

3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Caracterização sócio-econômica

Para a escolha do inseticida a ser estudado, realizou-se um levantamento dos dados de culturas, dos inseticidas e de seus respectivos modos de aplicação.

Para o levantamento dos dados foi elaborado uma entrevista semi-estruturada aplicada ao universo de 35 trabalhadores rurais, entre pequenos produtores, meeiros e técnicos agrícolas que correspondem ao total de membros das duas localidades sob estudo. Para o levantamento dos dados foi elaborado uma entrevista semi-estruturada aplicada ao universo de 35 trabalhadores rurais, entre pequenos produtores, meeiros e técnicos agrícolas que correspondem ao total de membros das duas localidades sob estudo. O levantamento foi realizado com os seguintes itens de orientação/direcionamento: (a) produção (de inverno); (b) agrotóxicos mais usados; (c) sistema de irrigação; (d) preparo das caldas; (e) aplicação das caldas; (f) limpeza do equipamento de aplicação; (g) armazenagem; (h) destino das embalagens vazias; (i) o caso das estufas de sementes. Foram entrevistados produtores e meeiros da região, além de técnicos agrícolas que prestam assistência técnica e venda de insumos a esta comunidade. Falaram sobre a realidade de suas propriedades e das propriedades vizinhas. Foram acrescentadas aos resultados destas entrevistas as observações feitas pela autora pertencente à comunidade desde 2001, baseadas na sua convivência local (experimentação).

3.2. Área de Coleta, amostragem e pré-tratamento dos solos

As amostras de solo foram coletadas na localidade de Campestre e Baixada de Salinas em área agrícola do município de Nova Friburgo (RJ) situada na microbacia do Córrego de São Lourenço, uma das 13 bacias hidrográficas do município como representado na Figura 17.

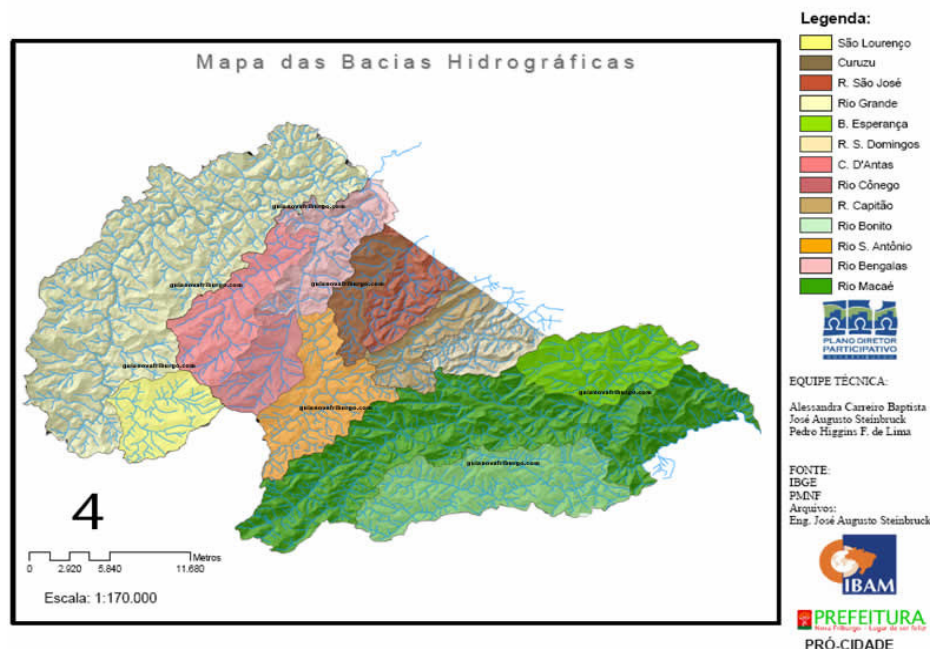


Figura 17 – Distribuição das bacias hidrográficas no município de Nova Friburgo.

A metodologia para coleta das amostras de solo seguiu o procedimento descrito por Mendes e Ricci (1997) e seu preparo para as análises foi realizado segundo Galvani e Fernandes (2005).

Na chegada ao laboratório, o material foi seco ao ar e peneirado em malha de 2 mm, conforme procedimento descrito por Galvani e Fernandes (2005).

3.2.1. Áreas Agrícolas

As amostras de solo foram coletadas ao longo das margens do principal rio da microbacia, o rio São Lourenço. Esta área de várzea é ocupada com o cultivo dos principais produtos da estação (couve-flor e beterraba) na margem esquerda do rio São Lourenço. A área é ausente de mata ciliar ao longo de toda a sua extensão por conta de desmatamento para implantação de plantio com manejo mecanizado.

A escolha dos pontos de amostragem levou em consideração diferentes critérios da dinâmica do composto no ambiente sob estudo: (i) alta solubilidade em água e baixa adsorção em solos, sendo, por isso, considerado contaminante potencial dos corpos d'água; (ii) entrada por escoamento superficial para o rio São Lourenço, (iii) entrada na época das chuvas, com as inundações regulares das áreas de várzeas, (iv) maior área de concentração de plantações do local; (v) presença de diferentes categorias de solos; (vi) proximidade com nascentes.

O relevo de baixada às margens do rio favorece a concentração de plantações em função das facilidades de manejo e disponibilidade de água para a irrigação, apesar de ser área inundada freqüentemente na época das chuvas, outubro a março (**Figura 18**).



Figura 18 – Vista do leito do rio São Lourenço nas proximidades da área de amostragem.

A Figura 19 mostra o mosaico de culturas, comum na região e típica da agricultura familiar, por se caracterizar por pequenas propriedades.



Figura 19 - Vista geral da área de amostragem de solos com mata remanescente à direita.

Pela diversidade de situações de manejo encontradas na região, a área de amostragem compreendeu locais de plantio das principais cultivares de inverno, além de áreas com diferentes tempos de pousio. Foram coletadas onze amostras de solos de pontos distintos sendo que todas elas com histórico de uso de pesticidas anticolinérgicos (carbamatos e/ou organofosforados). A Tabela 3 apresenta as coordenadas dos pontos de coleta e suas principais características:

Tabela 3 – Perfil de manejo das áreas de amostragem dos solos na região de Campestre/Baixada de Salinas.

Solo	Posição média da área	Histórico
Solo 1	S 22º 20.73' W 042º 40.172'	Pastagem
Solo 2	S 22º 20.648' W 042º 40.308'	Pousio longo (menos de um ano)
Solo 3	S 22º 21.072' W 042º 40.282'	Alternância de manejo orgânico e convencional
Solo 4	S 22º 20.565' W 042º 40.068'	Margem direita do rio São Lourenço (sem cultivo)
Solo 5	S 22º 21.153' W 042º 40.354'	Couve-flor (pós-colheita)
Solo 6	S 22º 21.143' W 042º 40.314'	Couve-flor (pré-colheita)
Solo 7	S 22º 21.677' W 042º 40.007'	Couve-flor (pré-colheita)
Solo 8	S 22º 20.315' W 042º 39.247'	Beterraba
Solo 9	S 22º 20.688' W 042º 40.013'	Salsa
Solo 10	S 22º 20.654' W 042º 40.043'	Couve-flor (colheita)
Solo 11	S 22º 20.329' W 042º 39.042'	Pousio curto (mais de um ano)

Para as amostras de solos agrícolas, foram escolhidos quatro pontos aleatórios para a amostragem e abertos quatro quadrados de 40cm em cada área e coletados apenas os primeiros 10 cm. Inicialmente, o objetivo era realizar os testes com a detecção enzimática em amostras de solo da camada arável (0-10cm), já que esta é atingida pelas aplicações de agrotóxicos e influenciadas pelo manejo físico-químico do solo.

Após homogeneização de todo o material em baldes de alumínio, retirou-se amostra composta, segundo Lemos e Santos (1984). Todas as amostras

foram armazenadas em recipientes de alumínio na ausência de luz e sem umidade.

3.2.2. Mata Primária

Para a obtenção de amostras de solo utilizadas como referência, ou seja, amostras consideradas sem contaminação por pesticidas anticolinérgicos, foram coletadas amostras de solo em área de mata primária sob vegetação densa, sem histórico de utilização antrópica e afastada de áreas de influência da deriva dos produtos aplicados (Figura 20) na mesma microbacia sob estudo.



Figura 20 – Vista geral dos pontos de coleta.

Estas amostras foram coletadas no fim do mês de agosto, por ser a época de menor aplicação de pesticidas em toda a área, incluindo as regiões vizinhas, e época de estiagem. O ponto de coleta está situado a S 22° 20.691' e W 042° 40.322' em terreno coberto por mata primária a 1098m de altitude.

Para a coleta, foram abertos três quadrados de 30cm com 50cm de profundidade (Figura 21) com auxílio de trado, separando-se a serrapilheira. Com a intenção de verificar a aplicação da metodologia de detecção enzimática de metomil em amostras de solo de diferentes profundidades, com um perfil representativo da área escolhida, utilizou-se amostras compostas desse material separadas por profundidade (a cada 10 cm), obtendo-se assim cinco amostras compostas. As amostras foram colocadas em sacos plásticos e acondicionadas em geladeira até a análise.



Figura 21 – Foto do quadrados de solo de 30cm com 50cm de profundidade.

3.3. Caracterização dos Solos

3.3.1. Caracterização do Solo

As amostras de solo foram caracterizadas nos seguintes parâmetros: granulometria, pH em água, teor de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} trocáveis, Na^+ , P assimilável, K^+ , C (orgânico), N e C/N. Estas análises foram feitas no CNPS (Centro Nacional de Pesquisa de Solos – EMBRAPA, RJ).

3.3.1.1. Composição granulométrica

A composição granulométrica foi determinada usando-se solução de NaOH 1 mol L⁻¹ a 6% como agente dispersante. As areias foram determinadas com o auxílio de peneiras, enquanto a argila total foi determinada após agitação e sedimentação da amostra pelo método do hidrômetro de Boyoucos (Embrapa, 1997). A fração silte foi calculada subtraindo-se de 100 as percentagens de argila total e areia.

3.3.1.2. Carbono orgânico

- O teor de carbono orgânico total foi determinado por oxidação da matéria orgânica com dicromato de potássio 117,6 mol L⁻¹ em meio ácido para a oxidação quantitativa de carbono. Neste método, utiliza-se um oxidante bastante forte, no caso o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), numa solução ácida para a oxidação quantitativa de carbono. A determinação da quantidade de íons Cr (III) reduzidos pode ser feita indiretamente pela titulação dos íons dicromato em excesso com íons Fe^{2+} (Embrapa, 1997).

3.3.1.3. Nitrogênio total

O teor de nitrogênio total foi determinado utilizando o método de Kjeldajhl (Embrapa, 1997). A determinação é feita por digestão com ácido sulfúrico concentrado. Após a conversão do nitrogênio em sal amoniacal, este é decomposto por NaOH a 30% e a amônia recolhida é titulada com HCl 0,01 mol L⁻¹.

3.3.1.4. pH (em água)

Determinação potenciométrica na suspensão solo/líquido 1:2,5 (v/v) e o tempo de leitura nunca inferior a 30 minutos.

3.3.1.5. Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} trocáveis

A extração foi feita com 10cm^3 de solo em solução de KCl 1 mol L^{-1} . Em uma alíquota, o Al^{+3} é determinado pela titulação da acidez com NaOH $0,025\text{ mol L}^{-1}$, utilizando azul de bromotimol como indicador. Em outra alíquota, dosou-se o Ca^{2+} e o Mg^{+2} com EDTA $0,0125\text{ mol L}^{-1}$ pelo método complexiométrico usando eriocromo como indicador.

3.3.1.6. K^+ e Na^+ extraíveis

Extraídos com mistura de solução de HCl $0,05\text{ mol.L}^{-1}$ e H_2SO_4 $0,0125\text{ mol L}^{-1}$ com determinação por fotometria de chama.

3.3.1.7. Acidez extraível (H^+ + Al^{3+})

A extração foi feita com solução de acetato de cálcio 1 N, pH 7 e titulada a acidez resultante por NaOH $0,025\text{ mol.L}^{-1}$, usando-se fenolftaleína como indicador.

3.3.1.8. H^+ extraível

Calculado com base nas determinações anteriores, subtraindo-se o valor encontrado de acidez extraível do alumínio extraível.

3.3.1.9. P assimilável

Tanto o P quanto o K^+ são extraídos com solução de HCl $0,05\text{ mol L}^{-1}$ e em ácido sulfúrico $0,05\text{ mol L}^{-1}$. O P é determinado pelo método colorimétrico com o emprego do ácido ascórbico em presença de sal de bismuto.

3.3.1.10. Cálculos

Tabela 4 – Fórmulas dos parâmetros de fertilidade: Valor de S, Valor de T, Valor de V e saturação com alumínio.

Parâmetro	Fórmula
Valor S (Bases extraíveis)	$\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{K}^{+} + \text{Na}^{+}$ extraíveis
Valor T (Capacidade de Troca de Cátions)	Soma dos valores de S, H^{+} e Al^{3+} extraíveis
Valor V (Saturação de Bases)	Calculado pela fórmula $100 \times S / T$
Saturação com Alumínio	Calculada pela fórmula $100 \times \text{Al}^{3+} / \text{Al}^{3+} + S$

3.4. Determinação de metomil nas amostras de solos

3.4.1. Ajustes das condições experimentais de extração

Para a otimização da etapa de extração dos solos, utilizou-se amostras do solo florestal fortificadas com metomil (Lannate – Du Pont).

As soluções utilizadas para as contaminações das amostras de solo foram feitas a partir da formulação comercial de LANNATE BR (Du Pont – Lote nº 134-05-9240) cuja concentração é de 215 000 mg L⁻¹.

Amostras (110 g) de solo florestal da profundidade de 0-10 cm e 40-50 cm foram contaminadas com soluções (33 mL) de LANNATE BR (Du Pont) em acetona (VETEC) na concentração de 100 mg L⁻¹ para se obter uma concentração de 30 mg Kg⁻¹ de metomil nas amostras de solo (concentração acima dos valores normalmente citados na literatura). Após a homogeneização (manual) do solo, este foi submetido a evaporação total do solvente (secura) através de fluxo de ar contínuo. A utilização de duas faixas de profundidade de camada de solo visou verificar possíveis influências na análise.

Nas amostras de controle, adicionou-se apenas 60 mL de acetona (VETEC) sem a solução de Lannate.

3.4.2. Escolha do solvente de extração

A extração foi realizada segundo método EPA 8318, com modificações, para extração de n-metilcarbamatos em solos. Um volume de 25 mL de solvente foi adicionado a 10 g do solo florestal fortificado com a solução de Lannate. A extração foi feita por agitação mecânica inicialmente com 1 alíquota de 25 mL e, na sequência, mais duas etapas de agitação com 10 mL cada, por um período total de cinco horas. O sobrenadante foi recolhido em frascos de plástico (tipo Falcon) de 50 mL. Intercalado a todas as três etapas de extração, o sobrenadante foi submetido à centrifugação por dez minutos para posterior filtração. O material que decantou nos tubos, após a centrifugação, foi ressuspenso em acetona e readicionado à amostra para a nova etapa de extração. O extrato resultante foi levado a um volume conhecido e submetido a posterior análise.

O método EPA 8318 recomenda o uso de acetonitrila, outros autores sugerem o uso de metanol ou acetona. Assim, estes foram os três solventes testados para a extração de metomil nos solos em estudo. Destes, a acetonitrila e o metanol não foram adequados para a extração de metomil nas amostras de solo. O primeiro pela evaporação lenta na etapa de pré-concentração dos extratos e o segundo por dificuldades na separação do extrato da fração mineral do solo por centrifugação. Por isso, a acetona foi o solvente escolhido para este estudo. Cada teste de extração foi realizado utilizando-se dez replicatas.

O uso da acetona como solvente apresenta algumas vantagens como a adequada solubilidade do metomil (73 g/100 g de solvente), miscibilidade em água e baixo custo. Além disso, é usada para extração de diversos pesticidas em alimentos e solos, metilcarbamatos e organofosforados, com eficiência superior a 80% de recuperação (Jones e colaboradores, 1989).

O procedimento de extração foi otimizado tanto para a natureza do solvente a ser usado quanto para o volume deste. Os ensaios foram realizados seguindo os volumes de solventes recomendado pelo método EPA descritos anteriormente e com modificações. As modificações serão aqui descritas como método EPA modificado 1, onde foram realizadas três etapas de extração com volumes de solvente de 20 mL, 15 mL e 10 mL, respectivamente, e método EPA modificado 2, onde foram realizadas três etapas de extração com volumes de solvente de 15 mL.

3.5. Detecção por inibição da Acetilcolinesterase (AChE)

A extração da acetilcolinesterase é feita a partir de ratos da linhagem Wistar (200 g) que foram anestesiados com éter e sacrificados para a remoção dos cérebros (Moura, 1998). A preparação final tem a propriedade de ativação de pesticidas tionofosforados (Cunha Bastos et al., 1991; Lima et al., 1996).

Alíquotas do extrato foram evaporadas a secura em tubos de ensaio e em seguida ressuspensas em 12 μL de solução de proteínas totais (2 mg mL^{-1}) contendo acetilcolinesterase e 68 μL de solução tampão de fosfato de sódio 0,2 mol L^{-1} . A solução resultante foi incubada e colocada em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. A seguir, foram adicionados à solução 160 μL do reativo de cor, ácido ditio-bis-nitrobenzóico (DTNB) na concentração de 1 mmol L^{-1} e 80 μL de solução de acetiltiocolina (Merck) de 1,25 mmol L^{-1} para iniciar a reação de quebra/degradação da molécula de acetiltiocolina. Considerando o valor de K_m da acetilcolinesterase para a acetilcolina variando entre $0,92 \times 10^{-4}$ e $6,3 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} (Main, 1976 citado por Bastos e colaboradores, 1991), o volume da alíquota utilizada foi suficiente para atingir as condições de saturação ao longo de todo o experimento/tempo de leitura de sua atividade.

A solução de incubação foi, então, imediatamente transferida para microplaca de plástico com 96 poços (marca TPP) e as medições foram realizadas utilizando um leitor de ELISA (Vítor R³ – PERKIN ELMER) em filtro de 405 nm (com extensão a 415 nm) durante três minutos, como mostrado na Figura 22.



Figura 22 – Foto da microplaca com as incubações enzimáticas com adição de substrato e reativo de cor.

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi determinada pela variação da absorvância por minuto em cada amostra incubada. A atividade máxima da

AChE (sem inibição) foi determinada por incubações sem a presença de Lannate, somente a AChE em tampão de fosfato de sódio sob as mesmas condições de pH e temperatura das demais amostras.

A quantificação do carbamato metomil (Lannate- Du Pont) foi feita a partir da porcentagem de inibição da AChE calculada em cada incubação e interpolada a respectiva curva de inibição enzimática.

3.5.1. Curva de Inibição da Acetilcolinesterase (AChE) por Lannate (Du Pont)

As curvas analíticas foram feitas utilizando alíquotas de volumes distintos de uma solução estoque de Lannate em acetona p.a. VETEC (1 mg L^{-1}) que foi colocada em tubos de ensaio para posterior evaporação em fluxo de ar até a secagem.

Para a otimização do método foram feitas curvas de calibração utilizando diferentes faixas de concentração, sendo a melhor curva analítica obtida na faixa de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ a 1 mg L^{-1} . Em seguida, procedeu-se a rotina de incubação com a AChE como já descrito.

3.6. Variação da concentração do analito (metomil) nas amostras de solos

Com a intenção de verificar a faixa de abrangência de aplicação da metodologia em relação à concentração do analito, utilizaram-se amostras de solo florestal de 40-50cm de profundidade, em diferentes concentrações de fortificação com metomil: 30 mg Kg^{-1} , 15 mg Kg^{-1} e $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$.

Como já descrito, os testes nos experimentos iniciais utilizaram a concentração de 30 mg Kg^{-1} , acima dos valores normalmente citados na literatura. A escolha das outras duas concentrações foi baseada no trabalho de Prado-Rosales (2002), que utilizaram concentrações de 10 mg Kg^{-1} e em estimativas dos valores obtidos em testes preliminares em nosso laboratório para os solos da região.

As amostras foram submetidas à extração e quantificação como descrito nos itens anteriores.

As análises foram realizadas utilizando três replicatas de cada amostra.

3.7. Análise das amostras de solos agrícolas

A metodologia otimizada foi utilizada para a análise das amostras de solo agrícola da região de Nova Friburgo, RJ.

As amostras de solos foram analisadas sem e com fortificação com solução de Lannate (Du Pont) em acetona p.a. (Vetec). As análises das amostras sem fortificação foram realizadas em duplicata e as análises das amostras fortificadas foram realizadas em triplicata.

As amostras de solos foram fortificadas para obtenção de uma concentração final de 1 mg Kg^{-1} , com base no trabalho de Caballo-Lopez e Castro (2003) para metilcarbamatos em solos. Massas de 40 g de solo foram homogeneizadas com 20 mL de solução de Lannate BR (Du Pont) 2 mg L^{-1} em acetona p.a. (Vetec). Após o período estabelecido de uma hora para a adsorção do pesticida à matriz, o solvente foi evaporado completamente com fluxo de ar contínuo e retiradas três sub-amostras de 10 g cada para posterior extração de metomil. Posteriormente, os extratos de solo foram evaporados ao volume final de 2 mL e a detecção do carbamato feita a partir da incubação de 24 μL do extrato seco com a acetilcolinesterase em tampão fosfato pH= 7.5.

3.8. Teste de armazenamento e conservação das amostras

A fim de estudar a preservação e o armazenamento das amostras em relação a determinação de metomil, foram realizadas análises das amostras armazenadas em três diferentes temperaturas (4°C , 20°C e -15°C) e em períodos de 24 horas e sete dias.

Os testes foram realizados utilizando amostras das duas áreas de coleta, da mata primária e da área agrícola, ambas fortificadas com concentração final de 1 mg Kg^{-1} de metomil. Todos os testes foram realizados em triplicata. Após a secagem das amostras de solo, estas foram divididas e armazenadas em recipientes de alumínio fechado sob as três temperaturas em estudo: 20°C , 4°C e -15°C .

Foram retiradas alíquotas de 10 g das amostras armazenadas em cada temperatura e submetidas a procedimento de extração e detecção já descritos nos intervalos de 24 horas e sete dias após a primeira determinação antes do acondicionamento.

A detecção de metomil nas amostras foi feita a partir de alíquota do extrato de solo seco e ressuspenso em solução tampão fosfato pH= 7.5 com a acetilcolinesterase durante 30 minutos.