

CELISA DE MOURA LEITE

*Pesquisa de Inseticidas Organofosforados  
em Mel e em Sangue pela Técnica de  
Inibição Enzimática/Cromatografia  
Sobre Camada Delgada*

Tese apresentada à Faculdade  
de Odontologia de Piracicaba  
UNICAMP, para obtenção do  
grau de Doutor em Ciências.

Área de concentração:  
Farmacologia

PIRACICABA - 1987

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Deus disse: "Eis que eu vos dou toda a erva que dá semente sobre a terra, e toda as árvores frutíferas que contêm em si mesmas a sua semente, para que vos sirvam de alimento".

(Gen.1,29)

Aos meus pais,

Anésia Gomes de Moura Leite

José Joffre de Moura Leite

Aos meus irmãos,

J.Joffre, Edith, Ruth, Solange,

Denise, Lenyr, Consuelo e Milton

Aos meus cunhados,

Denise Maria, Roberto Naves, Roberto

Lourenço, Edson, Antonio e Edylene

Aos meus sobrinhos,

Ao Gilmar,

minha gratidão, carinho e Amor

Ao Prof. Dr.

Samir Tuffic Arbex, pela orien  
tação e estímulo que sempre,  
com amizade me dispensou,

minha sincera admiração e gratidão

À Profa. Dra.

Maria Amália Valadão Dias, pelo  
constante incentivo, apoio e ami  
zade,

minha gratidão.

## Agradecimentos

Ao Dr. Paulo Renato Costa Souza, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela oportunidade a nós confe  
rida para a conclusão do Curso de Pós Graduação.

Em especial à Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP),  
através de seu Digníssimo Diretor Dr. Simonides Consani.

À Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas (EFOA), através de  
seu Digníssimo Diretor Prof. Dr. Afrânio Caiafa de Mesquita e à  
Comissão do PICD-EFOA, que permitiram a realização do Curso de  
Pós Graduação.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Neder (UNICAMP), um dos pioneiros da  
Farmacologia no Brasil, pela criação do curso de Pós Graduação  
na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, e conseqüente oportu  
nidade a nós oferecida para a realização desta pesquisa.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Ciências Fi  
siológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP)  
pela assistência e cooperação.

À Professora Ruth de Andrade Schemy, chefe do Departamento de  
Farmacologia e Fisiologia, EFOA-Alfenas, pelo interesse e estímu  
lo no decorrer desta pesquisa.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia e Fisiologia, em

especial à Profa. Olivina Maria Carneiro Vieira - EFOA - Alfenas, pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Odilon Taveira Barbosa - EFOA - Alfenas, pela colaboração na realização da documentação fotográfica.

À Profa. Dra. Ana Maria Duarte Dias Costa - EFOA - e a Leda Brunelli - USP - pela ordenação das referências bibliográficas.

Ao Laboratório de Citologia Clínica - EFOA - por conceder-nos as amostras de sangue a aos Srs. Apicultores, pelas amostras de mel.

Às funcionárias Leda Maria e Suely Fernandes, pela contribuição prestada.

Aos colegas e Funcionários do Departamento de Farmacologia e Fisiologia - EFOA - Alfenas, pelo incentivo no decorrer deste trabalho.

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, nos apoiaram durante a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Mel .....	2
1.2. O espectro da fome .....	3
2. GENERALIDADES .....	6
2.1. Praguicidas .....	7
2.1.1. Inseticidas .....	10
2.1.1.1. Inseticidas organofosforados.....	11
2.2. Aspectos analíticos da técnica de inibição enzimá- tica associada à cromatografia em camada delgada....	21
3. PROPOSIÇÃO .....	27
4. MATERIAL E MÉTODO .....	29
4.1. Aplicação da técnica de inibição enzimática/croma- tografia sobre camada delgada (IE-CD).....	30
4.1.1. Material .....	30
4.1.1.1. Padrões .....	30
4.1.1.2. Agentes cromogênicos .....	31
4.1.1.3. Oxidante .....	32
4.1.1.4. Adsorvente, solventes e sistema sol- vente .....	32
4.1.1.5. Enzima - Esterase de fígado bovino... 33	
4.1.1.6. Vidraria .....	34
4.1.1.7. Aparelhos e acessórios .....	34
4.1.1.8. Amostras selecionadas para o traba- lho .....	34
4.1.2. Método .....	35
4.1.2.1. Escolha das condições analíticas ....	35

4.1.2.2. Determinação dos inseticidas organo-	
fosforados .....	35
4.1.2.3. Descontaminação do material.....	36
4.1.2.4. Preparo da cromatoplaça .....	36
4.1.2.5. Escolha do sistema solvente .....	38
4.1.2.6. Escolha do agente cromogênico e do	
oxidante .....	38
4.1.2.7. Marcha analítica utilizada para iden-	
tificação dos inseticidas .....	38
4.2. Aplicação da técnica padronizada (LEITE, 1980) pa-	
ra identificação de inseticidas em alimento (supos-	
tamente contaminado ou não e/ou enriquecido) e em	
material biológico (controle de intoxicação) .....	40
4.2.1. Material .....	40
4.2.1.1. Solventes, vidraria e outros .....	40
4.2.1.2. Aparelhos .....	42
4.2.1.3. Amostras para análise.....	42
4.2.2. Método .....	45
4.2.2.1. Técnicas de extração de inseticidas	
em amostra de alimento .....	45
4.2.2.2. Técnica de extração de inseticidas	
em amostra de material biológico ....	46
4.2.2.3. Identificação dos inseticidas even-	
tualmente presentes pela técnica IE-	
CD segundo 4.1.2.7. ....	48
5. RESULTADOS .....	50
5.1. Aplicação da técnica de inibição enzimática/croma-	
tografia sobre camada delgada (IE-CD) .....	51
5.2. Resultados obtidos na análise de amostras de alimen-	
to e de material biológico .....	51
6. DISCUSSÃO .....	71

7. CONCLUSÃO .....	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87

## 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. MEL

É um alimento altamente energético que pode ser armazenado quase que indefinidamente (CRANE, 1985). É uma substância açúcarada obtida a partir do néctar das flores ou das secreções provenientes de partes vivas das plantas ou que sobre elas se encontram (PALXÃO, s.d.), que as abelhas - Apis mellifera - se encarregam de transportar para a colméia onde a transformam em mel (CRANE, 1985).

Cerca de 80.000 toneladas de mel são anualmente produzidas no mundo, e a maior parte deste, vendido no mercado mundial para fins de uso doméstico, geralmente espalhado no pão ou algo similar. Esta grande quantidade de mel é ingerida no seu estado natural, não cozido ou misturado com outro produto. Não há muitos alimentos dos quais se possa dizer o mesmo.

Para bebês, crianças, velhos e inválidos, o mel é uma fonte de carboidratos prontamente aceitável e facilmente digerível. Possui muitos nutrientes valiosos (ácidos, diástase, substâncias aromáticas, enzimas, vitaminas, dextrinas, minerais, proteínas), em quantidades muito pequenas, açúcares em diversas concentrações (frutose: 38,19%; glicose: 31,18%; sacarose: 1,31%; maltose: 7,31%; açúcares superiores: 1,50%) e relativa quantidade de água (17,20%) (CRANE, 1985).

Exerce os seguintes efeitos sobre o organismo humano: emoliente, refrescante, laxativo (RIBEIRO, 1959), imunológico,

analgésico, antibacteriano, expectorante, anti-inflamatório, regenerativo, energético (CRANE, 1985), calmante (mel proveniente de flores de laranjeiras e de tília). As variações, portanto, dependem das flores, regiões, solos e condições metereológicas (PAIXÃO, s.d.).

Hoje, o mel deixou de ser "manjar dos Deuses" e passou a ser um alimento procurado e colocado ao alcance de uma boa parte da população, devido o seu consumo ser incentivado pela SECRETARIA DA AGRICULTURA - Projeto Apicultura.

Sendo a matéria prima para a elaboração do mel, pela abelha, obtida de diferentes plantas (CRANE, 1985; VIANA, s. d.) está o mesmo exposto à contaminação indireta por agrotóxicos, indispensáveis para a melhoria da produção alimentícia.

Calcula-se que, sem o uso de defensivos agrícolas, a alimentação universal reduzir-se-ia em 50% (CALABRESE & ASTOLFI, 1972), visto que o espectro da fome constitui um sério problema para a humanidade.

## 1.2. O ESPECTRO DA FOME

Considerando alguns informes fornecidos pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), tem-se, então, qual é, no mundo de hoje, o grau de vigência do direito à alimentação:

- Em 1982, no Dia Mundial da Alimentação (16 de outubro), foram apresentados os seguintes dados: a) 109 milhões de pobres conso

mem 4 vezes menos do que 16 milhões de ricos, e 460 milhões de pessoas - índice que está sempre aumentando - sofrem de desnutrição; b) no ano de 1985 morreram mais de 40.000 crianças por dia, de desnutrição e de infecções. Para cada criança morta, seis continuam vivendo em condições precárias que marcarão para sempre suas vidas (CROCE, 1986).

Em Moçambique e Angola, morrem de fome 500 crianças por dia; em Gana, o percentual de desnutrição infantil dobrou entre 1980 e 1983. No Zaire, nos últimos tempos, constatou-se um abaixamento de pesos dos recém-nascidos e um abaixamento da estatura dos habitantes (BRITO, 1987).

Nestes países, de cada 100 crianças nascidas, 15 morrem antes dos 5 anos e milhões daquelas que sobrevivem tem o desenvolvimento físico ou psíquico incompleto. E a situação em algumas regiões da América Latina não é muito diferente (BRITO, 1987), pois, milhares de pessoas morrem de fome toda vez que o Estados Unidos aumenta as taxas de juros em relação à dívida externa (URBANO JR., 1986).

No Brasil, atualmente, a fome mata sete crianças em cada cinco minutos, estimando-se em trinta e seis milhões o número de menores marginalizados (CURI, 1987).

CASTRO em seu livro "GEOGRAFIA DA FOME", diz: "Está provado, de maneira rigorosamente científica, que cerca de dois terços da humanidade vivem em estado de fome permanente; o que constitui uma forma de violência silenciada contra os direi-

tos humanos (artigo 25 e 28 - DECLARAÇÃO UNIVERSAL DOS DIREITOS HUMANOS), contra a vida. Portanto, a nível político, o critério a seguir é defender a vida e o nível de vida da maioria dos povos que se encontram em situação de precariedade. Para isto, o homem necessita prover alimento a uma população crescente (BUREAU, 1976), o que requer o uso de substâncias químicas visando produzir e salvaguardar as fontes alimentícias.

Sendo o mesmo, o maior predador, a maior força viva capaz de alterar o seu único habitat, compete com outras espécies animais, dos quais 70% são insetos (cerca de 850.000), na busca de alimentos (GIANNOTTI & cols., 1972; MARICONI, 1977; LEITE, 1985), desta forma, o homem com o objetivo de conseguir safras proporcionais às necessidades mínimas ao seu crescimento demográfico e, em diminuir as perdas alimentícias - até 87% da produção (GONÇALVES & cols., 1984) - ocasionadas pelos animais, por doenças de plantas e ervas daninhas, emprega um vasto arsenal de substâncias químicas (HAMBLIN, 1973; REIS, 1979).

Em vista disso, torna-se desnecessário enfatizar o papel que representa o uso adequado dos Xenobióticos, denominados Agrotóxicos, Defensivos Agrícolas, Pesticidas ou Praguicidas, em nossos dias.

## 2. GENERALIDADES

## 2.1. PRAGUICIDAS

Por praguicidas são definidos segundo o "Federal Environmental Pesticide Control Act" como incluindo: ..... (1) qualquer substância ou mistura de substâncias usadas com a finalidade de prevenir, destruir, repelir ou reduzir qualquer praga (insetos, roedores, nematóides, fungos, ervas daninhas, outras formas de plantas ou animais aquáticos ou terrestres ou vírus, bactérias e outros microrganismos, exceto aqueles presentes no homem ou animais que possam ser considerados pragas, (2) qualquer substância ou mistura de substâncias usadas com a finalidade de regular o crescimento, desfolhar ou dessecar plantas.... (HAYES, 1975).

Existem cerca de 1.000 princípios ativos (ALMEIDA, 1976) registrados em diferentes países e usados em toda extensão ao redor do mundo. Desses, 250 são comumente empregados na agricultura, incluindo-se 100 para formulação de inseticidas, 50 para herbicidas, 20 para nematicidas e 30 para outros fins (MAB, 1980).

Esses compostos tiveram grande desenvolvimento contínuo e intenso, com aplicação à agricultura, à pecuária; à veterinária (MELLO, 1976), ao armazenamento e transporte dos alimentos.

Entretanto, após o uso desses defensivos agrícolas freqüentemente permanecem nas plantas e no solo, resíduos que irão contaminar os alimentos, a água, os produtos alimentícios de origem animal e vegetal, acarretando vários problemas de ordem toxicológica, que serão maiores ou menores de acordo com:

"a quantidade aplicada, a formulação, o método, o tempo de aplicação e particularmente a intensidade do uso do praguicida"

(MAB, 1980), resultando , infortunadamente, prejuízo ou desequilíbrio do eco-sistema , pela contaminação do ambiente.

É este um dos paradoxos de nossa civilização moderna: a utilização de Xenobióticos para a produção de substâncias alimentícias (YOKOMIZO & CARVALHO, 1985). Devido a alta toxicidade de muitos desses defensivos e considerando que não existem substâncias inócuas e sim maneiras seguras de as utilizar (CASARETT & DOULL, 1975) , faz-se necessária a aplicação adequada dos mesmos e o controle de seus resíduos nos alimentos consumidos pela população , visando proteger a saúde dos consumidores, avaliar os tipos de resíduos que estão sendo ingeridos e qual a sua quantidade (YOKOMIZO & CARVALHO, 1985; SOARES, 1981).

Tem-se por resíduo de praguicida " o remanescente de qualquer produto químico utilizado para o combate das pragas agrícolas que fique contaminando os alimentos, estendendo-se esta expressão tanto para os compostos como para os seus derivados " (AKAMINE , 1977). "Os resíduos são expressos em ppm (uma parte do tóxico para um milhão de partes de alimentos), em outras palavras, a quantidade de mg do tóxico para cada quilo do alimento (BASTOS, 1982).

A ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA (1977) trabalha conjuntamente com a Organização Mun-

dial da Saúde (OMS), integradas pela ONU, na avaliação de dados toxicológicos e dos possíveis riscos para o homem (carcinogênese, mutagênese e teratogênese) (ALMEIDA, 1976), estabelecendo a Ingestão Diária Admissível (IDA).

O problema atinge o Brasil, cujo governo, através do Departamento Nacional de Saúde, Comissão Permanente de Aditivos para Alimentos, determinou o limite máximo de tolerância para praguicidas em alimentos, por lei federal em 1967 (BRASIL, 1967), e introduziu modificações posteriores objetivando melhorar ou complementar este dispositivo legal (BRASIL, 1977). outras exigências foram estabelecidas (portaria de nº37 - Serviço de Fiscalização de Medicina e Saúde - (AEROSÓIS, 1976) e de nº 220 - Ministério da Saúde), visando proteger o consumidor (RECEITA, 1979).

Os praguicidas constituem risco para o homem, principalmente quando não são observadas as regras de segurança para sua aplicação e/ou o uso incorreto dos mesmos, assim como a não observância do tempo de carência (GIANNOTTI & cols., 1972; AZEVEDO, 1979). Estes fatores poderão redundar em fracasso no controle da praga, maior possibilidade de desenvolvimento de resistência, contaminação do ambiente e presença de altos níveis de resíduos nos alimentos. É, portanto, conveniente avaliar os efeitos, a longo prazo, dessas substâncias químicas (e de seus resíduos) sobre o eco-sistema (AZEVEDO, 1979).

Segundo GEARY (1967), ainda serão necessários, por algum tempo, o controle de pragas pelo método químico, que associado a outras medidas técnicas e legislativas (HAMBLIN, 1973;

ALMEIDA, 1976; COMEÇOU, 1976; GIANNOTTI & cols., 1972; SUAREZ, 1976; MORAES, 1985), alcançará maior vitória sobre as pragas e menor contaminação ambiental.

### 2.1.1. Inseticidas

Os defensivos químicos recebem diferentes denominações (MARICONI, 1977) segundo o uso a que se destinam.

Dentre essas substâncias destacam-se, em importância, aquelas utilizadas para o controle de insetos e suas larvas, ou seja, os inseticidas.

Sob o ponto de vista químico, os mesmos podem ser divididos em dois grandes grupos: (1) inorgânicos, (2) orgânicos.

No primeiro caso estão agrupados os compostos de arsênio, tálio e flúor, não muito representativos, em virtude de seu emprego já bastante restrito.

No segundo caso, dois sub-grupos podem ser considerados: (1) dos inseticidas de origem natural: piretrinas, rotenona e a nicotina; (2) e o dos organo-sintéticos, que de acordo com as suas características químicas e toxicológicas podem ser (MIDIO, 1974):

- inseticidas organoclorados (60%)
- inseticidas organofosforados (32%)
- inseticidas nitrogenados (5%)

As propriedades fundamentais exigidas desses compostos são:

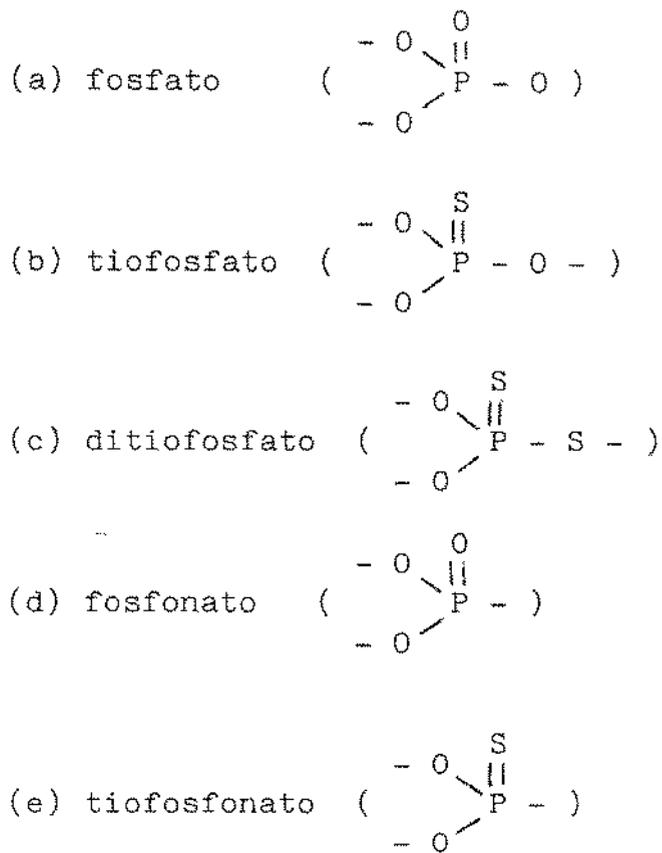
- eficácia na ação inseticida
- ausência de toxicidade
- obtenção fácil e econômica
- manipulação prática e sem risco

De maneira geral, os inseticidas não apresentam esses requisitos reunidos, mas em função da própria estrutura química, agem de forma extremamente específica (LEITE, 1980).

Destes, os organoclorados são os de maior poder residual, devido, em grande parte, à estabilidade de suas moléculas. São persistentes (PUGA, 1980), francamente biodegradáveis, se decompõem em meio alcalino, permanecendo no solo, nas plantas, ou nas superfícies onde são aplicados, durante vários anos. São neurotóxicos, lipossolúveis, com poder acumulativo para o tecido adiposo dos homens e animais (MIDIO, 1971; MARICONI, 1977; LARINI, 1979; AZEVEDO, 1979; SOARES, 1981; LEITE, 1985). Acarretam alteração de equilíbrio ecológico, motivo pelo qual o Ministro do Estado da Agricultura proibiu o uso de produtos agrotóxicos organoclorados, destinados à agropecuária, em todo o território nacional (BRASIL, 1985).

#### 2.1.1.1. Inseticidas Organofosforados

São substâncias estruturalmente derivadas do ácido fosfórico ou de seus homólogos (ácido tiofosfórico, ácido ditiofosfórico) e do ácido fosfônico e seus homólogos, podendo-se dizer que são ésteres do ácido fosfórico.



A Tabela I permite visualizar as propriedades físico-químicas de alguns inseticidas organofosforados, que são de fundamental importância no que diz respeito à velocidade de degradação desses compostos no ambiente e nas formulações, assim como também, de sua maior ou menor atividade no organismo.

São compostos que apresentam uma pequena "margem de alarme" (RODRIGUES, 1957) e cuja dose necessária para produzir uma intoxicação grave é atingida sem nenhum sinal ou sintoma, quando da absorção pela pele e via pulmonar (LARINI, 1979).

A toxicidade de um inseticida pode ser expressa em função de sua DL 50 e é alterada segundo as condições de exposição: espécie animal, via de administração, idade, sexo, estado de nutrição, temperatura, tempo de experimen

TABELA I - Propriedades físico-químicas dos inseticidas organofosforados e carbaril

Nome comercial	Nome químico	Fórmula estrutural	Tipo de derivado	Propriedades físicas
mevinfos lindrin	2-carbonetoxi-1-metilvinil dimetil fosfato		fosforado (a)	p.e. 106-107°C (1mmHg) d <sub>4</sub> <sup>20</sup> = 1,25 Líquido amarelo (prod. comercial). Solúvel acetona, benzeno, água e outros. Insolúvel hexano. Estável em soluções neutras.
dieldrin dedevap fosvit nuvan DDVP vapona mafú herkol 100	O,O-dimetil-2-2-dicloro-vinil fosfato		fosforado (a)	p.e. 74°C (1mmHg) d <sub>4</sub> <sup>25</sup> = 1,1415 Líquido incolor. Solúvel sol. orgânicas e em água (1:100). Hidroliza-se em solução aquosa a 70°C.
metil paration paration metílico nitrox 80 dalf metacide folldol metafox dimetil paration E 601	O,O-dimetil-o(p-nitrofenil fosforotioato		monotiofosforado (b)	p.f. 35-36°C p.e. 109°C d <sub>4</sub> <sup>20</sup> = 1,358 Sólido branco cristalino. Solúvel sol. orgânicos. Hidratável em água. Isomeriza-se 140-160°C. Instável meio alcalino.
diazinon G-24480 basudin diazol	O,O-dietil-O-(2-isopropil-4-metil-6-pirimidinil)fosforotioato		monotiofosforado (b)	p.e. 89°C (0,1 mmHg) d <sub>4</sub> <sup>20</sup> = 1,116-1,118 Líquido incolor. Solúvel em sol. orgânicos. Insolúvel na água. Instável em meio ácido em alcalino.
malation malatol malatux MLI cythion emmatos fyfanor. inseticida nº 4049	O,O-dimetil S (etil-1,2-dicarboetoxi) fosforodi-dioato		ditiofosforado (c)	p.e. 120°C (0,2 mmHg) d <sub>4</sub> <sup>25</sup> = 1,22 Líquido viscoso, incolor. Solúvel sol. orgânicos, exceção hidrocarbonetos saturados e água. Instável em sol. ácidas e alcalinas. Isomeriza-se a 150°C.
dimetato roxion rogor perfektion benzeton filacid fostion flumetion	O,O-dimetil-S-(N-monometil) carbamil-metilditiofosfato		ditiofosforado (c)	p.f. 107°C Sólido cristalino, pó branco. Solúvel sol. orgânicos, ligeiramente em hidrocarbonetos parafínicos e em água (35 g/l). Instável em meio alcalino.
triclorfon dipterex tugon diox neduvon	O,O-dimetil-1-hidroxi-2-tricloroetil fosfonato		fosfonato (d)	p.f. 73-74°C p.e. 100°C Sólido branco, cristalino. Solúvel em CHCl <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O e benzeno. Instável em meio alcalino.
carbaril sevin menabot carvin shellvin invin dicarbam zavvon	1-naftil-N-metilcarbamato		N-metil carbamato (f)	p.f. 142°C d = 1,132 (20°C) Solúvel em sol. orgânicos. Pouco na água. Instável em meio fortemente alcalino (ph.10)

(LEITE, 1980)

to e também, conforme a natureza química do composto (MELLO, 1976; PUGA & cols., 1978).

A Tabela II expressa a maneira como a toxicidade pode se classificar, segundo HODGE & STERNER, (1949).

Esses compostos têm sido responsáveis por muitas intoxicações agudas graves e letais (AZEVEDO, 1979), ocorrendo mesmo em curtas exposições.

PRADO & cols. (1974) relatam que os organofosforados constituem uma das principais causas da intoxicação humana, sendo estas raramente criminais, ocasionalmente suicidas e mais freqüentemente acidentais.

No Brasil existem alguns registros de intoxicações desde 1950 até nossos dias (ALMEIDA, 1959;1960;1963;1967;1971;ROCHA,1972;PRADO & cols., 1973; ALMEIDA, 1976; ITAL, 1985; ZAMBRONE, 1986), apesar de não haver dados estatísticos regulares sobre estas ocorrências, sabe-se que surtos graves são relativamente freqüentes. O quadro se agrava pela distância dos locais de aplicação do produto químico até as cidades onde existam hospitais com estrutura suficiente para efetuar o diagnóstico e o tratamento (ALMEIDA, 1976).

A atividade inseticida dos organofosforados se deve ao fato de serem anticolinesterásicos, isto é, interferem no sistema de transmissão neural realizado através da acetilcolina (ACH). A acetilcolinesterase catalisa a hidrólise desse mediador, regenerando a colina e o ácido

TABELA II . Sumário de classificação, colocando os agentes tóxicos dentro de categorias relacionadas às suas toxicidades relativas

Avaliação toxicidade	Denominação usada	Provável dose letal para o homem 70 Kg
6	supertóxico	<5 mg/Kg Uma pitada; 7 gotas
5	extremamente tóxico	5-500 mg/Kg 7 gotas - 1 colher de chá
4	muito tóxico	50-500 mg/Kg 1 colher de chá - 30g
3	moderadamente tóxico	0,5-5 g/Kg 30g - 453,6g ou 568 ml
2	levemente tóxico	5-15 g/Kg 568 ml - 1,136 ml
1	praticamente atóxico	>15 g/Kg >1,136 ml

acético.

A ação tóxica é exercida alterando este processo bioquímico de hidrólise, isto é, inibindo a atividade da acetilcolinesterase (ACHE) (LARINI, 1979).

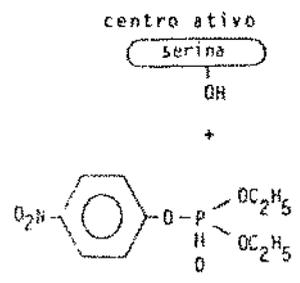
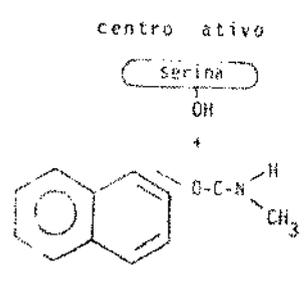
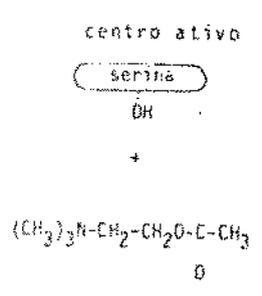
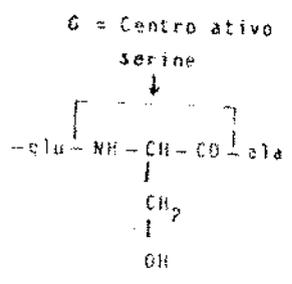
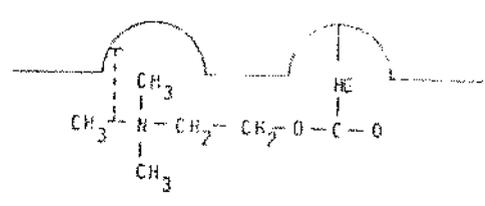
"As enzimas ACHE ocorrem tanto nos eritrócitos como no plasma sanguíneo e podem ser distinguidas pela especificidade de seus substratos. A colinesterase dos glóbulos vermelhos, também chamada verdadeira ou específica, hidroliza a acetilmetilcolina mais rapidamente do que a plasmática (pseudocolinesterase); o inverso é verdadeiro para o substrato butirilcolina.

A acetilcolinesterase tem dois centros ativos: um "aniônico", provavelmente grupo carboxílico ( $-COOH$ ) de um aminoácido dicarboxílico que se liga à parte catiônica do substrato por forças de Coulomb; outro "esterásico" contendo o grupo álcool primário ( $-CH_2OH$ ) do aminoácido serina, além de outros grupos ativadores ácidos e básicos" (MORAES, 1978).

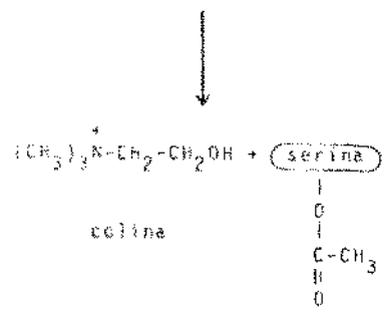
A ação dos organofosforados é a de interagir com o sítio esterásico dessas colinesterases, formando um complexo, pela eliminação de uma carga positiva do grupo ativo da enzima, fosforilando a mesma (Fig. I). Essa reação é irreversível e as condições da enzima só serão restabelecidas com o emprego de um reativador específico (Cloreto de pralidoxina - 2 - PAMCL, diacetilmonoxima - DAM e sulfametilato de N-metil-alfapiridilaldoxima - "Contra-



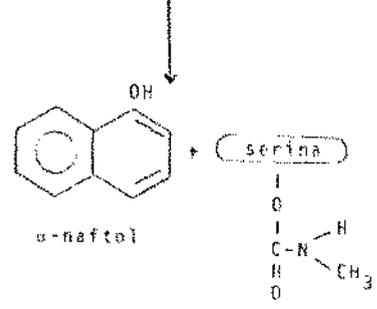
+ ACETILCOLINA



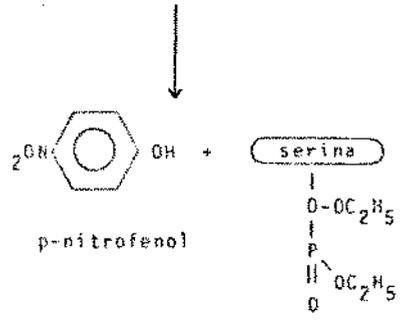
ACETILCOLINA



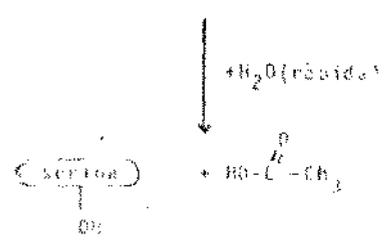
CARBARIL



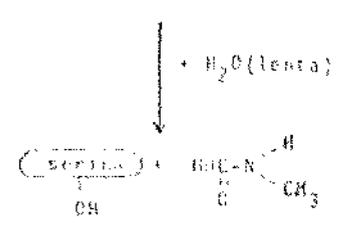
PARAOXON



Ache acetilada



Ache carbamilada (mais estável)



Ache fosforilada (muito mais estável)

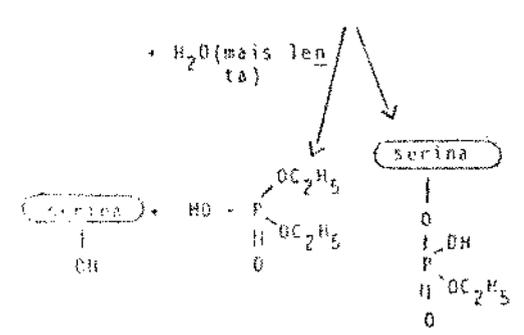


FIGURA 1 - Esquema da hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase e reações dos inseticidas anticolinesterásicos carbaril e paraoxon. (CASARETT & DOULL - 1975)

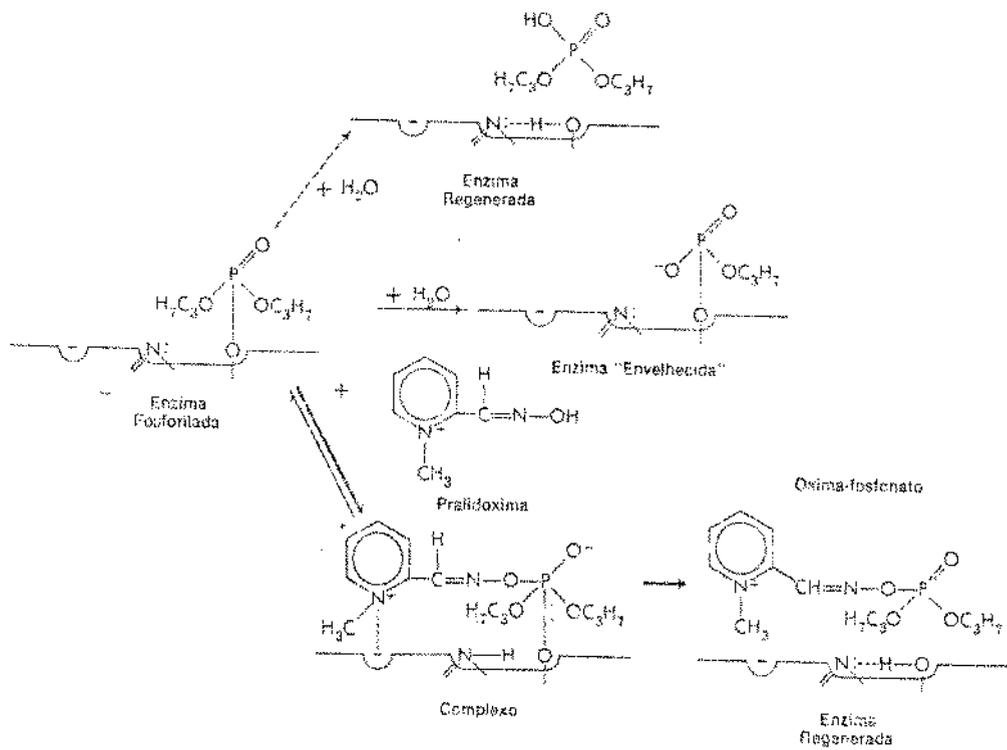
tion" (MIDIO, 1974; LARINI, 1979).

A velocidade de reativação da ACHE fosforilada pela pralidoxina varia com a natureza do agrupamento fosforila e pode vir a sofrer um processo muito rápido de "envelhecimento", de modo que, em poucos minutos ou horas, torna-se completamente resistente aos reativadores. É provável que o "envelhecimento" deva-se à perda de um grupo alquil ou alcoxi, formando um monoalquil ou monoalcoxil-fosforil - ACHE, que é muito mais estável (FLEISHER & HARRIS, 1965) (Fig. 2).

Fosfonatos que enceram grupamentos alcoxiterciários são mais propensos ao "envelhecimento" do que os seus congêneres secundários ou primários (ALDRIDGE, 1976).

Os efeitos provenientes de uma infecção aguda são desencadeados pelo acúmulo de acetilcolina no organismo e a duração dos mesmos depende das propriedades do composto, da estabilidade da ligação ACHE - organofosforado, da necessidade de reativação e, ainda, se já ocorreu "envelhecimento" da enzima fosforilada (GOODMAN & GILMAN, 1987).

Desta forma, a determinação da inibição colinésterásica, tanto plasmática como eritrocitária (MICHEL, 1949; CARAWAY, 1956; ELLMAN & cols., 1961), serve de parâmetro para evidenciar a exposição aos organofosforados. Embora possa não haver sintomas, mesmo com a atividade reduzida para até 30% (PROFETA, 1983). A atividade da coli-



(GOODMAN &amp; GILMAN, 1987)

FIGURA 2 - Reativação da acetilcolinesterase (ACHE) alquilfosforilada.

Após a alquilfosforilação da ACHE pelo DEP (à esquerda), ocorre uma reativação por hidrólise espontânea (reação superior); perda de um dos resíduos isopropoxi (envelhecimento); combinação com a pralidoxima (reação inferior), liberação do oxima-fosfonato, deixando a enzima regenerada.

nesterase leva dias, semanas ou meses para chegar ao normal, ficando o indivíduo suscetível a novas exposições.

No caso de exposição crônica a diversos agentes organofosforados - em particular os triarilfosfatos, os alquilorganofosforados que contêm flúor - podem produzir, tardiamente, uma neuropatia caracterizada por dismielinização e degeneração axônica; esses efeitos, aparentemente, não são provocados pela inibição das colinesterases, mas sim, pela inibição de uma enzima independente denominada esterase neurotóxica (GOODMAN & GILMAN, 1987).

O quadro clínico é o de uma polineurite grave que se instala muitos dias após a exposição a uma dose única suficiente do agente neurotóxico ou seu acúmulo no organismo. Dessa forma, tal efeito não parece depender da inibição da ACHE ou de outras colinesterases (GOODMAN & GILMAN, 1987), mas crescem as evidências que relacionam as lesões com a inibição da esterase neurotóxica (ABOU-DONIA, 1981; JOHNSON, 1982).

Apesar de os inseticidas organofosforados serem considerados não persistentes (PUGA, 1980), eles são encontrados em várias partes do ambiente (AZEVEDO, 1979), em consequência do uso inadequado e indiscriminado dos mesmos. A dispersão aérea compromete a fertilidade e a estrutura do solo. Ao serem concentrados ao longo das cadeias biológicas, liberam fosfato que concorre grandemente para a eutroficação das águas e para o desenvolvimento de flo-

ra monótona (HAMBLIN, 1973).

O Brasil, a exemplo de outros países onde se pesquisam inseticidas clorados e fosforados em diferentes amostras (AMBRUS & cols., 1981; KARANTH & cols, 1982; OTTGUNTHER, 1983), procura reduzir os níveis de exposição, preservar e promover a saúde humana através de análises de resíduos em alimentos (BATISTA & cols., 1980; YOKOMIZO & cols., 1982; NISHIKAWA & cols., 1982; UNGARO & cols., 1983; MAIA & BRANT, 1983; UNGARO & cols., 1984; LARA & cols., 1985; LEITE, 1985; PEIXOTO & FRANKLIN, 1986).

Desta forma faz-se necessário intensificar a procura de métodos cada vez mais adequados à pesquisa destes inseticidas nas mais diversas amostras, desde material biológico (diagnóstico de intoxicação) até em alimentos (com suspeita de contaminação e/ou ao natural).

## 2.2. ASPECTOS ANALÍTICOS DA TÉCNICA DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA ASSOCIADA À CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (IE-CD).

Não são numerosos os trabalhos referidos na literatura, ao nosso alcance, sobre a aplicação de técnica de rotina para pesquisa de inseticidas organofosforados nas análises toxicológicas. Com fins de se alcançar tal objetivo LEITE (1980) padronizou a técnica IE-CD, que foi inicialmente desenvolvida por COOK (1955) e estudada por diversos pesquisadores (McKINLEY & READ, 1962; McKINLEY & JOHAL, 1963; GETZ & FRIEDMAN, 1963; MENN & COLS, 1964; BUNYAN, 1964; CROSBY & cols, 1965; ORTLOFF

& FRANZ, 1965; EL-REFAI & HOPKINS, 1965; MENN & McBAIN, 1966; WINTERLIN & cols., 1968; MENDOZA & cols., 1969; GRANT & cols., 1969; SCHUTZMANN, 1970; ERNEST & cols., 1975; NAVARRO & CORNWELL, 1977), por ter a mesma se mostrado prática para análises de resíduos de pesticidas inibidores da acetilcolinesterase e/ou seus metabolitos.

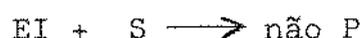
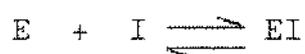
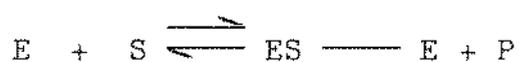
Alguns estudiosos, utilizando esta técnica, empregam-na para análise de amostras de vegetais (WALES & cols., 1968; MENDOZA & cols., 1968; MENDOZA & cols., 1968; MENDOZA & cols., 1968; EBERLE & NOVAK, 1969; MATTSON & cols., 1969; CROSSLEY, 1970; SANDRONI, 1971; MENDOZA & SHIELDS, 1971; GARDNER, 1971; MENDOZA, 1973; KUMAR & cols., 1976; ERNEST & cols., 1977), frutas (McKINLEY & JOHAL, 1963; MENN & cols., 1964; MENDOZA & cols., 1968; EBERLE & NOVAK, 1969; ERNEST & SCHURING, 1970; SANDRONI & SCHLITT, 1971; GARDNER, 1971; ERNEST & cols., 1977), material biológico (HEYDRICKY & cols., 1967; LEITE, 1980) água (LEONI, 1971); solo (STEWART & cols., 1971) e outros (CASSIDY & cols., 1969; ACKERMANN & ENGST, 1972; FECHNER & cols., 1972; FECHNER & cols., 1972).

Outros métodos enzimáticos baseados na inibição da acetilcolinesterase têm sido estudados (KUMAR & RAMASUNDARI, 1980; BRASKAR & KUMAR, 1981; 1982; BREUER, 1982), sendo porém a técnica de IE-CD aquela que vem atender o mínimo indispensável - considerando-se a precariedade dos recursos analíticos dos laboratórios para controle toxicológico - pois a mesma é adequada, simples, específica e pouco onerosa (MENDOZA, 1972; LEITE, 1980),

com sensibilidade de detecção a nível de nanograma ( $1 \times 10^{-12}$ ).

A Tabela III permite visualizar os resultados obtidos por LEITE (1980), e a Tabela IV os valores de hRf médios, obtidos com o solvente hexano-acetona (80:20) v/v, para (8) oito diferentes organofosforados.

O princípio envolvido na técnica se baseia na capacidade que possuem os organofosforados e nitrogenados de inibir a acetilcolinesterase (MENDOZA, 1972; MENDOZA, 1973).



E = enzima

S = substrato

P = produto

I = inseticida

Essas reações se processam sobre camada delgada, sendo detectados através de indicadores de pH ou de substratos cromogênicos, que mudam ou adquirem uma cor, devido ao produto ácido resultante no desenrolar do processo. Na eventual presença de inseticida, a enzima é inibida e o substrato naquela região não é hidrolizado.

No caso de reagente cromogênico semelhante ao indoxil acetato e seus derivados, a localização de inseticidas sobre o cromatograma aparece como pontos brancos (indoxil acetato e 5-bromoindoxil acetato) sobre um fundo intensamente colorido azul:

TABELA III - Limite de sensibilidade dos inseticidas frente a três substratos, esterase de fígado bovino, com ou sem uso de oxidantes.

Inseticida	LIMITE DE DETECÇÃO (ng)																
	2-NA (Fast Blue B)					5-EIA											
	5.0	H <sub>2</sub> O-Br	N-Br	UV*	I <sub>2</sub> 2.5% (ETOH)	I <sub>2</sub> 1% (CHCl <sub>3</sub> )	I <sub>2</sub> 2.5% (CHCl <sub>3</sub> )	H <sub>2</sub> O-Br	H-Br	UV*	I <sub>2</sub> 2.5% (ETOH)	I <sub>2</sub> 1% (CHCl <sub>3</sub> )	I <sub>2</sub> 2.5% (CHCl <sub>3</sub> )	5.0	H <sub>2</sub> O-Br	N-Br	UV*
metil paration	2	0,25	0,50	2	3	3	2	2	0,50	1	2	2	2	10	0,25	2	5
desecalto	nd	nd	nd	nd	nd	20	50	nd	nd	nd	100	50	nd	nd	100	nd	nd
trifluperfen	nd	100	nd	100	nd	100	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	100	nd
fenitrim	1	1	0,50	0,50	3	1	1	1	0,50	1	2	1	0,50	2	1	0,50	1
diazinon	20	2	5	20	nd	10	10	50	2	10	nd	10	5	50	1	2	20
malation	10	1	5	10	nd	10	10	50	1	10	nd	5	5	20	1	2	20
dbp	1	3	1	1	3	2	2	0,50	1	1	3	2	5	2	1	1	1
carbaryl	1	1	2	2	3	2	2	0,50	0,25	1	3	2	1	2	1	1	1

\* sem oxidante  
 H<sub>2</sub>O-Br - solução saturada de água de bromo  
 N-Br - solução de N-bromosuccinimida  
 UV - luz ultravioleta (expor a placa 1 hora sob UV)  
 I<sub>2</sub> 2.5% - solução etanólica de todo a 2.5%  
 I<sub>2</sub> 1% - solução cloroformica de todo a 1%  
 I<sub>2</sub> 2.5% - solução cloroformica de todo a 2.5%  
 nd - não detectado

(LEITE, 1980)

TABELA IV - Valores de  $R_f$ , obtidos por IE-CD, de oito (8) inseticidas em dois sistemas solventes diferentes.

Inseticida	Sistema Solvente	
	hexano-acetona (80:20) T = 20°C TP = 45 min	hexano-cloroformio (1:1) T = 23°C TP = 60 min
metil Paration	37	72
dimetoato	4	
triclorfon	19 3	13
fosdrin	10	6
diazinon	63	32
malation	37	35
DDVP	20	21
carbaril	17	17

(LEITE, 1980)

T = Temperatura média

TP = Tempo médio gasto para um desenvolvimento de 15 cm

Adsorvente: Sílica gel G



### 3. PROPOSIÇÃO

À vista do que foi exposto não se pode negar o importante papel dos praguicidas na agricultura visando um aumento de produção, assim como não se pode negar o problema da contaminação ambiental e a dos alimentos, ocasionados pelos mesmos.

Considerando-se as vantagens oferecidas pela técnica de inibição enzimática, quando associada à de cromatografia em camada delgada, foi despertado o interesse no sentido de utilizá-la para identificação de resíduos organofosforados, em amostras de alimentos (com suspeita ou não de contaminação) e de material biológico (controle de intoxicação e/ou enriquecido).

Com o intuito de detectar a possível presença destes inseticidas no ambiente, pela técnica IE-CD, já padronizada por LEITE (1980), escolheu-se diferentes amostras:

GRUPO I - Alimento: "Mel" - por ser a matéria prima do mesmo, coletada de plantas.

- nada existe, entre nós, em relação à pesquisa de resíduos de inseticidas em mel, como também quanto aos seus limites de tolerância.

GRUPO II- Material biológico: "Sangue" - como parâmetro que demonstra a exposição do homem a inseticidas não persistentes, através de cadeia alimentar.

#### 4. MATERIAL E MÉTODO

#### 4.1. APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA/CROMATOGRAFIA SOBRE CAMADA DELGADA (IE-CD)

##### 4.1.1. Material

###### 4.1.1.1. Padrões

Soluções padrões de inseticidas organo-  
fosforados.

Preparar soluções acetônicas a 1% das se-  
guintes substâncias:

- metil paration 77,3% (v/v)
- triclorfon 99,9% (p/v)
- malation 95,0% (p/v)
- diclorvos 97,0% (p/v) (DDVP)
- diazinon 40,0% (p/v)
- paration etílico (p/v)
- sumition (p/v)
- granutox (p/v)

Essas soluções denominadas como estoque  
(1), tiveram uma concentração de 10mg/ml  
(10  $\mu$ g/ $\mu$ l).

A partir destas, fazer soluções interme-  
diárias (2), em n-hexano a 100 $\mu$ g/ml  
(100ng/ $\mu$ l).

Preparar, ainda, soluções de uso (3) em

n-hexano nas concentrações de 0,1ng/ $\mu$ l.  
Acondicionar todas as soluções padrões em vidros com tampa esmerilhada, revestidos com papel alumínio e guardar em geladeira (foi guardado em congelador).

#### 4.1.1.2. Agentes cromogênicos

##### -2-Naftil Acetato (2-NA)

Dissolver 20mg de 2-NA em 0,8ml de etanol. Misturar imediatamente, antes da nebulização, com uma solução de 50mg de "Fast Blue B" em 32ml de água (8-10ml dessa mistura são suficientes para uma placa).

##### -5-Bromoindoxil Acetato (5-BIA)

(Sol. I) - Dissolver 15mg de 5-BIA em etanol absoluto.

(Sol.II) - Misturar:

a) 4,0ml de sol. tampão 0,05 Tris (hidroximetilaminometano) de pH = 8,32 (acertar o pH se necessário, com HCl 0,1M);

b) 5,0ml de sol. 2,0M de cloreto de sódio 0,2ml de sol. 1,0M de cloreto de cálcio;

c) 3,8ml de água, para fazer 13ml de uma solução.

(Sol.III)- Soluções a 0,05M de ferrocianeto e de ferricianeto de potássio (1:1).

Misturar, imediatamente, antes da nebulização 13ml da sol. II e 2ml da sol. III com 5ml da sol. I (cada placa exige, aproximadamente, 12ml dessa mistura).

#### 4.1.1.3. Oxidante

N-Bromosuccinimida (N-Br)

Dissolver 0,1 de N-Bromosuccinimida em 100ml de acetona. Diluir 5,0ml desse para 100ml com acetona, para solução "spray".

#### 4.1.1.4. Adsorvente, solventes e sistema solvente

- Sílica Gel G (tipo 60, Merck)
- Acetona
- n-hexano
- Éter etílico
- Etanol absoluto
- n-hexano-acetona (80:20) v/v

Nota : Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau p.a., sendo esses últimos destilados e testados por IE-CD. As soluções foram feitas com água bidestilada. Os substratos cromogênicos foram adquiridos da "Sigma Chemical Company".

#### 4.1.1.5. Enzima

##### Esterase de fígado bovino

Homogeneizar 20 g de fígado bovino (destituído de vasos) de animal adulto, num bujãozinho de vidro (liquidificador), com 180ml de água bidestilada e refrigerada. A seguir, centrifugar por 20 minutos o homogeneizado a 2.000 rpm a 0°C (refrigerada).

Coletar e transferir o sobrenadante para tubos de ensaios devidamente limpos e refrigerados. Lacrar os mesmos com folhas plásticas (parafilm) e guardar em congelador, se possível, a -20°C. No momento de usar, diluir 01 volume desse homogeneizado para 02 volumes de solução tampão 0,05 Tris (hidroximetilaminometano) de pH = 8,32.

## 4.1.1.6. Vidraria

- Frascos de 100 e 500ml com tampa esmerilhada
- pipetas tipo "pasteur"
- tubos de centrífuga de 15ml
- tubos de ensaio
- béqueres de 05; 10; 50; 100 e 250 ml
- erlemeyer de 250ml, com tampa esmerilhada
- balões volumétricos de 05; 10; 100 e 500ml.

## 4.1.1.7. Aparelhos e acessórios

- Conjunto "PERMUTATION" para cromatografia em camada delgada
- cubas de vidro
- placas de vidro 20x20cm
- suporte para placas
- microsseringas
- "THE HAMILTON COMPANY" (Reno, Nevada)  
(10 $\mu$ l e 5 $\mu$ l)
- estufa analítica "SAUTER" - tipo 424
- centrífuga

## 4.1.1.8. Amostras selecionadas para o trabalho

As amostras utilizadas foram adquiridas de diferentes fontes e distribuídas em dois grupos:

GRUPO I : ALIMENTOS

(supostamente contaminados e/ou enriquecidos ou natural)

GRUPO II: MATERIAL BIOLÓGICO

(controle de intoxicação e/ou enriquecido)

4.1.2. Método

4.1.2.1. Escolha das condições analíticas

Foram estudadas as melhores condições preconizadas por LEITE (1980) na padronização da técnica de cromatografia em camada delgada, associada á inibição enzimática (IE-CD).

4.1.2.2. Determinação dos inseticidas organofosforados

Realizada através da técnica IE-CD que permitiu detectar inseticidas adicionais e outros eventualmente presentes em

amostras suspeitas de contaminação e não suspeitas.

#### 4.1.2.3. Descontaminação do material

Antes de iniciar a análise, necessita-se de cuidados especiais em relação a todo material de vidro e solventes a serem utilizados.

- Vidraria: depois de bem lavada em detergente, imergir por 24 horas em solução sulfocrômica e, em seguida, lavar com água corrente (10 vezes), água destilada (4 vezes) e bidestilada (1 vez); secar em estufa e, antes de usar, lavar com acetona . Concentrar até quase secura e se solvente e transferi-lo totalmente para cromatoplaça a fim de verificar a limpeza do material (ausência de impureza).

- Solventes: transferir, sempre que necessário, para a cromatoplaça o resíduo proveniente da concentração de 10ml dos solventes a serem usados, para controle de eventuais contaminantes.

#### 4.1.2.4. Preparo da cromatoplaça

Placas de vidro foram preparadas conforme descrição seguinte:

- usar 40g de sílica gel G e 80ml de água bidestilada para preparar a suspensão de revestimento
- colocar as placas sobre o suporte e limpá-las com algodão embebido em acetona
- ajustar o espalhador sobre a placa situada em uma das extremidades livre do suporte e usá-lo em 500 $\mu$  de espessura
- preparar a suspensão de adsorvente com forte agitação, até completa homogeneização
- verter imediatamente a suspensão no espalhador, deslocando-o a seguir, com movimentos uniformes (no conjunto Permutation para CCD, as placas é que são deslocadas)
- secar as placas em temperatura ambiente ou com ventilador de ar quente, por 15 minutos
- ativar em estufa a 110<sup>o</sup>C durante uma hora e guardar a cromatoplaca em câmara isenta de umidade.

Antes do uso:

- desenvolver as cromatoplasmas em éter-etílico
- remover 0,3cm do adsorvente das bordas laterais, 0,5cm da extremidade superior da cromatoplasma e traçar nela, linhas de 2 em 2cm (foram traçadas de 1,5 a 1,5cm), estabelecendo guias, para melhor desenvolvimento dos inseticidas.

#### 4.1.2.5. Escolha do sistema solvente

Trabalhar com n-hexano-acetona (80:20) v/v, solvente eletivo da padronização de LEITE (1980).

#### 4.1.2.6. Escolha do agente cromogênico e do oxidante

Trabalhar com os substratos citados em 4.1.1.2. e com o oxidante de 4.1.1.3.

#### 4.1.2.7. Marcha analítica utilizada para identificação dos inseticidas

Técnica:

- transferir com auxílio de microsseringa, as diferentes concentrações (con-

forme necessidade) das soluções padrões de inseticidas (4.1.1.1.) para as cromatoplacas

- ressuspender e transferir 1/2 dos extratos das amostras para as cromatoplacas contendo os padrões
- desenvolver as mesmas no sistema n-hexano-acetona (80:20) v/v, em cubas previamente saturadas-por um espaço de tempo nunca inferior a 20 minutos - até 15cm a partir do ponto de aplicação
- expor as cromatoplacas, depois de secas ao ar, ao agente oxidante
- eliminar o excesso do oxidante sob corrente de ar quente, durante 20 minutos
- nebulizar com solução de enzima (4.1.1.5) gradualmente, até umedecer justa e completamente o adsorvente
- aguardar por 20 minutos, sob corrente de ar quente (37<sup>o</sup>C), para que se procese a reação enzima-inseticida
- a seguir, nebulizar com a solução de substrato cromogênico (4.1.1.2.)
- observar por um período de 30 minutos, o aparecimento de manchas brancas (correspondentes aos inseticidas), sobre um

fundo vivamente colorido de azul ou de roxo, dependendo do agente cromogênico empregado

- determinar e anotar os valores de hRf obtidos (Fig. 3).

#### 4.2. APLICAÇÃO DA TÉCNICA PADRONIZADA (LEITE, 1980) PARA IDENTIFICAÇÃO DE INSETICIDAS EM ALIMENTO (SUPOSTAMENTE CONTAMINADO OU NÃO E/OU ENRIQUECIDO) E EM MATERIAL BIOLÓGICO (CONTROLE DE INTOXICAÇÃO)

##### 4.2.1. Material

###### 4.2.1.1. Solventes, vidraria e outros

- clorofórmio
- n-hexano
- éter etílico
- pipetas de 2ml
- funis analíticos de 125ml e de 60ml
- funis de vidro
- bastões de vidro
- bequeres de 125, 80, 10 e 5ml
- papel de filtro Whatman nº42
- sulfato de sódio anidro
- lã de vidro

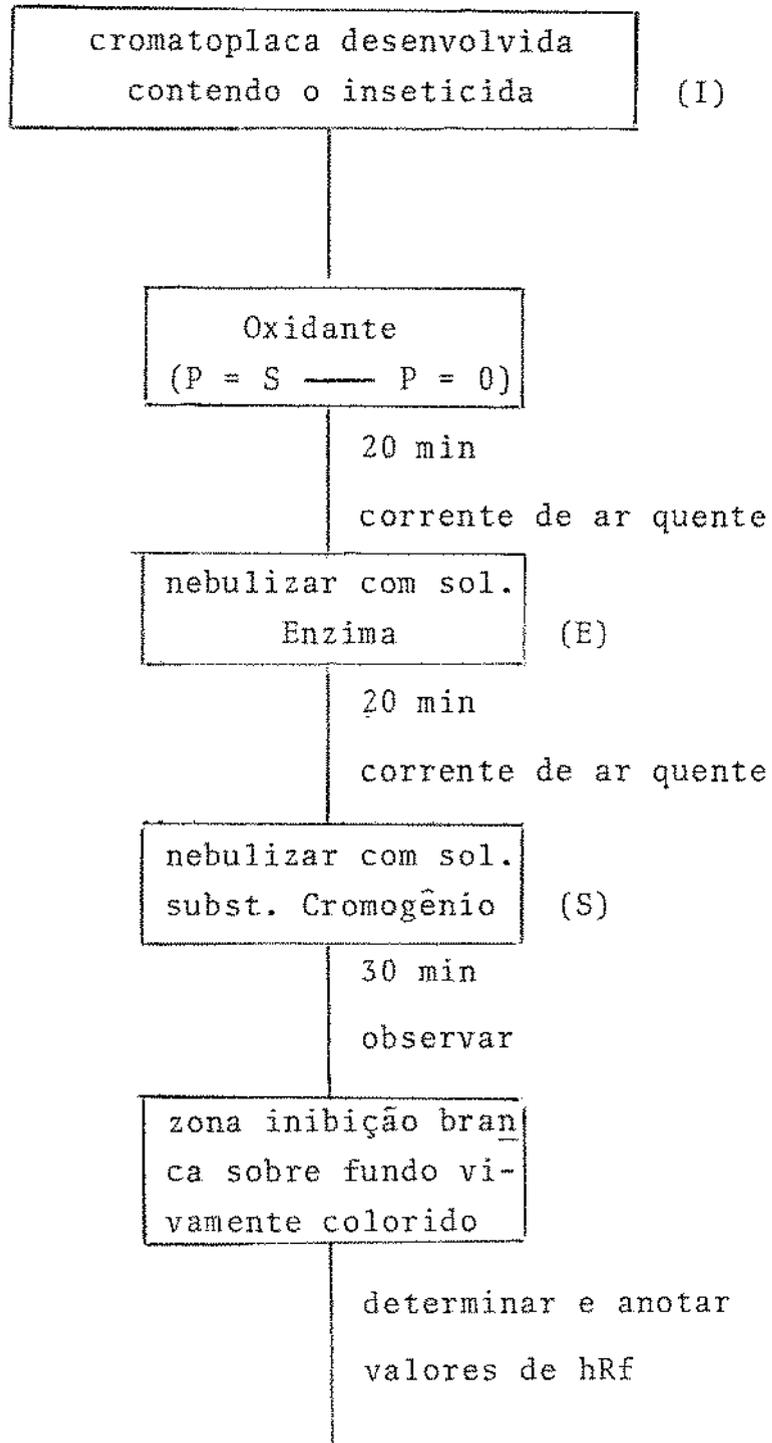


FIGURA 3- Esquema da marcha analítica utilizada para identificação dos inseticidas

Obs: Todos os solventes foram de grau  
p.a. e destilados.

#### 4.2.1.2. Aparelhos

- banho-maria a 45°C ("FANEN" - Mod.120/  
3N)
- balança "RECORD"

#### 4.2.1.3. Amostras para análise

GRUPO I : ALIMENTOS

(supostamente contaminados ou  
não e/ou enriquecidos)

##### MEL

As amostras de mel foram obtidas em  
diversas fontes produtoras na região de  
Alfenas e de localidades diferentes. Sem  
pre que possível, diretamente do apicul-  
tor.

Estes meles constituíram as amostras  
naturais do grupo A : A1, A2, A3, A4, A5,  
A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14,  
A15, A16, A17, A18, A24, A25, A27, A29,  
A30, A32, A35, A36, A37, A38, A39, A40,  
A41, A42, A43, A44, A45, A52, A53.

Duas amostras de própolis foram incluí

das no quadro das análises dos meles:

A54 e A55.

A partir destes meles, totalizados em trinta e oito (38), novas amostras foram obtidas por enriquecimento, de porções tiradas dos lotes anteriores, com os inseticidas estudados.

A amostra A1 originou a A56, que recebeu 200ng de diclorvos.

A porção retirada de A3 e A4 constituiu a amostra A28 enriquecida com 200ng de malation.

Do lote A18 obtiveram-se duas novas amostras A20 que receberam 1.000ng de diclorvos e A21 com 600ng de malation.

A amostra A14 originou A19 e A22 enriquecidas, respectivamente, com 600ng e 1.000ng de diazinon.

O lote A12 adicionado com 200ng de diazinon se tornou a amostra A23.

Da porção A30 foram retiradas as amostras enriquecidas com malation: A31 com 1.000ng; A33 com 600ng e A34 com 100ng. Deste mesmo mel foram preparadas, ainda, as amostras A46 com 300ng de diazinon e A47 com 300ng de diclorvos.

Da porção retirada de A40, obteve-se A49 contaminada com 400ng de diazinon, A50 com 400ng de diclorvos.

Desta forma, as porções de meles contaminados, totalizaram dezesseis (16) novas amostras que constituíram o grupo B: Mel enriquecido com inseticida organofosforado.

Totalizaram 54 amostras de mel e 02 de própolis.

## GRUPO II: MATERIAL BIOLÓGICO

### SANGUE

#### A) Humano

- a) indivíduos não expostos, ocupacionalmente aos inseticidas, constituíram 35 amostras
  - b) indivíduos ocupacionalmente expostos, totalizaram 04 amostras
  - c) enriquecido: 12 amostras de sangue de indivíduos não expostos foram adicionadas de inseticidas organofosforados, em concentrações de 25, 50, 200 e 300ng
- Totalizaram 51 amostras de sangue humano

## B) ANIMAL

a) bovino: (02) duas amostras provenientes de bezerro intoxicado

b) canino: (02) duas amostras provenientes de cachorro com suspeita de intoxicação

Constituíram (04) quatro amostras de sangue animal

## 4.2.2. Método

Para as análises das amostras, utilizaram-se diferentes técnicas, as mais simples possíveis, visando a proposição inicial.

## 4.2.2.1. Técnicas de extração de inseticidas em amostra de alimento

## GRUPO I

Mel

Desenvolveu-se a sistemática para pesquisa de um agente tóxico de caráter desconhecido, sendo utilizada a técnica de "Extração Direta" que é de rotina no laboratório de análises toxicológicas.

Técnica:

- tomar 10ml de mel e transferir para funil de separação de 60ml
- acrescentar 20ml de n-hexano(em vez de éter etílico-clorofórmio 1:2)
- extrair durante 10 minutos por agitação manual e filtrar sobre papel de filtro com sulfato de sódio anidro, recolhendo o filtrado em bequer de 100ml. Repetir esta operação mais duas vezes
- reunir os extratos "solvente orgânico" e concentrar em banho de água (45°C), lentamente, até secura
- ressuspender, transferir 1/2 do extrato para a cromatoplaça e proceder a técnica de identificação (4.1.2.7.)

A Figura 4 esquematiza o método empregado em amostra de mel

4.2.2.2. Técnica de extração de inseticida em amostra de material biológico

GRUPO II

Sangue

Foi usado o método de extração pre-

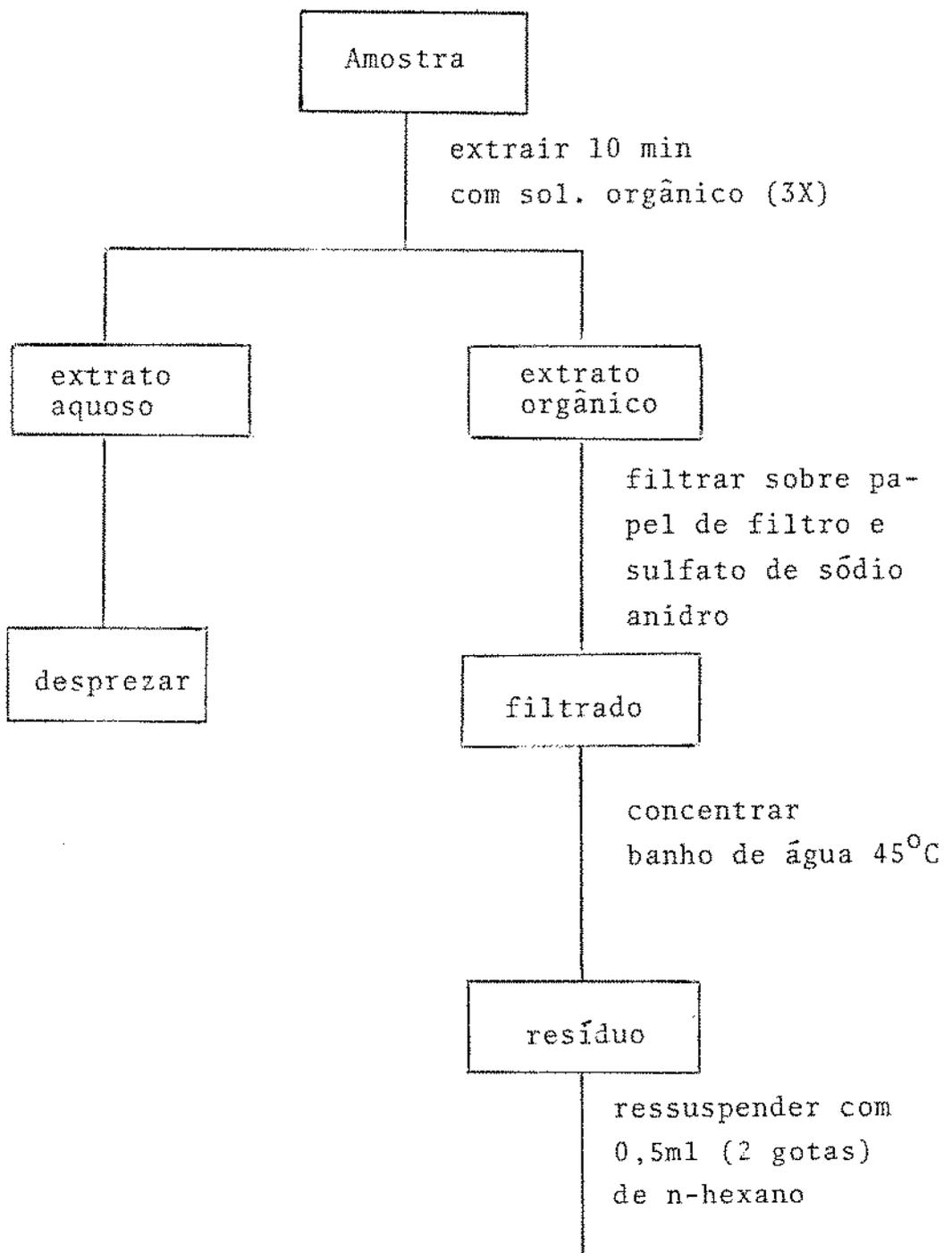


FIGURA 4 - Esquema da marcha analítica para extração de inseticidas organofosforados em amostras de mel

conizado por SUNSHINE (1975).

Técnica:

- tomar 02ml de sangue e transferir para funil de separação de 100ml, juntamente com 06g de sulfato de sódio anidro
- acrescentar 60ml de n-hexano
- extrair durante 20 minutos por agitação manual e filtrar sobre lã de vidro, recolhendo o filtrado em bequer de 100ml
- concentrar, lentamente, em banho de água (45°C) até secura
- ressuspender, transferir 1/3 do extrato para a cromatoplaça e proceder a técnica de identificação por IE-CD

A Figura 5 esquematiza o método empregado para a extração em amostra de sangue.

4.2.2.3. Identificação dos inseticidas eventualmente presentes pela técnica IE-CD segundo 4.1.2.7.

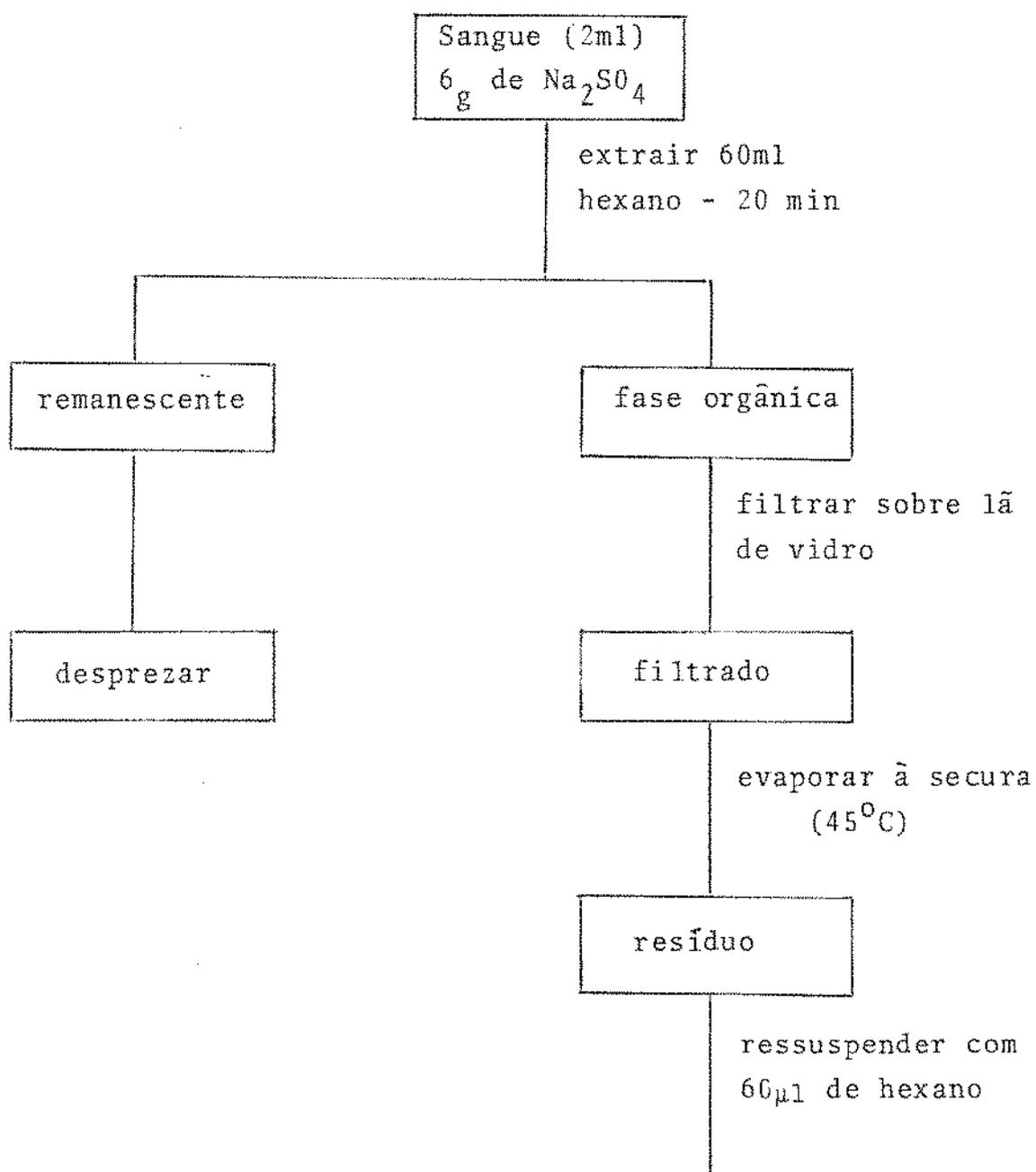


FIGURA 5 - Esquema da marcha analítica para extração de inseticidas organofosforados em amostras de sangue

## 5. RESULTADOS

## 5.1. APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA/CROMATOGRÁFIA SOBRE CAMADA DELGADA (IE-CD)

A técnica de inibição enzimática/cromatografia sobre camada delgada utilizada na identificação de resíduos de inseticidas organofosforados em alimentos e material biológico constitui excelente técnica, devido sua especificidade e alta sensibilidade.

## 5.2. RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE ALIMENTO E DE MATERIAL BIOLÓGICO

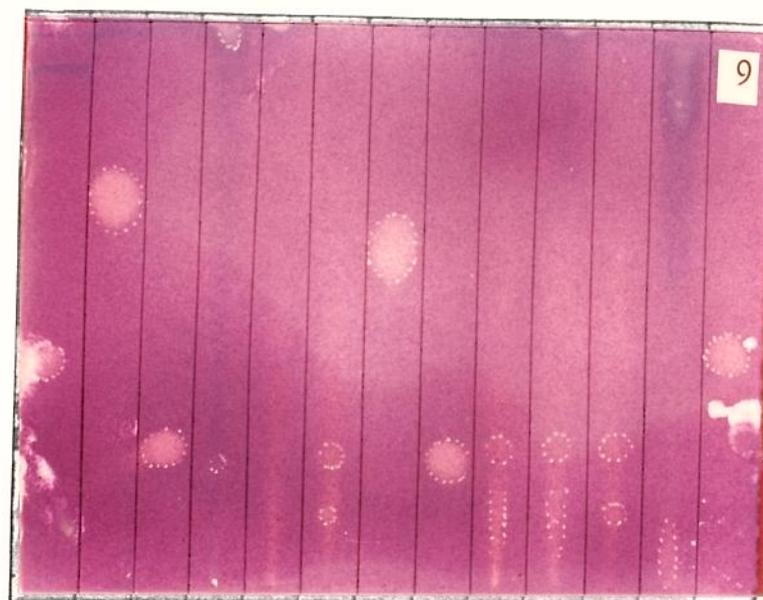
### GRUPO I - Alimento

#### Mel

A Fotografia 01 ilustra o cromatograma obtido com amostras de mel, proveniente de regiões diferentes (A12 = Penápolis; A13 = Goiânia; A14 = Botucatu; A15 = Coqueiral; A16 = Coqueiral; A17 = (?) desconhecido; A24 = Serrania), após revelação conforme a sequência -N-Br, esterase de fígado bovino e substrato 2-NA (Fast Blue B).

A Fotografia 02 retrata o cromatograma resultante da análise dos extratos das amostras de mel enriquecidas e de mel ao natural, enquanto a Fotografia 03 permite visualizar os extratos de mel de 04 fontes diferentes e de própolis, após revelação com N-Br, esterase de fígado bovino e 2-NA (Fast Blue B).

A Tabela V permite visualizar a análise de 24 amos-



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

FOTOGRAFIA 01 - Cromatograma IE-CD de extratos de mel de 7 fontes diferentes após revelação com N-Br, esterase de fígado bovino e 2-NA (Fast Blue B).

- |                         |                          |
|-------------------------|--------------------------|
| 1. malation             | 7. diazinon              |
| 2. diazinon             | 8. DOVP                  |
| 3. DOVP                 | 9. amostra de mel (A15)  |
| 4. amostra de mel (A12) | 10. amostra de mel (A16) |
| 5. amostra de mel (A13) | 11. amostra de mel (A17) |
| 6. amostra de mel (A14) | 12. amostra de mel (A17) |
| 13. malation            |                          |

Nota : padrões 1 a 3, 7, 8 e 13 (200 ng)

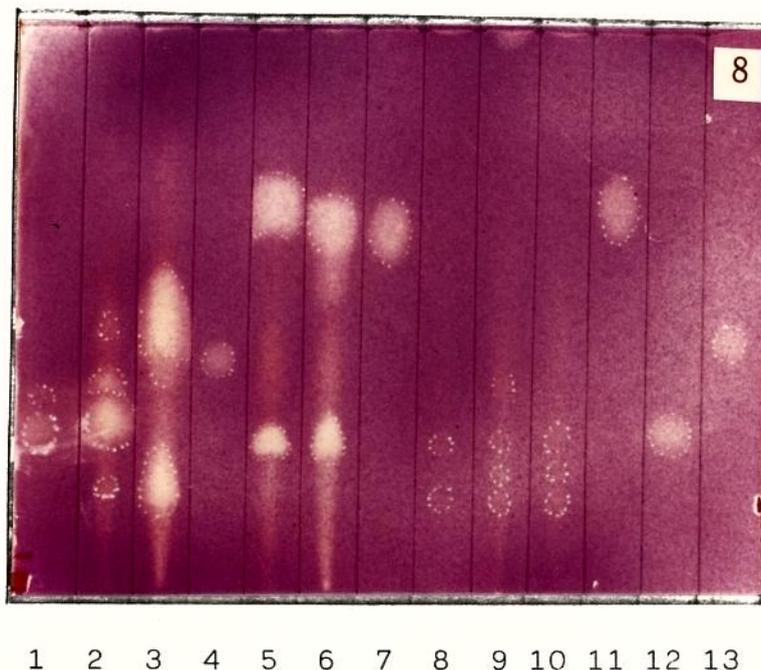
Cor : manchas esbranquiçadas sobre fundo roxo

Adsorvente : Sílica Gel G

Sistema Solvente : hexano-acetona (80:20)

Data : 23/05/86

Foto : 26/09/87



FOTOGRAFIA 02 - Cromatograma IE-CD de extratos de mel enriquecido e normal após revelação com N-Br, esterase de fígado bovino e 2-NA ( Fast Blue B).

- |                         |                          |
|-------------------------|--------------------------|
| 1. DDVP                 | 8. amostra de mel (A10)  |
| 2. amostra de mel (A20) | 9. amostra de mel (A11)  |
| 3. amostra de mel (A21) | 10. amostra de mel (A25) |
| 4. malation             | 11. diazinon             |
| 5. amostra de mel (A22) | 12. DDVP                 |
| 6. amostra de mel (A19) | 13. malation             |
| 7. diazinon             |                          |

Nota : padrões 1, 7, 11 (500ng) 12 e 13 (200ng)

Amostras A20 (DDVP- 1.000ng), A19 e A22 (diazinon - 600 e 1.000ng), A21 (malation - 600ng)

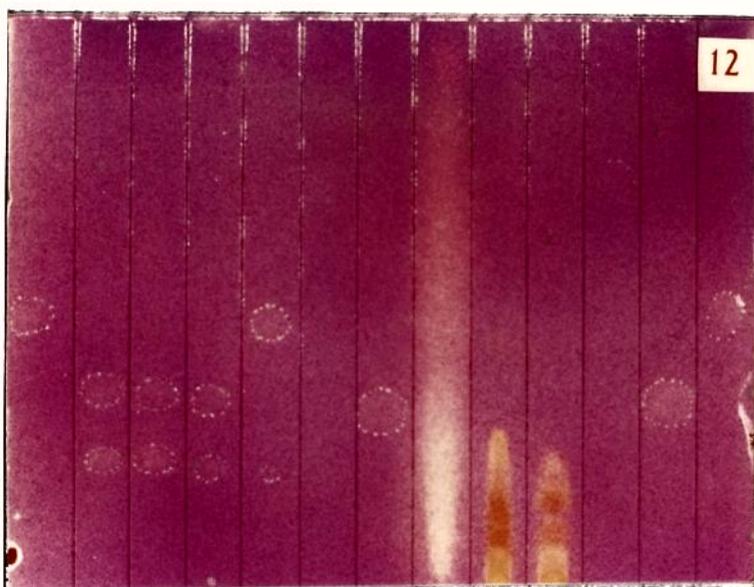
Cor : manchas esbranquiçadas sobre fundo roxo

Adsorvente : Sílica Gel G

Sistema Solvente : hexano-acetona (80:20)

Data : 16/05/86

Foto : 26/09/87



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

FOTOGRAFIA 03 - Cromatograma IE-CD de extratos de mel de 4 fontes diferentes e de própolis após revelação com N-Br, esterase de fígado bovino e 2-NA (Fast Blue B).

- |                        |                               |
|------------------------|-------------------------------|
| 1. malation            | 7. DDVP                       |
| 2. amostra de mel (A1) | 8. amostra de mel (A35)       |
| 3. amostra de mel (A2) | 9. amostra de própolis (A54)  |
| 4. amostra de mel (A3) | 10. amostra de própolis (A54) |
| 5. malation            | 11. diazinon                  |
| 6. diazinon            | 12. DDVP                      |
| 13. malation           |                               |

Nota : padrões 1, 5 a 7, 11 a 13 (300ng)

Cor: manchas esbranquiçadas sobre fundo roxo

Adsorvente : Sílica Gel G

Sistema Solvente : hexano-acetona (80:20)

Data : 13/05/86

Foto : 26/09/86

tras diferentes da região de Alfenas, tipo de mel, data de obtenção, resultado frente aos 02 substratos e provável inseticida presente.

A Tabela VI apresenta os resultados obtidos com os meles de outras regiões e a Tabela VII demonstra os resultados das análises de "mel enriquecido", enquanto a Tabela VIII o total de amostras de mel analisadas.

A Tabela IX demonstra os resultados obtidos para as (02) duas análises de própolis.

## GRUPO II - Material Biológico

### Sangue

A Fotografia 04 corresponde ao cromatograma revelado com N-Br, esterase de fígado bovino e 5-BIA, ilustrando os resultados obtidos para os extratos de sangue de 10 indivíduos não expostos.

A Fotografia 05 ilustra o cromatograma obtido com amostras provenientes de 5 indivíduos não expostos, sendo que um deles sofreu intoxicação através da cadeia alimentar e de 2 animais bovinos intoxicados, após revelação conforme sequência: -N-Br, esterase de fígado bovino e 2-NA (Fast Blue B).

A Fotografia 06 retrata o cromatograma resultante da análise dos extratos das amostras de sangue de 4 indivíduos trabalhadores rurais e animal canino com suspeita de intoxicação, após revelação com N-Br, esterase de fígado bovino e 2-NA (Fast

TABELA V- Análises de amostras de mel de seis produtores diferentes da região de Alfenas, pela técnica IE-CD.

MEL (10ml)

Produtor	Amostra	Tipo de mel	Data	Resultado 2-NA/5-BIA	Provável Inseticida
I	A1	café/eucalipto	fev./85	++	diclorvos
	A2	café	fev./85	++	diclorvos
	A3	laranja	mar./85	++	diclorvos
	A35	café/laranja	abril/86	++++	diazinon e diclorvos
	A36	laranja	jun./87	+	diclorvos
	A37	laranja	jun./87	+	diclorvos
	A4	laranja	out./84	+++	diclorvos
II	A5	eucalipto	out./84	+++	malation e diclorvos
	A6	silvestre	dez./84	++++	diazinon e diclorvos
	A7	silvestre	mar./85	+++	diclorvos
	A27	eucalipto	jun./85	+++	diclorvos
	A29	silvestre	fev./86	+++	malation e diclorvos
	A32	laranja	jan./86	++	malation
	A38	silvestre	jan./87	+	diclorvos
	A39	silvestre	jun./87	+	diclorvos
	A52	cana de açúcar	agosto/set/87	-	
	A53	assa-peixe	agosto/set/87	-	
III	A8	silvestre	jun./84	+++	diclorvos
	A9	silvestre	agosto/83	++	diclorvos
V	A45	?	agosto/86	+++	malation
	A10	?	mar./85	++	diclorvos
VI*	A11	?	mar./85	++	malation e diclorvos
	A25	?	jun./85	++	diclorvos
	A43	?	jan./86	+	diclorvos

Total : 24 amostras + = desaparece quase totalmente,  
 \* Produtor desconhecido, mel mancha- 0,3cm. diâmetro  
 comprado em Alfenas. ++ = desaparece 50%; mancha 0,5cm  
 +++ = estáveis; mancha 0,8cm.  
 ++++ = estáveis; mancha com 1cm  
 (-) = negativo

TABELA VI- Análises de amostras de mel, provenientes de oito regiões diferentes.

MEL (10 ml)						
Região	Produtor	Amostra	Tipo de mel	Data	Resultado para organofosforado 2-NA / 5-BIA	Provável Inseticida
Coqueiral (MG)	I	A15	silvestre	Jun/85	± F	diclorvos
		A16	silvestre	Jan/85	± F	diclorvos
Serrania (MG)	II	A24	silvestre	Jan/85	++	diclorvos
Governador Valadares (MG)	III	A30	silvestre	Abril/86	-	
Penápolis (MG)	IV	A12	silvestre	?	± F	diclorvos
Goiânia (GO)	V	A13	silvestre	Mar/86	-	
Botucatu (SP)	VI	A14	silvestre	Agosto/84	± F	diclorvos
?	VII	A17	?	Mar/85	++	diclorvos
?	VIII	A18	?	?	++	diclorvos
?	IX	A26	?	?	+	diclorvos
Poços de Caldas (MG)	X	A40	eucalipto	Agosto/87	+++	diazinon
		A41	eucalipto	Agosto/87	+++	diazinon
		A42	assa-peixe	Set/87	++	?
		A44	eucalipto	Set/87	+ F	?

Total : 14 amostras

± F = fugaz

+ = desaparece quase totalmente,mancha 0,5cm de diâmetro

++ = desaparece 50%;mancha de 0,5cm de diâmetro

+++ = estáveis, mancha de 0,8cm de diâmetro

(-) = negativo

TABELA VII - Análises de amostras de mel, enriquecidas com inseticidas organofosforados, pela técnica IE-CD.

MEL (10 ml)				
Lote Original	Amostra	Inseticida	(ng)	Resultado 2-NA e 5-BIA
A1	A56	diclorvos	200	++
A3/A4	A28	malation	200	++
A18	A20	diclorvos	1000	++++
	A21	malation	600	+++
A14	A19	diazinon	600	+++
	A22	diazinon	1000	++++
A12	A23	diazinon	200	++
A30	A31	malation	1000	++++
	A33	malation	600	++++
	A34	malation	100	++
	A46	malation	300	+++
	A47	diazinon	300	++++
	A48	diclorvos	300	++++
A40	A49	diazinon	400	++++
	A50	malation	400	++++
	A51	diclorvos	400	++++

Nota: As 16 amostras enriquecidas foram cromatografadas juntamente com padrões de inseticidas e amostras naturais (branco)

TABELA VIII - Total de amostras de mel analisadas pela técnica IE-CD.

MEL (10 ml)			
Região	Nº Amostras analisadas	Positivas nº	Negativas nº
Alfenas	24	22	02
Outras regiões	14	12	02
Total	38	34	04

Nota : As amostras analisadas apresentaram resultado positivo para inseticidas anticolinesterásicos numa proporção de 87,5%

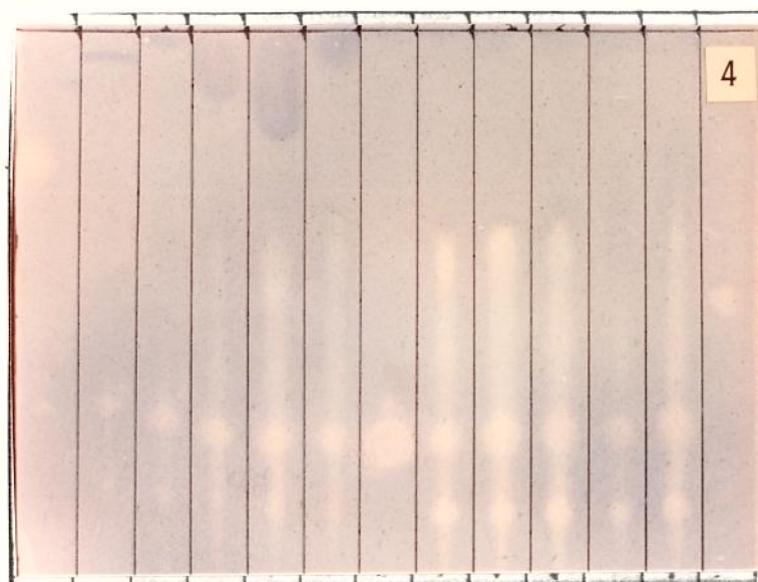
TABELA IX - Análises de duas amostras de própolis, após extração pela Técnica Direta e revelação pela Técnica de inibição enzimática/cromatografia sobre camada delgada.

PRÓPOLIS (10 ml)			
Amostra	Resultado		Provável inseticida
	2-NA	5-BIA	
A54	positivo		?
A54	positivo		?
A55	positivo		diazinon e metil paration

Nota : A54 = 500mg e 100mg

A55 = concentração desconhecida

Os extratos não sofreram processo de purificação



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

FOTOGRAFIA 04 - Cromatograma IE-CD de extratos de sangue de 10 indivíduos não expostos, após revelação com N-Br, esterase de fígado bovino e 5-BIA.

- |                           |                            |
|---------------------------|----------------------------|
| 1. diazinon               | 7. DDVP                    |
| 2. amostra de sangue (IS) | 8. amostra de sangue (C)   |
| 3. amostra de sangue (MS) | 9. amostra de sangue (R)   |
| 4. amostra de sangue (JA) | 10. amostra de sangue (AP) |
| 5. amostra de sangue (MM) | 11. amostra de sangue (LF) |
| 6. amostra de sangue (SG) | 12. amostra de sangue (KV) |
| 13. malation              |                            |

Nota : padrões 1, 7 e 13 (200ng)

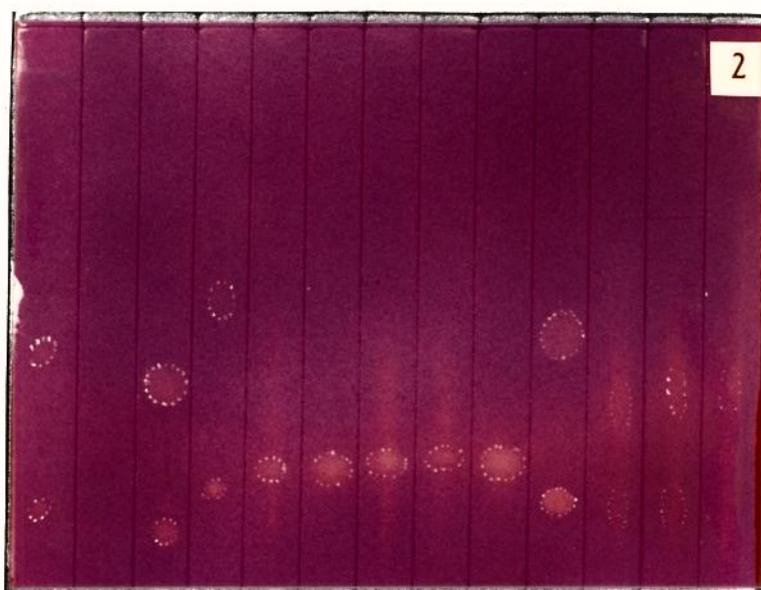
Cor : manchas brancas sobre fundo azul

Adsorvente : Sílica Gel G

Sistema Solvente : hexano-acetona (80:20)

Data: 26/03/86

Foto : 26/09/87



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

FOTOGRAFIA 05 - Cromatograma IE-CD de extratos de sangue de 5 indivíduos não expostos e de 2 animais bovinos intoxicados, após revelação com N-Br, esterase de fígado bovino e 2-NA (Fast Blue B).

- |                        |                          |
|------------------------|--------------------------|
| 1. malation            | 7. amostra sangue bovino |
| 2. amostra sangue (LA) | 8. amostra sangue bovino |
| 3. metil paration      | 9. DDVP                  |
| 4. diazinon            | 10. paration etílico     |
| 5. amostra sangue (MA) | 11. amostra sangue (AP)  |
| 6. DDVP                | 12. amostra sangue (LF)  |
|                        | 13. amostra sangue (KV)  |

Nota : padrões 1 a 4, 6, 9 e 10 (100ng)

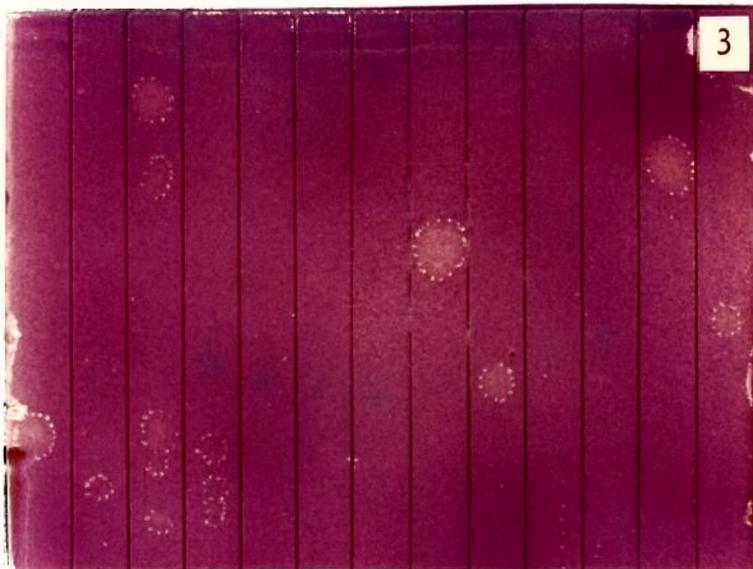
Cor : manchas esbranquiçadas sobre fundo roxo

Adsorvente : Sílica Gel G

Sistema Solvente : hexano-acetona (80:20)

Data : 01/04/86

Foto: 26/09/87



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

FOTOGRAFIA 06 - Cromatograma IE-CD de extratos de sangue de 4 indivíduos trabalhadores rurais e 1 animal canino com suspeita de intoxicação, após revelação com N-Br, esterase de fígado bovino e 2-NA.

- |                           |                              |
|---------------------------|------------------------------|
| 1. DDVP                   | 7. amostra de sangue (DR)    |
| 2. triclorfon             | 8. diazinon                  |
| 3. granutox               | 9. malation                  |
| 4. amostra de sangue (AR) | 10. amostra de sangue canino |
| 5. amostra de sangue (JR) | 11. amostra de sangue canino |
| 6. amostra de sangue (AA) | 12. diazinon                 |
|                           | 13. malation                 |

Nota : padrões 1 a 3, 8, 9, 12 e 13 (200ng)

Cor : manchas esbranquiçadas sobre fundo roxo

Adsorvente : Sílica Gel G

Sistema Solvente : hexano-acetona (80:20)

Data : 30/05/86

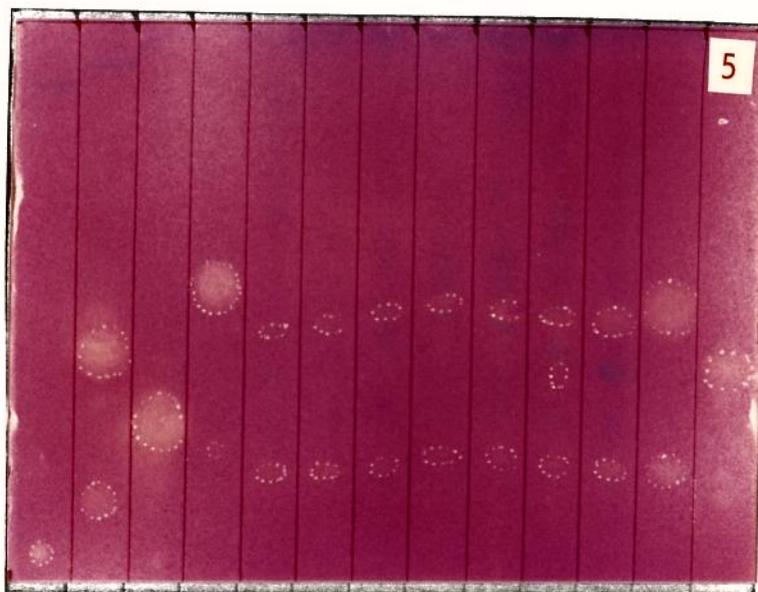
Foto : 26/09/87

Blue B).

A Fotografia 07 ilustra os resultados obtidos para os extratos de sangue de 07 indivíduos não expostos após revelação com N-Br, esterase de fígado bovino e 2-NA (Fast Blue B).

A Tabela X demonstra os resultados das análises de sangue enriquecido e a Tabela XI permite visualizar os resultados obtidos para extratos de sangue dos indivíduos intoxicados e com suspeita de intoxicação, enquanto os resultados para os não expostos são demonstrados na Tabela XII, após revelação por IE-CD.

A Tabela XIII apresenta os resultados obtidos para os extratos de sangue bovino e canino, após revelação por IE-CD, e a Tabela XIV apresenta o total de amostras de sangue analisadas pela técnica IE-CD.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

FOTOGRAFIA 07 - Cromatograma IE-CD de extratos de sangue de 7 indivíduos não expostos, após revelação com N-Br, esterase de fígado bovino e 2-NA (Fast Blue B).

- |                           |                            |
|---------------------------|----------------------------|
| 1. triclorfon             | 8. amostra de sangue (M)   |
| 2. metil paration         | 9. amostra de sangue (CS)  |
| 3. DDVP                   | 10. amostra de sangue (MA) |
| 4. diazinon               | 11. amostra de sangue (JL) |
| 5. amostra de sangue (OF) | 12. paration etílico       |
| 6. amostra de sangue (JP) | 13. malation               |
| 7. amostra de sangue (GF) |                            |

Nota : padrões 1 a 4, 12 e 13 (200ng)

Cor : manchas esbranquiçadas sobre fundo roxo

Adsorvente : Sílica Gel G

Sistema Solvente : hexano-acetona (80:20)

Data : 10/09/87

Foto : 26/09/87

TABELA X - Análises de amostras de sangue, enriquecido, pela técnica IE-CD.

SANGUE (2ml)			
Amostra	Inseticida	Quantidade (ng)	Resultado 2-NA 5-BIA
1	DDVP	25	* + positivo
2	malation	25	+ positivo
3	diazinon	25	+ positivo
4	metil paration	25	+ positivo
5	metil paration	50	+ positivo
6	malation	200	++ positivo
7	paration etílico	200	++ positivo
8	diazinon	200	++ positivo
9	DDVP	200	++ positivo
10	metil paration	200	++ positivo
11	metil paration	300	+++ positivo
12	DOVP	300	+++ positivo

Nota . As 12 amostras enriquecidas foram cromatografadas juntamente com padrões de inseticidas e amostras denominadas branco.

\* Quanto à intensidade das manchas

TABELA XI - Análises de amostras de sangue de indivíduos intoxicados e com suspeita de intoxicação, pela técnica de inibição enzimática/cromatografia sobre camada delgada.

SANGUE (2 ml)					
Amostra	Inseticida	Quantidade (ng)	Resultado		
			2-NA	5-BIA	
MA	DDVP	?	++	++	++
AA	?	?	-		++
JR	?	?	-		++
AR	Granutox	?	+++		++ +
DR	?	?	-		++

Nota : Em cada experimento foi usada como referência, uma amostra "branco" e padrões dos inseticidas

TABELA XII - Análises de amostras de sangue de indivíduos não expostos, pela técnica de inibição enzimática/cromatografia sobre camada delgada.

SANGUE (2 ml)			
Amostra	Provável Inseticida	Quantidade (ng)	Resultado 2-NA 5-BIA
M	?	?	-
LA	?	?	-
A	?	?	+
AM	?	?	-
J	?	?	+
JS	?	?	+
MS	?	?	+
JA	?	?	+
MM	?	?	+
SG	?	?	+
C	?	?	+
R	?	?	+
AP	?	?	+
KV	?	?	+
SB	?	?	-
EC	?	?	± fugaz
VA	?	?	-
SS	?	?	-
AF	?	?	-
OF	paration etílico	?	+
JP	paration etílico	?	+
GF	?	?	+
M	paration etílico	?	+
CS	paration etílico	?	+
Ma	paration etílico	?	+
RS	?	?	+
LB	?	?	+
JL	paration etílico	?	+
IM	?	?	+
ER	?	?	+
FF	?	?	+
CC	?	?	+
SSa	?	?	+

TABELA XIII - Análises de amostras de sangue animal pela técnica IE-CD.

SANGUE (2 ml)				
Animal	Amostra	Resultado		Inseticida
		2-NA	5-BIA	
Bezerro	A1	+++	++++	diclorvos
	A2	+++	++++	diclorvos
Canino	A1	-	-	-
	A2	-	-	-

TABELA XIV - Total de amostras de sangue analisadas pela técnica IE-CD.

		Amostras		
		Analisadas nº	Positivas nº	Negativas nº
H U M A N O	Não Expostos	35	27	08
	Expostos	04	{ 01 04	{ 03 (2-NA) - (5-BIA)
	Enriquecido	12	12	-
A N I M A L	Bovino	02	02	-
	Canino	02	-	02

## 6. DISCUSSÃO

Ao se propor um plano de trabalho para análise de resíduos de inseticidas em amostras de alimento (adicionados e/ou com suspeita de contaminação) e em material biológico (controle de intoxicação), escolheu-se a técnica de inibição enzimática/cromatografia sobre camada delgada já padronizada (LEITE, 1980), de grande sensibilidade, simplicidade, reprodutibilidade e especificidade (MENDOZA & SHIELDS, 1971; MENDOZA, 1972; MENDOZA, 1974; LEITE, 1980).

Na análise de resíduos, um dos maiores cuidados a se tomar é a eliminação de substâncias interferentes. Tais interferentes poderão ser contaminantes do material usado na análise (vidraria e reagentes) como também provir da própria amostra, sendo extraídos juntamente com os resíduos (BORGES, 1977).

Desta forma, cuidados especiais foram tomados com todos os materiais, segundo descrito em 4.1.2.3. Os extratos da sobra de acetona usada na lavagem da vidraria, como também o resíduo proveniente da concentração de 10ml dos solventes foram cromatografados como controle, constatando-se ausência de eventuais contaminantes.

As microsseringas (de 10 $\mu$ l e 5 $\mu$ l) utilizadas para aplicar os inseticidas, sofreram sucessivas lavagens (40 vezes) com n-hexano, no intervalo de cada aplicação.

Os resíduos dos extratos das amostras foram ressuspensos com 0,5ml (ou 02 gotas) (mel) e 60 $\mu$ l (sangue) de solvente e depositados (1/2) nas cromatoplacas através de capilares, utilizados uma única vez.

Todos os extratos finais, quando não cromatografados imediatamente, foram conservados em congelador (em bequeres fechados com parafilm e recobertos com papel alumínio), assim como, também as amostras.

Os padrões de metil paration, triclorfon, malation, diclorvos e diazinon foram padronizados (LEITE, 1980), podendo seus limites de sensibilidade (em ng) serem visualizados na Tabela III e os seus valores de hRf (relação entre a distância do ponto de aplicação da amostra até a região média da mancha, pela distância percorrida pelo solvente, multiplicado por 100) (MAY, 1965), na Tabela IV.

Os padrões de paration etílico, sumition e granutox foram introduzidos, visando solucionar os casos "controle de intoxicação". Esses inseticidas não apresentam "limite de sensibilidade" pela técnica IE-CE, mas seus valores médios de hRf - após 10 experimentos - no sistema solvente hexano-acetona (80:20) v/v, foram:

- paration etílico hRf = 53; 22; 15
- sumition hRf = 42; 16
- granutox hRf = 75; 61; 24; 20; 17; 6; 3 e 5 (manchas de cima para baixo - produto técnico).

A solução de enzima - esterase de fígado bovino - foi preparada segundo LEITE (1980), utilizando-se centrífuga comum, na falta da refrigerada, com obtenção de resultados satisfatórios, empregando-se juntamente água e vidraria resfriados para garantir melhores resultados - observou-se que a reação enzima/

substrato nesse caso, se processou de forma mais lenta que a usual, permitindo que a cor de fundo aparecesse vagarosamente, principalmente para o 5-bromoindoxilacetato - (5-BIA).

Os substratos 5-BIA e 2-NA foram utilizados por serem sensíveis e de fácil uso. Os produtos coloridos da hidrólise enzimática desses substratos são estáveis e de boa intensidade - pontos brancos ou esbranquiçados indicam os sítios onde os inseticidas inibem a enzima (MENDOZA & cols., 1968; MENDOZA, 1972; LEITE, 1980).

A Fotografia 01 ilustra um cromatograma obtido em 23/05/86 e conservado ao abrigo da luz, cuja foto foi tirada em 26/09/87, permanecendo inalterado.

O mesmo pode ser verificado com os demais, ilustrados pelas Fotografias 02, 03, 04, 05, 06. Segundo LEITE (1980), se expostos à luz e temperatura ambientes, alteram-se, sofrendo descoloração. O 2-NA chega a ficar quase rosa e o 5-BIA azul-claro, quase branco.

As Fotografias 01, 02 e 03, e as Tabelas V, VI e VII permitem uma boa visualização para os resultados obtidos com as 54 amostras de mel (GRUPO I) analisadas pela técnica IE-CD, realizando-se cromatogramas com os dois tipos de substratos (2-NA e 5-BIA) para cada amostra, respectivamente.

A Tabela VIII retrata o total de amostras de mel analisadas, demonstrando que de 38 porções, se detectou presença de inseticida organofosforado em 34, o que perfaz 87,5% das amostras. Considerando-se que o mel - elaborado pela abelha - é obtido de

matéria prima de diferentes plantas (CRANE, 1985; VIANA, s.d.), está o mesmo exposto à "contaminação indireta" por pesticidas e que funciona como veículo, fazendo chegar até o homem, estas substâncias químicas.

OGATA & BEVENUE (1973), demonstraram em estudos realizados com "sevin", que as abelhas carregavam este inseticida para a colméia, evidenciando desta forma que as mesmas não são capazes de distinguir flores contaminadas e, com isso, introduzem resíduos de inseticidas no mel através do néctar e pólen coletados (PEIXOTO & FRANKLIN, 1986). A Tabela XV apresenta os melles classificados segundo as plantas originárias e o número de amostras analisadas de cada tipo, podendo-se observar resíduo de "inseticida organofosforado" em todas as amostras de mel de café, laranja, eucalipto e em 12 das 14 amostras silvestres e 01 para a de assa-peixe.

A Figura 06 mostra que as amostras de 1983, 1984 e 1985 continham todos resíduos de inseticidas anticolinesterásicos e em 1986/87 de 18 análises, 04 foram negativas.

Observando-se a Tabela V e VI verifica-se que os inseticidas mais prováveis, presentes nas amostras foram:

a) na região de Alfenas : diclorvos (20 vezes), diazinon (02 vezes), malation (05 vezes)

b) em outras regiões : diclorvos (08 vezes), diazinon (02 vezes)

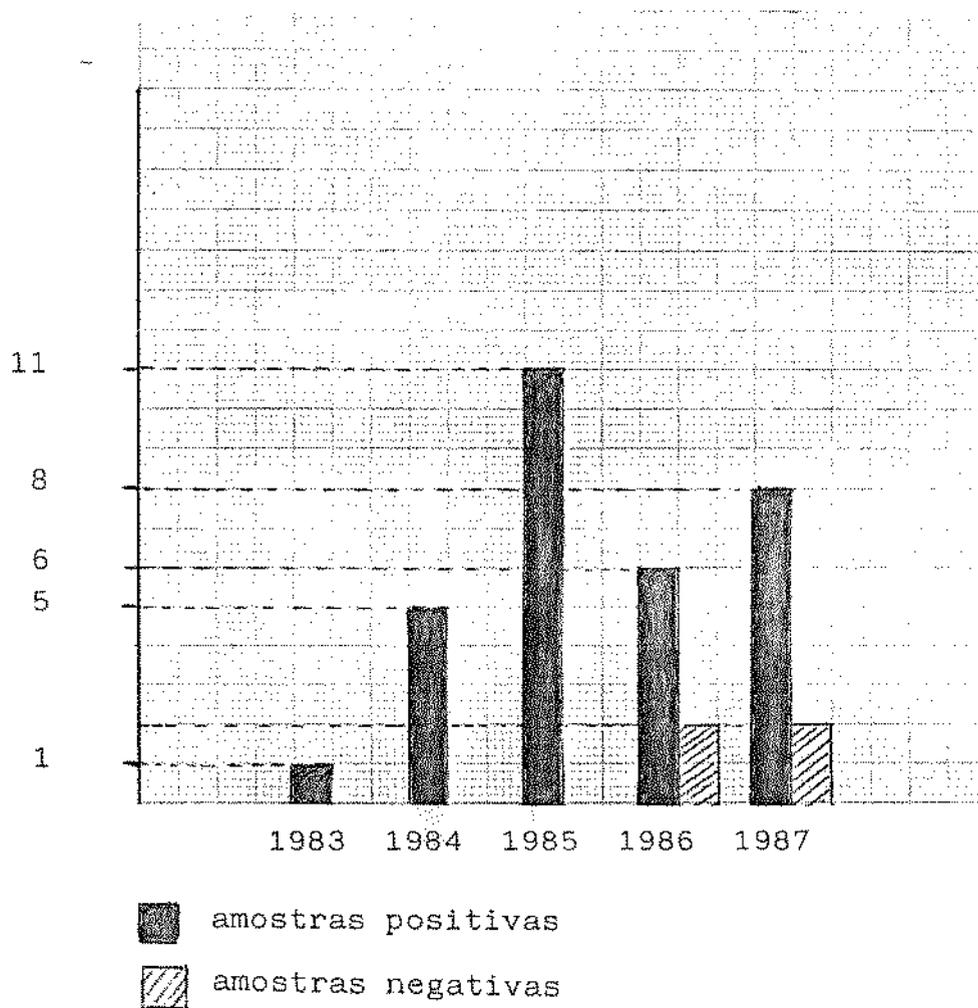
Os mesmos não deveriam estar presentes no mel, visto não existir "limite máximo permitido" para estes agrotóxicos

TABELA XV - Diferentes tipos de mel analisados.

Tipo de mel	AMOSTRAS		
	Analisadas nº	Positivas nº	Negativas nº
Silvestre	14	12	02
Eucalipto	05	05	0
Café (café/laranja) (café/eucalipto)	03	03	0
Laranja	05	05	0
Assa-peixe	02	01	01
Cana de açúcar	01	0	01

Nota : Os meles, elaborados de matéria prima obtida de plantas agrícolas, que recebem agrotóxicos, apresentam 100% positivo para inseticidas organofosforados

FIGURA 06 - Análise das amostras de mel (contaminadas ou não) correspondentes ao GRUPO I



Nota : Projeção dos números de amostras positivas e negativas, para inseticidas organofosforados em mel, cujas datas de coleta puderam ser computadas

neste alimento (BRASIL, 1967; BRASIL, 1977). Estes limites existem para a presença de preguicidas nas plantas, conforme Tabela XVI, onde se pode visualizar os inseticidas anticolinesterásicos encontrados no mel.

A identificação destes defensivos químicos foi feita, considerando-se os seus valores de hRf em relação aos valores das soluções padrões de inseticidas desenvolvidas no mesmo cromatograma. As amostras A1; A2; A3; A4; A5; A6; A27; A29; A35 apresentaram valores de hRf que variaram de 39 a 33, e as amostras A7; A8; A9; A10; A11; A12; A14; A15; A16; A17; A36; A37; A38; A39, valores que foram de 22 a 28, sendo que estas variações ocorreram também com o padrão de diclorvos colocado, juntamente, nas cromatoplacas.

As amostras A5, A11, A27, A29, continham também malation, com valores de hRf de 37 a 43; enquanto as amostras A43 e A45 só malation. Para A6, A35, A40, A41 detectou-se Diazinon cuja média dos valores dos hRf foi de 65 (variação de 63 a 80). As médias dos valores dos hRf obtidos para os diferentes inseticidas, com o solvente hexano-acetona (80:20) v/v, foram: malation hRf = 43, diclorvos hRf = 33(22), diazinon hRf=65 e metil parathion 53; 22, sendo esses valores maiores do que aqueles encontrados por LEITE (1980) (ver Tab. IV).

Embora em níveis relativamente baixos (resíduos a nível de ng), a maioria das amostras examinadas evidenciou a presença de inseticidas organofosforados.

Esta presença não deveria existir, mas que tendo sido constatada, demonstrou a importância de se observar a "boa

TABELA XVI - "Limite Máximo Permitido" dos inseticidas organofosforados para as plantas de café e laranja.

Plantação de	Inseticida Organofosforado	máx. permitido (ppm)
Café	diazinon	0,02
	diclorvos	2 (grão)
Laranja	malation	8

(BRASIL, 1977)

prática agrícola" e de se exercer um "controle efetivo", de análise residual de pesticidas, sobre os alimentos que se destinam ao consumo pela população, e assim, preservar e promover a saúde.

Sendo os alimentos, a principal fonte de exposição humana aos pesticidas e sabendo-se que a realidade brasileira dispõe de poucos dados que permitem avaliar a natureza e a intensidade da contaminação, por estes xenobióticos, pensou-se em pesquisá-los no sangue onde, para os mesmos, não existe "limite máximo permitido", ou seja, não devem ser encontrados.

LEITE (1980) realizou análise com amostras provenientes de seis (06) indivíduos não expostos, tendo obtido resultado negativo e, positivo para duas amostras suspeitas de intoxicação, pela cadeia alimentar.

Segundo JAGER (1970), os níveis sanguíneos dos inseticidas são o melhor parâmetro disponível para avaliar o ingresso e o equilíbrio de tais compostos no organismo. Portanto, o sangue possibilita estudos do "índice biológico de exposição" para pessoas expostas ou não.

A Tabela XII demonstra os resultados obtidos para indivíduos não expostos, em boa saúde, mas que apresentaram traços de inseticidas organofosforados em seus organismos; sendo o paration etílico o de maior incidência e o mais provável.

A Tabela XI apresenta as análises realizadas para casos de intoxicação ou com suspeita de contaminação. Na amostra MA, de pessoa não exposta, detectou-se diclorvos (DDVP) após 48 horas da manifestação de sinais e sintomas, evidenciando intoxi-

cação proveniente de ingestão de alimento (uva).

A amostra AR coletada de um jovem, menor de idade, 6 horas após uma jornada de trabalho, de um dia, sendo o resultado positivo (3 manchas - provável Granutox) com os substratos 2-NA e 5-BIA. As demais amostras, também de rapazes menores, foram negativas com 2-NA e positivas com 5-BIA. A amostra IR era de trabalhador em atividade sem sintomas; as amostras AA e DR foram coletadas 48 horas após exposição, com intoxicação, ao Granutox e tratamento.

Observa-se que o substrato 5-BIA se mostrou melhor revelador para amostras de sangue (LEITE, 1980), e por ser de grande estabilidade, pode ser indicado para casos forenses (HEYNDRICKY & cols., 1967).

A Tabela X visualiza as amostras de sangue enriquecidas com DDVP, malation, diazinon, paration etílico e metil paration; enquanto a Tabela XIII exhibe os resultados para casos de animais intoxicados. As amostras A1 e A2, de sangue proveniente de bezerro, foram positivas para diclorvos, sendo que o 1º animal faleceu e o 2º recebeu tratamento adequado, em tempo, salvando-se.

Todas as amostras de sangue foram coletadas com anticoagulante EDTA, não se tendo notícia do anticoagulante usado para coleta do sangue de cachorro.

A Tabela XIV demonstra os resultados para o total de amostras de sangue analisadas (55) pela técnica IE-CD, das quais 35 de pessoas não expostas, tendo-se porém constatado presença de inseticidas organofosforados em 27 destas amostras.

Estes resultados - não muito significativos, em termos de população - associados aos obtidos para o mel (produto natural), permitem que se questione a respeito da ação dessas substâncias químicas, a longo prazo, no organismo humano. Evidenciam ainda que estes xenobióticos se encontram contaminando o ambiente e principalmente o homem, através da cadeia alimentar.

Os organofosforados são altamente tóxicos, sendo a dose tóxica para o homem, do malation, de 400mg/Kg e do paration 3mg/Kg, mas deve-se lembrar que esses compostos são biotransformados no organismo, com produção de agentes intermediários (malaoxon e paraoxon) vinte vezes mais potentes do que seus precursores (PROFETA, 1983), o que poderia provocar intoxicação aguda, de possibilidade mais remota, e crônica.

Os efeitos provenientes de uma intoxicação a longo prazo, merecem toda atenção e serem melhores estudados, podem ocorrer pelo "envelhecimento" da enzima fosforilada (GOODMAN & GILMAN, 1987), em particular os inseticidas triarilfosfatos, os alquilorganofosforados (malaoxon) que podem produzir, tardiamente uma "neuropatia", pela inibição de uma enzima denominada "neurotóxica". Esse efeito pode ocorrer após a exposição a uma dose única suficiente, ou ao acúmulo desses agentes no organismo. É possível que ocorra envelhecimento do conjugado esterase-alquilfosfato, de modo similar ao que ocorre para ACHE, para que surjam os efeitos da doença (GOODMAN & GILMAN, 1987).

Segundo THIENES & HALEY (1972) numa exposição constante, pode ocorrer desmielinização, disseminada com sintomas se

melhantes à esclerose múltipla (provavelmente, devido à inibição da esterase neurotóxica ( ABOU-DONIA, 1981).

Considerando-se que todo xenobiótico absorvido no organismo provoca uma resposta, mesmo que de maneira não efetiva ou sem sinais e sintomas, fica-se a pergunta: não existirá, realmente, risco para a saúde humana, uma contaminação a longo prazo a nível de resíduo?

## 7. CONCLUSÃO

Considerando, os resultados experimentais do presente trabalho, pode-se concluir:

- 1- A técnica IE-CD padronizada por LEITE (1980) é simples, economicamente viável e específica, para detectar inseticidas organofosforados na rotina da análise toxicológica, conforme resultados obtidos em 111 amostras analisadas.
- 2- Os substratos 2-naftil acetato (2-NA) e 5-bromoindoxilacetato (5-BIA) mostraram-se sensíveis permitindo a identificação dos inseticidas adicionados e, de outros, eventualmente, presentes nas amostras analisadas.
- 3- O mel, por ser elaborado de matéria prima coletada de plantas, apresenta resíduos de inseticidas, evidenciando a presença destes, contaminando o ambiente.
- 4- Pode-se dizer que os alimentos constituem um dos principais meios através do qual os inseticidas chegam ao homem, podendo os mesmos serem detectados em sangue de pessoas não expostas ocupacionalmente.
- 5- As amostras de mel (GRUPO I) e as de sangue (GRUPO II) podem ser utilizadas como parâmetro que demonstra a exposição do homem à inseticidas organofosforados.
- 6- O uso adequado dos agrotóxicos é de responsabilidade de toda sociedade, apesar de que, só essa medida não constitui solu-

ção para todos os problemas, mas é condição básica para a proteção de homem, dos animais e de todo o eco-sistema.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-DONIA, M.B. - Organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1981, 21, 511-548.  
 Apud: GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G.; RALL, T.W. & MURAD, F. - As bases farmacológicas da terapêutica. 7a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1987. p. 79-80.
- ACKERMANN, H. & ENGST, R. - Vorkommen von phosphororganischen insecticiden im fetus. *Arch. Toxikol.*, 26:17, 1970. Apud: MENDOZA, C.E. - Analysis of pesticides by the thin-layer chromatographic enzyme inhibition technique. *Residue Rev.*, New York, 43 : 105-42, 1972.
- AEROSÓIS : toxicidade preocupa empresas. Folha da Tarde, São Paulo, 01 Jun. 1976. p. 7.
- AKAMINE, D. - Aspectos analíticos da determinação de resíduos de inseticidas organoclorados em sardinha (*Sardinella brasiliensis*). São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1977.  
 (Dissertação de Mestrado)
- ALDRIDGE, W.N. - Survey of major points of interest about reactions of cholinesterases. *Croat. Chem. Acta.* 1976, 47, 225-233.  
 Apud: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G.; RALL, T.W. & MURAD, F. - As bases farmacológicas da terapêutica. 7a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1987. p. 79-80.
- ALMEIDA, M.E.W. de - Contaminação de alimentos por pesticidas.  
 In: CONGRESSO DE TOXICOLOGIA TROPICAL, 1º, Anais. p. 91-3,

Manaus, 1976.

ALMEIDA, W.F. - Intoxicações acidentais humanas por inseticidas.

São Paulo, Instituto Biológico, 1960. 15p. (Inst. Biológico. Publicação nº 112).

ALMEIDA, W.F. - Intoxicações acidentais humanas por inseticidas.

2a. ed. São Paulo, Instituto Biológico, 1967. (Inst. Biológico. Publicação nº 120).

ALMEIDA, W.F. - Intoxicações pelos modernos inseticidas. Rev.

paul. Med., São paulo, 55: 380-94, 1959.

ALMEIDA, W.F. & PUGA, F.R. - Envenenamentos por pesticidas. In:

CONGRESSO DE TOXICOLOGIA TROPICAL. 1º, Anais. p.105-10. Manaus, 1976.

ALMEIDA, W.F. - Praguicidas: a segurança no seu emprego. Saúde

ocupac. Segur., São Paulo, 6 (1), 1971.

ALMEIDA, W.F. - Pesticidas e saúde pública. Trabalho apresentado

no ENCONTRO LATINO AMERICANO DE TOXICOLOGIA E FORMULAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 1º, Porto Alegre, 1976.

ALMEIDA, W.F. & PEREIRA, A.P. - Parations como principais respon

sáveis pelos casos acidentais de intoxicações por inseticidas de uso agrícola. Biológico, São Paulo, 29: 249-57, 1963.

AMBRUS, A.; HARGITAL, E.; KAROLY, G.; FULOP, A. & SANTOS, J. -

General method for determination of pesticide residues in sam

ples of plant origin, soil, and water. II. Thin layer chromatographic determination. J. Assoc. off. anal. Chem. Washington, 64 (3): 743-8, 1981.

AZEVEDO, F.A. de - Determinação dos níveis séricos de inseticidas organoclorados em trabalhadores expostos. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1979. (Dissertação Mestrado)

BASTOS, J.A.M. - Principais pragas das culturas e seus controles. São Paulo, Nobel, 1982. p.40. Apud: LEITE, M.C. de M. - Padronização cromatográfica em camada delgada para a identificação de inseticidas organoclorados e sua aplicação na análise de milho. Alfenas, Fundação de Ensino e Tecnologia de Alfenas - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, 1985. (Trabalho-PCQ)

BATISTA, G.C. de; DORIZZOTTO, P.H. & HOJO, H. - Resíduos de dimetoato e fenoxato em café cereja e beneficiado determinados por cromatografia em fase gasosa. In: V ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS, São Paulo, 1980. Relatório. São Paulo, 1980.

BHASKAR, S.U. & KUMAR, N.V.N. - Thin layer chromatographic determination of methylparathion as paraoxon by cholinesterase inhibition. J. Assoc. off. anal. Chem., Washington, 64(6): 1297-8, 1982.

BHASKAR, S.U. & KUMAR, N.V. - Selection of enzyme sources for improved sensitivity in enzymatic determination of organophosphorus pesticides. J. Assoc. off. anal. Chem., Washington, 65(6): 1297-8, 1982.

BORGES, E.L. - Análise de resíduos de inseticidas organoclorados

- em manteiga de cacau. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 1977. (Dissertação - Mestrado)
- BRASIL. Comissão Permanente de Aditivos para Alimentos - Resolução nº 23/66. Diário Oficial da União, Rio de Janeiro, 22 de fev. 1967, p. 2193.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. - Decreto nº 55.871 de 26 de março de 1965. In: Legislação federal do setor saúde. 2a. ed. Brasília, Revista do Ministério da Saúde, 1977. V.2, p. 516-37.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Portaria nº 329. Diário Oficial da União, Rio de Janeiro, 02 de set. de 1985. p. 12941.
- BREUER, H. - Sensitive and rapid detection of paraoxon by thin-layer chromatography and strips using enzyme inhibition and Ellman's method. Els. Sci. Publis. Company, Amsterdam, 243(1): 183-7, 1982.
- BRITO, J.B. de - Dívida externa: um desafio à solidariedade. Cidade Nova, (5): 14-7, 1987.
- BUNYAN, P.J. - The detection of organo-phosphorus pesticides on thin-layer chromatograms. Analyst, London, 89: 615-8, 1964.
- BUREAU, P.R. - População. São Paulo, Lidador, Editora da Universidade de São Paulo, 1976. p. 106-9; 130-47.
- CALABRESE, A.I. & ASTOLFI, E.A. - Toxicologia. 2a. ed. Buenos Aires, Kapeluzz, 1972. p.221. Apud: LEITE, C. de M. - Identifi-

- cação de inseticidas organofosforados e carbamatos pela técnica de inibição enzimática/cromatografia sobre camada delgada.  
São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1980. (Dissertação - Mestrado)
- CARAWAY, W.T. - Photometric determination of serum cholinesterase activity. Amer. J. clin. path., Baltimore, 26: 945-55, 1956.
- CASTRO, J. de - Geografia da fome. A fome no Brasil. Apud: FOLLEREAU, R. - Se Cristo amanhã bater `a tua porta...reconhecê-lo-ás? 3a. Ed. Lisboa, Além-Mar, 1968. p.68-70.
- CASARETT, L.J. & DOULL, J. - Toxicology the basic science of poisons. New York, MacMillan, 1975. p.423.
- CASSIDY, J.E.; RYSKIEWICH, D.P.; MURPHY, R.T. - Metabolism of s-(2 methoxy-5-oxo-A<sup>2</sup>-1, 3, 4-thiadiazolin-4-y) methyl -O,O-dimethyl phosphorodithioate (supracide) in alfalfa. J. agric. Food Chem., Washington, 17(3): 558-64, 1969.
- COMEÇOU a ofensiva para dobrar a produção. Quim. Deriv.; São Paulo, (1.222): 20-8, 1976.
- COOK, J.W. - Paper chromatography of some organic phosphate insecticides. IV. Spot test for in vitro cholinesterase inhibitors. J. Assoc. off. anal. Chem., Washington, 38: 150-3, 1955.
- CRANE, E. - O livro do mel. 2a. ed. São Paulo, Nobel, 1985. p.9-14, 20-33, 43,83 e 115-6.

- CROCE, A. - O direito à alimentação. Cidade Nova, (9): 16-7, 1986.
- CROSBY, D.G.; LEITIS, E.; WITERLIN, W.L. - Carbamate inseticidas. Photodecomposition of carbamate, inseticidas. J. agric. Food Chem. Washington, 13(3): 204-7, 1965.
- CROSSLEY, J. - GLC and TLC determination of tetraethyl pyrophosphate (TEPP). J. Assoc. off. agric. Chem., Washington, 53(3): 1036-9, 1970.
- CURI, M. - Quem acolhe o menor, a mim me acolhe. Cidade Nova.(3): 6-9, 1987.
- DECLARAÇÃO UNIVERSAL DOS DIREITOS HUMANOS. 1948. 5a. ed. São Paulo, Paulinas e CESE, p.22-5, 1984.
- EBERLE, D.O. & NOVAK, D. - Fate of diazinon in field-sprayed agricultural crops, soil and olive oil. J. Assoc. off. anal. Chem., Washington, 52: 228, 1969.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, D.; Jr. ANDRESU - A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol., Oxford, 7: 88-95, 1961.
- EL-REFAI, A. & HOPKINS, T.L. - Thin-layer chromatography and cholinesterase detection of several phosphorothions insecticides and their oxygen analogs. J. agric. Food Chem., Washington, 13: 477-81, 1965.
- ERNST, G.F.; RODER, S.J.; TJAN, G.H.; JANSEN, J.T.A. - Thin-layer

- chromatographic detection and indirect gas chromatographic determination of three carbamate pesticides. J. Assoc. off. anal. Chem., Washington, 58: 1015-9, 1975.
- ERNST, G.F.; PIETERSE, C.; MARTENS, L.J.H. - Comparison of drosophila rat-liver and bee-head esterases in detection residues of organophosphorus and carbamate pesticides in vegetables and fruits. J. Chromatogr. Amsterdam, 133: 245-51, 1977.
- ERNST, G.F. & SCHURING, F. - A modified enzymatic detection method for thin-layer chromatograms of pesticides. J. Chromatogr., Amsterdam, 49: 325-8, 1970.
- FECHNER, G.; ACKERMANN, H.; TOEPFER, H. - Bestimmung von DDVP in luft. Fresenius. Z. Anal. Chem. 246, 259 (1969b). Apud: MENDOZA, C.E. - Analysis of pesticides by the thin-layer chromatographic enzyme inhibition technique. Residue Rev., New York, 43: 105-42, 1972.
- FECHNER, G.; ACKERMANN, H.; LEXOW, B. - Dünnschichtchromatographische bestimmung von dimethoate und PO-Dimethoate in Milch. Z. Lebesm. Untersuch. u Forsch. 140, 145 (1969a). Apud: MENDOZA, C.E. - Analysis of pesticides by the thin-layer chromatographic enzyme inhibition technique. Residue Rev., New York, 43: 105-42, 1972.
- FLEISHER, J.H. & HARRIS, L.W. - Dealkylation as a mechanism for aging of cholinesterase after poisoning with pinacolyl methyl\_

- phosphonofluoridate. *Biochem. Pharmacol.*, 1965, 14, 641-650.
- Apud: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G.; RALL, T.W. & MURAD, F. - As bases farmacológicas da terapêutica. 7a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1987. p.79-80.
- GARDNER, A.M. - Confirmation of organophosphorus pesticide residue at manogram levels by two-dimensional thin-layer chromatography. J. Assoc. off. agric. Chem., Washington, 54(3): 517-24, 1971.
- GEARY, J.M. - Pesticides and the total environment. *Pestic monit. J.*, Atlanta, 1(1): IV-V, 1967. Apud: AZEVEDO, F.A. de - Determinação dos níveis séricos de inseticidas organoclorados em trabalhadores expostos. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1979. (Dissertação - Mestrado)
- GETZ, M.E. & FRIEDMAN, S.J. - Organophosphate pesticide residues: a spot test for detecting cholinesterase inhibitors. J. Assoc. off. agric. Chem. Washington, 46: 707-10, 1963.
- GIANNOTTI, O.; ORLANDO, A.; PUZZI, D.; CAVALCANTI, R.D.; MELLO, E.R. - Noções básicas sobre praguicidas. Generalidades e recomendações de uso na agricultura do Estado de São Paulo. Biológico, São Paulo, 38: 223-35, 1972.
- GONÇALVES, J.S. & cols. - Defensivos agrícolas. Contribuição da Pesquisa Agropecuária: atuação da CPA em 1983, CPA, São Paulo, 2(3): 11, maio/junho, 1984.

- GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G.; RALL, T.W. & MURAD, F. - As bases farmacológicas da terapêutica. 7a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1987. p. 76-81.
- GRANT, D.L.; SHERWOOD, C.R.; McCULLY, K.A. - Gás-liquid and thin layer chromatography of phorate disulfoton and five of their oxidation products. J.Chromatogr., Amsterdam, 44: 67-74, 1969.
- HAMBLIN, L. - Poluição: a crise mundial. Rio de Janeiro, Americana, 1973, p.65, 70-7, 79.
- HAYES, W.J. - Toxicology of pesticides. Baltimores, Williams & Wilkins, 1975. p. 325-7. Apud: LEITE, C. de M. - Identificação de inseticidas organofosforados e carbamatos pela técnica de inibição sobre camada delgada. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1980. (Dissertação - Mestrado)
- HEYNDRICKY, A.; VERCRUYSSSE, A.; NOE, M. - A review of fortyone cases of parathion (E-605) poisoning by man. J. Pharm. Belg., Bruxelles, 22: 127-40, 1967.
- HODGE, H.C. & STERNER, J.H. - Tabulation of toxicity classes AIHA Quart., 10: 93-96, 1949. Apud: CARARETT, L.J. & DOULL J. - Toxicology the basic science of poisons, New York, MacMillan, 1975. p.24.
- ITAL analisa causas da mortandade de peixes em MS. Jornal Campinas, Campinas, 06 de nov. 1985.
- JAGER, K.W. - Aldrin, dieldrin, endrin & telodrin. Amsterdam, El

sevier, 1970. p.3-19. Apud: AZEVEDO, F.A. de - Determinação dos níveis séricos de inseticidas organoclorados em trabalhadores expostos. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1979. (Dissertação - Mestrado)

JOHNSON, M.K. - The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters. In: Reviews in Biochemical Toxicology. Vol. 4 (Hodgson, E.; Band, E.; and Philpot, R.M.; eds) Elsevier Publishing Co., New York, 1982. pp 141-272. Apud: GORDMAN, L.S.; GILMAN, A.G.; RALL, T.W. & MURAD, F. - As bases farmacológicas da terapêutica. 7a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1987. p.79-80.

KARANTH, N.G.K.; SRIMATHI, M.S. & MAJUMDER, S.K. - A chromogenic paper for ultrarapid detection of organochlorine insecticide residues in vegetables. Bull. Environm. Contam. Toxicol., 28: 221-24, 1982.

KUMAR, N.V.N.; VISWESWARIAH, K.; MAJUMDER, S.K. - Thin-layer chromatography of parathion as paraoxon with cholinesterase inhibition detection. J. Assoc. off. agric. Chem., Washington, 59: 641-3, 1976.

KUMAR, N.V.N. & RAMASUNDARI, M. - Colorimetric determination of methyl parathion and oxygen analog. J. Assoc. off. anal. Chem., Washington, 63(3): 536-8, 1980.

LARA, W.H.; BARRETO, H.H. & INOMOTA, O.N.K. - Níveis de BHC e DDT em peixes, camarões e ostras do litoral de Santos, Estado de São Paulo. Síntese, Merck (8): 3-7, 1985.

LARINI, L. - Toxicologia dos inseticidas. São Paulo, Sarvier, 1979. p.1-71.

LEITE, M.C. de M. - Padronização cromatográfica em camada delgada para a identificação de inseticidas organoclorados e sua aplicação na análise de milho. Alfenas, Fundação de Ensino e Tecnologia de Alfenas - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, 1985. (Trabalho - PCQ).

LEITE, C. de M. - Identificação de inseticidas organofosforados e carbamatos pela técnica de inibição enzimática/cromatografia sobre camada delgada. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1980. (Dissertação - Mestrado).

LEONI, V. - The separation of fifty pesticides and related compounds and polychlorobiphenyls into four groups by silica gel microcolumn chromatography. J. Chromatogr., Amsterdam, 62:63-71, 1971.

(MAB) INTERNATIONAL CO-ORDINATING COUNCIL FOR THE MAN AND THE BIOSPHERE PROGRAMME - Expert consultation on project 9: ecological assessment of pest management and fertilizer use on terrestrial and aquatic ecosystem (part on pesticides); final report s.L.p. Unesco, 1980 (MAB report series, 24).

MAIA, R. & BRANT, P.C. - Estudo comparativo da contaminação da carne bovina por resíduos clorados nas regiões do Estado de Minas Gerais, Brasil. Síntese, Merck, (4): 17-21, 1983.

MARICONI, F.A.M. - Inseticidas e seu emprego no combate às pragas. 3a. ed. São Paulo, Nobel, 1977. V.1 , p.8, 95-102, 133.

- MATTSON, A.M.; KAHRS, R.A.; MURPHY, R.T. - Routine quantitative residue determinations of S-(2-methoxy-5-oxo- $\Delta^2$ , 1,3,4-thiadiazolin-r-yl) methyl O,O-dimethyl phosphorodithioate (supracide) and its oxygen analog in forage crops. J. agric. Food Chem., Washington, 17: 565-70, 1969.
- MAY, A.R. - Cromatografia em camada delgada. Curitiba, 1965. p.24.
- McKINLEY, W.P. & READ, S.I. - Esterase inhibition technique for the detection of organophosphorus pesticides. J. Assoc. off. agric. Chem., Washington, 45: 467-73, 1962.
- McLINLEY, W.P. & JOHAL, P.S. - Esterase inhibition technique for the detection of organophosphorus pesticides. II- Simplified version for routine Checking. J. Assoc. off. agric. Chem., Washington, 46: 840-2, 1963.
- MELLO, D. - Animais domésticos e silvestres e os pesticidas. In: CONGRESSO DE TOXICOLOGIA TROPICAL, 1º, Anais. p.83-9, Manaus, 1976.
- MELLO, D. & cols. - Toxicidade do triclorfon para ratas da linhagem Wistar, de 1 a 12 meses de idade. Biológico, São Paulo, 41: 3-5, 1975.
- MENDOZA, C.E. - Thin-layer chromatography and enzyme inhibition techniques. J. Chromatogr., Amsterdam, 78: 29-40, 1973.
- MENDOZA, C.E. - Analysis of pesticides by the thin-layer chromatographic-enzyme inhibition technique. Residue Rev. New York, 43:

105-42, 1972.

MENDOZA, C.E. - Analysis of pesticides by the thin-layer chromatographic enzyme inhibition technique. Part II. Residue Rev. New York, 50: 43, 1974.

MENDOZA, C.E. & SHIELDS, J.B. - Esterase specificity and sensitivity to organophosphorus and carbamate pesticides: factors affecting determination by thin-layer chromatography. J. Assoc. off. anal. Chem., Washington, 54:507-12, 1971.

MENDOZA, C.E.; WALES, P.S.; BRAY, D.F. - Consistency of Rst values of six organophosphorus pesticides of paint extracts without elaborate clean-up. Analyst, London, 93: 688-90, 1968.

MENDOZA, C.E.; WALES, P.J.; McLEOD, H.A.; McKIMLEY, W.P. - Enzymatic detection of ten organophosphorus pesticides and Carbaryl on thin-layer chromatograms: an evaluation of indoxyl, substituted indoxyl and 1-naphthyl acetates as substrates of esterases. Analyst, London, 93: 34-8, 1968.

MENDOZA, C.E.; WALES, P.J.; McLEOD, H.A.; McKINLEY, W.P. - Thin-layer chromatographic-enzyme inhibition procedure to screen for organophosphorus pesticides in plant extracts without elaborate cleanup. Analyst, London, 93: 173-7, 1968.

MENDOZA, C.E.; WALES, P.J.; GRANT, D.L.; MECYLLY, K.A. - Effect of bromine and ultraviolet light pesticides detected with liver esterase of five species. J. agric. Food Chem., Washing-

ton, 17: 1196-8, 1969.

MENN, J.J. & McBAIN, J.B. - Detection of cholinesterase inhibiting insecticide chemicals and pharmaceutical alkaloids on thin-layer chromatograms. Nature, London, 209: 1351-2, 1966.

MENN, J.J.; McBAIN, J.B.; DENNIS, M.J. - Detection of naturally occurring cholinesterase inhibitors in several crops by paper chromatography. Nature, London, 202: 697-8, 1964.

MICHEL, H.O. - An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. J. Lab. clin. Med., Saint Louis, 34: 1564-8, 1949.

MIDIO, A.F. - Aspectos de análise toxicológica de inseticidas em material biológico. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1974. (Dissertação - Mestrado).

MIDIO, A.F. - Rodamina B como agente cromogênico na cromatografia em camada delgada de inseticidas clorados. Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo, 9 (1): 225-34, Jan/jun., 1971.

MORAES, I. de O. - Alternativas biológicas para o controle de insetos. Assoc. Brasil. das Indust. da Alimentação. Alimento. Campinas, (78): 35, Mai/jun., 1985.

MORAES, E. de C.F. - Aspectos bioquímicos da intoxicação e índice de exposição. Rev. brasil. Saúde ocup., São Paulo, 6(21): 48-51, 1978.

- NAVARRO, J.G. & CORNWELL, E.S. - Determination of paraoxon by combined bovine liver esterase inhibition and gas-liquid chromatography. J. Chromatogr., Amsterdam, 138: 423-9, 1977.
- NISHIKAWA, A.M.; FAY, E.F.; CARVALHO, J.P. de P. & ARANHA, S. - Níveis de resíduos de praguicidas organoclorados em conservas de carne bovina. Biológico, São Paulo, 48(8): 189-93, 1982.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA. Quadro de Expertos em Resíduos de plaguicidas el Medio ambiente & ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Grupo de Expertos em Resíduos de plaguicidas. - Resíduos de plaguicidas en los alimentos. Ginebra, OMS, 1977. (Organização Mundial de la Salud. Série de informes técnicos, 612).
- OGATA, J.N. & BEVENUE, A. - Chlorinated pesticide residues in honey. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology, New York, 9(3): 143-147, 1973. Apud: PEIXOTO, T.M.A.G. & FRANKLIN, H.M. de O. - Níveis de inseticidas organoclorados em mel de abelha. Bol. SBCTA, Campinas, 20(3/4): 195-200, 1986.
- ORTLOFF, R. & FRANZ, P. - Zweinene methoden der biochemischen lokalisierung von phosphorhaltigen insektiziden auf dünschichtchromatogrammen. Z. Chem. (Leipzig). Vol. 5, p.388, 1965. Apud: Residue Rev., New York, 43: 105-42, 1972.
- OTT, D.E. & GUNTHER, F.A. - Colorimetric method for field screening above - tolerance parathion residus on and in citrus fruits. J. Assoc. off. anal. Chem., Washington, 66(1): 108-10, 1983.

- PAIXÃO, V.C. - O Mel. Produção, tecnologia, comercialização. Coleção Técnica Agrária. Lisboa Clássica Editora, s.d., p.13,24,115.
- PEIXOTO, T.M.A.G. & FRANKLIN, H.M. de O. - Níveis de inseticidas organoclorados em Mel de Abelha. Bol. SBCTA, Campinas, 20(3/4): 195-200, 1986.
- PRADO, A.B. & cols. - Aspectos toxicológicos dos inseticidas organofosforados. Faculdade de Ribeirão Preto, 1974.
- PRADO, A.B.; SILVA, H.C.; CARVALHO, D.; LARINI, L.- Envenenamentos (inquérito em Ribeirão Preto) Rev. Bras. Med., 30(1), Janeiro, 1973. Apud: LARINI, L. - Toxicologia dos inseticidas, São Paulo, Sarvier, 1979, p.6.
- PROFETA, G.R. - Intoxicação por organofosforados. ARS CURANDI, Rio de Janeiro, p.72-84, Jan/Fev. de 1983.
- PUGA, F.R.; MELLO, D.; GAETA, R. - Determinação da toxicidade dérmica de pesticidas em ratos por diferentes métodos. Biológico, São Paulo, 44: 11-16, 1978.
- PUGA, F.R. - O Desenvolvimento das operações com defensivos e seus aspectos ecológicos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE AVIAÇÃO AGRÍCOLA, II, São José dos Campos. Anais. p.29;34, 1980.
- RECEITA agrônômica: nova ameaça ao setor. Quim. Deriv., São Paulo, (157): 12-29, 1979.
- REIS, P.R. - Manual para o controle de pragas das principais cul-

turas em Minas Gerais. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 5(57): 2-3, Set. 1979.

RIBEIRO, E.B. - Farmacognosia. Drogas de origem animal. Florianópolis, Fac. Farm. e Od. de Santa Catarina, p.32-4, 1959.

ROCHA, E.E.M. da; OLIVEIRA, F. de; MORINIGO, F.; HONIGMAN, I. - Intoxicações por inseticidas. J. bras. Med.; Rio de Janeiro, 23(2): 152, 1972.

RODRIGUES, D.C.; PLANET, N. & GIANNOTTI, O. - Intoxicações por inseticidas. Biológico, 23: 137-40, 1957. Apud: LARINI, L. - Toxicologia dos inseticidas, São Paulo, Sarvier, 1979. p.3.

SANDRONI, S. & SCHLITT, H. - A screening method for organochlorine and phosphorus pesticide residues in vegetables using thin-layer chromatography. J. Chromatogr., Amsterdam, 55: 385-94, 1971.

SCHUTZMANN, R.L. - Note on improved spray reagentes for TLC fluorogenic detection of cholinesterase inhibitors. J. Assoc. off. anal. Chem., Washington, 53: 1056-7, 1970.

SECRETARIA DA AGRICULTURA- Projeto Apicultura. O mel hoje: uma doce mania. Belo Horizonte. 4p. s.d.

SOARES, J.A.A. - Análise de defensivos organoclorados em alimentos. Contagem, Centro Integrado de Apoio à produção. 1981. p.1-2. Apud: LEITE, M.C. de M. - Padronização cromatográfica em cama-

da delgada para a identificação de inseticidas organoclorados e sua aplicação na análise de milho. Fundação de Ensino e Tecnologia de Alfenas. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, 1985. (Trabalhos - PCQ)

STEWART, D.K.R.; CHISHOLM, D.; RAGAB, M.T.H. - Long term persistence of paration in soil. Nature, London, 229: 47, 1971.

SUÁREZ, V.C. del M. - Controle de insetos sem inseticidas químicos. In: CONGRESSO DE TOXICOLOGIA TROPICAL, 1º, Anais. p.437-41. Manaus, 1976.

SUNSHINE, J. - Methodology for analytical toxicology, Cleveland, CRC Press, 1975. p. 288-9.

THIENES, C.H. & HALEY, J.J. - Clinical Toxicology. 4a. ed., 1972, Lee & Sabiger, Philadelphia. Apud: PROFETA, G.H. - Intoxicação por organofosforados. ARS CURANDI, Rio de Janeiro, p. 72-84, Jan/Fev. 1983.

UNGARO, M.T.S. & cols. - Resíduos de inseticidas clorados e fosforados em frutas e hortaliças. Biológico, São Paulo, 49(1):1-8, 1983.

UNGARO, M.T.S. & cols. - Resíduos de inseticidas clorados e fosforados em frutos e hortaliças. Síntese, Merck, (7): 12-15, 1984.

URBANO, Jr., J.D. - Uma estratégia de renegociação mais junta. Cidade Nova, (8): 23, 1986.

- VIANA, L. de S. - Apicultura. Fac. Medicina Veterinária, s.d. p. 15-17.
- WALES, P.J.; MENDOZA, C.E.; McLEOD, H.A.; MsKINLEY, W.P. - Procedure for semi-quantitative confirmation of some organophosphorus pesticides residues in plant extracts. Analyst, London, 93: 691-3, 1968.
- WINTERLIN, W.; WALKER, G.; FRANK, H. - Detection of cholinesterase-inhibiting pesticides following separation on thin-layer chromatograms, J. agric. Food Chem., Washington 16:808-12, 1968.
- YOKOMIZO, Y. & cols. - Resíduos de pesticidas organoclorados em peixes de água doce no Estado de São Paulo. Síntese, Merck(3): 3-8, 1982.
- YOKOMIZO, Y. & CARVALHO, P.R.N. - Resíduos de pesticidas em alimentos, Campinas, ITAL, SBCTA, 1985.
- ZAMBRONE, F.A.D.- Perigosa família. Ciência Hoje. SBPC. 4(22): 44-5, 1986.