

ESTUDOS COM ZINEB-¹⁴C EM SUSPENSÃO AQUOSA E EM FOLHAS DE TOMATEIRO*

M.Raphaela Musumeci**, Elza F. Rüegg**, C.A.Campacci***

RESUMO

Estudou-se a degradação do zineb-¹⁴C no metabólito etilenotiouréia (ETU) em solução aquosa e nas folhas de tomateiro. Em suspensão aquosa o zineb degradou-se em ETU, já nas primeiras 8 horas de incubação, prosseguindo essa degradação com os períodos mais longos de tratamento em pH 6,0 e 7,0 e a temperatura de 30°C. A ETU, detectada nas folhas de tomateiro, já estava presente na formulação aplicada, sendo detectados resíduos desse metabólito nas folhas até 21 dias após a aplicação.

PALAVRAS-CHAVE - Fungicidas: ditiocarbamatos; etilenotiouréia.

SUMMARY

Studies with ¹⁴C-zineb on aqueous suspension and tomato leaves

¹⁴C-zineb degradation in ethylenethiourea (ETU) was studied in aqueous suspension and on tomato leaves. In aqueous suspension zineb decomposes in ETU, in the first 8 hours of incubation; degradation proceeds with the incubation time, in pH 6.0 and 7.0 at 30°C. ETU was detected in tomato leaves, and though already present in the formulation applied to plants, residues were detected even 21 days after the application.

KEY-WORDS - Dithiocarbamates fungicides; ethylenethiourea

INTRODUÇÃO - Os fungicidas do grupo etilenobisditiocarbamatos utilizados no controle de doenças de várias culturas têm despertado o interesse para o estudo toxicológico e ecológico devido à presença de um de seus metabólitos, a etilenotiouréia (ETU). Este composto constatado em culturas pulverizadas com os etilenobisditiocarbamatos (EBDCs) (1) apresenta propriedades carcinogênicas, e em altas doses pode produzir em animais de laboratório carcinoma da tireóide e tumores no fígado (7).

Dados sobre resíduos de ETU são virtualmente inexistentes, em nosso meio, assim esta investigação teve a finalidade de verificar a decomposição de um fungicida desse grupo, o zineb (etilenobisditiocarbamato de Zinco) em ETU, em suspensão aquosa e no tecido vegetal, escolhendo-se por facilidade de estudos iniciais as folhas de tomateiro, anteriormente à pesquisa com frutos no campo.

MATERIAL E MÉTODOS - *Compostos.* Zineb-¹⁴C marcado nos carbonos 1 e 2 do etileno (fornecido pelo Instituto de Isótopos, Budapeste, Hungria), com atividade específica de 3,071 MBq/mg.

Zineb formulado (75% i.a.).

Etilenotiouréia (ETU) e Etilenouréia (EL), grau analítico, como padrões de referência.

Análise da degradação em solução aquosa - Devido à instabilidade do zineb em água, suspensões aquosas do zineb-¹⁴C (0,37 KBq/ml), acrescidas de 30,0mg do zineb formulado em 100ml de tampão PO₄ (pH 5,0; 6,0 e 7,0) foram mantidas em incubadeiras a temperaturas de 18,25 e 30°C, iluminadas por luz fluorescente de 12h/dia. Em diferentes períodos de incubação, desde zero a 24 dias, alíquotas de 1,0ml foram removidas, liofilizadas, retomadas em 1,0ml de metanol e 400 ml foram aplicadas em cromatoplasas de celulose (Merck, celulose F), desenvolvidas em isopropanol: água (85:15). Após secagem à temperatura ambiente, os cromatogramas foram expostos a filmes de raios-X (Kodak XK-1) por 3 semanas. As zonas da celulose correspondentes à ETU foram raspadas e contadas ao espectrômetro de cintilação em líquido. A concentração de ETU, apresentada em porcentagens, foi obtida dividindo-se o número de desintegrações por minuto da zona de ETU pelo total aplicado na cromatoplasa.

Aplicação e análise das folhas - Foram utilizadas plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) (cv.Sta.Cruz), com 5 semanas

* Financiado pela Agência Internacional de Energia Atômica (Viena)

** Pesquisador Científico, Centro de Radioisótopos, Instituto Biológico

*** Pesquisador Científico, Seção de Resíduos, Instituto Biológico

de idade, desenvolvidas em estufa e transplantadas para vasos.

Seis folhas de cada planta foram tratadas com 100ml da suspensão aquosa do fungicida (37 KBq/ml de zineb-¹⁴C, acrescido de 500 ppm do zineb formulado, 75% i.a. em 100ml de água), aplicadas em forma de pequenas gotas na superfície das folhas. Foram utilizadas 18 plantas mantidas após o tratamento fora da casa de vegetação, expostas às condições naturais de temperatura, luz e umidade.

Nos tempos de 0, 1, 3, 7, 14 e 21 dias após o tratamento, procedeu-se a coleta das folhas (12 folhas em cada tempo), que foram submersas por 40 minutos em água (30ml) e, a seguir em uma solução de EDTA 0,4M (30ml) para retirada do zineb não degradado (8). A seguir as folhas foram homogeneizadas num almofariz com gelo seco e extraídas duas vezes com água gelada (20ml). O radiocarbono retirado pela água de lavagem, pelo EDTA, e pela extração aquosa, foi quantificado pela contagem de alíquotas (0,5ml de água de lavagem e do extrato aquoso, 100ml da solução de EDTA), ao espectrômetro de cintilação em líquido (4).

Para acompanhar a degradação do zineb em ETU, as amostras aquosas foram liofilizadas, retomadas em 2,0ml de metanol e, 500ml aplicados em cromatoplaças de celulose, desenvolvidas em isopropanol: água (85:15). Os padrões de referência dos metabólitos ETU e EL foram cromatografados na mesma cromatoplaça. Após o desenvolvimento, as placas foram expostas a filmes raios-X (Kodak XK-1) por 3

semanas, e depois da revelação, a zona da placa correspondente a ETU foi raspada e contada por cintilação em líquido (4). A porcentagem de metabolismo foi expressa pelo valor de contagem da mancha dividido pelo total de radiocarbono aplicado às placas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES - A presença de ETU como contaminante de formulações de fungicidas ditiocarbamatos foi descrita por BOTOYAN *et alii* (2). Pequena quantidade de ETU (4%) estava presente na formulação do zineb, empregada nestes experimentos (Tabela 1). Entretanto, observou-se acentuada decomposição do fungicida em suspensão aquosa, no período de incubação de 8 horas em pH 6,0 e 7,0. Após 4 dias, a quantidade de ETU aumentou consideravelmente em todos os tratamentos. Assim, ressalta-se a importância da utilização rápida da calda de pulverização após o seu preparo, pois a manutenção do fungicida em suspensão aquosa por períodos superiores a 8 horas, acarreta considerável concentração de ETU. Por sua vez a aplicação em mistura desse fungicida com agrotóxicos com pH igual ou superior ao pH 7,0 poderá levar a uma degradação mais intensa do fungicida com maior concentração de ETU na calda de pulverização a ser empregada.

Verificou-se uma associação entre a temperatura de 30°C e a incubação em pH 7,0, levando a maior porcentagem de degradação do zineb em ETU nessas condições (Tabela 1).

Nas folhas de tomateiro que receberam a aplicação de Zineb-¹⁴C a maior concentração do

TABELA 1 - Decomposição do zineb-¹⁴C em suspensão aquosa determinada por cromatografia em camada delgada como porcentagem de etilenotiouréia.

Tempo de incubação	pH	5			6			7		
	Temp (°C)	18	25	30	18	25	30	18	25	30
Horas										
0		4,0	4,0	4,0	3,9	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
1		5,2	4,0	4,5	4,0	5,0	5,3	6,0	8,3	6,8
2		6,8	6,4	4,1	4,4	7,2	7,2	7,3	9,7	8,7
8		4,4	6,5	6,0	9,3	13,0	8,7	9,3	8,5	8,7
Dias										
1		4,2	5,1	5,8	6,9	6,2	5,6	13,0	10,0	14,0
4		11,0	17,0	15,3	16,0	11,0	23,0	22,0	14,0	21,0
7		13,0	18,0	25,0	17,0	18,0	27,0	27,0	27,0	41,0
14		32,0	22,0	16,0	24,0	20,0	13,1	30,0	40,0	40,0
21		28,0	40,0	27,0	19,0	25,0	20,0	33,0	19,0	20,0

radiocarbono encontrada na água de imersão indica facilidade de remoção pela água, nos períodos iniciais do contacto do fungicida com o tecido vegetal, pois a concentração de radiocarbono removida pela imersão das folhas na água, diminui consideravelmente em função do tempo, após a aplicação do fungicida. Paralelamente, altas porcentagens foram detectadas nos extratos aquosos das folhas coletadas nos intervalos de tempo com maior contacto com o fungicida (14 e 21 dias após a aplicação do zineb-¹⁴C), indicando absorção dos metabólitos hidrossolúveis para o interior do tecido vegetal (Tabela 2).

TABELA 2 - Porcentagens do radiocarbono detectadas nas folhas de tomateiro após aplicação do zineb-¹⁴C

Tempo (dias)	Água de imersão	EDTA	Extrato aquoso
0	80,0	12,0	3,9
1	69,0	15,0	13,0
3	52,0	17,0	23,0
7	52,0	18,0	23,0
14	38,0	15,0	36,0
21	24,0	20,0	48,0

Houve uma intensa degradação do fungicida, pois, seis manchas foram detectadas nos radioautocromatogramas dos liofilizados da água de lavagem e extratos aquosos das folhas tratadas com zineb. Foram identificados os metabólitos ETU e EL por co-cromatografia com os padrões de referência. Os demais metabólitos não foram identificados.

Os resultados indicam a presença de ETU durante todo o período de observação. Uma porcentagem elevada de ETU foi detectada, já no tempo zero do experimento (Tabela 3) e, apesar de declinar com o tempo, permaneceu, mesmo após 14 e 21 dias.

TABELA 3 - Concentração de etilenotiouréia (porcentagens e ppm) detectadas pela cromatografia em camada delgada da água de imersão das folhas tratadas com zineb-¹⁴C durante vários dias.

Tempo (dias)	Concentrações ETU (Rf 0.66)	
	%	ppm
0	50	1,2
1	59	1,2
3	30	0,5
7	15	0,25
14	8	0,09
21	3	0,02

Evidencia-se ainda pelos cromatogramas dos extratos de folhas que a ETU também é encontrada no interior dos tecidos, alcançando sua concentração mais alta em 7 e 14 dias após a aplicação, provavelmente em consequência da absorção do metabólito pela planta (Tabela 4).

TABELA 4 - Compostos detectados em extratos aquosos de folhas de tomateiro por cromatografia em camada delgada (% em relação ao total de radiocarbono na cromatografia.)

Compostos (Rfs)	Tempo (dias)				
	1	3	7	14	21
Origem (0.00)	15	16	12	9	10
Não identificado (0.22-0.27)	12	14	20	19	35
Etilenotiouréia (0.58)	16	19	13	17	12
Etilenotiouréia (0.66)	38	34	50	55	43
Não identificados (0.78)	20	17	5	ND	ND

ND = Não foi detectado

De acordo com os dados obtidos a degradação do zineb nas folhas de tomateiro origina níveis de ETU que declinaram durante o período analisado, semelhante aos resultados obtidos na alface e no repolho (9) e no tomate (5,6). Segundo a legislação brasileira os índices permitidos para os resíduos de zineb nas partes vegetais comestíveis, variam de 0,05 a 7ppm segundo a cultura e devem ser livres de ETU (3). Todavia, a ETU já se encontrava presente na formulação (Tabela 1) e, apesar de presente também na solução aquosa aplicada às folhas (Tabela 3) os resultados não indicam uma persistência da ETU no tecido vegetal, embora a degradação desse metabólito, após 21 dias, se apresente ainda como resíduo de 3%, correspondente a uma concentração de 0,02ppm. Esse resíduo, contudo, é resultante de uma única aplicação do fungicida, fato que não ocorre, na prática agrícola, na cultura do tomate, onde as aplicações no fruto são semanais e se iniciam desde a inflorescência. Assim a possibilidade de maior resíduo de ETU no fruto em consequência das aplicações repetidas do fungicida não deve ser descartada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ENGST, R. & SCHNAAK, W. Residues of dithiocarbamate fungicides and their metabolites on plant foods. *Residue Rev.*, 52:45, 1974.
2. BONTOYAN, W.R.; LOOKER, J.B.; KAISER, T.E.; GIANG P.; OLIVE, B.M. Survey of ethylenethiourea

- in commercial ethylenebisdithiocarbamate formulations. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 55:923, 1972.
- 3 . BRASIL. Departamento Nacional de Vigilância Sanitária Animal. *Substâncias com ação tóxica sobre animais e/ou plantas*. 2.ed. rev. Banco do Brasil, DESED/DENAR, 1985. p.177.
- 4 . MUSUMECI, M.R. & RÜEGG, E.F. Degradação Microbiana do fungicida metalaxil no solo. *Fitopatol. Bras.*, 9:583, 1984.
- 5 . NASH, R.G & BEAL Jr., M.L. Fate of Maneb and Zineb fungicides in micro-ecosystem chambers. *J. Agric. Food. Chem.*, 28:322, 1980.
- 6 . NEWSOME, W.H.; SHIELDS, J.B.; VILLENEUVE, D.C. Residues of Maneb, Ethylenethiuran monosulfide, ethylenethiourea, and ethylenediamine on Beans and Tomatoes field treated with Maneb. *J. Agric. Food Chem.*, 23:756, 1975.
- 7 . ULLAND, B.M.; WEISBURGER, J.H.; WEISBURGER, E.K.; RICE, J.M.; CYPHER, R. Thyroid Cancer in rats from ethylenethiourea intake. *J. Nat. Cancer Inst.*, 49:583, 1972.
- 8 . VONK, J.W. *The fate of ¹⁴C-labelled zineb on lettuce plants*. Joint FAO/IAEA Division on Atomic Energy in Food and Agriculture, 1975. p.107.
- 9 . YIP, G.; ONLEY, J.H.; HOWARD, S.F. Residues of Maneb and Ethylenethiourea on field-sprayed lettuce and Kale. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 54:1373, 1971.