

1

INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Os pesticidas se inserem no atual contexto de demanda por alimentos e demais produtos de origem animal e vegetal exigido pelo aumento progressivo da população. Para tanto, é necessário diminuir as perdas nas lavouras e assegurar o desenvolvimento de culturas em larga escala com alta produtividade.

A utilização dos agrotóxicos na agricultura iniciou-se na década de 1920, época em que eram pouco conhecidos do ponto de vista toxicológico. Durante a Segunda Guerra Mundial foram utilizados como armas químicas, tendo seu uso se expandido enormemente.

No Brasil, os agrotóxicos foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e controle de parasitas, passando a ser utilizados mais intensivamente na agricultura a partir da década de 1960 em um processo denominado de Revolução Verde. Neste período, o processo de difusão de um modelo agrícola para as regiões do Terceiro Mundo contava, principalmente, com estratégias de valorização do uso de agrotóxicos. Assim, os pesticidas foram responsáveis pela consolidação do padrão tecnológico da agricultura moderna intensiva através das técnicas de controle fitossanitário de culturas (Lanna, 2002).

Em 1975, o Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), responsável pela abertura do Brasil ao comércio de agrotóxicos, condicionou o agricultor a comprar o veneno com recursos do crédito rural, ao instituir a inclusão de uma cota definida de agrotóxico para cada financiamento requerido (Organização Pan-Americana de Saúde / Organização Mundial de Saúde - OPAS/OMS, 1996).

Essa obrigatoriedade, somada à propaganda dos fabricantes, determinou um enorme incremento e disseminação da utilização dos agrotóxicos no Brasil. Muitos desses produtos não possuem antídotos e são proibidos em seus países de origem.

De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), em 2004, o Brasil consumia 3,2 Kg de agrotóxico por hectare, sendo, então, o oitavo maior consumidor desses produtos do mundo. Atualmente, ocupa o terceiro lugar, segundo informações divulgadas neste ano pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A Lei Federal n.º 7.802 de 11/07/89, regulamentada pelo Decreto nº 98.816, no seu artigo 2º, inciso I, dispõe desde a pesquisa, transporte e comercialização e destino final dos resíduos e define o termo “agrotóxicos” da seguinte forma:

Os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento.

Após grande mobilização da sociedade civil, o termo “agrotóxico”, em vez de “defensivo agrícola”, passou a ser utilizado, no Brasil, para denominar os venenos agrícolas. Esta denominação coloca em evidência a toxicidade desses produtos para o meio ambiente e a saúde humana, mimetizada pela denominação anterior (Peres e colaboradores, 2003).

Os agrotóxicos organofosforados e carbamatos foram introduzidos no mercado brasileiro na década de 1980 em substituição aos organoclorados. Esta era considerada uma alternativa que utilizava compostos de menor persistência e toxicidade no ambiente, apesar da sua maior toxicidade aguda a saúde humana e animal, efeito mutagênico e teratogênico.

Em 1996, a OPAS/OMS classificou a grande diversidade de produtos, cerca de 300 ingredientes ativos em duas mil formulações comerciais diferentes no Brasil. Foram classificados quanto ao alvo como: inseticidas, nematicidas, moluscicidas, acaricidas, rodenticidas e vampiricidas. Os inseticidas estão distribuídos em quatro grupos químicos principais:

1. Organoclorados: o grupo pioneiro dos praguicidas sintéticos. Foram desenvolvidos durante a Segunda Guerra Mundial para proteção contra malária, tifo exantemático e outras enfermidades transmitidas por insetos, bem como para o controle de enorme quantidade de espécies prejudiciais à lavoura, consideradas na época uma panacéia. Com o advento de legislações restritivas

em muitos países, por sua persistência ambiental, tendência a acúmulo no organismo e o aumento da resistência dos insetos, diminuiu-se a sua utilização. No Brasil, os organoclorados são proibidos para o uso agrícola, mas são autorizados para os órgãos públicos responsáveis pelas Campanhas de Saúde (Portaria n.º 329 de 2/9/85 do Ministério da Agricultura), embora atualmente esteja também em desuso por estes últimos. Corresponde a classes dos hidrocarbonetos clorados, ainda que, além do cloro, alguns deles possuam oxigênio. São derivados do clorobenzeno, do ciclohexano ou do ciclodieno.

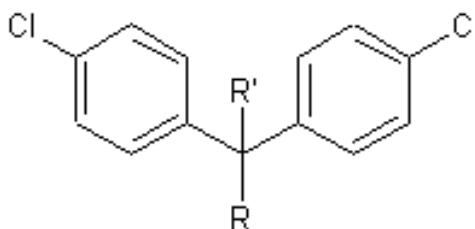


Figura 1 – Representação estrutural dos ciclodienos.

2. Organofosforados: desenvolvidos na década de 1940, foram os primeiros a substituir os representantes do grupo dos organoclorados, aos quais os insetos já apresentavam resistência. Possuem uma ampla gama de produtos agrícolas e sanitários, desde os extremamente tóxicos até aqueles com baixa toxicidade, como o temephos, que têm seu uso permitido em água potável. Têm sido bastante usados na área da saúde, dada a sua eficiência. No entanto, este grupo é responsável por grande número de intoxicações e mortes no país.

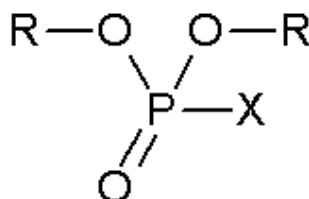


Figura 2 – Representação estrutural dos organofosforados.

3. Carbamatos: o primeiro carbamato foi posto no mercado na década de 1950. São praguicidas orgânicos derivados de ácidos metilcarbâmicos e dimetilcarbâmicos. Três classes de carbamatos são conhecidas: carbamatos inseticidas (e nematicidas), carbamatos herbicidas e carbamatos fungicidas. Os carbamatos (Figura 3) usados como inseticidas (e nematicidas) são derivados do éster do ácido carbâmico.

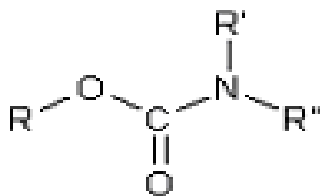


Figura 3 – Representação estrutural genérica dos carbamatos, onde R é um álcool (OH), um grupo oxima (C=NOH), ou anel fenólico, e R' é um H ou grupo metil (–CH).

4. Piretróides: são compostos sintéticos análogos aos componentes obtidos a partir dos piretros, extraídos do crisântemo (*Chrysanthemum sp.*). Introduzidos no mercado em 1976, os piretróides têm sido bastante empregados na área da saúde e na agricultura até hoje.

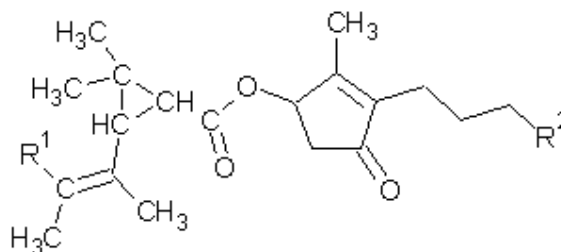


Figura 4 – Representação estrutural genérica dos piretróides.

Recentemente, os piretróides e os ditiocarbamatos (fungicidas) foram introduzidos como uma alternativa de menor toxicidade e persistência ambiental. No entanto, apesar da progressiva disseminação destes produtos, os carbamatos e organofosforados continuam ocupando significativa fatia do mercado nacional.

A família dos carbamatos compreende substâncias utilizadas como inseticidas, herbicidas, fungicidas e até antibióticos (Santos, 2001). De um modo geral, os carbamatos inseticidas subdividem-se em: n-metilcarbamatos e n,n-dimetilcarbamatos, podendo ambos estar associados a heterociclos aromáticos ou a função oxima, sendo então conhecidos por carbamatos heterocíclicos e carbamatos de oxima (Santos, 2001).

O primeiro n,n-dimetilcarbamato foi sintetizado em 1947, o Pirimicarb, e em 1957, o primeiro n-metilcarbamato, o Carbaril (Sevin®). Estes dois produtos, juntamente com o Propoxur (Baygon®), introduzido pela Bayer em 1959, ainda são amplamente utilizados no Brasil (Barbosa, 2003).

A Du Pont e a Union Carbide desenvolveram um novo tipo de inseticida com estrutura semelhante à acetilcolina, o carbamato de oxima, considerado um dos mais tóxicos. O Aldicarbe, Temik® (Figura 5), é ainda amplamente utilizado, inclusive na sua forma sólida, em domicílios e plantações, popularmente conhecido como “chumbinho”.

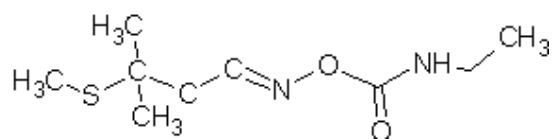


Figura 5 – Fórmula estrutural do Aldicarb (“chumbinho”)

No Brasil, no ano de 2003, foram registrados 5945 casos de intoxicação humana causadas por agrotóxicos de uso agrícola, sendo 269 no estado do Rio de Janeiro (ANVISA, 2008). Além da intoxicação de trabalhadores que têm contato direto ou indireto com esses produtos, um grande número de intoxicações e mortes ocorre em decorrência da contaminação de alimentos.

O morango e a alface foram os alimentos que apresentaram maiores índices de contaminação por agrotóxico no ano de 2007, de acordo com os dados do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA).

Em 1960, a área ocupada com plantações no Brasil era de 28 milhões de hectares. Em 2008, a segunda estimativa da safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas indica uma produção da ordem de 139,6 milhões de toneladas, sendo 2,3% maior que a produção prevista em janeiro (136,5 milhões de toneladas) e superior em 5,1% à obtida em 2007 (132,9 milhões de toneladas). Com relação à área plantada em 2007, a atual estimativa apresenta acréscimo de 2,7%, situando-se em 46,6 milhões de hectares (SINDAG, 2008).

A soja, o milho e o arroz são os produtos que apresentam maiores áreas previstas, com respectivamente, 21, 14,5 e 3 (tirei os zeros depois da vírgula) milhões de hectares cultivados em 2008. Estes produtos representam 91,1% da produção nacional estimada (SINDAG, 2008).

As culturas brasileiras de maior consumo de pesticidas são a soja, o milho, a cana-de-açúcar e citrus. Os três primeiros não têm aplicação intensa de pesticidas, mas ocupam extensas áreas. O tomate, porém, se destaca pelo seu uso intenso em áreas pequenas (SINDAG, 2004).

O consumo de agrotóxicos difere nas várias regiões do país. O estado de São Paulo é o maior consumidor de agrotóxicos do Brasil, responsável por 20,6% das vendas nacionais. Em 2006, atingiu a marca de 3.919.841 milhões de dólares. Os estados de Mato Grosso, Paraná, Minas Gerais, Goiás, Bahia e Santa Catarina dividem as vendas mais expressivas. O Rio de Janeiro, junto com as demais unidades federativas, ficam com apenas 7,1% do total (SINDAG, 2006).

A Portaria Normativa IBAMA nº 84 de 15/10/96 instituiu o Sistema Permanente de Avaliação e Controle de Agrotóxicos e o Decreto 4.074/2002 preconizou o monitoramento dos agrotóxicos no ambiente, em condições reais, como parte da avaliação no processo de registro de novos produtos ou da reavaliação de produtos já em uso, com o objetivo de agilizar e permitir maior transparência ao processo de análise técnica e registro de agrotóxicos na Anvisa, IBAMA e MAPA. O Sistema Integrado de Informações sobre Agrotóxicos (SIA), instituído pelo art. 94 do Decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002, é constituído de módulos que permitem a interação eletrônica entre os órgãos registrantes e destes com as empresas, além de módulos de componentes e de informações de produtos registrados.

A resolução Nº 020/CONAMA de 18/06/86 estabelece limites máximos de contaminantes em águas, dentre eles organoclorados, organofosforados e carbamatos. Para os carbamatos e organofosforados totais, o limite máximo para águas destinadas ao abastecimento doméstico e irrigação de culturas forrageiras é de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Entretanto, esta resolução foi revogada por uma outra, a de Nº 357, de 17/03/2005, que estabelece o valor máximo permitido para o metil-carbamato Carbaril de $0,02 \mu\text{g/L}$ e de $70,0 \mu\text{g/L}$ para água doce das classes I e III, respectivamente.

Para o metil-carbamato metomil, não há definições de teores máximos, o mesmo acontecendo com os níveis fixados pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo) para águas (CETESB, 2005). Este composto vem sendo intensamente utilizado em culturas olerícolas, em geral, e principalmente nas que vêm apresentando os maiores níveis de contaminação como o tomate, a alface e o morango. No Brasil, nem a legislação nem os órgãos técnicos responsáveis definem limites de agrotóxicos em solos.

A determinação dos níveis de agrotóxicos em solos e seu monitoramento são importantes para a regulamentação do uso adequado e do controle de

qualidade dos alimentos com vistas ao seu escoamento no mercado interno e externo em conformidade com as exigências fitossanitárias.

1.2. Região agrícola de Nova Friburgo, R.J.

1.2.1. Caracterização física

A microbacia do Córrego de São Lourenço situa-se na Serra do Mar, no município de Nova Friburgo (região serrana do estado), como indicado na Figura 6. A região é predominantemente montanhosa e de relevo acidentado, com ocorrência de escarpas e pequenos vales e altitudes variando entre 900 e 2200 metros, sujeita à alta umidade do ar.

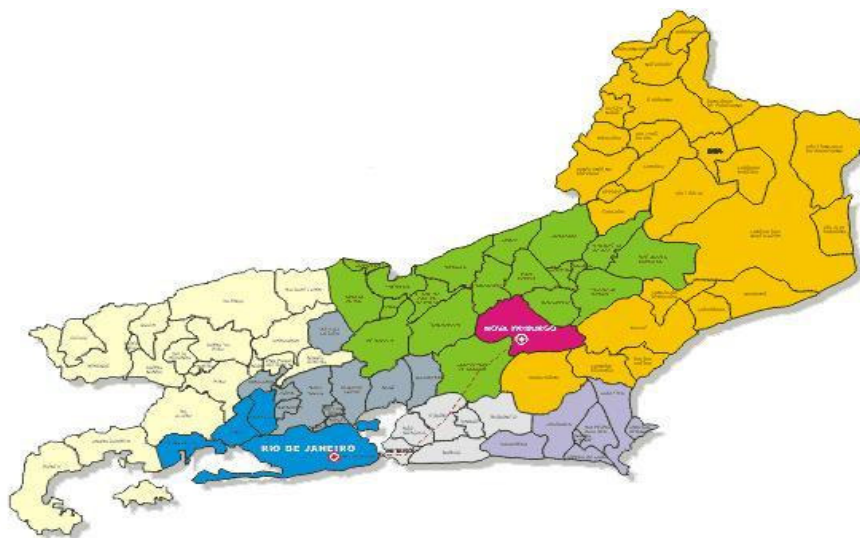


Figura 6 – Mapa do estado do Rio de Janeiro com o município de Nova Friburgo em destaque (cor rosa).

As bacias hidrográficas, de qualquer hierarquia, são unidades geográficas delimitadas por uma rede de drenagem (córregos) que deságua em um rio principal. Estão ligadas pelos diversos divisores topográficos, formando uma rede onde cada uma delas drena água, material sólido e dissolvido para uma saída comum ou ponto terminal, que pode ser outro rio, lago, reservatório ou oceano.

A área das cabeceiras da bacia do rio Grande, afluente do Rio Paraíba do Sul, incluindo o contribuinte rio São Lourenço, está localizada na encosta norte da Serra dos Órgãos, entre os morros dos Três Picos e da Caledônia, a oeste da cidade de Nova Friburgo, RJ. Abrange as Áreas de Proteção Municipais dos Três Picos e do Morro da Caledônia, que se sobrepõem parcialmente ao Parque

Estadual dos Três Picos, criado no final de 2002. O parque está incluído na Reserva da Biosfera da Mata Atlântica (IEF, 2008), e considerada uma área de alta prioridade para a conservação, pois abriga remanescentes de floresta montana e campos rupestres, com uma alta diversidade biológica, habitat de diversas espécies ameaçadas de extinção (Bohrer, 1998; Lima e Guedes-Bruni, 1997, citados por Bohrer e Barros, 2006).

A região possui umidade relativa do ar em torno de 83%, precipitação média anual entre 1500 e 2400mm, distribuída ao longo de todo o ano, porém, concentrada entre os meses de outubro e abril, e temperatura variando de 9°C a 27°C, com média anual igual a 17,8°C. Ocorre uma estação seca curta no inverno, amenizada pela altitude e frentes frias ocasionais.

O clima pode ser classificado como tropical de altitude ou subtropical, equivalendo aos tipos Cf/Cw no sistema de Koppen que destaca clima úmido com inverno seco. Dados de estações próximas sugerem uma maior pluviosidade e temperaturas mais baixas na porção sul da bacia devido ao relevo, podendo atingir valores negativos nas maiores altitudes (Bohrer, 1998, citado por Bohrer, 2006).

Destacam-se na hidrografia local os córregos Baixadão, São Lourenço, Campestre e o Rio Grande (Cunha, 1978, citado por Bohrer e Barros, 2006). Este conjunto de rios são utilizados para a irrigação das áreas agrícolas. As várias nascentes são as responsáveis pelo abastecimento da maioria das residências, visto que os rios são reconhecidamente contaminados pelos despejos das lavouras e esgotos domésticos.

Os solos da região são resultantes de uma combinação da litologia, do relevo, do clima e da cobertura florestal densa, que exerce forte influência através de processos físicos e hidrológicos (fixação mecânica, interceptação, infiltração, evapotranspiração) e ecológicos (produção de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes). São solos altamente lixiviados e de fertilidade moderada, em função da drenagem intensa, geralmente apresentando baixos pH e teores de nutrientes. Os principais tipos de solos são: Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA) e húmico (LH), Podzólico Vermelho-Amarelo (PVA) álico (a) ou distrófico (d), Cambissolo álico ou distrófico (CA) e húmico (CH), solo Aluvial (A), Litossolos (RE) e Afloramento Rochoso (AR) (EMBRAPA, 1992, citado por Bohrer e Barros, 2006; RADAMBRASIL, 1983).

A vegetação original da área é constituída pela Floresta Ombrófila Densa Montana nas áreas até 1500-1600m, além de vegetação rupestre nos afloramentos e campos de altitude.

A cobertura atual na bacia é constituída, além das áreas com vegetação natural remanescente, por florestas secundárias, plantios florestais, olericultura intensiva (concentrada nas áreas aluviais), agricultura anual em pequena escala, pastagens em baixadas e encostas e pequenos núcleos urbanos.

O desmatamento provocado pela ocupação da área, seguido pela pecuária e cultivos anuais, favoreceu a formação de processos erosivos em grau variável, incluindo ravinamentos, voçorocas etc.

As pequenas propriedades baseiam-se principalmente na produção agrícola olerícola intensiva, com uso de mecanização e irrigação, e de insumos como corretivos, adubos químicos e minerais, herbicidas, pesticidas e fungicidas.

Com relação à declividade, esta encontra-se distribuída de forma mais ou menos regular entre as classes de 0-45º, com exceção da classe de 5-10º. Levando-se em conta o código florestal, as áreas onde o uso agrícola é permitido (até 25º) somam 11.420ha (73,3%), enquanto que a faixa onde apenas o manejo florestal é permitido (25-45º) representa 24,3% da área total. As áreas mecanizáveis (até 5º) representam apenas 18,8% da área, enquanto que as áreas com aptidão para culturas perenes ou sistemas agroflorestais (15-25º) representam 51,9% da área total (Bohrer e Barros, 2006). A atividade agrícola está concentrada nas áreas aluviais, porém, se estende às áreas de baixada e encostas com declividade amplamente variada. Este fato, aliado ao desmatamento, vem favorecendo processos erosivos acentuados. É comum, na época chuvosa, transbordamento dos rios que cortam a região e alagamento de vastas áreas agrícolas seguido de assoreamento devido ao transporte de grandes volumes de solo das áreas de plantio para seu leito.

1.2.2.Dinâmica dos pesticidas no solo

É reconhecida a influência das características físico-químicas dos solos sobre as recuperações de compostos orgânicos, como é o caso dos pesticidas. O conjunto de fatores climáticos e intrínsecos à matriz dos solos (genéticos) determina suas características mineralógicas e químicas. O perfil pedológico (de solos) da região pode ser descrito através do levantamento de tais características, que podem ser alteradas pelo manejo químico, pelo uso de corretivos e fertilizantes que alteram as propriedades naturais destes solos.

Buscando avaliar a representatividade das matrizes utilizadas neste trabalho e a aplicabilidade do método proposto ao perfil dos solos da região estudada, foram realizadas análises dos parâmetros de fertilidade e comparados

com levantamento prévio feito pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO) na região.

O teores encontrados para os solos da região foram confrontados com as classes de referência previamente estabelecidas, correspondentes aos intervalos de valores que representam os teores de nutrientes do solo que estão presentes no Manual de Adubação para o Estado do Rio de Janeiro (DE-POLLI, 1988).

1.3. Caracterização da fertilidade

1.3.1. Composição granulométrica

Fator de ordem física que está relacionado ao potencial nutricional dos solos pelo seu poder de adsorção de nutrientes e suas condições de umidade. No levantamento realizado pelo laboratório de Solos da Estação Experimental de Nova Friburgo da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO-EENF) não há registros de dados de granulometria para os solos da região.

1.3.2. Complexo Sortivo

O cálcio e o magnésio são macronutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas. São importantes indicadores de possíveis carências nutricionais das cultivares e determinantes do manejo químico de adubos e corretivos. Os solos da região são naturalmente pobres nestes elementos.

A carência de cálcio e magnésio nos solos se deve aos seguintes fatores: (i) pobreza original do solo, particularmente o de textura mais grossa; (ii) lavagem do Ca^{2+} e Mg^{2+} trocável das camadas superiores para as inferiores, onde há baixa proporção de raízes adsorventes (Malavolta, 1980); (iii) falta de umidade, diminuindo o contato dos íons com as raízes por fluxo de massa. Especificamente para o Mg^{2+} , acrescenta-se: (i) alta relação K/Mg no solo que causa menor absorção do segundo; (ii) indução de carência (diminuição na absorção) pelo cálcio do calcário não magnesiano; (iii) indução de carência pelo excesso de K_2O na fórmula do adubo e; (iv) baixo uso de calcário dolomítico ou de adubos magnesianos.

A partir de 2002, os produtores da região da microbacia contaram com o serviço de análise química dos solos e diagnóstico de fertilidade oferecido pela

PESAGRO-RIO/EENF. Nos cinco primeiros anos de funcionamento (2002 – 2006), foram realizadas 2.727 análises com as recomendações de calagem e adubação para o desenvolvimento das culturas locais. O banco de dados foi construído por entrega voluntária de solo pelos produtores e que, portanto, representam uma média de distribuição dos parâmetros de fertilidade da região da microbacia.

Segundo o histograma da Figura 7, a maior frequência de amostras de solo na faixa de baixa fertilidade para cálcio e magnésio, 1,1 a 2,0 cmol_c Kg⁻¹ (centimol de carga por quilograma de solo), classe II, justifica-se pela maior necessidade de recomendações de calagem para essas áreas por conta dos produtores.

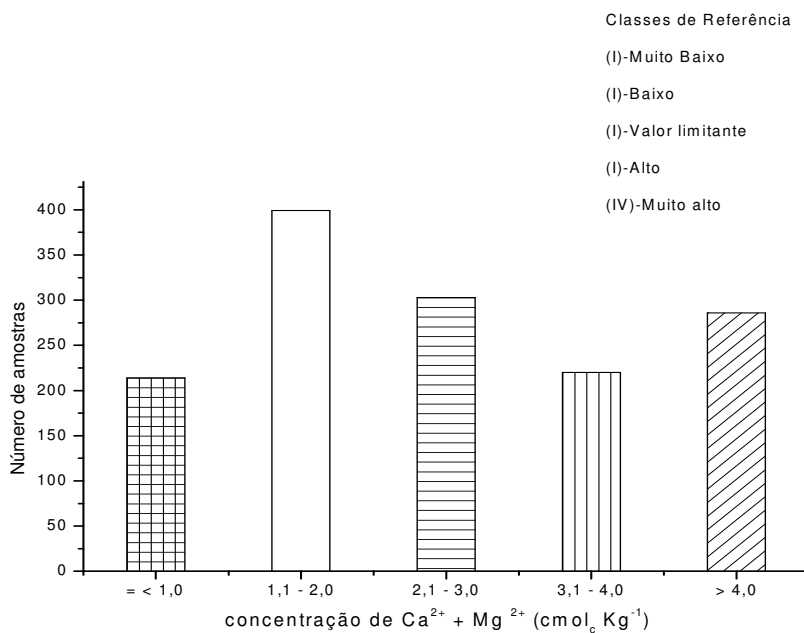


Figura 7 - Distribuição dos teores de cálcio e magnésio nos solos de Nova Friburgo entre os anos de 2002 e 2006 (Barradas, 2006).

1.3.3. Potássio Trocável

A forma trocável envolve a fração do K que se encontra ligada às cargas negativas nas superfícies das frações orgânicas e inorgânicas (minerais de argila silicatados, óxidos e hidróxidos) do solo. As ligações do K trocável com os componentes da fase sólida do solo são de caráter eletrostático. Nesse tipo de ligação (adsorção), os elementos somente se ligam às superfícies sólidas com carga elétrica oposta (Ernani et al., 2007).

A Figura 8 mostra que a maior parte das amostras analisadas no município com baixos e médios teores de K^+ nos solos indica a necessidade de recomendação para a adubação potássica. Porém, 16,43% das amostras revelam altos níveis de potássio nos solos, indicando adubação recente.

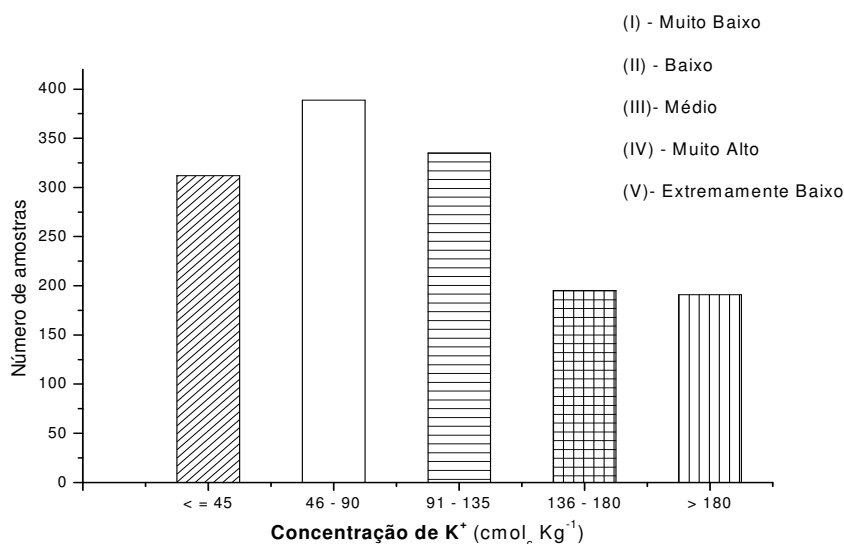


Figura 8 – Distribuição dos teores de potássio nos solos de Nova Friburgo entre os anos de 2002 e 2006 (Barradas, 2006).

1.3.4. Acidez Potencial

Este parâmetro corresponde aos teores de H^+ e Al^{3+} no complexo de troca do solo.

A espécie Al^{3+} é tida como um componente que contribui mais para a acidez do solo do que o H^+ , que se encontra ligado por atração covalente aos colóides. A toxicidade do alumínio para as plantas é bem conhecida, sendo

considerada um dos fatores prejudiciais para o seu crescimento e pelas baixas produções nos solos ácidos (Malavolta e colaboradores, 1976, citado por Malavolta, 1980).

Na maioria das amostras de solo dos produtores de Nova Friburgo não foi verificado problemas com a presença de Al^{3+} , nota-se que estes têm subutilizado o calcário em detrimento do uso de outras formas de adubação como mostram os valores de pH, bem abaixo do ideal para cultivos de hortaliças (as culturas regionais) na maioria das amostras analisadas (figura 9).

Em relação ao comportamento do pesticida estudado, os prótons adsorvidos à fração mineral (ou argilo-humificada), na ausência de Al^{3+} , não interferem na adsorção desse pesticida nesta fração do solo. Porém, a presença do Al^{3+} trocável, que desloca os prótons das superfícies carregadas do mineral, pode provocar a saturação dos sítios ativos das partículas argilo-húmicas. Dessa forma, o Al^{3+} pode desfavorecer a adsorção do metilcarbamato metomil (Lannate – Du Pont) ao solo (Yang e colaboradores, 2005).

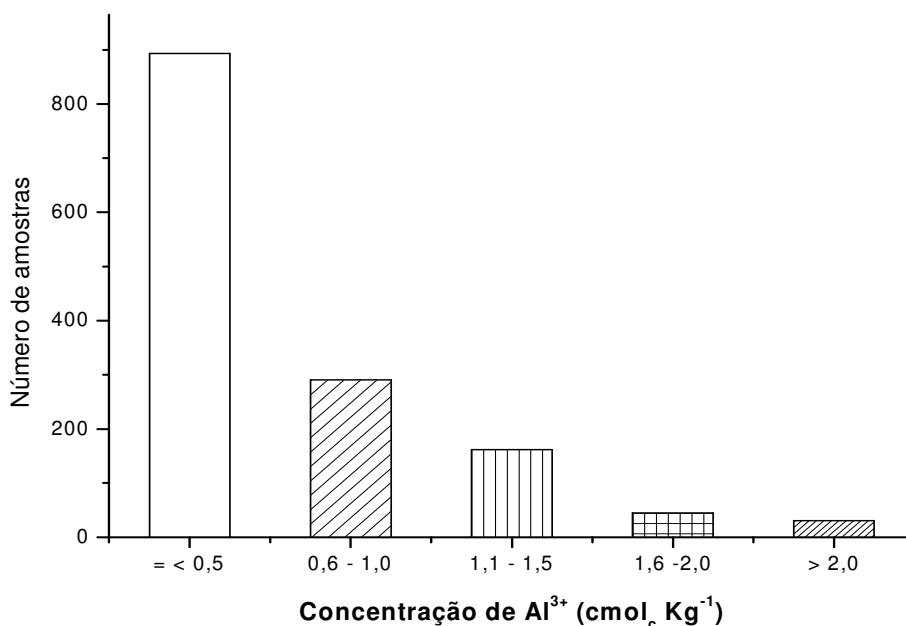


Figura 9 – Distribuição dos teores de Al^{3+} em amostras de solos agrícolas do município de Nova Friburgo (Barradas, 2006).

1.3.5. pH

A medida de pH indica o grau de acidez do solo e pode ser influenciada por diferentes fatores: (i) material de origem: a característica de basicidade da rocha matriz que forma o solo com o trabalho do intemperismo; (ii) chuva: a água que atravessa o solo pode carrear elementos considerados alcalinos, como K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , e substituí-los por elementos considerados “ácidos” como H^+ , Al^{3+} e Mn^{2+} (Malavolta, 1980).

No caso do H^+ da matéria orgânica, porém, a ligação com o radical se faz por covalência, o que impede o deslocamento por outros cátions. A dissociação de um ácido orgânico tem lugar somente quando o pH aumenta; com isso a carga negativa pode ser neutralizada por um cátion.

A disponibilidade dos íons de K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} na solução do solo ou no complexo de troca é pouco afetada quando o pH é igual ou pouco maior que 5,0. A elevação do pH diminui o número de cargas positivas dos óxidos hidratados de Fe e Al, resultando a liberação de elementos como Mo e Cl dos minerais do solo.

Para os solos agrícolas da região, os valores referentes à classe de solos moderadamente ácidos (5,1 – 5,5) compreendem a maior parte das amostras levadas para análise (Figura 10).

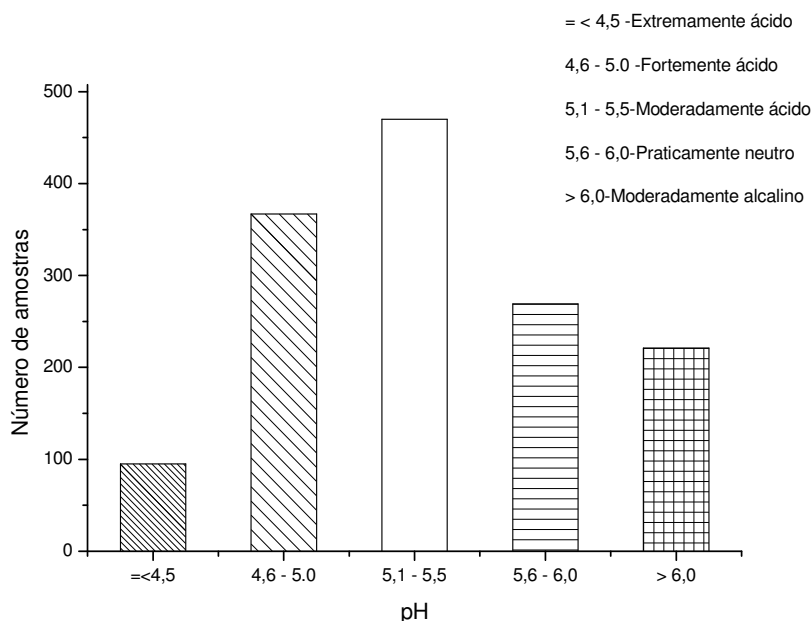


Figura 10 – Distribuição dos valores de pH nas amostras de solo agrícola do município de Nova Friburgo durante os anos de 2002 a 2006 (Barradas, 2006).

1.3.6. Capacidade de Troca de Cátions (CTC) e Valor de V (% saturação em bases)

As propriedades de adsorção iônica do solo são devidas, quase que totalmente, aos minerais de argila e à matéria orgânica do solo, materiais de elevada superfície específica. Essas partículas coloidais do solo apresentam cargas elétricas negativas e positivas, podendo adsorver, por diferenças de carga, tanto cátions como ânions.

O colóide do solo, representado pela argila, encontra-se rodeado pela solução do solo contendo diferentes cátions e H^+ ; estes também se acham ligados à argilas. Os cátions se originam da decomposição dos minerais do solo, do adubo aplicado e da decomposição da matéria orgânica; o alumínio vem do intemperismo da argila e o H^+ tem origem na hidrólise de grupos carboxílicos, fenólicos, entre outros.

A troca catiônica se dá quando um cátion da solução do solo substitui um número equivalente de cátions da argila. Este equilíbrio raramente existe devido a lavagem de cátions pela água da chuva, a irrigação ou absorção de cátions da solução do solo pela raiz das plantas, promovendo a difusão entre as fases (colóide e solução do solo).

A Capacidade de Troca de Cátions (CTC) é a capacidade que os colóides do solo possuem para reter cátions, sendo diretamente dependente da quantidade de cargas negativas presentes.

Segundo Novais e Mello (2007) alguns princípios básicos caracterizam a CTC:

- a) a troca de cátions é reversível. Estes quando adsorvidos podem ser deslocados por outros;
- b) as condições do solo têm influência sobre a CTC, dentre elas: o pH, as características dos cátions trocáveis (valência e raio hidratado, por exemplo), a concentração da solução e natureza da fase sólida.
- c) O Al^{3+} sendo trivalente, é mais fortemente retido que os divalentes. O H^+ em razão de suas propriedades específicas, com ligações preferencialmente covalentes, não se comporta como monovalente, quanto à preferência de troca. Seu papel depende, também, da natureza da matriz trocadora do solo.

A CTC da matéria orgânica deve-se aos grupos carboxílicos ($R-COOH$), fenólicos (C_6H_5OH), alcoólicos ($R-OH$) e metoxílicos ($R-OCH_3$), encontrados na superfície das moléculas dos ácidos húmicos que entram na sua composição. A

CTC da matéria orgânica do solo depende do grau de acidez desses grupos que, por sua vez, varia com o pH.

O levantamento dos solos de Nova Friburgo não registra os valores de CTC ou valor V (% de saturação em bases). Como o objetivo das análises eram as recomendações de adubação e calagem, os dados foram interpretados em conjunto. Por isso, o relatório final deste levantamento considerou os resultados de valor de V (% de saturação em bases) como uma medida que indica melhor as demandas de adubação, já considerando o total de cargas trocáveis do solo (CTC).

Pela figura 11 observa-se que a maioria dos solos agrícolas analisados (272 amostras) apresenta um percentual de saturação em bases muito inferior ao recomendado para as espécies agrícolas da região (Barradas, 2006).

Quando se tem uma saturação elevada de base, o Ca^{2+} e o Mg^{2+} são adsorvidos por cargas que variam com o pH, favorecendo as reações de hidrólise e aumentando a atividade desses cátions na solução do solo. Assim, cresce a sua disponibilidade de transporte para camadas mais profundas do perfil (MALAVOLTA, 1980).

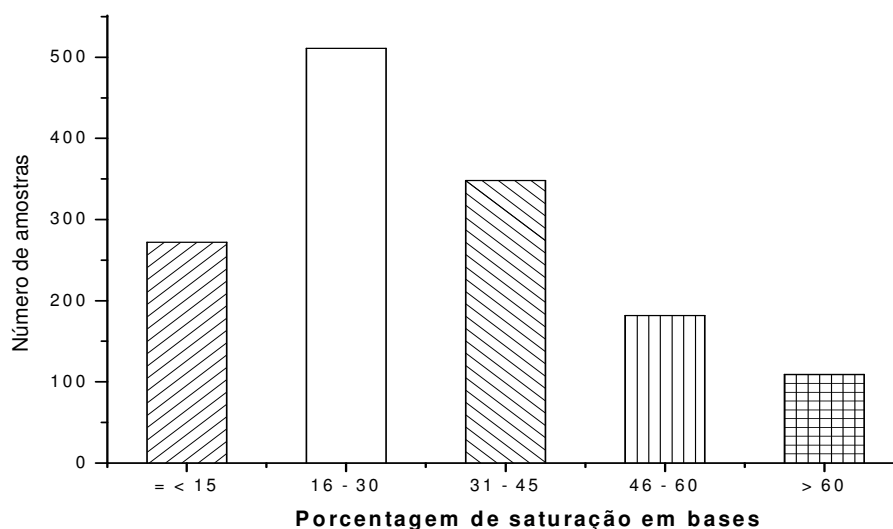


Figura 11 – Distribuição dos valores de V nas amostras de solo agrícola do município de Nova Friburgo entre os anos de 2002 e 2006 (Barradas, 2006).

1.3.7. P assimilável (fósforo assimilável)

Nas regiões tropicais, como acontece com o Brasil, a freqüente falta de P no solo limita a produção.

No solo, o fósforo pode ocorrer em três compartimentos principais: (i) fósforo inorgânico que pode estar fortemente adsorvido na rede cristalina, ligado ao Al^{3+} , ao Fe^{3+} ou ao Ca^{2+} ; (ii) Fósforo inorgânico que pode estar fracamente adsorvido ou disponível na solução do solo e (iii) fósforo orgânico.

Pela carência de P na solução do solo, quando se consideram os macronutrientes, a adubação é a via inevitável para os solos da agricultura tradicional (manejo químico).

Para anular o alto poder de fixação do P ao solo, faz-se a adubação corretiva ou fosfatagem, incorporando-se, antes do plantio, uma quantidade significativa de adubo fosfatado. Durante o plantio, a cultura recebe, então, uma dose menor de adubo localizado.

A fixação é considerada como a principal responsável pela baixa eficiência da adubação fosfatada. A pobreza em P dos solos brasileiros e o seu alto poder de fixação fazem com que os adubos fosfatados sejam os mais consumidos no país, embora as necessidades das culturas sejam relativamente baixas.

Para as áreas de plantio de Nova Friburgo, a maioria das amostras apresenta níveis considerados baixos desse elemento como indica a Figura 12. Porém, mais da metade do número de amostras acusaram níveis muito altos de fósforo. Isto confirma o grande consumo dessa forma de manejo químico nos solos agrícolas da região.

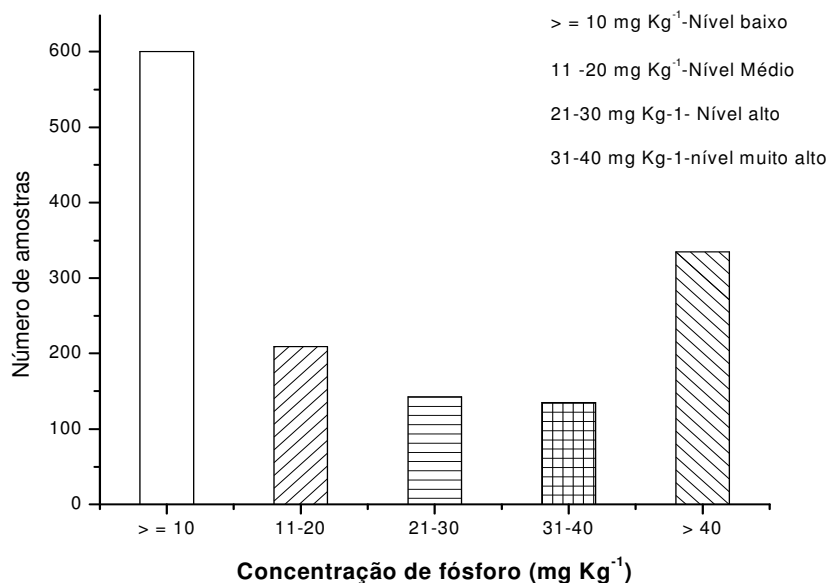


Figura 12 – Distribuição da concentração de fósforo assimilável nas amostras de solo agrícola do município de Nova Friburgo entre 2002 e 2006 (Barradas, 2006).

1.3.8. Necessidade de Calagem

A calagem refere-se à quantidade de calcário ou de outro material alcalino necessário para neutralizar a acidez dissociada e não dissociada na faixa que vai da condição inicial a uma outra. Tal faixa pode ser a neutralidade ou uma menos ácida (Mc Lean, 1973 citado por Malavolta, 1980). Em geral, pretende-se atingir o pH mais favorável para a espécie vegetal a ser cultivada. Outros critérios podem ser o de inativar o Al^{3+} trocável ou o de atingir dado grau de saturação em bases, Ca^{2+} ou $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$.

A calagem leva a um aumento no pH do solo e, por isso, ocorrem variações na sua composição (Malavolta, 1980). O emprego de doses crescentes de calcário (neutralizante ou corretivo de acidez) tende a aumentar o grau de saturação do solo em calcário, diminuindo a de saturação de Al^{3+} .

O elemento mais eficiente para prever a necessidade de cal dos solos das regiões tropicais é o nível de Al^{3+} trocável. Isto está em oposição com a teoria aplicada nas regiões temperadas onde a obtenção de um pH específico é o único critério. Aparentemente, nos solos muito intemperizados nos trópicos, o nível de Al^{3+} na solução do solo correspondente a um dado pH é menor que o existente em solos menos intemperizados das regiões temperadas. Os solos das regiões tropicais úmidas são em geral muito resistentes a variações acima do pH

5,5 e qualquer tentativa de fazer a calagem a níveis convencionais de pH como 6,5 a 7,0 não é aconselhável (Pearson, 1975, citado por Malavolta, 1980).

A calagem, por aumentar a biodisponibilidade dos elementos nutrientes, proporciona redução de despesas com insumos pela maior eficiência das quantidades aplicadas à lavoura.

O perfil da necessidade de calagem na região agrícola do município de Nova Friburgo mostra que 562 amostras apresentam necessidade de calagem igual ou inferior a 0,5 T/ha, demonstrando que, na região, as correções de pH e dos teores de Ca^{2+} e Mg^{2+} são realizados periodicamente (Figura 13).

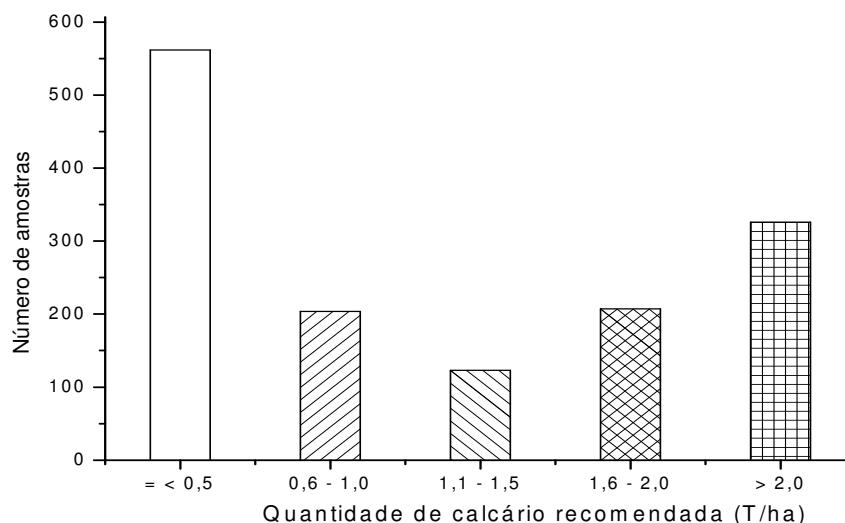


Figura 13 – Necessidade de calagem para os solos da região agrícola de Nova Friburgo, R.J (Barradas, 2006).

Os dados apresentados por Barradas (2006) indicam que na região agrícola do município de Nova Friburgo encontram-se áreas com solos distribuídos nas varias classes de fertilidade, de baixa a elevada.

Os resultados apresentados neste levantamento indicam que a maioria dos produtores da região vem utilizando adubos químicos sem que o solo esteja com a acidez devidamente corrigida, sendo este um fator determinante para a inibição da eficiência dos fertilizantes minerais empregados (Barradas, 2006).

1.4. Comportamento de pesticidas no solo

O solo é um recurso natural básico, constituindo um componente fundamental dos ecossistemas e dos ciclos naturais, um reservatório de água, um suporte essencial do sistema agrícola e um espaço para as atividades humanas. Ao mesmo tempo, o solo é via obrigatória dos pesticidas, independente de sua forma de aplicação.

A maior entrada de pesticidas no solo se dá pela sua aplicação direta, porém outras vias devem ser consideradas: a deriva, a erosão, a lixiviação, o escoamento superficial, o descarte e lavagem das embalagens vazias de agrotóxicos, barris e instrumentos de aplicação e o próprio manejo do solo.

No ambiente edáfico, as vias/processos/rotas de dispersão de pesticidas na vegetação (por fluxo de massa e difusão), retenção (sorção, absorção), transporte (deriva, lixiviação e carreamento superficial) e transformação (degradação química e biológica) são determinados pelo conjunto de interações entre as substância e as características do sistema em questão, como as condições meteorológicas, o perfil físico-químico do solo, a composição da fauna (populações de microorganismo, macrofauna e mesofauna), a topografia, a cobertura vegetal e as práticas de manejo introduzidas neste ambiente.

A freqüente interação de solos e pesticidas tem dificultado a avaliação do comportamento de determinado composto no ambiente. Estas substâncias apresentam propriedades como tempo de meia-vida de dissipação (DT_{50}), coeficiente de adsorção à matéria orgânica (K_{oc}) e solubilidade, que interagem com as propriedades físico-químicas dos solos resultando em diversificadas rotas de dispersão e/ou persistência. Várias são as formas de elaborar tal análise, muitas das quais demandam informações detalhadas, como as obtidas por simulações da dinâmica de pesticidas no perfil vertical dos solos (Ferracini, 2001).

A retenção do pesticida ao sistema edáfico é essencial na determinação da eficiência agrônômica dos agrotóxicos e de seus efeitos ambientais (Lanna, 2002) e envolve tanto a sorção de suas moléculas quanto sua absorção pelas plantas.

Os compostos poderão estar adsorvidos tanto aos seus colóides minerais quanto aos colóides orgânicos (partição hidrofóbica). Dependendo do mecanismo e da energia das ligações, as moléculas orgânicas podem se

apresentar na forma de resíduo-ligado, não estando em equilíbrio com a solução do solo.

O resíduo-ligado é definido como compostos que persistem no solo, planta ou animal, na forma de molécula original (parental) ou de seus metabólitos após extrações que não alterem significativamente a natureza da molécula nem a estrutura da matriz (Fuhr e colaboradores, 1998).

Quando a concentração dos compostos orgânicos está em equilíbrio com a solução do solo, a dessorção pode ocorrer disponibilizando novas moléculas e tornando-as biodisponíveis. Dessa forma, estes se tornam susceptíveis ao processo de absorção, degradação e transporte ao longo do perfil do solo, caracterizando o processo denominado remobilização (Lavorenti, 1997, citado por Prata, 2002).

A sorção de compostos orgânicos associados à fração orgânica do solo acontece junto às superfícies externas e penetração nos vazios internos das substâncias húmicas e/ou dos microagregados argilo-húmicos (Khan, 1991). Quanto menor for a adsorção do pesticida nos colóides do solo e menor a sua taxa de degradação neste ambiente, maior será sua mobilidade potencial (Urzedo e colaboradores, 2006). De modo geral, solos com alta composição de argila e silte, por exemplo, não permitem que os pesticidas, principalmente os clorados, migrem através dele (Lanna, 2002).

A temperatura e o tipo de cultura também influenciam grandemente a persistência dos agrotóxicos. As velocidades de degradação são mais altas sob altas temperaturas e radiação mais intensa (Lanna, 2002; Dores e De-Lamonica-Freire, 2001). Entretanto, alguns estudos mostram que a toxicidade também deve aumentar com o aumento da temperatura (Dores e De-Lamonica-Freire, 2001). As culturas de cobertura tendem a aumentar a persistência dos agrotóxicos, provavelmente por diminuir o grau de evaporação do solo (Lanna, 2002).

A alta radiação solar da região favorece a degradação de pesticidas por fotólise, o que pode reduzir a meia-vida dos ingredientes ativos no solo em relação aos dados encontrados na literatura, pois estes últimos se referem, na sua maioria, a regiões temperadas (Lanna, 2002).

A adaptação dos microorganismos do solo a determinados pesticidas é um processo comum e tem sido verificada em muitos estudos. Neste caso, em áreas com aplicações prévias de determinados compostos, sua persistência pode ser consideravelmente reduzida (Papini e Andréa, 2001). Esta alteração na velocidade de transformação leva o nome de biodegradação acelerada. O

inseticida carbofuran pode ser considerado em exemplo disso, pois já houve relatos de redução de sua eficiência no controle de insetos em áreas com aplicações prévias desse inseticida (Racke, 1991). Este evento tem efeito determinante no processo de dissipação do pesticida no ambiente.

O índice de meia-vida ($t_{1/2}$) expressa o tempo em que 50% da concentração inicial aplicada encontra-se dissipada no solo. Este índice, por envolver a dissipação da molécula original, pode não representar bem o destino de um pesticida em determinados casos específicos.

Das e colaboradores (2005) concluíram que o metilcarbamato carbofuran apresentou maior persistência em um solo laterítico do que em um solo aluvial com $t_{1/2}$ de 16 e 8 dias, respectivamente. Como cada solo tem uma composição microbiana particular, isso resulta em diferentes metabólitos formados e velocidades de biodegradação que correspondem à estimulação ou inibição conferida pelas aplicações do pesticida em questão. Por isso, as características físico-químicas são importantes para a avaliação do comportamento dessas substâncias nos solos, mas sua relação com outros fatores é fundamental como, por exemplo, o efeito sobre as populações de decompositores.

O monitoramento dos agrotóxicos deve considerar a dinâmica particular dos diversos ambientes edáficos agrícolas na avaliação da dissipação e toxicidade dos agrotóxicos neste meio. O tipo de formulação, os solventes utilizados e os surfactantes também podem influenciar na transformação dos pesticidas. Pesticidas em formulações granuladas, por exemplo, tendem a ser mais persistentes que concentrados emulsionáveis e outros. Além disso, todos os ingredientes inertes e impurezas misturadas a eles podem afetar a microbiota do solo responsável por sua degradação no meio.

A permanência dos agrotóxicos no solo é inversamente dependente da taxa de ocorrência dos processos de transporte. As substâncias carregadas juntamente com a água que alimenta os aquíferos causa contaminação das águas subterrâneas por lixiviação. O escoamento superficial do solo favorece a contaminação das águas de rios, lagos, córregos e demais afloramentos e os compostos podem ser arrastados, adsorvidos às partículas do solo erodido ou podem ficar em suspensão na água de escoamento (Spadotto, 2004).

Nota-se, aqui, que as características de solo e pluviosidade da região favorecem a contaminação de águas subterrâneas e superficiais, enquanto as altas temperaturas e radiação solar favorecem a vaporização e degradação dos pesticidas por fotólise, o que contribui para a redução da meia-vida destas substâncias no solo. Laabs e colaboradores (2000), em um estudo realizado

sobre a dissipação de pesticidas em Latossolos brasileiros, constataram que, em contraste com regiões temperadas, as meias-vidas eram bastante menores, principalmente devido à maior degradação e perdas por volatilização.

Deve-se considerar também que, quando pesadas chuvas ocorrem pouco tempo após a aplicação dos pesticidas, a possibilidade de penetração no solo aumenta devido ao menor tempo que as substâncias estiveram expostas a mecanismos de dissipação. Uma vez que a época de aplicação de pesticidas, em geral, coincide com o período de chuvas mais intensas, esta hipótese torna-se bastante provável; o contrário acontecendo para o manejo da época de estiagem.

A transformação de um pesticida no solo consiste na alteração da sua estrutura molecular por meios bióticos ou abióticos. A transformação total, que dá origem a CO_2 , H_2O e íons minerais, é chamada de mineralização, e a transformação parcial, que dá origem a subprodutos (metabólitos), recebe o nome de metabolização. Os metabólitos resultantes da transformação tendem a diminuir a toxicidade do pesticida, embora possa, em certos casos, resultar em compostos mais tóxicos que a molécula parental (Cox, 1997).

As vias bioquímicas de biodegradação dependem das populações microbianas presentes e de condições abióticas que interfiram nas reações químicas envolvidas.

Segundo Helal (2006), a troca de cátions e a ligações de hidrogênio são os mecanismos envolvidos na adsorção de metomil às substâncias húmicas. O primeiro é um tipo de interação característica de grupos funcionais carboxílicos e de oxidrilas fenólicas presentes nas substâncias húmicas, os quais podem ser protonados na solução do solo, assumindo forma iônica. Os compostos orgânicos carregados podem reagir com os sítios carregados presentes nas substâncias húmicas. O metomil é um pesticida polar (não ionizável) que tem grupos funcionais como $\text{C}=\text{O}$, capazes de atrair pontes de H, o que lhe confere uma estrutura altamente polar. Uma molécula muito polar é mais suscetível a mover-se em superfícies carregadas, aumentando a probabilidade de pontes de hidrogênio (Chen et al., 2004). Os materiais orgânicos (matéria orgânica do solo) possuem alguns grupos funcionais como ácidos carboxílicos (COOH) e hidroxilas (OH) que podem prover alguns sítios de adsorção. A adsorção ocorre pela força das pontes de hidrogênio entre as moléculas de metomil e os sítios de adsorção primários. As moléculas de metomil, então adsorvidas, constituem sítios de adsorção secundários nos quais são providas por pontes de hidrogênio (Dural e Chen, 1997). Portanto, o mecanismo é eficiente para envolver a

formação de aglomerados de moléculas, inicialmente centradas em sítios específicos, e favorecendo a união nas camadas secundárias subsequentes prosseguindo a adsorção (Yang et al., 2005). A habilidade da formação de pontes de hidrogênio depende da solubilidade do composto orgânico, da sua concentração na solução, do pH e da força de ligação do H nos grupamentos funcionais das substâncias húmicas (Hamaker e Thompson 1972, citado por Canellas et al, 2008).

O estudo de escoamento superficial (*“run off”*) feito por Harvey e Pease (1973) com metomil marcado sob condições de uso agrícola não mostrou deslocamento para áreas adjacentes.

Ao mesmo tempo, áreas distantes dos pontos críticos de contaminação podem ser afetadas, como acontece com áreas inundadas que, mesmo distantes dos pontos de aplicação dos pesticidas, são alvo de contaminação pelos compostos mais solúveis. Dessa forma, a dinâmica hídrica da região pode mudar o quadro esperado de contaminação: os compostos podem estar presentes em altas concentrações no solo, mesmo que reconhecidos como menos persistentes neste compartimento.

A primeira etapa da degradação metabólica dos carbamatos em solo é a hidrólise. Ésteres simples são hidrolisados a seu ácido ou álcool (instável). Em geral, as reações de degradação dos carbamatos em solos são descritas em detalhes na revisão de Still e Herrett (1975). O produto de hidrólise (S-metil n-hidroxi-tioacetimidato) e uma mistura traço de muitos compostos polares são os intermediários da degradação antes de formar seu principal produto final, o dióxido de carbono.

Estudos de laboratório mostraram que o metomil foi degradado rapidamente pela atividade microbiológica no solo com o dióxido de carbono como seu produto final. Em solos tratados com metomil em condições de campo, somente resíduos traço, suas oximas e uma fração polar permaneceram depois de um mês, não sendo mais detectado depois de um ano (Harvey e Pease, 1973).

Segundo Harvey e Pease (1973), o metomil se dissipa rapidamente em areia fina e solo areno-argiloso. Seguido um mês da aplicação em solo, apenas 1,8% da dosagem aplicada foi recuperada e depois de um ano o composto não foi mais encontrado.

A velocidade de degradação do metomil também foi investigada nos estudos para tiodicarbe onde o metomil aparece como metabólito. Em geral,

estes estudos mostram que o metomil é moderadamente ou pouco persistente em solos sob condições aeróbicas de laboratório ($DT_{50} = 4 - 15.2$ dias).

A acetonitrila foi detectada como o principal metabólito volátil. A comissão da European Food Safety Authority (EFSA, 2006) considerou ser o potencial de contaminação ambiental da acetonitrila derivado do uso de metomil, insignificante em relação a outras fontes antropogênicas.

Estudos sobre a degradação fotolítica de metomil sobre condições naturais de irradiação em um solo seco sob condições não estéreis não identificou novos metabólitos. A velocidade de degradação do metomil sob condições de irradiação foi maior que o controle (escuro), porém menores que em condições aeróbicas. É esperado que, em condições ambientais normais, a degradação microbiana predomine sobre a fotolítica (EFSA, 2006).

Por causa de sua alta solubilidade em água e baixa afinidade pelos ligantes do solo, este composto pode ser um potencial contaminante de águas subterrâneas. Ele é menos móvel em solos argilo-arenosos e solos argilo-siltosos por conta da maior superfície de adsorção nestes solos, porém tal dado também deve ser relativizado conforme os teores de matéria orgânica, por exemplo.

A questão do impacto ambiental e o significado dos seus metabólitos com relação à persistência e bioacumulação em certas espécies e na cadeia alimentar tem ainda que ser respondida. Até o momento, os estudos de degradação em diversos ambientes indicam que os metabólitos de metilcarbamatos conhecidos são rapidamente biodegradáveis e menos tóxicos do que as suas moléculas precursoras (Still e Herret, 1975).

O uso dos metilcarbamatos na agricultura levou ao aumento de seus resíduos em matrizes ambientais, principalmente em solos (Sun e Lee, 2003). Por isso, estão na lista de prioridades formulada pela EPA.

É importante definir o comportamento do metomil em solos sob as condições ambientais de áreas de risco de contaminação visto as limitações à aplicação de modelos e índices obtidos em condições diferentes. A grande variedade de solos, com diferentes composições granulométricas, de matéria orgânica, teor de metais e pH, entre outros parâmetros, influencia diretamente o comportamento dos pesticidas. Nesse caso, quaisquer definições das potencialidades de contaminação de determinado composto serão sempre discutíveis.

A instrução normativa do IBAMA institui o Sistema Permanente da Avaliação e Controle dos Agrotóxicos, seus componentes e afins, que compreende os seguintes subsistemas: a) classificação do potencial de periculosidade ambiental; b) estudo de conformidade; c) avaliação do risco ambiental; d) divulgação de informações; e) monitoramento ambiental; f) fiscalização. Este documento define, entre as informações necessárias para obtenção de registro dos agrotóxicos, relatório de avaliação toxicológica que inclui o comportamento no solo envolvendo os seguintes itens: i) teste de biodegradabilidade imediata e em solos; ii) avaliação da mobilidade; iii) teste para avaliação da adsorção/dessorção.

Em solos brasileiros, como os encontrados na região da microbacia do Córrego de São Lourenço (N.F.), verifica-se uma maior mobilidade de diversas substâncias ao longo do perfil por serem bem drenados e geralmente de textura arenosa (como os Latossolos Vermelho-Amarelos e os cambissolos, por exemplo).

1.5. Metilcarbamatos

Os metilcarbamatos foram isolados a partir de substância extraída do feijão Calabar (*Physostigma venenosum*) em 1864. A physostigmina (ou eserina) tem uma pronunciada ação colinérgica de inibição da atividade catalítica das enzimas colinesterases presentes em insetos e mamíferos (Still e Herrett, 1975). Após a determinação de sua estrutura, em 1925, foram sintetizados análogos com atividade tanto do ponto de vista farmacêutico/farmacológico quanto agroquímico.

Os metilcarbamatos são divididos em dois grupos: carbamatos e carbamatos de oxima, mas seus modos bioquímicos de ação são similares. A Tabela 1 apresenta as propriedades e características para alguns metilcarbamatos.

Tabela 1 – Propriedades Físico-químicas e valores toxicológicos de alguns metilcarbamatos.

Nome Químico (IUPAC)	Nome Genérico	S_w (mg L ⁻¹)	K_{oc}	Sistêmico	Log K_{ow}
1-naphtil metilcarbamato	Carbaril	40	300	Não	2.81
2,3-diidro-2,2-dimetil-benzofuranil-metilcarbamato	Carbofuran	320	22	Sim	2.32
2-metil-2-(methylthio)propionaldehyd e O-metilcarbamoxyloxima	Aldicarbe	6000	30	Sim	1.13
n,n-dimetil-2-metilcarbamoiloxiimino-2-(metiltio)acetamida	Oxamil	280000	25	Sim	0.4
S-methyl n-(methylcarbamoxyloxy)tioacetimidato	Metomil	57900	72	Sim	1.08
2-isopropoxiphenil metilcarbamato	Propoxur	2000	30	Sim	1.56

Fonte: Kanrin, 2000

Valores de K_{ow} são expressos, normalmente, na forma logarítmica (log K_{ow}).

O coeficiente de partição associado à matéria orgânica (K_{oc}) indica a tendência a adsorção por partículas sólidas. Altos valores de K_{oc} indicam uma tendência para o composto ser adsorvido preferencialmente pelas partículas minerais do solo do que dissolvido na sua solução. Moléculas adsorvidas fortemente têm pouca mobilidade no perfil do solo. Valores de K_{oc} menores que 500 indicam pouca ou nenhuma adsorção e alto potencial de lixiviação ou escoamento.

Pela tabela anterior, observa-se a diversidade de propriedades desta classe de substâncias indicando comportamentos diversos no ambiente, com diferentes rotas de transporte e, conseqüentemente, diferentes potenciais de contaminação ambiental.

1.5.1. Metomil

O metomil, S-methyl n-(methylcarbamoxyloxy)tioacetimidato] (IUPAC), é um metilcarbamato com fórmula molecular $C_5H_{10}N_2O_2S$. É um inseticida de amplo espectro, com propriedades sistêmicas, tóxico a insetos tanto por contato quanto por ingestão e não ionizável no ambiente, sob condições normalmente observadas. É um produto usado em cerca de 100 países (du Pont de Nemours, 1975) e conhecido comercialmente pelas sinonímias: Acinate, Agrinate, DuPont 1179, Flytek, Kipsin, Lannate, Lanox, Memilene, Methavin, Methomex, Nudrin, NuBait, Pillarmate (Kanrin, 2000).

O metomil pode, em princípio, existir sob as formas isoméricas *cis* e *trans* sobre a ligação dupla $C=N$. Entretanto, a forma *cis* é fortemente favorecida termodinamicamente. Na prática, o isômero *trans* não é detectável (FAO, 2002).

Este composto é classificado pela EPA como altamente tóxico e de uso restrito pela sua toxicidade aguda em humanos (FAO, 2002, 3p.). A formulação nacional mais difundida na região é o Lannate inseticida, solução miscível em água. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a classificação de pesticidas por periculosidade e lista este composto na classe de altamente perigosos.

Segundo a monografia¹ do composto, seu limite máximo de resíduo (LMR) considerado como a soma de metomil e hidroxítioacetimidato de metil, expressa como metomil – é de 3 mg Kg^{-1} para verduras como brócolis, repolho e couve e de 1 mg Kg^{-1} para tomate. Classificado como extremamente tóxico (classe toxicológica I), carência de 3 a 14 dias, dependendo da cultura com aplicação foliar recomendada (ANVISA, 2007).

O metomil (Figura 14) pertence a classe dos inseticidas carbamatos de oxima, como o aldicarbe e o oxamil, também amplamente utilizados para fins fitossanitários. Ele também é o metabólito de outro pesticida em uso, o tiodicarbe, representado na Figura 15.

¹ As monografias contém o resultado da avaliação e reavaliação toxicológica dos ingredientes ativos destinados ao uso agrícola, domissanitário, não agrícola e preservante de madeira. Trazem, entre outras informações, os nomes comum e químico, a classe de uso, a classificação toxicológica e as culturas para as quais os ingredientes ativos encontram-se autorizados, com seus respectivos limites máximos de resíduo permitido para as principais culturas em que é permitido seu uso.

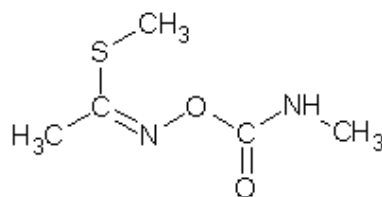


Figura 14 – Fórmula estrutural do metil-carbamato metomil

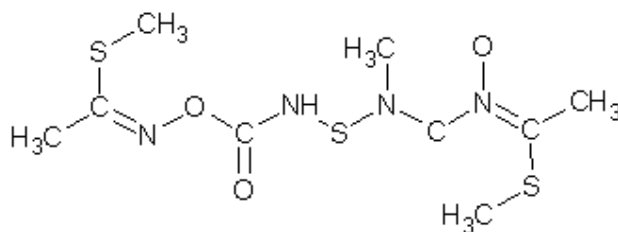


Figura 15 – Fórmula estrutural do Tiodicarbe.

1.5.1.1. Toxicidade do metomil

No relatório de atualização do registro fornecido pela EPA (1998), o metomil foi indicado como tendo pouco ou nenhum potencial carcinogênico e também sem atividade nos vários testes de mutagenicidade realizados. O mesmo documento o indica, contudo, como altamente tóxico para pássaros, mamíferos e organismos aquáticos.

Segundo o relatório técnico da EFSA, de 2006, em *Daphnia magna*, a formulação comercial SL (solúvel concentrada) indica EC_{50} em 96 horas de 0,098 mg L⁻¹ em 27 dias em adultos e 0,084 em neonatos. Os testes com *Lepomis macrochirus* ("bluegill sunfis") indicam uma LC_{50} de 96 horas de 0,63 mg L⁻¹ e no estágio jovem de *Pimephales promelas* ("fathead minnow") o EC_{50} é de 0,073 mg L⁻¹. Em nematóide (*Eisenia foetida*) a CL_{50} é de 19 mg L⁻¹ de metomil.

Tabela 2 – Valores Toxicológicos de metomil em água potável (EPA e WHO).

Parâmetros de Toxicidade	Níveis de consumo
ADI	0,03 mg/Kg/dia
HA	0,2 mg L ⁻¹

ADI: Dose máxima da substância sem riscos conhecidos à saúde humana quando consumida diariamente ao longo da vida. É estabelecida pela WHO.

Lifetime Health Advisory (HA or LHA): Índice da EPA para avaliar a significância de um contaminante na água potável. Corresponde à concentração do contaminante que pode ser consumida diariamente na água potável ao longo da vida sem efeitos conhecidos à saúde humana.

Os inseticidas organofosforados e carbamatos são absorvidos pelo organismo, pelas vias oral, respiratória e cutânea. A absorção por via oral ocorre nas intoxicações agudas acidentais, nas tentativas de suicídio, sendo, portanto, a principal via implicada nos casos atendidos nos serviços de emergência. A via dérmica, contudo, é a via mais comum de intoxicações ocupacionais, seguida da via respiratória (Caldas, 2000).

1.6. Métodos analíticos

Os estudos sobre metodologias de extração e determinação de agrotóxicos em solos focalizam, na sua grande maioria, os compostos com alta adsorção e persistência nesta matriz. Por isso, observa-se hoje um pequeno número de artigos relatando procedimentos para metomil em solos, já que este vem sendo considerado potencial contaminante de águas subterrâneas pelas principais agências ambientais internacionais. Os metilcarbamatos Carbofuran e Carbaril têm merecido maior atenção pela sua ampla utilização em vários países, maior toxicidade e persistência nos solos estudados.

Os laboratórios de controle e execução de programas de vigilância empregam métodos multiresiduais, cobrindo uma ampla faixa de pesticidas de diferentes famílias. Não sendo suficientemente sensíveis para todos os compostos utilizados, a outra alternativa é a adoção de métodos seletivos que se aplicam a pesticidas da mesma família ou a um único ingrediente ativo.

O método espectrofotométrico proposto em 1976 por Rangaswamy e colaboradores consiste na conversão de metomil em sua oxima e consecutivamente a hidroxilamina por indução de hidrólise em extratos de solo fortificados. As conversões alcançaram 100% e a recuperação variou entre 76% a 100%.

A determinação de metomil tem como padrão o método descrito por Krause (1980), cuja sensibilidade permite seu uso para determinação de n-metilcarbamatos em frutas e vegetais. Os carbamatos são hidrolizados com solução alcalina (geralmente NaOH) a uma metilamina que é sequencialmente derivatizada para criar um produto fluorescente. O método envolve extração com metanol, uma grande quantidade de amostra e uso de solvente, além das etapas de *clean-up*.

Em 1983, Dekker e Houx utilizaram extração por agitação e a determinação de metomil em solos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) em HPLC com detecção por fluorescência e Ultra-violeta (UV). A fluorescência seguiu o método padrão para estes compostos (Krause, 1980) obtendo limite de detecção de 2 ng mL^{-1} , bem abaixo do encontrado para a detecção por UV que foi de 100 ng mL^{-1} . Com concentrações de fortificação de 4 e 6 mg g^{-1} , alcançaram recuperações de 83 e 95%, respectivamente.

Em laboratórios modernos, a metodologia clássica para determinação de poluentes em matrizes sólidas, baseada em agitação ou extração Soxhlet, tem sido substituída pelo consumo de menor tempo e solvente e muitas vezes automatizadas, o que inclui processos de alta pressão e/ou temperatura: extração assistida por microondas (MAE), extração por fluido supercrítico (SFE), extração por solvente acelerado (ASE), extração por agitação vigorosa e extração ultrassônica (USE).

Em 1994, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) adotou a agitação manual como referência (método 8318) para a extração de metomil e os demais n-metilcarbamatos em solos, que permanece até hoje como o método de referência e mais adotado. A extração é feita com acetonitrila por 4 horas, seguida de pré-concentração do extrato com aquecimento a 50°C sob fluxo de nitrogênio. O *clean up* é feito em catucho de C-18 com o metanol como eluente. A determinação é feita utilizando HPLC com detector de fluorescência, para solos contaminados com 2 mg Kg^{-1} obtendo recuperação de 76% para metomil.

As técnicas de extração que empregam vácuos ou elevada pressão e temperatura (instrumentos Soxhlet, por exemplo) têm sido utilizadas na etapa de

extração dos pesticidas em matrizes aquosas ou sólidas (alimentos e solos). A degradação térmica de grande parte dos pesticidas mais polares, como é o caso dos inseticidas carbamatos e organofosforados, compromete o uso destas metodologias.

Castro e colaboradores (2003) desenvolveram um novo extrator Soxhlet com irradiação de microondas (MASE) que apresentou vantagens em relação à extração Soxhlet convencional. Por conta do menor tempo de extração, pode-se utilizar este sistema em amostras de solo com metilcarbamatos, já que o tempo de residência é o responsável pela degradação destes compostos termolábeis.

Sun e Lee (2003) compararam o procedimento de extração por microondas e o SFE para vários carbamatos (propoxur, propham, methiocarb, chlorpropham). Em geral, as recuperações no método MASE foram maiores que no método SFE. Porém, em solos “envelhecidos” por 60 dias, ambos os procedimentos obtiveram queda de recuperação na extração de todos os metilcarbamatos considerados. Neste caso, o procedimento de microondas foi mais eficiente que a extração por fluido supercrítico, mostrando ser uma melhor opção para a extração de pesticidas metilcarbamatos de solos “frescos” ou “envelhecidos”.

Em muitas situações, a extração assistida por ultra-som é uma alternativa eficiente, rápida e de baixo custo em relação às técnicas de extração convencionais, porém, até aqui, existem poucos casos descritos na literatura onde a extração de carbamatos em solos foi feita utilizando ultra-som. Caballo-Lopes e Castro (2003) obtiveram recuperações dos diversos carbamatos adotando a extração por ultra-som em torno de 80% para cinco metilcarbamatos similares aos valores encontrados no método 8318 (EPA) utilizando solos de várias classes texturais.

O procedimento de extração por banho de ultra-som foi utilizado por Sanchez-Brunete e colaboradores (2003) em amostras de solos superficiais (0-10 cm) da região de Madrid (Espanha) e contaminados com 0,2 µg/g de metomil. As recuperações chegaram a 90% e o cromatograma obtido por cromatografia líquida (HPLC) com detector de fluorescência mostra que a etapa de “*clean-up*” foi desnecessária. O limite de quantificação foi de 10 µg kg⁻¹.

No final da década de 1980, a extração em fluido supercrítico (SFE) surgiu como uma alternativa em substituição aos procedimentos de partição sólido-líquido. O fluido possui elevado coeficiente de difusão que favorece o processo de extração sobretudo em matrizes sólidas. A baixa reprodutibilidade do SFE sugere que estes procedimentos devem ser testados em outras amostras, a fim de verificar se há algum efeito de matriz. Este é um dos principais motivos que

tornam difícil a inclusão de métodos de preparo de amostras baseados nos procedimentos de SFE como alternativa às metodologias convencionais de bancada.

Em geral, as recuperações são baixas na extração dos metilcarbamatos devido ao fato de não ser possível usar condições drásticas para preservar a integridade estrutural desses pesticidas. Quando a extração supercrítica foi usada para a extração de metilcarbamatos em solos, as recuperações obtidas para solos envelhecidos por 24 horas foram menores que 50% depois de 30 minutos de extração dinâmica (Stuart e colaboradores, 1999).

Ainda é necessária a otimização da SFE para pesticidas, pois, de modo geral, ela não tem se mostrado muito eficiente na análise multiresidual. A demanda do tempo envolvido na preparação da amostra e a quantidade de solventes tóxicos usados frequentemente são outras desvantagens destes métodos. Portanto, é necessário o uso e o desenvolvimento de técnicas de baixo custo, rápidas, de fácil uso, robustas e sensíveis que sejam adequadas à análise de campo.

A Du Pont, fabricante da formulação comercial de metomil (Lannate), indica a extração por agitação com acetato de etila, *clean up* em coluna de sílica gel e determinação por HPLC com detecção por UV. Este método foi submetido a EPA para fins de manutenção de seu registro comercial pela Du Pont.

A confirmação de metilcarbamatos em amostras de alimentos e ambientais tem sido feita por HPLC com várias interfaces com a espectrometria de massas. Em geral, LC-MS com ionização à pressão atmosférica é o método escolhido para confirmação de pesticidas em amostras de alimentos e ambientais. A utilidade/disponibilidade de tal instrumentação tem crescido nos últimos anos, logo, sua implementação será de grande ajuda no controle de pesticidas.

Através do uso de espectrômetros de massa quadrupolar simples para a quantificação e confirmação do pesticida metomil em extratos de plantas, dados confirmatórios altamente reprodutíveis em matrizes complexas têm sido obtidos (Soler, 2006).

Em publicações mais recentes, os fatores que afetam a extração de pesticidas em solos têm sido otimizados por análise multivariada, não somente para avaliar a importância das variáveis de extração (volume de amostra, de solvente, seu teor de umidade) como também sobre as características físico-química das diferentes matrizes e seus efeitos sinérgicos sobre as metodologias.

As vantagens e limitações associadas às técnicas de extração e determinação dos compostos em matrizes complexas devem corresponder ao

perfil específico da matriz, das condições de contaminação e ao próprio procedimento de extração. Sun e Lee (2003) compararam os métodos de extração dos metil-carbamatos por ultra-som e SFE observando eficiências similares na recuperação de ambos, exceto para solos fortificados há 60 dias, onde a extração assistida por microondas (AE) apresentou melhores recuperações.

A maioria dos trabalhos envolvendo determinação de pesticidas concentra-se em amostras de alimentos e de água por conta das regulamentações e pelo controle da fiscalização sanitária e/ou ambiental. Em geral, os trabalhos visam o desenvolvimento e validação de procedimentos analíticos menos onerosos e que atendam a esse controle e que proporcionem as análises de um maior número de amostras em menor tempo e custo.

Técnicas e métodos analíticos que combinem algumas dessas características estão sendo desenvolvidos para análise de resíduos de pesticidas. A esse respeito, podemos mencionar as técnicas de imunoensaio (IA), cromatografia de imunoafinidade e os biosensores óticos e eletroquímicos.

1.6.1. Metodologia enzimática de inibição da acetilcolinesterase (AChE)

As técnicas que utilizam a medida da atividade catalítica das enzimas colinesterases se apresentam como procedimentos analíticos de custo menor do que as técnicas convencionais com sensibilidade adequada a análise de material clínico e ambiental.

Dois tipos de colinesterases são conhecidas e têm sido usadas como metodologias de análises: acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE). Esta última tem uma estrutura molecular similar a AChE, mas é caracterizada pela especificidade a diferentes substratos: a AChE hidroliza preferencialmente acetil ésteres como a acetilcolina, enquanto a BuChE hidroliza a butilcolina (Hosea e colaboradores, citado por Andreescu e Marty, 2006). Outro aspecto que distingue essas duas enzimas é a inibição da AChE pelo excesso de substrato. Além dos substratos naturais, as colinesterases também hidrolizam ésteres de tiocolina como a acetiltiocolina e a butiriltiocolina, entre outros.

As colinesterases extraídas de *Drosophila melanogaster* e enguia elétrica estão disponíveis comercialmente.

1.7. Princípio

A acetilcolina é o mediador químico necessário para transmissão do impulso nervoso em todas as fibras pré e pós-ganglionares do sistema nervoso autônomo (SNA). Ainda é o transmissor neuro-humoral do nervo motor do músculo estriado (placa mioneural) e algumas sinapses interneurais do sistema nervoso central (SNC). Para que haja a transmissão sináptica é necessário que a acetilcolina seja liberada na fenda sináptica e se ligue a um receptor pós-sináptico. Em seguida, a acetilcolina disponível é hidrolizada pela acetilcolinesterase como representado na Figura 16.

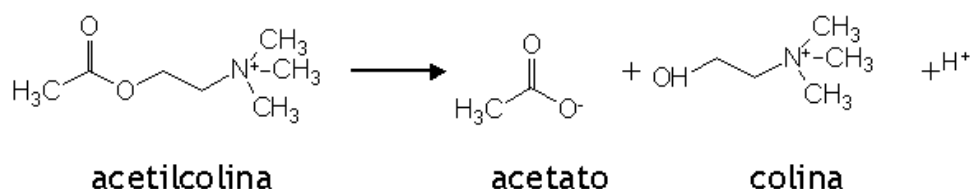


Figura 16 – Degradação da acetilcolina promovida pela ação catalítica da acetilcolinesterase.

Quando há a inibição da acetilcolinesterase ocorre um acúmulo de acetilcolina na fenda, levando a uma hiperestimulação colinérgica. A inativação da colinesterase dá-se através da ligação do composto ao centro esterásico da enzima. Assim, na ausência da acetilcolinesterase, a acetilcolina liberada acumula-se, provocando um colapso no sistema nervoso central, a perda da coordenação muscular, convulsões e, finalmente, a morte.

Na superfície da colinesterase existe um centro ativo para inativação da acetilcolina que contém um sítio aniônico e um esterásico. A inibição da colinesterase se dá através da ligação do composto com o centro esterásico da enzima diferindo apenas o tipo de ligação (fosforilação em organofosforado ou carbamilação em carbamatos). Tais substâncias são posteriormente hidrolisadas e a enzima regenerada. A taxa de regeneração varia de acordo com o composto. Se isso não ocorrer, supõe-se que uma forma fosforilada muito estável tenha sido produzida pela perda de um grupo alquil.

O princípio de detecção dos compostos anticolinérgicos é a inativação da enzima na presença de inibidores (analito). A inibição relativa é determinada por comparação com curvas de inibição construídas a partir de soluções-padrão dos compostos em estudo (Nunes, 2006).

Ellman e colaboradores (1961) desenvolveram uma metodologia de medição da atividade catalítica da acetilcolinesterase a partir da variação de absorbância do produto formado na reação de hidrólise da molécula de acetilcolina. A medida espectrofotométrica permite quantificar a variação da atividade da acetilcolinesterase e possíveis sinais de inibição. Desde então, esta metodologia vem sendo uma alternativa na avaliação da atividade enzimática da AChE e na determinação de substâncias colinérgicas (como organofosforados e metilcarbamatos).

O princípio do método de Ellman (1961) é a medição da velocidade de produção de tiocolina quando a acetiltiocolina é hidrolisada. Esta é acompanhada pela reação contínua do tiol com o íon 5:5 – ditiobis-2-2 nitrobenzoato para produzir o ânion de 5-tiol-2-nitrobenzoato. A reação com a grupo tiol tem se mostrado suficientemente rápida para não ser limitante da medição da velocidade da atividade da enzima e a concentração usada não inibe a hidrólise enzimática.

Os organofosforados são ditos inibidores irreversíveis da acetilcolinesterase, enquanto os carbamatos são ditos inibidores reversíveis (sofrem hidrólise *in vivo* em 12 a 48 horas).

Embora os carbamatos sejam rapidamente degradados, apresentam alta toxicidade, sendo inibidores competitivos das enzimas colinesterases presentes em insetos e mamíferos pela ação sobre seu centro ativo esterásico (Marques e Marques, 2006).

Vários carbamatos utilizam vias metabólicas similares tipo monoxigenases FAD-dependentes que rapidamente os degradam em oximas, sulfóxidos, sulfo, acetonitrilas e CO₂. A acetonitrila em concentrações elevadas no organismo pode determinar, por sua vez, o aparecimento de cianometahemoglobinemia. A maioria dos carbamatos, em geral, não causa sintomatologia exuberante no sistema nervoso central (SNC) e, quando esses sinais estão presentes, são considerados sinais de gravidade (Caldas, 2000).

A acetilcolinesterase pode ser utilizada na sua forma imobilizada, como biosensores, ou na sua forma livre, em solução.

1.7.1.1. Acetilcolinesterase como biosensores

Diferentemente dos imunossensores, que são caros e se limitam a detecção de um composto particular ou um conjunto de estruturas quimicamente

similares por reação-cruzada, os sensores enzimáticos têm sido apontados como uma alternativa para um amplo espectro de substâncias.

Os biosensores são materiais analíticos que combinam a especificidade de materiais biológicos, como por exemplo, as enzimas, com um transdutor, em geral eletroquímico. O transdutor é capaz de responder e transformar uma propriedade bioquímica e/ou físico-química em um sinal mensurável como resultado de um bio-reconhecimento entre um bio-receptor e seu analito alvo.

O primeiro biossensor enzimático foi o desenvolvido por Clarck e Lions, em 1962, utilizando a glicose oxidase sobre a superfície de um eletrodo amperométrico de oxigênio e sendo empregado para a quantificação de glicose. Desde então, vários sensores enzimáticos em diferentes configurações têm sido desenvolvidos. Entre eles, os biossensores utilizando as enzimas colinesterases têm demonstrado adequada sensibilidade ao monitoramento de amostras ambientais e de alimentos. Seu funcionamento é baseado na inibição dessas enzimas por contaminantes como os pesticidas e metais pesados (Andreescu e Marty, 2006).

A principal motivação para o desenvolvimento destes biossensores com fins de monitoramento de contaminantes foi a possibilidade de ser uma alternativa aos métodos analíticos clássicos/tradicionais utilizados (métodos cromatográficos acoplados a procedimentos espectrométricos: GC, HPLC-MS/HPLC-F/HPLC-UV). Estas técnicas, em geral, apresentam um custo e tempo de análise maior, muitas vezes exigindo o consumo de vários reagentes e a qualificação técnica de pessoal.

A etapa mais importante no desenvolvimento de um biossensor enzimático é a estabilidade da enzima sobre a superfície do eletrodo de trabalho. Este processo é determinado pelas várias interações entre a enzima e o material do eletrodo e afeta fortemente o desempenho do biossensor em termos de sensibilidade, estabilidade, tempo de reposta e reprodutibilidade. Neste contexto, a seleção do material apropriado para o eletrodo e o processo de imobilização da enzima é essencial (Andreescu e colaboradores, 2005, citado por Andreescu e Marty, 2006).

No campo de análise de pesticidas anticolinérgicos, os sensores enzimáticos adotados são os eletroquímicos baseados em detecção potenciométrica e amperométrica (Marty e colaboradores, 1998).

Os sensores amperométricos bi-enzimáticos baseados em duas enzimas, colinesterase e colina oxidase (ChO), apareceram no fim dos anos 1980 e foram usados para detecção de pesticidas organofosforados. Este sistema consiste na

hidrólise, pela Che, do substrato (acetilcolina para AChE) à colina e ao acetato. A colina não é eletroquimicamente ativa e a segunda enzima, a colina oxidase, é usada para produzir peróxido de hidrogênio que tem fácil detecção amperométrica.

Os biossensores monoenzimáticos baseiam-se na detecção amperométrica direta de tiocolina, o produto da reação catalizada pela AChE usando o substrato acetiltiocolina. Esse sistema tem duas grandes vantagens em relação ao bi-enzimático (Che/ChO): o uso de uma única enzima e o limite de detecção, menor que no uso da oxidação do peróxido de hidrogênio. Entretanto, sua limitação é a hidrólise espontânea do substrato na ausência da enzima. Os trabalhos de Nunes (1999a e 1999b) utilizam este sistema para a determinação do grupo de metilcarbamatos (ardicarbe, carbofuram e metomil) em amostras reais com limite de detecção de 0,2 – 1,5 ppb para metomil (Nunes, 1999b, 2004) .

Os biossensores potenciométricos baseiam-se na medição de mudanças de pH. Esta mudança é induzida pela formação de um ácido orgânico durante a hidrólise do éster de colina por uma esterase apropriada. No caso da AChE, a liberação de ácido acético formado pela hidrólise da acetilcolina. O trabalho de Andreescu e Marty (2006) utiliza os biossensores potenciométricos na determinação de carbamatos bendiocarbe e carbaril a partir da AChE. Os autores obtiveram um limite de detecção variável atingindo 108 ppb para o carbaril e 2,2 ppb para o bendiocarbe.

A maior limitação dos biossensores de ChE imobilizados está relacionada a sua incapacidade de diferenciar corretamente os analitos, tornando-se um método pouco seletivo. Em geral, todos os carbamatos, organofosforados e metais pesados inibem a atividade das ChE, porém em graus diferentes. Além disso, a inibição das ChEs não tem seguido os mesmos padrões que os observados com as enzimas em solução. Este fato tem sido atribuído à matriz usada na imobilização da enzima (Andreescu e colaboradores, 2002 a,b,c, citado por Andreescu, 2006).

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a seletividade aos diferentes inibidores das ChEs, o uso de enzimas mutantes e seu uso em sistemas de sensores multienzimáticos permitem a descrição do comportamento individual de inibição de misturas de organofosforados e de carbamatos (Bachmann et al, 2000; Schulze, 2003 e 2005).

1.7.1.2. Acetilcolinesterase livre (em solução):

Recentemente, técnicas envolvendo sistemas que utilizam as enzimas em solução vêm sendo usadas. Nesta configuração, o sistema fornece importantes indicações sobre os mecanismos de reação enzimática.

Em 1991, Bastos e colaboradores utilizaram a detecção potenciométrica da atividade da AchE em solução para a determinação de metilcarbamatos e organofosforados em amostras de água. Mais tarde, esta técnica foi estendida para amostras de alimentos por Moura (1998) que obteve níveis de resíduos quantificados menores que 1 mg L^{-1} . Posteriormente, Lima e colaboradores (1996) utilizaram o mesmo extrato enzimático para ativar, *in vitro*, compostos organofosforados (não prontamente inibidores das ChEs) em suas formas oxon-análogos. Assim, o uso da enzima acetilcolinesterase em solução mostrou ser um procedimento mais rápido e abrangente na detecção de compostos anticolinérgicos (metilcarbamatos e organofosforados). Uma comparação feita por Faria (2003) entre o método de incubação da AChE, sem imobilização, e o método clássico para determinação dos compostos anticolinérgicos, a cromatografia líquida de alta eficiência, indica que os resultados encontrados em amostras de água e alimentos são coerentes na faixa de 0,3 a 30 mg L^{-1} .

Em 1993, Nostrand e colaboradores propuseram modificações no método de Ellman (1961), entre as quais, cita-se a utilização de microplacas de 96 poços para as medições espectrofotométricas.