

Foto: Cláudio de Norões Rocha



Determinação de Carbendazim em Melão por Imunoensaio: um Método Rápido e Seguro

Maria Elisabeth Barros de Oliveira¹
Oscarina Maria da Silva Andrade²
René Peter Schneider³
Anamaria Mayer Dentzien⁴
Rosângela Blotta Abakerli⁵
Glauciane Bastos de Almeida⁶
Cícera Lorena Justo Rodrigues⁷

Um dos principais obstáculos para maior inserção da fruticultura nacional nos mercados internacionais de frutas de mesa é a inexistência de um sistema de monitoramento dos resíduos de pesticidas que permita comprovar a garantia da qualidade dos produtos e a conformidade com os limites máximos de resíduos de pesticidas (LMRs) (Carraro & Cunha, 1994). A solução ideal será conduzir a seleção dos produtos agrícolas na propriedade ou no galpão de embalagem (*packing house*). Isso permitirá eliminar produtos que não satisfaçam os parâmetros de qualidade exigidos pelo comprador e/ou pela legislação na etapa inicial de comercialização.

Carbendazim (nome técnico) é um fungicida sistêmico de largo espectro no tratamento de frutas e vegetais. Pertence ao grupo dos benzimidazoles. Quimicamente, carbendazim é o 2- metoxycarbonilamino-benzimidazol (MBC), se constitui produto de degradação do benomil, em solução aquosa, e seu principal princípio fungitóxico tem a fórmula estrutural mostrada na Figura 1; sua fórmula molecular é $C_9H_9N_3O_2$ e tem a seguinte sinonímia: Derosol[®], Bom-Carbozol 200PW, Delsene[®]. Quando aplicado ao solo,

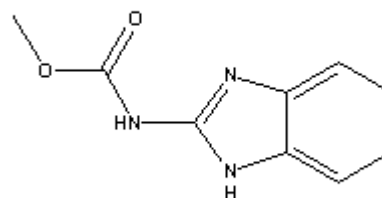


Fig. 1. Fórmula estrutural do carbendazim.

carbendazim é influenciado pelo tipo de solo, temperatura e pela esterilização do solo, o que sugere estarem os microrganismos envolvidos na decomposição desse produto (Zambolim & Chaves, 1989).

Recentemente, foram desenvolvidos métodos baseados em imunoensaios para detecção de contaminantes que apresentam excelente sensibilidade, rapidez de resposta e baixo custo operacional (Meulenberg et al., 1995; Van Emon & Gerlach, 1995; Schneider, 1997). Esses sistemas são específicos para princípios ativos e permitem estabelecer uma estratégia de seleção para monitoramento de

¹ Eng. Química, M. Sc., Embrapa Agroindústria Tropical. Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici, CEP 60511-110 Fortaleza, CE. E-mail: elisabet@cnpat.embrapa.br

² Eng. Agrôn. M. Sc., Embrapa Agroindústria Tropical.

³ Biólogo, Prof. Dr., Universidade de São Paulo, Departamento de Microbiologia.

⁴ Bióloga, M. Sc., Embrapa Meio Ambiente. Rod. SP 340, Campinas/Mogi, Km 127,5, C. Postal 69, CEP 13820-000 Jaguariúna, SP. sac@cnpma.embrapa.br

⁵ Química, Ph. D., Embrapa Meio Ambiente.

⁶ Bolsista da Embrapa Agroindústria Tropical.

⁷ Bolsista PIBIC/CNPq.

pesticidas-problema, compostos que produzem resíduos restritivos em determinadas culturas.

O fator mais importante, porém, é a simplicidade do teste, que permite a análise pelo técnico ou mesmo pelo próprio produtor. A maior desvantagem da tecnologia de imunoensaios é a especificidade relativamente alta dos testes, que não permite a análise simultânea de resíduos de pesticidas com estruturas moleculares distintas.

Como funciona o kit?

O kit, que pode ser adquirido por importação, é um teste semiquantitativo, planejado para detectar resíduos de carbendazim em frutas. O kit é baseado na tecnologia de teste ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay). Especificamente, anticorpos para carbendazim são imobilizados na superfície interior dos pocinhos usados para condução do ensaio, com os sítios de ligação do pesticida nos anticorpos disponíveis para interação com pesticida da solução. Durante o teste, uma amostra com pesticida é incubada em conjunto com uma alíquota de imunoconjugado. O imunoconjugado consiste do mesmo pesticida da análise unido por ligação química covalente a uma enzima que, no caso do kit comercializado pela empresa Envirologix, é a peroxidase de rábano-picante (*horseradish*). O pesticida da amostra compete com o pesticida ligado à peroxidase pelos sítios de ligação do anticorpo. Quanto menor é a quantidade de pesticida na amostra, tanto maior a quantidade de imunoconjugado ligada aos anticorpos do pocinho. O material (pesticida da amostra ou imunoconjugado) não ligado aos anticorpos é removido por lavagem. Em seguida, é inserida uma solução de revelação nos pocinhos, que contém o substrato da peroxidase. Após um tempo de incubação predeterminado, a reação enzimática é interrompida pela adição de uma solução de interrupção. O produto dessa reação enzimática é colorido (cor azul). A intensidade da cor depende da quantidade de imunoconjugado ligado aos anticorpos do pocinho. Como a quantidade do imunoconjugado adicionado aos pocinhos é sempre a mesma em todos os ensaios, é possível a construção de uma curva de calibração, variando-se a concentração de pesticida. A interação do pesticida com o anticorpo no interior do pocinho pode ser influenciada por componentes da amostra. É importante, portanto, construir curvas de calibração usando a mesma variedade de produto agrícola a ser analisada, mas cultivada sem o respectivo pesticida (testemunha). Isso garante que todos os fatores específicos do produto agrícola serão considerados de forma adequada durante a construção da curva de calibração. A construção dessa curva com outra variedade do mesmo produto ou com o produto cultivado com o pesticida pode resultar em comprometimento irreversível da referida curva.

Os ensaios para testar o método foram realizados nos Laboratórios da Embrapa Meio Ambiente e no Laboratório de Química da Escola Superior de Agricultura de Mossoró (ESAM), com melões orgânicos sem histórico de aplicação de benomil/carbendazim ou derivados do grupo benzimidazoles (controle) e com aqueles com histórico de aplicação de benomil. O método foi validado por metodologia clássica (multirresíduo) no Laboratório de Resíduo de Pesticida da Embrapa Meio Ambiente.

Extração de pesticida para a análise de benomil/carbendazim por imunoensaio

Nota 1 - Esse protocolo foi desenvolvido para análise de benomil/carbendazim na matriz melão.

Material necessário

- Melão orgânico, com histórico de não aplicação de benomil/carbendazim ou derivados da família, para ser usado como testemunha (controle).
- Melões a serem testados.
- Faca grande para uso exclusivo com o melão.
- Bandeja ou assadeira de aço inoxidável ou azulejo vitrificado grande, para cortar o melão.
- Frascos de vidro para guardar as amostras (qualquer tipo de frasco comercial, tipo palmito, maionese, outros).
- Béqueres de 500 mL ou frascos de vidro para extração (também podem ser substituídos por frascos comerciais de boca larga).
- Frascos de vidro pequenos para transporte do extrato (pode ser substituído por frascos pequenos de remédio).
- Proveta de 100 mL.
- Pipeta automática de 20 a 200 μ L com caixa de ponteiros.
- Pipeta volumétrica de 1 mL e pêra ou pipeta automática de 200 a 1000 μ L com caixa de ponteiros.
- Papel-toalha.
- Lenço de papel ou papel higiênico macio.
- Filme de PVC.
- Água destilada.
- Metanol PR (para resíduo).
- Cronômetro (ou relógio).
- Kit de benomil/carbendazim da Envirologix (n.º EPO26).
- Líquidificador ou mixer (se o processo de extração for lento, não precisa ser usado).
- Balança semi-analítica, com pelo menos uma casa decimal.

- Miniagitador de placas ELISA.
- Espectrofotômetro e cubetas de vidro com capacidade entre 300/400 μ L, ou leitor de placa ELISA portátil.

Preparação

- Lavar toda a vidraria e o material a ser utilizado, de acordo com os procedimentos de lavagem indicados nesse item.
- Lavar os melões (testemunha e amostra) com água corrente para retirar a terra e secá-los com papel-toalha.
- Manipular um melão de cada vez, cortando-os em triângulo (3 cm de largura por 1 cm de espessura, aproximadamente), com casca semente e polpa, e guardá-los em frascos de vidro com tampa.
- Rotular (tipo de amostra, origem, data, outros).
- Lavar os instrumentos e repetir essa operação até terminar com todos os melões.

Método rápido

- Pesar 20 g de cada testemunha/amostra, já em duplicata, nos frascos para extração.
- No caso de testar três amostras, serão:
 - Dois frascos para cada amostra, num total de seis frascos.
 - Seis frascos com a testemunha, num total de três controles (negativo, baixo e alto).
- Marcar todos os frascos de forma que possam ser identificados posteriormente.
- Colocar 100 mL de metanol em cada um dos frascos.
- Separar os frascos de testemunha dois a dois.
- Deixar dois frascos da testemunha apenas com metanol.
- Acrescentar 20 μ L da solução padrão de benomil/carbendazim do kit em dois deles;
- Acrescentar 200 μ L da solução-padrão de benomil/carbendazim do kit nos outros dois; dessa forma, ficarão dois frascos com 0 ppm (0 μ g/mL), dois com 0,01 ppm (0,01 μ g/mL), e dois com 0,1 ppm (0,1 μ g/mL), do princípio ativo. Esses frascos serão, respectivamente, o controle negativo, o controle baixo e o controle alto de benomil/carbendazim.
- Com auxílio de *mixer*, triturar cada um dos controles e das amostras por dois minutos. Lavar o mixer com água destilada e depois com metanol, a cada passagem. Ter o cuidado de manipular as preparações sempre começando pelos controles (do negativo para o de maior concentração) e depois as amostras.

- Deixar decantar e retirar uma alíquota do sobrenadante de cada um deles, com cuidado para não pipetar polpa de melão. Colocar em vidros pequenos, devidamente marcados. Toda essa operação é feita usando-se uma pipeta e/ou uma ponteira para cada uma das preparações.
- Seguir os procedimentos de análise indicados no manual do kit de benomil/carbendazim.

Método lento

(dispensa o uso de liqüidificador e/ou *mixer*)

- Picar os triângulos de melão em pedaços pequenos, com cuidado, para evitar contaminação de uma preparação para outra.
- Pesar 20 g de cada amostra já picada, em duplicata, nos frascos para extração.
- Pesar seis vezes 20 g do melão testemunha, já picado, em seis frascos para extração.
- No caso de testar três amostras, serão:
 - Dois frascos para cada amostra, num total de seis frascos;
 - Seis frascos com a testemunha, num total de três controles (negativo, baixo e alto).
- Marcar todos os frascos de forma que possam ser identificados posteriormente.
- Colocar 100 mL de metanol em cada um dos frascos.
- Separar os frascos de testemunha dois a dois.
- Deixar dois frascos da testemunha apenas com metanol;
- Acrescentar 20 μ L da solução-padrão de benomil/carbendazim do kit em dois deles;
- Acrescentar 200 μ L da solução-padrão de benomil/carbendazim do kit nos outros dois; desta forma, ficarão dois frascos com 0 ppm (0 μ g/mL), dois com 0,01 ppm (0,01 μ g/mL), e dois com 0,1 ppm (0,1 μ g/mL), do princípio ativo. Esses frascos serão, respectivamente, o controle negativo, o controle baixo e o controle alto de benomil/carbendazim.
- Deixar os frascos sob agitação durante a noite (aproximadamente 16 horas).
- Deixar decantar e retirar uma alíquota do sobrenadante de cada um deles, com cuidado para não pipetar polpa de melão. Colocar em vidros pequenos, devidamente marcados. Essa operação é feita usando-se uma pipeta e/ou uma ponteira para cada uma das preparações.
- Seguir os procedimentos de análise indicados no manual do kit de benomil/carbendazim.

Procedimentos para uso do kit de benomil/carbendazim

Preparo da solução de lavagem do kit

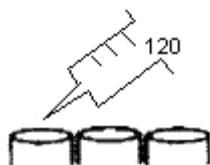
- Adicionar o conteúdo do envelope de tampão salino de lavagem em um litro de água destilada.
- Armazenar sob refrigeração quando não estiver em uso.
- Deixar atingir a temperatura ambiente no momento da análise.

Preparo do carbendazim-enzima-conjugado do kit

- O kit vem com um suprimento de enzima-conjugado 100 vezes concentrado, para melhor estabilidade do produto. Esse reagente não pode ser congelado, mas deve ser mantido em geladeira.
- Para cada 16 pocinhos, preparar uma solução da seguinte forma: 20 μ L de enzima-conjugado carbendazim para 2 mL de diluente.
- Agitar com cuidado para misturar a solução sem fazer espuma. Essa diluição enzima-conjugado carbendazim deverá ser preparada somente no dia da análise e na quantidade suficiente para os pocinhos que serão utilizados, pois não pode ser utilizada no dia seguinte.

Análise de Benomil/Carbendazim por Imunoensaio

1º) Adicionar 120 μ L de solução diluente em todos os pocinhos.



2º) Adicionar 20 μ L das soluções abaixo em duplicata, em seus respectivos pocinhos:



- 1 e 2 - controle negativo
- 3 e 4 - controle baixo
- 5 e 6 - controle alto
- 7 a 12 - extrato das amostras dos melões a serem testadas

3º) Adicionar, imediatamente, 60 μ L de carbendazim-enzima-conjugado (diluída) em cada pocinho



- Misturar cuidadosamente por dois a três segundos essas soluções, com movimentos circulares da mão, mantendo o suporte do kit com as fileiras de pocinhos em uso sempre na horizontal, apoiado em superfície lisa.
- Cobrir o suporte com filme de PVC ou equivalente, para evitar evaporação.
- Deixar agir por 60 minutos, sob agitação.

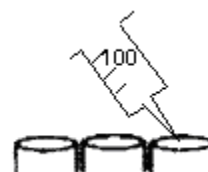


4º) Fazer a lavagem para retirada do conteúdo dos pocinhos, da seguinte forma:



- Com um movimento brusco e rápido do pulso jogar fora o conteúdo dos pocinhos.
- Encher os pocinhos até transbordar com a solução de lavagem.
- Despejar o conteúdo com um movimento brusco e rápido do pulso.
- Agitar vigorosamente para remover toda a solução no interior dos pocinhos.
- Repetir esses passos por mais quatro vezes, agitando sempre para retirar o quanto possível de água de lavagem do interior dos pocinhos.
- Inverter o suporte e batê-lo sobre um papel-toalha limpo, para remover todo o resíduo de umidade.

5º) Adicionar 100 μ L de substrato em cada pocinho.

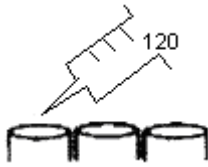


- Assegurar-se de que o substrato esteja à temperatura ambiente antes de adicioná-lo aos pocinhos.
- Misturar cuidadosamente por dois a três segundos essas soluções, mantendo o suporte sempre reto.
- Deixar agir por 30 minutos, sob agitação.



- Uma coloração azul deverá aparecer. Se o controle sem pesticida não desenvolver a coloração correspondente em 15 minutos, o teste está inválido.

6º) Adicionar 100 μL de solução de interrupção (*stop solution*) em cada pocinho.



- Misturar cuidadosamente, por dois a três segundos, mantendo o suporte sempre reto.
- A coloração passa de azul para amarela.

Exemplo de interpretação dos resultados (Tabela 1).

Tabela 1. Interpretação dos resultados do teste.

Valores médios das duplicatas						
Controle negativo (livre de pesticida)	Controle baixo (baixa concentração de pesticida)	Controle alto (baixa concentração de pesticida)	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
1,11	0,76	0,31	1,06	0,62	0,77	0,25

Amostra 1 - A absorvância não é diferente (>80%) do resultado do **controle negativo** de benomil/carbendazim. Conclusão: a amostra está livre de níveis detectáveis de benomil/carbendazim, ou seja, a concentração do pesticida na amostra está entre 0,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Amostra 2 - O resultado é significativamente (<80%) mais baixo do que o resultado do **controle negativo** para benomil/carbendazim e, também, é menor do que o **controle baixo**, entretanto é maior do que o **controle alto**. Conclusão: a amostra tem benomil/carbendazim entre os níveis do **controle baixo** e do **controle alto**, ou seja, a concentração de pesticida na amostra está na faixa de 0,1 a 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

7º) Fazer a leitura da absorvância do conteúdo de cada pocinho no espectrofotômetro, usando comprimento de onda igual a 450 nanômetros, e anotar os valores.

Cuidados especiais

- Ler o manual do kit atentamente e identificar cada um dos reagentes.
- Manusear com cuidado a solução de interrupção (*stop solution*), pois se trata de ácido clorídrico 1N.
- Antes de iniciar o teste retirar todo o material da geladeira para que atinja a temperatura ambiente.
- Ligar os equipamentos para que aqueçam, de acordo com as normas de cada fabricante.
- Não misturar variedades de melões, no mesmo teste.
- Não reaproveitar as testemunhas de um teste para outro.

Nota 2 -

- O **controle negativo** (testemunha livre de pesticida) deve exibir absorvância entre 0,6 e 1,8
- Absorvâncias abaixo de 0,4 são indicativas de deterioração do kit. Estes resultados devem ser descartados.
- Comparações de resultados entre amostras e controles, apenas serão válidos se forem entre resultados obtidos nas análises feitas ao mesmo tempo.

Amostra 3 - O resultado é significativamente (<80%) mais baixo do que o resultado do **controle negativo** para benomil/carbendazim, e está próximo ao valor do **controle baixo**. Conclusão: a amostra também tem benomil/carbendazim entre os níveis do **controle baixo** e do **controle alto**, ou seja, a concentração de pesticida na amostra está na faixa de 0,1 a 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Amostra 4 - O resultado é menor do que o do **controle alto**. Conclusão: a amostra contém benomil/carbendazim ao mesmo nível ou superior ao do **controle alto**, ou seja, a concentração de pesticida na amostra está acima de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Lavagem da vidraria

Vidraria contaminada com pesticida

- Fazer uma pré-lavagem da vidraria com acetona grau comercial ou grau analítico ou acetona usada em vidraria limpa.
- Descartar o solvente em bombona para “solvente orgânico”; nunca jogar o solvente no meio ambiente.
- Deixar o material de molho em solução de detergente, por pelo menos duas horas.
- Enxaguar com água corrente em abundância, até que todo o detergente seja removido.
- Enxaguar com água destilada ou bidestilada pelo menos cinco vezes.
- Passar acetona grau analítico na vidraria.
- Deixar secar em estufa com circulação de ar e temperatura máxima de 40°C, ou ao natural, ao abrigo de poeiras.

Vidraria contaminada com ácido, base, outros

- Fazer uma pré-lavagem com água corrente em abundância.
- Deixar o material de molho em solução de detergente por pelo menos duas horas.
- Enxaguar com água corrente em abundância, até que todo o detergente seja removido.
- Enxaguar com água destilada ou bidestilada pelo menos cinco vezes.
- Passar acetona grau analítico na vidraria.
- Deixar secar em estufa com circulação de ar e temperatura máxima de 40°C, ou ao natural, ao abrigo de poeiras.

Observação: Caso seja notada alguma sujeira, a vidraria deve ficar na solução sulfocrômica por, pelo menos, uma hora.

Referências Bibliográficas

CARRARO, A.F.; CUNHA, M.M. da. **Manual de exportação de frutas**. Brasília: MAARA-SDRI / FRUPEX-IIICA, 1994. 254p.

ENVIROLOGIX. (Portland, Maine). **Envirologix Benomyl Carbendazim Screening Test**: for analysis of benomyl and carbendazim fungicide residues in dried vine and tree fruits, measured as carbendazim. Portland, 1999. 7p.

MEULENBERG, E.P.; MULDER, W.H.; STOCKS, P.G. Immunoassays for pesticides. **Environmental Science & Technology**, v.29, n.3, p.553-561, 1995.

SCHNEIDER, R.P. Monitoramento químico e biológico de áreas contaminadas: tecnologias emergentes. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1997. p. 43-66.

VAN EMON, J.M.; GERLACH, C.L. Status report in field portable immunoassay. **Environmental Science & Technology**, v.29, n.7, p.312A-317A, 1995.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. **Fungicidas sistêmicos recomendados no controle de doenças**. Brasília: ABEAS, 1989. 65p. Curso de defensivos agrícolas. Módulo 2.

Comunicado Técnico, 80

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria Tropical

Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici

Fone: (0xx85) 299-1800

Fax: (0xx85) 299-1803 / 299-1833

E-mail: negocios@cnpat.embrapa.br

1ª edição *on line*: outubro de 2003.

Comitê de Publicações

Presidente: *Oscarina Maria da Silva Andrade*

Secretário-Executivo: *Marco Aurélio da Rocha Melo*

Membros: *Francisco Marto Pinto Viana, Francisco das Chagas Oliveira Freire, Heloisa Almeida Cunha Filgueiras, Edneide Maria Machado Maia, Renata Tiekko Nassu, Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo.*

Expediente

Supervisão editorial: *Marco Aurélio da Rocha Melo*

Revisão de texto: *Maria Emília de Possídio Marques*

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

Normalização bibliográfica: *Rita de Cassia Costa Cid.*