automática, forno de coluna e detector de arranjo de diodos, controlado através do software XcaliburTM;
- espectrômetro de massas Thermo-Finnigan®, modelo LCQ Deca XP MAX, com fonte de ionização por *electrospray* e analisador de massas do tipo *ion trap*.
- sistema de purificação de água Milli-Q Plus, Millipore®;
- banho de ultra-som;
- luminômetro;
- pHmetro digital;
- balança analítica;
- agitador mecânico tipo "vortex";

- estufa de secagem;
- bomba a vácuo

4.1.2. Reagentes e materiais

- capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies), revestidos externamente com poliimida, com 75 μm de diâmetro interno, 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector;
- coluna analítica para cromatografia líquida de alta eficiência Zorbax[®] – Eclipse XDB C18 (150mm x 4,6mm – 5 μm)
- coluna analítica para cromatografia líquida de alta eficiência Phenomenex[®] Sinergi Max RP 80 (30mm x 2 mm – 4 μm)
- cartucho para extração em fase sólida C18 Lichrolut[®] (500 mg/6 mL) Merck;
- sistema para extração em fase sólida
- filtros Millex em polietileno com poro de 0,45 μm , 33 mm de diâmetro, Millipore[®];
- seringa de 5mL;
- pipetas automáticas, com diferentes capacidades volumétricas;
- vial de polipropileno, com tampa de borracha (1,0 mL), para injetor automático do sistema de eletroforese capilar;

- vial de vidro, com tampa de rosca e septo (2,0 mL), para injetor automático do sistema cromatográfico;
- balões volumétricos de 5, 10, 25, 50, 100 e 500 mL;
- tubo cônico de plástico com capacidade para 15 e 50 mL com tampa de rosca;
- suporte universal, garra e argola;
- metanol J.T. Baker[®], grau HPLC;
- dodecil sulfato de sódio, Merck[®], grau HPLC;
- tetraborato de sódio, Merck[®], grau HPLC;
- hidróxido de sódio, Merck[®], grau HPLC;
- ampola de bactéria *Vibrio fischeri* liofilizada linhagem NRRL B-11177, BIOLUX[®]Lyo

4.1.3. Soluções-Padrão

Os padrões de aldicarbe, aldicarbe sulfona e aldicarbe sulfóxido foram gentilmente cedidos pela Bayer S/A. O padrão de metomil, utilizado como padrão interno, foi obtido da Sigma-Aldrich (Milwaukee, EUA). Soluções estoque foram preparadas em balão volumétrico por pesagem dos sais e diluição em metanol, obtendo-se concentração de 1000 mg.L⁻¹.

Para análise por cromatografia líquida, foram preparadas soluções de trabalho de aldicarbe, sulfóxido e sulfona, a partir de diluições das soluções-estoque, obtendo-se concentrações finais de 5; 10; 25; 50; 100; e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (para realização dos adicionados).

Para análise por eletroforese capilar, foram preparadas soluções de trabalho de aldicarbe, sulfóxido e sulfona, a partir de diluições das soluções-estoque, obtendo-se concentrações finais de 50; 75; 100; 125; 150 e 200 mg.L^{-1} (para realização dos adicionados).

Todas as soluções preparadas (estoque e trabalho) foram armazenadas em frasco de vidro com tampa e lacre de alumínio e mantidas em freezer (-20°C).

4.1.4. Amostras de Referência Negativa

As amostras de água de torneira utilizadas foram coletadas no próprio laboratório em béquer de vidro no momento da análise. As amostras de água de rio e represa utilizadas foram coletadas de acordo com os procedimentos padrões da CETESB armazenadas em frascos de vidro com tampa, identificados com data e local da coleta e mantidas sob refrigeração até o momento da análise. Para melhor organização do texto, os diferentes tipos de amostras foram identificadas por letras como indica a Tabela 3.

Tabela 6. Diferentes tipos de amostras de água utilizadas no desenvolvimento do trabalho e seus respectivos pHs.

Procedência	pH
Água de Torneira	6.0
Água de Rio	6.5
Água de Represa	6.7
Água Ultrapura	6.0

4.2 Métodos

4.2.1. Determinação de aldicarbe e aldicarbe sulfona por HPLC-DAD

Extração

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

As amostras de água, fortificadas e branco, foram submetidas ao processo de extração em fase sólida descrito abaixo:

- ✓ Condicionamento da coluna extratora C18 Lichrolut® com 1 mL de metanol e em seguida 1 mL de água ultrapura
- ✓ Passagem de 10 mL da amostra através da coluna extratora, com fluxo de 1 mL min⁻¹
- ✓ Lavagem com 5 mL de água ultrapura
- ✓ Secagem da coluna por 5 minutos, sob vácuo
- ✓ Eluição com 1 mL de metanol, com fluxo de 1 mL min⁻¹
- ✓ Evaporação do solvente sob fluxo de nitrogênio
- ✓ Ressuspensão do extrato com 1 mL da mistura água/metanol na proporção 85% e 15%, respectivamente.
- ✓ Ultrasom por 5 minutos

Condição cromatográfica

Coluna cromatográfica: Zorbax[®] – Eclipse XDB C18 (150mm x 4,6mm – 5µm)

Fase móvel: Água ultrapura : Metanol

Gradiente:

Tempo (min)	% Água	% Metanol
0	85	15
6	15	85
8	85	15
10	85	15

Vazão da fase móvel: 1 mL min⁻¹

Volume de injeção: 20 µL

Temperatura do forno: 30°C

Deteção DAD: 204nm e 252nm

4.2.2. Determinação de aldicarbe por CE-DAD

Soluções padrão de aldicarbe foram utilizadas nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 mg.L⁻¹, adicionadas em água. O padrão interno utilizado foi tiofanato metílico na concentração 50 mg.L⁻¹.

Condição eletroforética

Capilar de sílica fundida com 75 µm de diâmetro interno, 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector. O capilar era condicionado diariamente antes do início dos trabalhos com passagem de hidróxido de sódio 1 mol.L⁻¹, água ultrapura e eletrólito de corrida (5 minutos cada).

Eletrólito: solução aquosa de tetraborato de sódio 10 mmol L⁻¹ e dodecil sulfato de sódio 50 mmol L⁻¹.

Voltagem: 25 kV

Injeção: hidrodinâmica 50 mbar por 5 segundos

Temperatura do capilar: 20°C

Deteção DAD: 252 nm

4.2.3. Determinação de aldicarbe e aldicarbe sulfona por LC-MS

Condição cromatográfica

Coluna cromatográfica: Phenomenex Sinergi Max RP 80 (30 x 2 mm – 4 μ m)

Fase móvel: Formiato de amônio em água ultrapura 10 mmol L⁻¹ : Formiato de amônio em metanol 10 mmol L⁻¹

Gradiente:

Tempo (min)	% Água contendo formiato de amônio	% Metanol contendo formiato de amônio
0	95	5
3	5	95
6	5	95
6,5	95	5
12	95	5

Vazão da fase móvel: 350 μ L min⁻¹

Volume de injeção: 20 μ L

Temperatura do forno: 40°C

Condições do espectrômetro de massas:

Tensão do spray: 4,5 kV

Temperatura do capilar de transferência: 350°C

Fluxo de gás nebulizador (N₂): 35 unidades arbitrárias

Modo de análise: *full scan* de 150 a 300 amu.

4.2.4. Teste de toxicidade com bactéria luminescente *Vibrio fischeri*

O teste de toxicidade aguda foi realizado com a bactéria *Vibrio fischeri* disponível comercialmente. A ampola contendo a biomassa liofilizada foi retirada do freezer (onde é conservada até o momento do teste) e deixada em temperatura ambiente por 15 minutos, onde em seguida adicionou-se 1 mL da solução tampão de reativação e a ampola foi homogeneizada. A concentração de bactérias por ampola é de 10⁸ e a solução reconstituída é estável por 4h em geladeira. Soluções de aldicarbe, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona foram preparadas em água ultrapura e de represa (para verificar efeito matriz). A concentração inicial de aldicarbe foi de 200 mg.L⁻¹ e de aldicarbe sulfóxido e sulfona 100 mg.L⁻¹. Foram realizadas 5 diluições a partir da concentração inicial. Um controle negativo (água, solução salina e solução teste) e um “branco” foram adicionados em todas as análises. A leitura foi realizada em luminômetro a 492nm em tempo 0 e após 15 minutos de exposição da bactéria aos analitos testados, verificou-se a inibição causada e o cálculo de CE50 é feito através da curva dose-resposta.

4.3. Validação analítica

A validação do método foi realizada estabelecendo-se os valores de recuperação, linearidade, seletividade, precisão intraensaio, exatidão, limite de detecção e de quantificação (Peters e Maurer, 2002; Ribani et al, 2004). Todos os cálculos foram realizados através do programa Microsoft Excel® 2003 para sistema operacional Windows® XP-Professional.

Seletividade

Este parâmetro foi avaliado através das análises de amostras de água referência negativa (água de torneira e amostra de água coletada na região do Alto Cotia). Considerou-se como critério de seletividade a ausência de picos interferentes no tempo de retenção dos analitos investigados e do padrão interno.

Recuperação

A eficiência do procedimento de extração foi avaliada através da recuperação. Para o estudo da recuperação do método, amostras de água referência negativa foram enriquecidas com o padrão interno e com os analitos de interesse na concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ e submetidas ao método de extração descrito no item 4.2.1. Outro grupo de amostras de água referência negativa foram enriquecidas apenas com o padrão interno, submetidos ao processo de extração, e os analitos de interesse foram adicionados apenas no instante da ressuspensão dos extratos. A recuperação absoluta foi avaliada pela área relativa média obtida no primeiro grupo

(resposta do analito adicionado à matriz antes da extração) em relação à área relativa média obtida no segundo (resposta do analito adicionado à matriz após a extração), expressos em porcentagem.

Curva analítica (Linearidade)

A curva analítica para o método proposto foi realizada através de fortificação de água de torneira (referência negativa) coletada no dia da análise. As amostras foram fortificadas a partir de soluções padrão de aldicarbe e aldicarbe sulfona a fim de se obter as concentrações de 5; 10; 25; 50; 100 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para cromatografia líquida e 10; 25; 50; 75 e 100 mg.L^{-1} para eletroforese capilar ($n=3$ para cada concentração investigada). As amostras fortificadas foram submetidas aos procedimentos de extração e às condições cromatográficas e eletroforéticas especificadas acima.

A curva analítica foi obtida pela projeção das concentrações do analito no eixo das abscissas e das relações entre a área do analito e do padrão interno (metomil) no eixo das ordenadas, utilizando-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para a obtenção da equação da reta.

A linearidade, definida como a capacidade do método em gerar resultados proporcionais da espécie em estudo, foi avaliada através do coeficiente de determinação (r^2) da curva (Ribani, et al, 2004).

Precisão intra-ensaio

Os estudos de precisão intra-ensaio foram conduzidos indiretamente pelo cálculo de imprecisão através da determinação do coeficiente de variação (CV) das áreas relativas (razão entre área absoluta do analito e a área absoluta do padrão interno). Este parâmetro avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra (Peters e Maurer, 2002; Ribani et al, 2004). A precisão intraensaio (repetibilidade) foi determinada através da análise, em um mesmo dia, de seis replicatas de amostras de água adicionadas nas concentrações 10, 50 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (Ribani et al, 2004).

Neste estudo, a exatidão foi determinada através do cálculo das concentrações médias (seis replicatas) obtidos de amostras de água referência negativa fortificadas em três níveis de concentração (10, 50 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e submetidas ao procedimento analítico proposto. Os valores de área relativa foram convertidos em valores de concentração de analito, através das respectivas equações de regressão linear obtidas das curvas analíticas. Considerou-se exatidão como a porcentagem do erro sistemático, expresso pela tendenciosidade (diferença entre o valor real e o valor obtido) (Ribani et al, 2004).

Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Para determinação do LOD e LOQ, foi empregado o método empírico, que consiste em analisar amostras de água referência negativa adicionadas de quantidades decrescentes dos analitos em questão, sendo observada a relação sinal/ruído produzida nas análises cromatográficas e/ou eletroforéticas. Considerou-se como limite de detecção a concentração que forneceu relação sinal/ruído = 3 e limite de quantificação a concentração que forneceu relação sinal/ruído = 10 (Peters e Maurer, 2002; Ribani et al, 2004).

4.4. Teste de toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda com a bactéria *Vibrio fischeri* foi realizado em água deionizada coletada no momento do teste, adicionada de soluções padrão de aldicarbe, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona também preparadas em água. As amostras foram testadas em diferentes concentrações e os resultados foram expressos em CE50 - concentração efetiva da amostra que causa 50% de inibição da produção de luz emitida pela bactéria, medida em luminômetro. Este teste também foi realizado utilizando água de rio, coletada em frascos adequados, mantida sob refrigeração até o momento do teste e adicionada de soluções padrão de aldicarbe, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona. Todos os testes foram realizados com um controle negativo, ou seja, sem adição de aldicarbe. Tanto a água deionizada quanto a água de rio foram submetidas a um ajuste osmótico com solução salina 20 g.L⁻¹, visto que o microorganismo utilizado é proveniente de ambiente marinho.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados cromatografia líquida

As condições instrumentais para o método foram otimizadas de modo a se obter completa resolução cromatográfica dos analitos investigado e do padrão interno. A escolha da melhor coluna cromatográfica foi feita a partir de injeções de soluções padrão de aldicarbe, aldicarbe sulfóxido, aldicarbe sulfona e padrão interno metomil. A figura 6 mostra o cromatograma obtido com as colunas Atlantis® e Zorbax®.

Figura 6 - Cromatograma de amostra de água deionizada adicionada testando a melhor coluna cromatográfica Zorbax® e Atlantis®.

A Figura 7 apresenta cromatograma de amostra referência negativa de água de torneira adicionada com padrão de aldicarbe sulfona, aldicarbe sulfóxido, padrão interno metomil e aldicarbe (nesta ordem de eluição), bem como respectivos espectros de absorção na região do ultravioleta de cada substância, obtidos através do detector DAD.

Figura 7 - Cromatograma de amostra referência negativa de água de torneira adicionada com padrão de aldicarbe sulfona, aldicarbe sulfóxido, padrão interno metomil e aldicarbe, respectivamente, indicados na seta os espectros ultravioleta de cada substância, obtidos através do detector DAD. Condições cromatográficas, vide item 4.2.1.

Figura 8 - Cromatograma de amostra referência negativa de água de torneira adicionada com padrão de aldicarbe sulfóxido, sendo observada degradação do analito em questão (alteração no tempo de retenção e no espectro de absorção ultravioleta – vide Figura 7 para comparações). Condições cromatográficas, vide item 4.2.1.

5.2. Otimização do procedimento de extração

Para a extração em fase sólida foram selecionados três tipos de cartuchos de extração, com propriedades extratoras (retenção na fase estacionária) semelhantes. Os cartuchos foram utilizados para extração de águas referência negativa (água de torneira e água de represa) adicionada com soluções padrão de aldicarbe, aldicarbe sulfona e aldicarbe sulfóxido, sendo comparadas as recuperações obtidas. Os resultados de recuperação são apresentados na tabela a seguir:

Tabela 7 – Resultados obtidos no teste de recuperação (em %) para os analitos investigados, utilizando diferentes cartuchos extratores, avaliados em triplicata.

Cartucho Extrator	Aldicarbe	Aldicarbe Sulfóxido	Aldicarbe Sulfona
Água de torneira			
Abs Elut	94%	85%	80%
Stracta X	96%	93%	97%
C18	93%	96%	97%
Água de represa			
Abs Elut	93%	83%	75%
Stracta X	94%	90%	90%
C18	91%	90%	95%

A seletividade foi avaliada pela análise de amostras de água referência negativa. Considerou-se o método proposto como seletivo, uma vez que não foi detectada presença de picos interferentes no tempo de retenção dos analitos investigados (e do padrão interno). A Figura 9 apresenta cromatograma de amostra de água de represa referência negativa submetida ao procedimento analítico descrito no item 4.2.1. A Figura 10 apresenta cromatograma de extrato de amostra de água de represa referência negativa adicionada de solução padrão de aldicarbe sulfona e aldicarbe ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Figura 9 - Cromatograma de extrato de amostra de água de represa referência negativa submetida ao procedimento analítico descrito no item 4.2.1.

Figura 10 - Cromatograma de extrato de amostra de água de represa referência negativa adicionada de solução padrão de aldicarbe sulfona e aldicarbe ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$) e submetida ao procedimento analítico descrito no item 4.2.1.

Ainda avaliando a seletividade do método, a Figura 11 apresenta cromatograma de amostra de água de rio referência negativa submetida ao procedimento analítico descrito no item 4.2.1. A Figura 12 apresenta cromatograma de extrato de amostra de água de rio referência negativa adicionada de solução padrão de aldicarbe sulfona, aldicarbe e do padrão interno metomil ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Figura 11 - Cromatograma de extrato de amostra de água de rio referência negativa submetida ao procedimento analítico descrito no item 4.2.1.

Figura 12 - Cromatograma de extrato de amostra de água de rio referência negativa adicionada de solução padrão de aldicarbe sulfona, aldicarbe e do padrão interno metomil ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$) e submetida ao procedimento analítico descrito no item 4.2.1.

As Figuras 13 e 14 apresentam as curvas analíticas obtidas durante a validação do método para análise de aldicarbe e aldicarbe sulfona, respectivamente. Já a Tabela 8 apresenta os resultados obtidos nos testes de precisão e exatidão do método.

Figura 13 - Representação da curva analítica de aldicarbe em água nas concentrações de 5 a 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, utilizando o método descrito no item 4.2.1.

Figura 14 - Representação da curva analítica para a determinação de aldicarbe sulfona em água nas concentrações de 5 a 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, utilizando o método descrito no item 4.2.1.

Tabela 8 – Valores de precisão e exatidão do método descrito no item 4.2.1 (n = 6).

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Aldicarbe		Aldicarbe Sulfona	
	Precisão (%CV)	Exatidão (%)	Precisão (%CV)	Exatidão (%)
10	3,4	- 34	3,9	- 19
50	2,5	7,6	0,6	1,2
500	0,8	- 0,4	0,6	- 0,1
%CV = coeficiente de variação				

O limite de detecção obtido para o método proposto foi de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ para aldicarbe e aldicarbe sulfona. O limite de quantificação foi de $2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ para os dois analitos.

5.3. Resultados - eletroforese capilar

A Figura 15 apresenta eletroferograma de amostra de água de torneira referência negativa submetida ao procedimento analítico descrito no item 4.2.2. Já a Figura 16 apresenta eletroferograma de amostra de água de torneira adicionada com padrão de aldicarbe na concentração 100 mg.L^{-1} e padrão interno tiofanato na concentração 50 mg.L^{-1} , submetida ao mesmo procedimento analítico citado para a Figura 15.

Figura 15 - Eletroferograma de amostra de água de torneira referência negativa submetida ao procedimento analítico descrito no item 4.2.2.

Figura 16 - Eletroferograma de amostra de água torneira adicionada com padrão de aldicarbe na concentração 100 mg.L^{-1} e padrão interno tiofanato na concentração 50 mg.L^{-1} .

A Figura 17 apresenta a curva analítica obtida durante a validação do método para análise de aldicarbe por eletroforese capilar. Já a Tabela 9 apresenta os resultados obtidos nos testes de precisão e exatidão do método.

Figura 17 - Representação da curva analítica de aldicarbe em água nas concentrações de 10 a 100 mg.L⁻¹, utilizando o método descrito no item 4.2.2.

Tabela 9 – Valores de precisão e exatidão do método descrito no item 4.2.2.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Aldicarbe	
	Precisão (%CV)	Exatidão (%)
50	5,4	- 12,4
125	1,5	1,3
200	1,0	- 2,4

O limite de detecção obtido para o método proposto foi de 3 mg.L⁻¹ para aldicarbe e o limite de quantificação foi de 10,0 mg.L⁻¹.

5.4. Resultados cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

A Figura 18 apresenta cromatograma de amostra de água de torneira adicionada com padrão de aldicarbe na concentração 1000 ug.L^{-1} , submetida ao procedimento analítico descrito no item 4.2.3. Já a Figura 19 apresenta cromatograma de amostra de água de torneira adicionada com padrão de aldicarbe na concentração 100 ug.L^{-1} .

Figura 18 – Cromatograma obtido a partir da injeção direta de amostra de água de torneira referência negativa adicionada com padrões de aldicarbe e aldicarbe sulfona na concentração 1000 ug.L^{-1} e analisados por LC-MS.

Figura 19 – Cromatograma obtido a partir da injeção direta de amostra de água de torneira referência negativa adicionada com padrões de aldicarbe e aldicarbe sulfona na concentração 100 ug.L⁻¹ e analisados por LC-MS.

As Figuras 20 e 21 apresentam as curvas analíticas obtidas durante a validação do método para análise de aldicarbe e aldicarbe sulfona por LC-MS. Já a Tabela 10 apresenta os resultados obtidos nos testes de precisão e exatidão do método.

Figura 20 - Representação da curva analítica para a determinação de aldicarbe em água nas concentrações de 50 a 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, utilizando o método descrito no item 4.2.3.

Figura 21 - Representação da curva analítica para a determinação de aldicarbe sulfona em água nas concentrações de 50 a 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, utilizando o método descrito no item 4.2.3.

Tabela 10 – Valores de precisão e exatidão do método descrito no item 4.2.3 (n = 6).

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Aldicarbe		Aldicarbe Sulfona	
	Precisão (%CV)	Exatidão (%)	Precisão (%CV)	Exatidão (%)
50	4,6	- 12	2,0	- 8,7
500	4,1	8,6	4,1	3,2
1000	2,8	- 4,4	3,2	- 7,1

%CV = coeficiente de variação

O limite de detecção obtido para o método proposto foi de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ para aldicarbe e aldicarbe sulfona. O limite de quantificação foi de $50,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ para os dois analitos.

5.5. Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

Foram realizados dois ensaios utilizando soluções padrão preparadas em água ultrapura e água de rio. O primeiro se deu no tempo 0 (T0), e após 6 dias (T6) à temperatura ambiente (cerca de 25°C em frascos de vidro com tampa) as soluções foram novamente testadas e os valores de CE50 permaneceram muito próximo dos iniciais, os resultados estão apresentados na tabela 10. A estabilidade dos compostos foi monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência através do método descrito no item 4.2.1. e não demonstrou transformação do aldicarbe em aldicarbe sulfóxido e sulfona.

Tabela 11 – Resultados de CE50 obtidos no teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* após 15 minutos de exposição, nos tempos 0 e após 6 dias à temperatura ambiente.

Amostra	Analitos		
	Aldicarbe	Sulfóxido	Sulfona
Água ultrapura – T0	54,7 mg.L ⁻¹	7,6 mg.L ⁻¹	44,3 mg.L ⁻¹
Água ultrapura – T6	56,0 mg.L ⁻¹	8,2 mg.L ⁻¹	48,0 mg.L ⁻¹
Água de rio – T0	55,0 mg.L ⁻¹	8,0 mg.L ⁻¹	46,0 mg.L ⁻¹
Água de rio – T6	56,0 mg.L ⁻¹	7,8 mg.L ⁻¹	47,0 mg.L ⁻¹

Observa-se que o aldicarbe sulfóxido é cerca de 7 vezes mais tóxico para o *V. fischeri* que o próprio aldicarbe, e 6 vezes mais tóxico que o aldicarbe sulfona.

O segundo ensaio foi realizado variando o pH das soluções a serem testadas, como descrito na literatura o aldicarbe é estável em meio neutro e levemente ácido, mas pouco estável em meio alcalino. Desta forma foram preparadas soluções padrão de aldicarbe em água ultrapura com concentração em torno de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ em pH 5.8 e 8.8, em seguida essas soluções foram submetidas ao teste para verificar a influência do pH na estabilidade do composto. O pH ácido não foi testado porque a bactéria é sensível ao pH baixo, podendo gerar um resultado falso positivo. Os resultados estão apresentados na tabela 11.

Tabela 12 – Resultados de CE50 para aldicarbe obtidos no teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* em diferentes pHs nos tempos 0 e após 6 dias.

pH estudado	CE50
5.8 – T0	$41,4 \text{ mg.L}^{-1}$
5.8 – T6	$45,1 \text{ mg.L}^{-1}$
8.8 – T0	$41,1 \text{ mg.L}^{-1}$
8.8 – T6	$42,6 \text{ mg.L}^{-1}$

6. DISCUSSÃO

A Agência de Proteção Ambiental Americana (US EPA) estabelece como método padrão para determinação de praguicidas carbamatos em água, a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência e derivação pós coluna (US EPA, 2001). Visto que essas substâncias não são naturalmente fluorescentes, é necessário a etapa de derivatização para dar a elas essa característica. A corrida cromatográfica do método referido separa doze compostos, entre princípios ativos e seus produtos de transformação em um tempo total de 30 minutos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos analíticos alternativos ao método padrão da US EPA, para determinação do praguicida aldicarbe e seus produtos de transformação aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona em amostras de água.

A otimização da condição cromatográfica para determinação de aldicarbe e seus produtos de transformação, baseou-se em métodos já descritos na literatura como Nogueira et al (2003). Para esses três compostos obteve-se uma condição de separação com 10 minutos de corrida, sem etapa de derivatização pois o detector utilizado foi arranjo de diodos. Os detectores baseados na absortividade da luz ultravioleta, são menos seletivos que o detector por fluorescência. Desta forma é possível obter níveis de detecção muito baixos com o fluorescência, mas se o composto não for naturalmente fluorescente é necessário a etapa de derivatização, que por vezes pode ser demorada e de alto custo. As amostras de água testadas passaram por uma etapa de extração em fase sólida onde realizou-se a pré concentração dos analitos, tornando assim possível a detecção dos compostos na faixa dos limites máximos permitidos pela OMS, que é de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de aldicarbe (WHO, 2003).

Para a escolha da melhor coluna de extração foram selecionadas colunas disponíveis comercialmente com fase C18, onde uma delas possui recheio de sílica e duas possuem recheio de resina (Lichrolut[®] Merck, AbsElut[®] Varian, e StractaX[®] Waters, respectivamente). A vantagem da resina sobre a sílica está no fato de que durante o processo de extração não haverá problemas se a fase secar, se entre o condicionamento da coluna e introdução da amostra não houver líquido na fase nenhum dano ocorrerá prejudicando o processo de extração. As colunas com recheio de sílica são mais sensíveis a secagem, portanto nas etapas de condicionamento da coluna, introdução da amostra e lavagem não pode faltar líquido, apenas após a lavagem e antes da eluição é que haverá a secagem por vácuo. A vantagem das colunas com recheio de sílica frente as resinas está no baixo custo. Os valores de recuperação obtidos para as colunas testadas foram parecidos, cerca de 90%, entre a resina AbsElut[®] e a sílica Lichrolut[®]. Desta forma optou-se por utilizar a de menor custo, pois este é um fator que pode ser determinante para a implantação do método em uma rotina de análises.

As colunas cromatográficas testadas para obtenção da melhor resolução possuem características similares, ambas C18 com comprimento de 150 mm, e com modificações químicas que permitem a separação de compostos polares e apolares. A coluna Atlantis[®] tem tamanho de partícula igual a 3 µm, enquanto que a coluna Zorbax[®] tem tamanho de partícula igual a 5 µm. Essa diferença poderia gerar na Atlantis[®] cromatogramas com picos mais delgados o que levaria a uma maior resolução. Entretanto isso não foi observado e a separação foi bastante similar em ambas as colunas como demonstrado na figura 6.

No início do trabalho os padrões de aldicarbe, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona foram gentilmente cedidos pela empresa Bayer. Os mesmos padrões também foram adquiridos junto a empresa Sigma-Aldrich. Os testes de seleção de coluna cromatográfica, definição das condições de separação, as primeiras extrações para verificação dos níveis de recuperação e o ensaio de toxicidade com *V fischeri* foram realizados com os três analitos. Entretanto observou-se que o aldicarbe sulfóxido que no início era um sal de coloração branca, adquiriu um aspecto amarelado e formava pequenos grumos. Soluções preparadas com este padrão não apresentavam mais o pico referente ao sulfóxido no cromatograma, e outro pico com tempo de retenção diferente surgiu. Ao comparar o espectro ultravioleta deste pico com o espectro do aldicarbe sulfóxido observou-se que não eram iguais (vide Figuras 7 e 8). Quando essa solução padrão foi injetada no método por LC-MS, observou-se que realmente era outro composto com baixa estabilidade, visto que quando foi injetado pela segunda vez, um novo espectro de massas foi detectado. Quando então se concluiu que o padrão de aldicarbe sulfóxido cedido pela Bayer havia degradado, foi aberta a ampola adquirida da empresa Sigma-Aldrich, que estava armazenada nas condições indicadas pelo fornecedor, em temperatura ambiente e mantido em dessecador. Contudo, o padrão apresentava-se na forma de líquido levemente amarelado, diferente da especificação do fabricante que dizia ser um sólido branco. Desta forma não foi possível realizar a validação dos métodos com o aldicarbe sulfóxido, sendo utilizados apenas o aldicarbe e aldicarbe sulfona na validação dos métodos analíticos.

A técnica de eletroforese capilar foi otimizada buscando uma análise mais rápida, com menor consumo de amostra e menor consumo de solventes quando

comparada a técnica de cromatografia líquida. Pelo fato de os analitos aldicarbe e aldicarbe sulfona serem compostos neutros, o modo de separação utilizado foi o micelar. Micelas aniônicas foram testadas em eletrólito com pH alto e modo de injeção positiva, assim o fluxo eletrosmótico é o responsável pela migração, pois as micelas aniônicas são atraídas para o injetor pela diferença de carga. Nesta condição a migração dos compostos que estão sendo carregados pelas micelas é mais lento pois somente o fluxo eletrosmótico é o responsável pela migração. O tempo de migração obtido para o aldicarbe foi de 5,9 minutos, já o aldicarbe sulfona chega ao detector junto com o fluxo eletrosmótico, o que indica que este composto tem baixa afinidade com a micela. Quanto maior a afinidade do composto pela micela mais tempo ele levará para chegar ao detector (Grossman e Colburn, 1992b). Assim sendo a quantificação dessa substância ficou comprometida uma vez que ela estava no fluxo eletrosmótico, região onde qualquer substância que não possui mobilidade eletroforética sairá podendo ser um interferente.

Outra alternativa seria a utilização de uma micela catiônica em eletrólito com pH baixo para então poder suprimir o fluxo eletrosmótico, e ocorrer a migração em direção ao detector somente pela atração das cargas das micelas. Essa condição foi testada mas a resposta para os analitos em questão não foi satisfatória uma vez que o aldicarbe teve um tempo de migração maior que na condição com as micelas aniônicas e o aldicarbe sulfona também apresentou um tempo de migração bastante alto para o esperado em análises eletroforéticas.

A sensibilidade para o método proposto por eletroforese capilar em meio micelar poderia ser melhorada testando uma condição de pré-concentração das amostras online (*stacking*). Esse fenômeno de pré-concentração é baseado na migração do composto analisado em meios de diferentes composições

(concentração, condutividade) ou por manipulação da migração de micelas dentro do capilar (Perez et al, 2007).

Outra possível alternativa seria o acoplamento com a espectrometria de massas como ferramenta para quantificação dos compostos de interesse. O grande problema da análise em meio micelar utilizando a espectrometria de massas está no momento da ionização por *electrospray*, pois as micelas suprimem a volatilização. Biensen e Bottaro, (2006) propõem um método de análise em meio micelar por espectrometria de massas utilizando como agente surfactante o perfluorotanoato de amônio, um surfactante volátil, obtendo limites de quantificação entre 10 e 80 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Na literatura a técnica analítica que mais aparece como ferramenta para determinação de aldicarbe e seus produtos de transformação é a cromatografia líquida de alta eficiência (de acordo com a Tabela 5). Isso ocorre devido as características físico-químicas dos analitos. A eletroforese capilar é uma opção mais viável para matrizes que contenham uma concentração maior das substâncias, pois seu limite de detecção em modo micelar é bastante reduzido. O método desenvolvido pode ser aplicado por exemplo em situações onde há mortandade de peixes, pois nesses casos há uma alta concentração de aldicarbe e seus produtos de transformação, não sendo possível sua aplicação para quantificação dos analitos em níveis de traços.

No método proposto para determinação do praguicida aldicarbe por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, obteve-se limites de quantificação próximos aos observados no método proposto por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos. As análises foram realizadas no modo *fullscan*, poderia ser testada a análise no modo de fragmentação seriada, pois desta

forma a relação sinal/ruído seria melhorada podendo talvez alcançar limites de detecção mais baixos para o método.

O praguicida aldicarbe possui meia-vida em solo bastante variável com estudos demonstrando valores entre 10 dias a 36 meses, de acordo com a classe de solo, profundidade, umidade, temperatura e pH (Rigitano et al, 2001). Estudos sobre a lixiviação do aldicarbe e seus produtos de transformação sulfóxido e sulfona em solo, revelaram uma alta mobilidade desses compostos, especialmente dos produtos de transformação. Isso pode ser atribuído a baixa lipofilicidade e ao baixo coeficiente de adsorção na matéria orgânica do solo. A quantidade de resíduos lixiviados depende das propriedades físico-químicas do solo, mas sabe-se que em áreas de solos rasos, arenosos, ácidos e localizados em regiões de chuvas intensas, a aplicação do aldicarbe pode resultar na contaminação de lençóis freáticos e águas superficiais que tenham baixos níveis de correnteza (Lourencetti, 2005).

Fenômenos de eutrofização que são o crescimento excessivo das plantas aquáticas a níveis tais que gerem um excessivo grau de nutrientes no corpo d'água, principalmente nitrogênio e fósforo (Sperling, 1996), pode levar entre outras alterações ao aumento do pH do meio. Esse ambiente propicia para o aldicarbe uma condição instável onde rapidamente ele se transforma em aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona. Outros compostos não carbamatos também podem ser formados. Desta forma, considerando que seus produtos de transformação são mais tóxicos para organismos aquáticos que o próprio aldicarbe, poderia surgir uma condição agravante no caso de um ambiente eutrofizado e contaminado com resíduos do praguicida.

O teste de toxicidade aguda com a bactéria *Vibrio fischeri* pode ser utilizado como parâmetro de controle de lançamento de efluentes, para cálculo de avaliação de impacto ambiental em águas, avaliação da eficiência de estações de tratamento, como teste complementar a avaliação das condições ambientais de rios, lagos, águas marinhas, reservatórios, estuários e efluentes industriais. Quando realizado em conjunto com outros testes ecotoxicológicos pode também auxiliar na identificação de contaminantes em corpos d'água (Rodrigues e Pawlowsky, 2007).

Na literatura não há dados sobre a toxicidade dos produtos de transformação do aldicarbe para a bactéria *Vibrio fischeri*. Desta forma este trabalho poderá contribuir fornecendo esses dados. Na tabela 11 estão indicados os resultados do teste de toxicidade aguda realizado. Pode-se observar que o aldicarbe sulfóxido é cerca de 7 vezes mais tóxico que o próprio aldicarbe. Essa informação está coerente com dados de toxicidade do aldicarbe e aldicarbe sulfóxido para outras espécies como peixes e microorganismos aquáticos (Inchem, 1991). No teste com variação de pH, observa-se que em pH alcalino a toxicidade se manteve igual no T0 e no T6, isso pode ser explicado pelo curto período entre o primeiro e segundo teste, 6 dias. Esse período pode não ser suficiente para transformação do aldicarbe em sulfóxido que é mais tóxico para a bactéria, e desta forma apresentaria aumento na toxicidade.

O *V. fischeri* se mostrou sensível ao aldicarbe e seus produtos de transformação, mas sua sensibilidade é muito menor que a de microcrustáceos (ex. misidáceo CL50 $13 \mu\text{g.L}^{-1}$) e peixes (ex. truta arco-íris CL50 $780 \mu\text{g.L}^{-1}$). Apesar da facilidade de execução e rapidez de resposta, o teste não é indicado para ser utilizado como alerta na prevenção de mortandade de peixes eventualmente causada por carbamatos como o aldicarbe.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A melhor condição de extração para aldicarbe, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona, foi obtida com a coluna de extração em fase sólida Lichrolut[®], com uma recuperação média de 90% para todos os analitos;
- ✓ O método de análise com extração em fase sólida e quantificação por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos apresentou sensibilidade satisfatória para análise das 3 substâncias de interesse, com limites de quantificação inferiores ao limite máximo permitido de aldicarbe em água de acordo com a OMS;
- ✓ A técnica de eletroforese capilar não apresentou resultados satisfatórios nas condições testadas para análise em níveis de traços, mas o método desenvolvido pode ser utilizado em situações onde os analitos estejam em concentrações na ordem de mg.L⁻¹;
- ✓ A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas se mostrou eficiente na quantificação dos analitos de interesse, com um limite de quantificação muito próximo ao da cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos;
- ✓ O teste de toxicidade com a bactéria *V. fischeri* forneceu dados da toxicidade dos produtos de transformação sulfóxido e sulfona até então não disponíveis na literatura. A sensibilidade dessa bactéria para o aldicarbe é menor que para outros microrganismos aquáticos, não sendo o *V.fischeri*, um indicador ideal para situações de monitoramento e prevenção de mortandade de peixes e outros organismos aquáticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONZO, H. G. A. ; CORRÊA, C. L. Praguicidas. In: OGA, S., CAMARGO, M. M. A. e BATISTUZZO, J. A. O. (Ed.). **Fundamentos de toxicologia**: Atheneu, v.1, 2008, p.621-642.

ALWIS, G. K. H.; NEEDHAM, L. L. ; BARR, D. B. Measurement of human urinary organophosphate pesticide metabolites by automated solid-phase extraction, post extraction derivatization, and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, v.843, p.34-41. 2006.

ANASTOS, N.; BARNETT, N. W. ; LEWIS, S. W. Capillary electrophoresis for forensic drug analysis: A review. **Talanta**, v.67, p.269–279. 2005.

ANDRAWES, N. R.; DOROUGH, H. W. ; LINDQUIST, D. A. Degradation and elimination of Temik in rats. **J. Econ. Entomol.**, v.60, n.979-987. 1967.

ANVISA. Nota técnica da reavaliação do ingrediente ativo aldicarbe. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/reavaliacao/aldicarbe.pdf>>. Acesso em: 20 junho 2008.

ANVISA. Monografias de Produtos Agrotóxicos - Aldicarbe. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/a07.pdf>>. Acesso em: 20 junho 2008.

AQUINO-NETO, F. R. D. ; NUNES, D. S. S. *Cromatografia - princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência. 2003. 187 p.

ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; CRUCES-BLANCO, C. ; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Determination of aldicarb, carbofuran and some of their main metabolites in groundwater by application of micellar electrokinetic capillary chromatography with diode-array detection and solid-phase extraction. **Pest Management Science**, v.60, n.7, p.675-679. 2004.

ATKINS, E. L.; KELLUM, D.; NEUMAN, K. J.; MACDONALD, R. L. ; FERGUSON, D. T. Effect of Pesticides on Apiculture. **Project No 1499, Annual Report. University of California at Riverside**. 1975.

BARROS, S. B. M. ; DAVINO, S. C. Avaliação de risco. In: OGA, S., CAMARGO, M. M. A. e BATISTUZZO, J. A. O. (Ed.). **Fundamentos de toxicologia**: Atheneu, v.1, 2008, p.71-80.

BAYER. Bayer Crop Science. Temik 150[®] - informações técnicas do produto. Disponível em: <<http://www.bayercropscience.com.br/PRD/busca/prd.asp>>. Acesso em: 20 junho 2008.

BIESEN, V.G.; BOTTARO, C. S. Ammonium perfluorooctanoate as a volatile surfactant for the analysis of *N*-methylcarbamates by MEKC-ESI-MS. **Electrophoresis** v.27,p. 4456–4468, 2006

BULICH, A. A. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environment. In: MARKINGS, L. L. e KIMERIE, R. A. (Ed.). **Aquatic toxicology**. Philadelphia: ASTM, 1979, p.97.

CCREM - Canadian Water Quality Guidelines: Updates (April, 1993). Canadian Council of Resource and Environment Ministers. noncarcino-gens in Mutagen. In: (Ed.). **S. typhimurium and E. coli. Environ.**, v.7, 1993, p.1-248.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp#ensaio1>, 2001. Acesso em: 10 setembro 2008.

CODY, J. T. ; FOLTZ, R. L. GC/MS analysis of body fluids for drugs of abuse. In: YINON, J. (Ed.). **Forensic applications of mass spectrometry**. Boca Raton: CRC Press, 1995, p.1-59.

COLE, R. B. Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation and applications. New York: John Wiley & Sons. 1997. 577 p.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. ; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da Unicamp. 2006

CORCIA, A.D.; NAZZARIA, M.; RAOB, R.; SAMPERIA, R.; SEBASTIANI, E. Simultaneous determination of acidic and non-acidic pesticides in natural waters by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 878 p. 87–98, 2000.

CURINI, R.; GENTILI, A.; MARCHESE, S.; PERRER, D.; ARONE, L.; MONTELEONE, A. Monitoring of Pesticides in Surface Water: Off-Line SPE Followed by HPLC with UV Detection and Confirmatory Analysis by Mass Spectrometry. **Chromatographia** v.53, p.244-250, 2001.

D'ARCHIVIO, A. A.; FANELLI, M.; MAZZEO, P. ; RUGGIERI, F. Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v.71, n.1, p.25-30. 2007.

DAWLING, S. Gas chromatography. In: MOFFAT, A. C., OSSELTON, M. D. e WIDDOP, B. (Ed.). **Clarke's analysis of drugs and poisons**: Pharmaceutical Press, v.1, 2003, p.425-499.

EDWARD, C. A. Testing the Effects of Chemicals on Earthworms: The Advantages and Disadvantages of Field Tests. In: GREIG-SMITH, P. W., BECKER, H., EDWARDS, P. J. e HEIMBACH, F. (Ed.). **Ecotoxicology of Earthworms**: Intercept Ltd UK., 1992.

EDWARDS, P.J. and COULSON, J.M.; Choice of Earthworm Species for Laboratory Tests. In: Greig-Smith PW, Becker H, Edwards PJ & Heimbach F **Ecotoxicology of Earthworms**, Intercept Ltd UK, 1992.

EL-KABBANY, S.; RASHED, M.M.; ZAYED, M.A. Monitoring of the pesticide levels in some water supplies and agricultural land, in El-Haram, Giza (A.R.E.) **Journal of Hazardous Materials** v. A72, p. 11–21, 2000.

EPA. Method 531.1 - Measurement of N-methylcarbamoyloximes and N-methylcarbamates in water by direct aqueous injection HPLC with post column derivatization. Disponível em:

<http://www.epa.gov/waterscience/methods/method/files/531_1.pdf>. Acesso em: 04 julho 2008.

ERCEGOVICH, C. D. ; RASHID, K. A. Mutagenesis induced in mutant strains of *Salmonella typhimurium* by pesticides. **American Chemical Society (abstracts of papers)**, p.43. 1973.

FAO (2007) *Pesticide residues in food* Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/docs/word/ALDI.DOC>>. Acesso em: 10 outubro 2008.

FERRACINI, V. L.; PESSOA, M. C. Y. P.; SILVA, A. S. ; SPADOTTO, C. A. ANÁLISE DE RISCO DE CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS SUBTERRÂNEAS E SUPERFICIAIS DA REGIÃO DE PETROLINA (PE) E JUAZEIRO (BA). **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.11. 2001.

FERRER, I.; THURMAN, E.M. Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1175, p. 24–37, 2007.

FILIZOLA, H. F.; FERRACINI, U. L.; SANS, M. M. A.; GOMES, M. A. F. ; FERREIRA, C. J. A. Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guaíra. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.37, n.5, p.659-667. 2002.

FUNG, Y.S.; MAK, J.L.L. Determination of pesticides in drinking water by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Electrophoresis**, v. 22 Issue 11, p. 2260–2269, 2001.

FYTIANOS, K.; PITARAKIS, K. ; BOBOLA, E. Monitoring of N-methylcarbamate pesticides in the Pinios River (central Greece) by HPLC. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.86, p.131-145. 2006.

GIVEN, C. J. ; DIERBERG, F. E. Effect of pH on the rate of aldicarb hydrolysis. **Bull. environ. Contam. Toxicol.**, v.34, p.627-633. 1985.

GROSSMAN, P. D. ; COLBURN, J. C. Capillary electrophoresis - theory and practice San Diego: Academic Press. 1992a. 527 p.

GROSSMAN, P. D. ; COLBURN, J. C. Capillary electrophoresis - theory and practice. San Diego: Academic Press. 1992b. 527 p.

HANDLEY, J. W.; MEAD, C. ; BARTLETT, A. J. Aldicarb Sulfone: Algal Inhibition Test. Safepharm Report Reference 282/443. Rhone-Poulenc Agrochimie. Unpublished. In: (Ed.), 1994a.

HANDLEY, J. W.; MEAD, C. ; BARTLETT, A. J. Aldicarb Sulfoxide: Algal Inhibition Test. Safepharm Report Reference 282/441 issued 29 December 1994. Rhone-Poulenc Agrochimie. Unpublished. In: (Ed.), 1994b.

HANDLEY, J. W.; MEAD, C. ; BARTLETT, A. J. The Acute Toxicity of Aldicarb Sulfoxide to *Daphnia magna*. Safepharm Report Reference 282/442. Rhone-Poulenc Secteur Agro, Sophia Antipolis. Unpublished. In: (Ed.), 1995.

HERRERA, M. C.; PRADOS-ROSALES, R. C.; LUQUE-GARCÍA, J. L. ; CASTRO, M. D. L. D. Static–dynamic pressurized hot water extraction coupled to on-line filtration–solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–post-column derivatization–fluorescence detection for the analysis of N-methylcarbamates in foods. **Anal. Chim. Acta**, v.463, p.189–197. 2002.

HIEBSCH, S. The occurrence of thirty-five pesticides in Canadian drinking water and surface water. Ottawa, Ontario, Department of National Health and Welfare, **Environmental Health Directorate**, 1988.

HILLMAN E.; Algae Growth Inhibition Test, Test Article Temik 5G. InternationalBioResearch Project No 95-92-0285-01-90 Rhone-Poulenc Agro, Cologne, 1990.

INCHEM. Aldicarb (EHC 121, 1991). Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc121.htm>>. Acesso em: 04 julho 2008.

ISENBERG, D. L. The Microtox toxicity test, a developers commentary. In: RICHARDSON, M. (Ed.). **Ecotoxicology Monitoring**. Weinheim, Germany: VCH, 1993, p.3-15.

JONES, R. L. ; MARQUARDT, T. E. Monitoring of aldicarb residues in Long Island, New York potable wells **Environmental Contamination Toxicology**, v.16, p.643-647. 1987.

KAISER, K. L. E. Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms. **Environmental Health Perspectives**, v.106, n.2, p.583. 1998.

KIRKBRIDE, K. P. Spectroscopic techniques. In: SIEGEL, J., KNUPFER, G. e SAUKKO, P. (Ed.). **Encyclopedia of forensic sciences**, v.1-3, 2000, p.179-191.

KUPIEC, K.; SLAWSON, M.; PRAGST, F. ; HERZLER, M. High performance liquid chromatography. In: MOFFAT, A. C., OSSELTON, M. D. e WIDDOP, B. (Ed.). **Clarke's analysis of drugs and poisons**. London: Pharmaceutical Press, v.1, 2003, p.500-534.

KUSESKE, D. W.; FUNK, B. R. ; SCHULTZ, J. T. Effects and persistence of Baygon (propoxur) and Temik (aldicarb) insecticides in soil. **Plant Soil**, v.41, p.255-269. 1974.

LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE). São Carlos: Rima Editora. 2004

LARINI, L. Toxicologia dos praguicidas. São Paulo: Malone. 1999. 230 p.

LEMLEY, A. T. ; ZHONG, W. Z. Kinetics of aqueous base and acid hydrolysis of aldicarb, aldicarb sulphoxide and aldicarb sulphone. **J. Environmental Science Health**, v.18, p.189-206. 1983.

LIGHTFOOT EN, THORNE PS, Laboratory studies on mechanisms for the degradation of aldicarb, aldicarb sulfoxide, and aldicarb sulfone. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 6:377–394, 1987.

LLASERA, M.P.G. and GONZÁLEZ, M.B. Presence of carbamate pesticides in environmental waters from the northwest of Mexico: determination by liquid chromatography. **Wat. Res.** v. 35, n. 8, p. 1933–1940, 2001.

LOURENCETTI, C.; SPADOTTO, C. A.; SANTIAGO-SILVA, M. ; RIBEIRO, M. L. Avaliação do potencial de contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: comparação entre métodos de previsão e lixiviação. **Rev. Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.15, p.1-14. 2005.

MAKIHATA, N.; KAWAMOTO, T.; TERANISHI, K. Simultaneous Analysis of Carbamate Pesticide in Tap and Raw Water by LC/ESI/MS. **Analytical Sciences** v.19, p.543-549, 2003.

MARQUES, M. N; COTRIM, M. B.; PIRES, M. A F; and BELTRAME FILHO, O. Avaliação do impacto da agricultura em áreas de proteção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do rio ribeira de iguape, São Paulo. **Quím. Nova** v. 30, n. 5, p. 1171-1178. 2007.

MARSHALL, T. C. ; DOROUGH, H. W. Biliary excretion of carbamate insecticides in the rat. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.11, p.56-63. 1979.

MARTÍNEZ, R. C.; HERMIDA, C. G.; GONZALO, E. R. ; MIGUEL, L. R. Behaviour of carbamate pesticides in gas chromatography and their determination with solidphase extraction and solid-phase microextraction as preconcentration steps. **J. Sep. Sci.**, v.28, p.2130–2138. 2005.

MATTOS, L. M. ; SILVA, E. F. Influência das propriedades de solo e de pesticidas no potencial de contaminação de solos e águas subterrâneas. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.9, p.103-124. 1999.

MELITO, A. L. F., J.C. Detecção e quantificação de aldicarb por cromatografia líquida de alta resolução acoplada a detector UV em amostras de sangue de cães. **Rev. Bras. Toxicol.**, v.19, n.2, p.95-101. 2006.

MENEZEZ-FILHO, A.; NAVICKIENE, S. ; DOREA, H. S. Development of MSPD method for the determination of pesticide residues in tomato by GC-MS. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.17, p.874-879. 2006.

MILLER, W.L.I. Ground water monitoring for Temik (aldicarb) in Florida. **Water Resources Bulletin**, 25(1):79, 1989.

MINK, F. L.; RISHER, J. F. ; STARA, J. F. The environmental dynamic of the carbamate insecticide aldicarb in soil and water. **Environmental Pollution**, v.61, p.127-155. 1989.

MOLINA, M.; WIEDMER, S. K.; JUSSILA, M.; SILVA, M. ; RIEKKOLA, M.-L. Use of a partial filling technique and reverse migrating micelles in the study of N-methylcarbamate pesticides by micellar electrokinetic chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.927, p.191–202. 2001.

MORAES, A. N. C. **Contribuição para o estudo das intoxicações por carbamatos: o caso do "chumbinho" no Rio de Janeiro**. Dissertação - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 138 p., 1999.

MORRICA, P.; FIDENTE, P. ; SECCIA, S. Liquid chromatographic determination of nine N-methylcarbamates in drinking water. **Biomed. Chromatogr.**, v.19, n.1, p.107-110. 2005.

MOULTON, C. A.; FLEMING, W. J. ; PURNELL, C. E. Effects of Two Cholinesterase-Inhibiting Pesticides on Freshwater Mussels. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.15, p.131-137. 1996.

MOURKIDOU, E. P. ; PATSIAS, J. Development of a semi-automated high-performance liquid chromatographic-diode array detection system for screening pesticides at traces levels in aquatic systems of the Axios River basin. **Journal Chromatography A**, v.726, p.99-113. 1996.

NETO, A. J. S. ; SIQUEIRA, M. E. P. B. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração em fase sólida (SPE) utilizando discos c18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de furnas (MG-Brasil). **Quim. Nova**, v.28, n.5, p.747-750. 2005.

NOGUEIRA, J.M.F.; SANDRA, T. AND SANDRA, S. Considerations on ultra trace analysis of carbamates in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 996, p. 133–140, 2003.

NRA - National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals, Australia, 2001. Disponível em: < <http://www.apvma.gov.au/chemrev/aldicarb.shtml>>

OLIVI, P.; COSTA, C.R.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7 p. 1820-1830, 2008.

PEREZ, L. M. R.; BORGES, J. H.; CIFUENTES, A. ; DELGADO, M. A. R. MEKC combined with SPE and sample stacking for multiple analysis of pesticides in water samples at the ng/L level. **Electrophoresis**, v.28, p.1805-1814. 2007.

PERRETT, D. Capillary electrophoresis for drug analysis. In: MOFFAT, A. C., OSSELTON, M. D. e WIDDOP, B. (Ed.). **Clarke's analysis of drugs and poisons**: Pharmaceutical Press, v.1, 2003. 30, p.535-549.

PETERS, F. T. ; MAURER, H. H. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. **Accred. Qual. Assur.**, v.7, n.11, p.441-449. 2002.

PICÓ, Y.; RODRÍGUEZ, R. ; MAÑES, J. Capillary electrophoresis for determination of pesticide residues. **Trends Anal. Chem.**, v.22, n.3, p.133-151. 2003.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H. ; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, v.24, n.1, p.68-76. 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. ; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v.27, n.5, p.771-780. 2004.

RIGITANO, R. L. D. O.; ALVES, A. D.; SOUZA, J. C. D. ; FRANCO, A. A. Degradação do inseticida-nematicida aldicarb em solos sob vegetação nativa e sob cultura do cafeeiro. **Ciênc. Agrotec.**, v.25, n.6, p.1295-1300. 2001.

RODRIGUES, N. L. V. B. ; PAWLOWSKY, U. Testes de toxicidade aguda através de bioensaios no extrato solubilizado dos resíduos classe II A - não inertes e classe II B - inertes **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.12, n.1, p.8-16. 2007.

ROMÁN, D. A.; CARRETERO, A. S.; BLANCO, C. C. ; GUTIÉRREZ, A. F. Determination of aldicarb, carbofuran and some of their main metabolites in groundwater by application of micellar electrokinetic capillary chromatography with diode-array detection and solid-phase extraction. **Pest. Manag. Sci.**, v.60, p.675-679. 2004.

SILVA, J. A. F. D.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E. ; TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Quim. Nova**, v.30, n.3, p.740-744. 2007.

SONG, X. AND MCNAIR, H. Fast Gas Chromatography Analysis of N-Carbamates with Cold On-Column Injection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 40, p. 321-325, 2002

SPERLING, M. V. Introdução a qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Disponível em: <<http://www.etg.ufmg.br/tim1/eutrofiz.doc>>. Acesso em: 04 julho 2008.

SPURR, H. W. ; SOUSA, A. A. Pathogenicidal activity of a new carbamoyloxime insecticide. **Plant Dis. Rep.**, v.50, p.424-425. 1966.

SPURR, H. W. ; SOUSA, A. A. Potential interactions of aldicarb and its metabolites on nontarget organisms in the environment. **J. Environ. Qual.**, v.3, p.130-133. 1974.

SUNDBERG, S. E.; ELLINGTON, J. J. ; EVANS, J. J. A. A simple and fast extraction method for organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in small volumes of avian serum. **J. Chromatogr. B**, v.831, p.99-104. 2006.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Quim. Nova**, v.19, n.2, p.173-181. 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Quim. Nova**, v.20, n.5, p.493-511. 1997.

TIMOTHY R. M., SHUO, L. and MICHAEL, L. N. Analysis of synaptic transmission in *Caenorhabditis elegans* using an aldicarb-sensitivity assay. **Nature** Protocols 1, 1772 – 1777, doi:10.1038/nprot.2006.281

THUN, S. Final Report 21 d Reproduction Test in Daphnia Test Article: "Temik 5G". International BioResearch Project No 80-91-0285-03-90. Rhone-Poulenc Agro GmbH, Cologne. Unpublished. In: (Ed.), 1991.

US EPA - EPA notice initiating review of aldicarb pesticides. US Environmental Protection, Agency. *Federal Register*, 49:28320, 1984.

US EPA - EPA notice of preliminary determination regarding continued registrations of products containing aldicarb. US Environmental Protection Agency. *Federal Register*, 53:24630, 1988.

UMBUZEIRO, G.A. E RODRIGUES, P.F. Ambiente Técnico ASEC/CRF N.07 2004 pg. 2 – 5 Junho 2004 Disponível em: <http://www.asec.com.br/v3/docs/Doc_AmbienteTecnico_007.pdf>

WANG, N. W. L. B. Determination of Carbamate, Urea, and Thiourea Pesticides and Herbicides in Water. **Analytical Chemistry**, v. 73 (5), p. 997-1006, 2001.

WATSON, D. Mass spectrometry. In: MOFFAT, A. C., OSSELTON, M. D. e WIDDOP, B. (Ed.). **Clarke's analysis of drugs and poisons**. London: Pharmaceutical Press, v.1, 2003, p.379-391.

WHO (2001) The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000–2002. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (WHO/PCS/01.5).

WHO (2003) Guidelines for Drinking-water Quality - Aldicarb in Drinking-water. World Health Organization, (WHO/SDE/WSH/03.04/72). Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/aldicarb.pdf>

WU, Y.S.; LEE, H.K. AND LI, S.F.Y. A Fluorescence Detection Scheme for Capillary Electrophoresis of *N*-Methylcarbamates with On-Column Thermal Decomposition and Derivatization. **Analytical Chemistry**, v. 72 (7), p. 1441-1447, 2000.

YOUNG SONG M., STARK J.D.; and BROWN J.J.; Comparative Toxicity of Four Insecticides, Including Imidacloprid and Tebufenozide, to Four Aquatic Arthropods. **Environ Toxicol Chem**, 16: 2492-2500, 1997.

YU, K.; KROL, J. and MONKS, M.B. A Fully Automated LC/MS Method Development and Quantification Protocol Targeting 52 Carbamates, Thiocarbamates, and Phenylureas. **Analytical Chemistry**, v. 75 (16), p. 4103-4112, 2003.